

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：12608
 研究種目：特定領域研究
 研究期間：2007～2011
 課題番号：19057003
 研究課題名（和文） 卵細胞における細胞周期の開始機構

研究課題名（英文） Cell Cycle Start in Eggs

研究代表者

岸本 健雄（KISHIMOTO TAKEO）
 東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授
 研究者番号：00124222

研究成果の概要（和文）：卵細胞は、受精するまでは細胞周期の進行を停止させ、受精するときの停止を解除して初期胚細胞周期を開始する。この細胞周期の停止と解除をもたらす分子機構の解明を目指した。その結果、停止のための二重ロック・システム、停止時の DNA 複製装置の状態等が判明し、種々の動物卵に普遍的な停止のメカニズムを提唱した。それとともに、停止解除のためのタンパク質脱リン酸化酵素の必要性が、新たに見出された。

研究成果の概要（英文）：Unfertilized mature eggs are arrested at a particular stage of the cell cycle, and fertilization releases the arrest to initiate embryonic cell cycle. Here we investigated molecular mechanisms underlying this cell cycle arrest and release. We found the dual lock for the arrest and the state of DNA replication machinery, and proposed the arrest mechanism common to metazoan eggs. We further found requirement of protein phosphatases for release of the cell cycle arrest after fertilization.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-------------|------|-------------|
| 2007年度 | 41,100,000 | 0 | 41,100,000 |
| 2008年度 | 36,900,000 | 0 | 36,900,000 |
| 2009年度 | 44,900,000 | 0 | 44,900,000 |
| 2010年度 | 44,400,000 | 0 | 44,400,000 |
| 2011年度 | 36,400,000 | 0 | 36,400,000 |
| 総計 | 203,700,000 | 0 | 203,700,000 |

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞周期、卵細胞、受精、細胞死、Mos-MAPK-Rsk、サイクリン-CDK、カスパーゼ

1. 研究開始当初の背景

有性生殖を行う多細胞生物にあっては、卵細胞は精子が侵入することによって胚発生を開始する。こうした受精による胚発生の開始は、S期の開始とその後のM期への移行に続く細胞周期の継続的進行、およびそれらと並行しておこる雌雄両前核の融合 総じて、

初期胚細胞周期の開始 として見られる。これは生物学上の古典的命題の一つといえるが、それをもたらす分子機構は依然として不明であった。しかし、近年における細胞周期制御の基本原理の確立は、受精による初期胚細胞周期開始の分子機構について、解明の手掛かりをもたらしつつあった。

他方、卵細胞は、受精しない場合は最終的には細胞死に至ることが従来から知られているが、その分子機構は不明であった。しかし、近年の細胞死研究の飛躍的進展は、未受精卵において細胞死が誘起される分子機構を解明する手掛かりも提供していた。

そこで本研究計画では、受精による初期胚細胞周期開始と細胞死回避の分子機構をあわせて究明しようとした。これにより、受精による卵細胞の起死回生の全容を判明させ、胚発生の開始機構を解明する突破口を開くことを目論んだ。

2. 研究の目的

研究代表者らは、これまで、卵細胞型細胞周期の特異性を制御する分子機構を解明してきた。その到達したところは、受精するまでは胚発生を開始しないように卵細胞に待機させるシステムが存在しているという概観である。具体的には、Mos (MAPKKK)-MEK (MAPKK)-MAPK (MAP kinase)-Rsk (p90 ribosomal S6 kinase) 経路が初期胚細胞周期の開始に対しては抑制的に、細胞死に対しては促進的に機能しており、この経路の解除だけで、細胞周期が再開して胚発生を開始するとともに細胞死が回避されることを見出していた。

そこで、本研究計画では、受精前は Mos-MEK-MAPK-Rsk 経路の下流において細胞周期の停止が如何にしてもたらされているのか；受精によってこの経路がどのようにして遮断されるのか；それによって如何にして細胞周期が再開するのか；他方、この経路が維持される場合、如何にして細胞死がもたらされるのか、を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 実験系としては、研究代表者及び分担者が従来から活用しているヒトデ卵を主材料とし、カエル卵を併用した。

(2) 受精による細胞周期の再開に際しては、S期の開始、その後のM期への進行、雌雄両前核の融合が見られ、他方、未受精の場合は一定時間後に細胞死が起こる。これら4つのイベントは互いに独立して起こりえるため、それぞれに至る別個のシグナル伝達経路が想定される。そこで Mos-MEK-MAPK-Rsk 経路の途中あるいは下流から、どのように経路が分岐し最終標的に至るのかを解析した。典型的には、候補タンパク質の cDNA クロン化、その抗体の作製、抗体を用いた解析が、研究アプローチ法である。

(3) 本計画のうち、細胞周期の停止と再開および核融合については研究代表者(岸本)が、細胞死については研究分担者(千葉)が、研究を実施した。

4. 研究成果

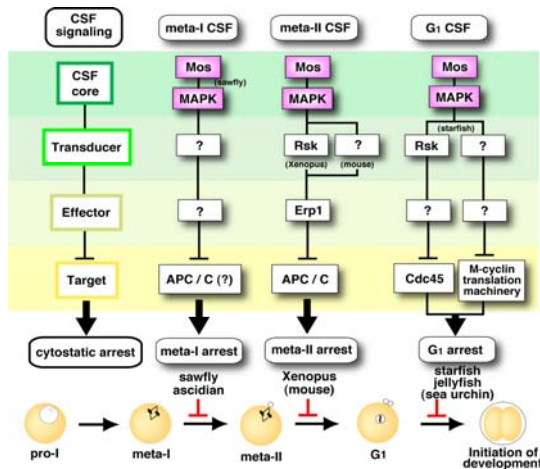
(1) ヒトデ成熟未受精卵は、減数分裂完了後のG1期に停止して受精を待つ。この停止は、Mos-MEK-MAPKの直下での「dual lock(二重ロック)」 Rsk (p90 ribosomal S6 kinase) を介した経路によるS期への移行抑制と、Rskを介さない経路によるM期への移行抑制によって実現されることを見出した(下図)。これは、DNA複製チェックポイントが非機能的な系におけるG1期制御システムを初めて明らかにするものである。



(2) 上記(1)について、S期抑制は、RskがCdc45(DNA polymeraseの積載因子)の染色体積載を抑制することによる；M期抑制は、MAPKがcyclin Aとcyclin Bのタンパク質合成を、poly(A)鎖の伸長非依存的に抑制することによると判明した(上図)。これは、G1期に停止した未受精卵(典型的にはウニ卵)におけるDNA複製装置の状態を、pre-RC(pre-replicative complex)の段階は越えているが、pre-IC(pre-initiation complex)の段階には至っていない状況にあると、全動物卵を通じて初めて明らかにしたものである。

(3) 動物卵は普遍的に受精を待つために減数分裂期中で細胞周期を停止させるが、この停止が起こる時期は、動物種によって異なる。典型的には、ヒトデやウニ、クラゲではG1期、カエルなどのほとんどの脊椎動物では減数第二分裂中期(meta-II)、ホヤや多くの昆虫では減数第一分裂中期(meta-I)といった具合である。上記(1)(2)のヒトデの場合と、クラゲ、カエル、マウス、ホヤ、ハチの場合等を比較することから、受精を待たための細胞周期停止(CSF停止；cytostatic factor arrest)を普遍化した。すなわち、CSFシステムは共通してMos-MEK-MAPK経路を活用し

ており、その下流で動物種に応じたシグナル伝達の rewiring が起こって特異的な停止が実現する、という概念を提唱している(下図)。



(4) ヒトデ受精卵においては、G 1 期から S 期の間に、雌雄両前核の接近と融合がおこる。こうした核融合は、細胞周期の進行を必要としないが、間期に起こるにもかかわらず M 期に機能するサイクリン B -Cdk1 の低レベルの活性を必要とし、それは精子星状体の形成のためであることを見出した。これは核融合の制御について全く新たな視点を切り開くとともに、M 期 Cdk の間期における役割を初めて明らかにするものである。

(5) カエル成熟未受精卵は減数第二分裂中期に停止して受精を待つ。この停止の解除には、従来いわれていた CaMKII だけでなく、カルシニューリン (CaN) も必要であることを明らかにした。これは、CaN の新規機能の発見でもある。

(6) ヒトデ成熟未受精卵の G 1 期停止は Mos-MEK-MAPK-Rsk 経路に依存しており、この停止中、Mos のタンパク量は見かけ上、一定である。ところが実際には、Mos はダイナミックに合成と、プロテアソーム依存性の分解を繰り返しており、それらが釣り合うことによって一定量を維持していると判明した。

(7) ヒトデ成熟未受精卵は、受精すると Mos タンパクが消失するとともに MAPK が不活性化して、G 1 期停止を解除する。ところが実際には、Mos のタンパク消失とは独立に、しかも Mos のキナーゼ活性が高いままでも、受精によって MEK の phosphatase が活性化し、それによっても MAPK 経路が不活性化すると判明した。さらに、受精による Mos タンパクの

消失は、プロテアソーム非依存性のタンパク分解と、タンパク合成停止の両方に依存すると判明した。

これまで、Mos のタンパク分解は MAPK 経路の不活性化に必須と考えられていた。ところが、上記の発見は、MEK phosphatase の受精による活性化と、それによる MAPK 経路の遮断という、全く新規の局面を切り開くものである。胚発生開始のための受精による MAPK 経路の遮断は、複数のシステムにより保証されているといえる。

(8) ヒトデ成熟卵は、受精が起こらない場合、減数分裂完了後 8 時間で同調的なアポトーシスを起こして死滅する。このヒトデ未受精卵アポトーシスの実行因子であるカスパーゼを同定し、それが哺乳類で知られているカスパーゼ 9 (initiator caspase) と 3 (effector caspase) の両方の特性を持つことから、カスパーゼ 3/9 と命名した。

(9) ヒトデ成熟未受精卵では、アポトーシスが始まるまでは、MAPK の下流で Rsk が Na⁺/H⁺ Exchanger をリン酸化して活性化することで卵細胞内 pH を上昇させ、アポトーシスを抑制している；ところが、アポトーシス直前には MAPK が不活性化し、pH が低下することでアポトーシスが促進される、と判明した。この時、ヒトデ・プロカスパーゼは、カスパーゼ 3/9 N 末の CARD 構造に依存して自己限定分解し、高いカスパーゼ 3 様活性を獲得して、アポトーシスを誘導した。

卵成熟分裂の進行は発生開始に必須であるが、それと同時に死のプログラムも駆動し、受精がそのプログラムを解除するといえる。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 20 件、全て査読有)

Hiraoka, D., Okumura, E., and Kishimoto, T. (2011). Turn motif phosphorylation negatively regulates activation loop phosphorylation in Akt. *Oncogene*, 30, 4487-4497.

Chiba, K. (2011). Evolution of the acquisition of fertilization competence and polyspermy blocks during meiotic maturation. *Mol. Reprod. Dev.*, 78, 808-813.

Tachibana, K., Mori, M., Matsuhira, T., Karino, T., Inagaki, T., Nagayama, A.,

Nishiyama, A., Hara, M., and Kishimoto, T. (2010). Initiation of DNA replication after fertilization is regulated by p90Rsk at pre-RC/pre-IC transition in starfish eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 5006-5011.

Harada, K., Fukuda, E., Hirohashi, N., and Chiba, K. (2010). Regulation of intracellular pH by p90Rsk-dependent activation of an Na⁺/H⁺ exchanger in starfish oocytes. *J. Biol. Chem.*, 285, 24044-24054.

Hara, M., Mori, M., Wada, T., Tachibana, K., and Kishimoto, T. (2009). Start of the embryonic cell cycle is dually locked in unfertilized starfish eggs. *Development*, 136, 1687-1696.

Tachibana, K., Hara, M., Hattori, Y., and Kishimoto, T. (2008). Cyclin B-Cdk1 controls pronuclear union in interphase. *Curr. Biol.*, 18, 1308-1313.

Hirohashi, N., Harada, K., and Chiba, K. (2008). Hormone-induced cortical maturation ensures the slow block to polyspermy and does not couple with meiotic maturation in starfish. *Dev. Biol.*, 318, 194-202.

Nishiyama, T., Yoshizaki, N., Kishimoto, T. and Ohsumi, K. (2007). Transient activation of calcineurin is essential to initiate embryonic development in *Xenopus laevis*. *Nature*, 449, 341-345.

[学会発表](計90件)

Kishimoto, T. Cooperation of Greatwall kinase with cyclin B-Cdk1 in starfish oocytes. The 6th UK-Japan Cell Cycle Workshop, Ambleside, UK, 2011 / 4 / 9-12.

Kishimoto, T. The Cell Cycle Control: Lessons from Starfish Oocytes (Keynote Lecture). Czech-Japan Jpoint Symposium "Animal Reproduction: From Gametes to Stem Cells", Liblice, Czech Republic, 2010 / 9 / 20-21.

Chiba, K. M1 arrest of starfish oocytes. FHL International Symposium "Mechanisms of Egg Maturation and Fertilization: From Sea to Land", Friday Harbor Laboratories, USA, 2010 / 9 / 10-12.

Kishimoto, T. Dual lock for cell cycle arrest in unfertilized mature starfish eggs. Les Treilles Conference "Meiotic Division in Oocytes", Les Treilles,

France, 2009 / 6 / 22-27.

Kishimoto, T. Revisit to MPF. Jacques Monod Conference "The cell cycle and genomic instability", Roscoff, France, 2008 / 4 / 26-30.

Kishimoto, T. Cell cycle start after fertilization. EMBO Workshop "Molecular Mechanisms of Cell Cycle Control in Normal and Malignant Cells": XIV European Cell Cycle Conference, Spetses, Greece, 2007 / 10 / 5-8.

[図書](計5件)

立花和則、岸本健雄. c-Mosによる卵子染色体半数化と単為発生の抑制。「卵子学」(森崇英編) pp. 312-328 (2011)、京都大学出版会。

Nishiyama, T., Tachibana, K., and Kishimoto, T. Cytostatic arrest: Post-ovulation arrest until fertilization in metazoan oocytes. In "Oogenesis: The Universal Process" (ed. Verlhac, M.H.), Chapter 14, pp.357-384 (2010), Wiley-Blackwell, UK.

佐方功幸・稲垣昌樹・岸本健雄(編集)。「細胞周期フロンティア」, p.252 (2010)、共立出版。

岸本健雄(監修)。細胞工学(1月号)特集「細胞周期研究の新たなステージ」, pp.1-58 (2009)、秀潤社。

[産業財産権]

該当無し

[その他]

ホームページ等

特定領域「細胞増殖制御」ホームページ
<http://www.cellprolif.bio.titech.ac.jp/>
東工大 岸本・立花研究室ホームページ
<http://www.cell-dev.bio.titech.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

岸本 健雄 (KISHIMOTO TAKEO)
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授
研究者番号: 00124222

(2)研究分担者

千葉 和義 (CHIBA KAZUYOSHI)
お茶の水女子大学・理学部・教授
研究者番号: 70222130