

学 位 論 文 題 名

Molecular Biological Analysis of Mechanisms Involved in the Signal Transduction and in the Translational Activation of mRNAs in Amphibian Oocyte Maturation

(両生類卵成熟過程でのシグナル伝達系および
mRNA の翻訳に関する分子生物学的研究)

学位論文内容の要旨

ヒトを含む多くの脊椎動物では、減数分裂の第一前期で停止した卵母細胞(未成熟卵)が、ホルモン刺激により減数分裂を再開することで受精可能な卵(成熟卵)ができる。この過程は卵成熟と呼ばれ、卵母細胞中で卵成熟促進因子(MPF)が形成されることで引き起こされる。MPF はサイクリン B と Cdc2 からなる複合体である。未成熟卵中で、サイクリン B は翻訳抑制された mRNA として存在しており、ホルモン刺激によりタンパク質が翻訳される。新規に合成されたサイクリン B タンパク質は、未成熟卵中ですでにタンパク質として存在する Cdc2 と結合し、MPF が形成される。しかし、ホルモン受容から MPF の形成に至るシグナル伝達系およびサイクリン B 翻訳制御については、未だに不明の点が多い。

アフリカツメガエルは一年中未成熟卵を採取することが出来るため、卵成熟研究に一般的に用いられている。しかし、その未成熟卵は、ほとんどの脊椎動物が持たない不活性型の MPF(pre-MPF)を持ち、これが活性化することで卵成熟が引き起こされる。つまり、ツメガエルは脊椎動物では例外的な卵成熟誘起機構を採用しており、脊椎動物の卵成熟におけるシグナル伝達系の一般的な機構の解析には適さない。そこで第一章では、pre-MPF を持たないアカガエル卵母細胞を用いて解析を行った。

著者はツメガエル卵成熟に関わるとされる、ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ (PI3K)、プロテインキナーゼ B(PKB)、グリコーゲン合成酵素キナーゼ 3 β (GSK3 β)が、アカガエル卵成熟で機能しているかを調べた。PI3K の阻害剤は卵成熟を阻害し、かつ、その効果は卵成熟過程の初期に限られることが明らかとなった。一方、PKB 阻害剤は卵成熟に影響せず、恒常的に活性を持つ PKB あるいは GSK3 β の強制発現も卵成熟への影響は全く見られなかった。以上の結果から、PI3K はサイクリン B の翻訳の上流に位置するが、PKB および GSK3 β は pre-MPF を持つツメガエルの卵成熟のみに関わると考えられる。

ツメガエルを用いた研究から、サイクリン B1 mRNA の翻訳制御は、ポリ A 鎖伸長を伴う細胞質ポリアデニル化を介して行われ、それには複数のタンパク質が関わるということがわか

っている。その中で中心的な役割を果たすのは細胞質ポリアデニル化因子結合タンパク質 (CPEB)であり、そのリン酸化が引き金となって翻訳が起こるとされている。しかし、卵成熟過程ではサイクリン B1 mRNA 以外にも複数の mRNA が細胞質ポリアデニル化により翻訳制御されており、それら mRNA の翻訳時期はそれぞれに異なる。したがって、各 mRNA の翻訳開始のタイミングを決定する機構が存在するはずであるが、その詳細は全く不明である。過去の研究において、サイクリン B1 mRNA に特異的に結合するタンパク質として Pumilio1 (Pum1)が同定され、これによるサイクリン B1 mRNA の翻訳制御が示唆された。また、ツメガエル卵母細胞中には Pum1 と同じタンパクファミリーに属する Pumilio2 (Pum2) も存在していることが判っている。しかし、Pum1 と Pum2 の機能に関する研究は未だ十分にはなされておらず、実際、これらの機能の違いは不明である。そこで第二章では、ツメガエル卵母細胞を材料に、mRNA の時期特異的な翻訳開始を制御するタンパク質として Pum1 と Pum2 に着目し、これらの機能を明らかにすることを目的として研究を行った。

その結果、両タンパク質とも、1) 未成熟卵中で、CPEB を含めた細胞質ポリアデニル化に関与するタンパク質群と複合体を形成する、2) 卵成熟過程でリン酸化された後、CPEB と解離する、3) 抗体注射により機能を阻害すると、卵成熟過程でサイクリン B1 の合成が早まり、卵成熟が促進することがわかった。また、卵成熟過程を通じて Pum1 とサイクリン B1 mRNA の結合は維持されるが、CPEB は mRNA から解離するという結果も得られた。これらのことから、1)Pumilio は標的 mRNA の翻訳開始に必要な CPEB のリン酸化を抑えている。2)Pumilio がリン酸化されると、CPEB のリン酸化が可能になる。3)リン酸化された CPEB は mRNA から解離することで標的 mRNA の翻訳が可能となると考えられる。さらに、リン酸化と CPEB からの解離のタイミングは Pum2 の方が早く起こり、標的 mRNA も両者で異なることも明らかになった。以上のことから、Pum1 と Pum2 は、細胞質ポリアデニル化を介してそれぞれに特異的な mRNA の翻訳開始のタイミングを決めており、Pum2 の標的 mRNA は Pum1 の標的であるサイクリン B1 mRNA の上流に存在すると考えられる。

ツメガエル卵母細胞では、Mos が新規合成され、p42 MAP キナーゼが活性化される、Mos-MAP キナーゼ経路により卵成熟が誘起されることがわかっている。また他の MAP キナーゼファミリータンパク質である、c-Jun N-terminal キナーゼ、p38 γ キナーゼも卵成熟への関与が示唆されている。したがって、ツメガエル卵成熟の様々な過程において、MAP キナーゼタンパク質ファミリーは必要とされと考えられる。しかし、上記以外の MAP キナーゼファミリータンパク質については十分に解析がなされていない。

第三章では MAP キナーゼ様のタンパク質の一つである Nemo-like キナーゼ(NLK)に着目し、そのツメガエル卵成熟過程への関与を調べた。その結果、1) NLK は卵成熟過程を通して一定の発現が見られるが、未成熟卵中では活性を持たず、卵成熟過程の初期に活性化する、2) NLK の活性化には Mos タンパク質が必要であるが、MAP キナーゼの活性化は必要ではない、3) NLK の強制発現によりサイクリン B1 mRNA のポリ A 鎖伸長および翻訳を促進し、卵成熟を促進する、4) NLK は直接 Pum1、Pum2、CPEB をリン酸化することが明らかとなった。これらのことから、ツメガエル卵成熟過程では Mos-MAP キナーゼ経路とは別

に、Mos-NLK 経路が存在し、NLK は Pum1、Pum2、CPEB のリン酸化を介して、サイクリン B1 mRNA を含む mRNA の翻訳を制御に関わると考えられる。

学位論文審査の要旨

主査	教授	山下	正兼
副査	教授	高橋	孝行
副査	准教授	勝	義直
副査	准教授	木村	敦

学位論文題名

Molecular Biological Analysis of Mechanisms Involved in the Signal Transduction and in the Translational Activation of mRNAs in Amphibian Oocyte Maturation

(両生類卵成熟過程でのシグナル伝達系および mRNA の翻訳に関する分子生物学的研究)

多くの脊椎動物では、減数分裂の第一前期で停止した卵母細胞が、ホルモン刺激により減数分裂を再開することで受精可能な卵が作られる。この過程は卵成熟と呼ばれ、卵母細胞内で卵成熟促進因子(MPF)が形成されることで誘起される。MPFはサイクリンBとCdc2からなる複合体で、未成熟卵にはサイクリンBは翻訳抑制されたmRNAとして存在し、ホルモン刺激によりタンパク質が翻訳される。合成されたサイクリンBタンパク質は未成熟卵にすでに存在するCdc2タンパク質と結合してMPFを形成する。しかし、ホルモン受容からMPF形成に至るシグナル伝達系およびサイクリンB翻訳制御については、未だに不明の点が多い。

アフリカツメガエルは卵成熟研究に一般的に用いられているが、その未成熟卵は、ほとんどの脊椎動物が持たない不活性型MPF(pre-MPF)を持ち、その活性化により卵成熟が誘起される。著者は第一章において、pre-MPFのないアカガエル卵母細胞を用い、ツメガエル卵成熟に関わるとされるホスファチジルイノシトール3キナーゼ(PI3K)、プロテインキナーゼB(PKB)、グリコーゲン合成酵素キナーゼ 3β (GSK3 β)がアカガエル卵成熟で機能しているかを調べた。PI3Kの阻害剤は卵成熟を阻害し、その効果は卵成熟過程の初期に限られた。一方、PKB阻害剤や恒常的に活性を持つPKBあるいはGSK3 β の強制発現は卵成熟に影響を与えなかった。以上の結果から、PI3KはサイクリンB翻訳の上流に位置するが、PKBおよびGSK3 β はpre-MPFを持つツメガエルの卵成熟のみに関わると考えられる。

サイクリンB1 mRNAの翻訳制御は細胞質ポリアデニル化を介して行われ、それには細胞質ポリアデニル化因子結合タンパク質(CPEB)が主要な役割を果たす。しかし、卵成熟過程ではサイクリンB1以外にも複数のmRNAが細胞質ポリアデニル化により翻訳制御されており、またそれらの翻訳時期は異なる。したがって、各mRNAの翻訳開始のタイミングを決める機構が存在するはずであるが、その詳細は全く不明である。過去の研究でPumilio1(Pum1)がサイクリンB1 mRNAの翻訳を制御することが示唆された。また、ツメガエル卵母細胞にはPum1に類似のPumilio2(Pum2)も存在することが知られている。しかし、Pum1とPum2の機能の違いは不明である。そこで第二章では、ツメガエル卵母細胞を材料に、mRNAの時期特異的

な翻訳開始を制御するタンパク質として Pum1 と Pum2 に着目し、これらの機能を明らかにする研究を行った。

その結果、Pum1、Pum2 とともに以下のことが判った。1) 未成熟卵中で CPEB を含めた細胞質ポリアデニル化に関与するタンパク質群と複合体を形成している。2) 卵成熟過程でリン酸化された後、CPEB と解離する。3) 抗体注射により機能を阻害すると、卵成熟過程でサイクリン B1 の合成が早まり、卵成熟が促進する。以上のことから、Pumilio がリン酸化されると CPEB がリン酸化され、リン酸化 CPEB が mRNA から解離することで標的 mRNA の翻訳が可能となると考えられる。さらに、リン酸化と CPEB の解離のタイミングは Pum1 より Pum2 の方が早く起こり、標的 mRNA も両者で異なることから、Pum1 と Pum2 は細胞質ポリアデニル化を介してそれぞれに特異的な mRNA の翻訳を制御していると考えられる。

ツメガエル卵成熟は Mos-MAP キナーゼ経路によりが誘起される。また他の MAP キナーゼの関与も示唆されているが、十分に解析されていない。第三章では MAP キナーゼ様タンパク質である Nemo-like キナーゼ (NLK) のツメガエル卵成熟過程への関与を調べた。その結果、以下のことが明らかになった。1) NLK は卵成熟過程の初期に活性化する。2) それには Mos が必要だが、MAP キナーゼは必要ではない。3) NLK の強制発現はサイクリン B1 mRNA のポリ A 鎖伸長と翻訳を促進し、卵成熟を促進する。4) NLK は Pum1、Pum2、CPEB をリン酸化する。これらの結果は、ツメガエル卵成熟過程では Mos-MAP キナーゼ経路とは別に Mos-NLK 経路が存在し、NLK は Pum1、Pum2、CPEB のリン酸化を介してサイクリン B1 を含む mRNA の翻訳を制御することを示唆する。

以上を要するに、著者はアカガエルとアフリカツメガエルを用い、両生類卵成熟における情報伝達機構と卵母細胞に蓄積された mRNA の翻訳開始機構を分子生物学的解析により明らかにした。これらの成果は生命科学分野における基本原理の理解に貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。