

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 10 日現在

機関番号：12611

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14504

研究課題名(和文) 卵成熟誘起ホルモン受容体の同定

研究課題名(英文) Identification of receptor for maturation-inducing hormone

研究代表者

岸本 健雄 (Kishimoto, Takeo)

お茶の水女子大学・サイエンス&エデュケーションセンター・客員教授

研究者番号：00124222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：卵成熟は、有性生殖をおこなう動物の発生にとって必須の前提である。この卵成熟を誘起するホルモンの卵表受容体を、全動物卵を通じて初めて同定することを目指した。実際にはヒトデ卵を用い、その卵成熟誘起ホルモンの結合タンパク質を同定して、卵表受容体の分子実体に迫ることを企図した。その結果、ヒトデ卵成熟誘起ホルモン結合タンパク質複合体を同定したが、それが実際に卵成熟誘起のシグナル伝達に関わっているのかの証明は今後の課題となった。

研究成果の概要(英文)：Oocyte maturation is a prerequisite for embryonic development after fertilization, whereas a putative oocyte surface receptor of maturation-inducing hormone has long been a major missing link. Here, we intended to identify the surface receptor in starfish oocytes through isolation of maturation-inducing hormone-binding protein. At present, we isolated and identified the protein complex that binds to starfish maturation-inducing hormone. However, it remains unclear whether the complex is actually involved in hormonal signaling that leads to oocyte maturation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：卵成熟 ホルモン受容体 ヒトデ卵

1. 研究開始当初の背景

(1) 動物の卵母細胞では、細胞周期は減数第一分裂の前期に停止している。こうした未成熟卵の細胞周期停止は、通常、卵成熟誘起ホルモンが解除する。それにより減数分裂が再開して卵成熟が起こり、卵細胞の分化が完成するとともに、その後に受精した場合は胚発生を開始する。しかし、卵成熟誘起ホルモンの受容体は、卵表に存在すると想定されて久しいが、未だいかなる動物種においても決定的な同定には至っていない。これまでにカエル卵と魚類卵で追究され、一時は同定に成功したかのようであったが、振り出しに戻っている。そのため、この受容体の分子実体は、卵成熟誘起機構における最大かつ長年の missing link となっている。

(2) 研究代表者らは、これまでヒトデ卵を用いて、卵成熟誘起ホルモンから卵減数分裂再開に至るシグナル伝達経路の全容の解明を進めてきた。その成果は、この経路の解析としては、全動物卵を通じて最先端をいくものとなっている。ヒトデの卵成熟誘起ホルモンは 1-methyladenine (1-MeAde) であるが、これは金谷晴夫らによって 1969 年に全動物を通じて最初に同定された卵成熟誘起ホルモンである。それ以来、ヒトデ卵は、卵成熟誘起機構解析のモデル系の一つとなっている。これまでに、1-MeAde は卵外から卵表に作用する；1-MeAde に結合する分画が卵表に存在する；卵表に想定される 1-MeAde 受容体は GPCR (G-protein coupled receptor) である；その直下では PI3 キナーゼ (PI3K) が活性化される等々が示唆されている。しかし、これまで 1-MeAde 受容体を同定する試みが種々、他の研究室でなされたものの、全て不調に終わって今日に至っている。

2. 研究の目的

(1) ヒトデ卵を用いて、その卵成熟誘起ホルモンである 1-MeAde の卵表受容体の分子実体を明らかにすることが目的である。これにより、全動物卵を通じて卵成熟誘起ホルモンの卵表受容体を初めて確定させ、その本格的解析の突破口を開くことを目指した。

(2) 具体的には、研究代表者らは近年、1-MeAde アフィニティービーズを用いて、1-MeAde 受容体に関する予備的研究を蓄積してきた。それにより、「1-MeAde 受容体は、Rendezvin 複合体 (Rdz) と GRL101 様タンパク質 (GRL) から構成される」という作業仮説を得ているので、本研究では、この仮説の確証を企図した。

3. 研究の方法

1-MeAde 結合タンパク質をまず単離・同定し、それを手掛かりとして、卵成熟誘起に関わる 1-MeAde 受容体の分子実体にせまる方針をとった。そのために、まず、1-MeAde 誘導体 (卵成熟誘起活性を持つ) を化学合成し、それを Ferrite-GMA (FG) ナノビーズに共有結合させて、1-MeAde 固定化 FG ビーズを作製した (半田宏、和田忠士両博士との共同研究)。次に、ヒトデ未成熟卵から卵表層 (cortex) を単離し、それを Triton X-100 処理して可溶化画分を得た。この画分から 1-MeAde 固定化 FG ビーズを用いてアフィニティー精製を行い、97 kDa、92 kDa、42 kDa (p97、p92、p42) の 3 種の 1-MeAde 結合タンパク質を得た。これを出発点として、本研究での解析を進めた。

4. 研究成果

(1) 3 種の 1-MeAde 結合タンパク質 (p97、p92、p42) は、1-MeAde 固定化 FG ビーズにヒトデ未成熟卵表層からの可溶化画分を吸着させ、そのビーズを SDS-PAGE 処理することで得た。一方、この可溶化画分を吸着させた 1-MeAde 固定化 FG ビーズを 1-MeAde 処理すると、上清に p97、p92、p42 が遊離した。さらにこの上清をゲル濾過したところ、溶出液中での 1-MeAde の存在の有無にかかわらず、p97、p92、p42 は個別には溶出されず、挙動をともにして 500-600 kDa にピークが見られた。従って、1-MeAde 結合タンパク質は、p97、p92、p42 からなるタンパク質複合体であるとみなされる。しかも、1-MeAde の存在に依存せずにこのヘテロ三量体が形成され、それがさらに二量体化している可能性が考えられる。

(2) p97、p92、p42 それぞれの cDNA を得る目的で、それらの部分アミノ酸配列を 15 種決定した。それらをもとに cDNA のクローニングを試みたところ、最終的には、終止コドンを含む全長約 5.4 kb の cDNA が 1 種得られた。その中には p97、p92、p42 の全ての部分アミノ酸配列がコードされており、全長をコードするタンパク質は、Rendezvin (Rdz) のヒトデ・ホモログと判明した。Rdz は、ウニ未受精卵表層顆粒中であって、受精膜を構成するタンパク質として見出されたものである (Wong & Wessel, 2006)。

(3) p97、p92、p42 それぞれの部分アミノ酸配列に対する抗体を各種作製し、実際にヒトデ未成熟卵表層にこれらのタンパク質が存在することを蛍光抗体法で確認した。

(4) 次に、Rdz の全長から、どのようにして p97、p92、p42 が得られるのかを検討した。ヒトデ Rdz の cDNA は 1787 残基のアミノ酸をコード

しており、プロテアーゼ Furin の切断モチーフ R-X-K/R-R が 2 カ所存在した。翻訳後の全長 Rdz がこれらのモチーフでプロセッシングを受けると仮定すると、それによって産生される 3 つのペプチドの分子量は、ほぼ p97、p92、p42 に相当した。そこで、reticulocyte lysates 中で全長 Rdz を in vitro 合成し、それをヒト Furin で処理したところ、p97、p92、p42 に相当するタンパク質が検出された。これらの事実は、1-MeAde 結合タンパク質は、Rdz タンパク質が翻訳後に Furin によって 2 カ所切断されて得られる 3 つの断片から構成されることを支持している。ヒトデ卵内において実際にそれが起こっていることを確認するのは、今後の課題である。

(5) さらに、Rdz の Furin 切断モチーフを境として 3 つの組換えタンパク質を作製し、in vitro 解析をした。その結果、組換え p97、p92、p42 は互いに複合体を形成したが、1-MeAde 固定化 FG ビーズに結合するのは p97 と p92 で、p42 は結合しなかった。従って、1-MeAde 結合タンパク質は Rdz の断片である p97、p92、p42 複合体 (Rdz 断片複合体) であり、そのうちの p97 と p92 に 1-MeAde が結合することが示唆される。

(6) 1-MeAde 結合タンパク質は Rdz 断片複合体であると判明したが、1-MeAde 受容体は GPCR であると想定されているにもかかわらず、ヒトデ Rdz 配列中には、細胞膜貫通ドメインも GPCR に保存された特徴的な配列も見当たらない。そこで、この Rdz 断片複合体がどのようにして 1-MeAde 受容体として機能するのかの解析を進めた。ヒトデ Rdz 配列中には CUB ドメインが 10 個存在し、この領域には、LDL-A (Low Density Lipoprotein receptor class A) module が結合すると予想されている (Wong & Wessel, 2006)。そこで LDL-A module をもつ GPCR を検索したところ、GRL101 (Tensen et al., 1994) が候補としてあった。そこで、GRL101 のヒトデホモログ (GRL) の cDNA をクローン化した。

(7) まず、ヒトデ GRL の N 端側の細胞外ドメイン (LDL-A module を含む) と予想される領域を in vitro で合成し、ヒトデ Rdz 複合体と結合することを確認した。さらに、この細胞外ドメイン領域を抗原として抗体を得、実際にヒトデ未成熟卵表層に GRL が存在することを蛍光抗体法で確認した。

(8) 次に、ヒトデ GRL の 7 回膜貫通領域を恒常活性型 GPCR となるように改変し、ヒトデ卵内で発現させて、1-MeAde 刺激無しに卵成熟を誘起することを目指したが、発現が不首

尾に終わっている。他方、Rdz の種々の領域や GRL の細胞外ドメイン領域に対する抗体を用いて、1-MeAde による卵成熟誘起の阻害、あるいは 1-MeAde なしでの卵成熟誘起を試みているが、どれもそのような効果は得られていない。

(9) これらの結果から、今回得られた 1-MeAde 結合タンパク質は Rdz (細胞外) -GRL (細胞膜内) 複合体であると予想されるが、それが実際に 1-MeAde 受容体として卵成熟誘起のシグナル伝達に関わるかの証明は、今後の課題となった。卵成熟誘起に関わらないことが確かとなった際は、この複合体が他の生理的役割を果たしている可能性もあり、その方向に研究展開することも考えられる。

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 3 件)

① Hiraoka, D., Aono, R., Hanada, S., Okumura, E., and Kishimoto, T. (2016). Two new competing pathways establish the threshold for cyclin B-Cdk1 activation at the meiotic G2/M transition. *J. Cell Sci.*, 129, 3153-3166, doi: 10.1242/jcs.182170. (査読有)

② Kubiak, J.Z., and Kishimoto, T. (2016). MPF, starfish oocyte and cell-free extract in the background – an interview with Takeo Kishimoto. *Int. J. Dev. Biol.*, 60, 193-200 (Special issue edited by Jacek Z. Kubiak), doi: 10.1387/ijdb.160348jk. (査読無)

③ Kishimoto, T. (2015). Entry into mitosis: a solution to the decades-long enigma of MPF (review). *Chromosoma*, 124, 417-428, doi: 10.1007/s00412-015-0508-y. (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

① 平岡大作、岸本健雄. サイクリン B-Cdk1 は Akt の基質を標的とする脱リン酸化酵素の活性化により、減数分裂再開の閾値設定に関わる負のフィードバックをもたらす. 第 39 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2016 / 11 / 30-12 / 2.

② 平岡大作、岸本健雄. G $\beta\gamma$ 依存的な新規経路による Akt の基質のリン酸化昂進. 第 38 回日本分子生物学会年会、神戸国際会議場、2015 / 12 / 1-4.

③ Hiraoka, D and *Kishimoto, T. To activate, or not to activate cyclin B-Cdk1:

that is the question of the oocyte at G2/M-phase border. EMBO Workshop on "The Cell Cycle", Budapest, Hungary, 2015 / 9 / 4-7.

④ *Hiraoka, D. and Kishimoto, T. To resume, or not to resume meiosis: how do starfish oocytes make a decision? Oocyte Maturation and Fertilization Meeting IV, Asamushi, Aomori, Japan, 2015 / 6 / 15-18.

⑤ *Okumura, E., Morita, A., Mochida, S., Hara, M., and Kishimoto, T. Autoregulatory activation of cyclin B-Cdk1: Arpp19, but not its upstream Gwl, is essential at meiotic G2/M-phase transition in starfish oocytes. Oocyte Maturation and Fertilization Meeting IV, Asamushi, Aomori, Japan, 2015 / 6 / 15-18.

[その他]

アウトリーチ活動 (2件)

① 岸本健雄. 「-仮想実験- 細胞の分裂を開始させるメカニズムを考える」. 高校生出前授業: 一関第一高等学校、2016 / 2 / 26.

② 岸本健雄. 「細胞の分裂を開始させる分子は何?」. 高校生臨海実習、東北大学附属浅虫海洋生物学教育研究センター、2015 / 6 / 14.

ホームページ

東工大・生命理工・立花研究室 (その中で岸本健雄名誉教授として表示)

<http://www.cell-dev.bio.titech.ac.jp/home/index-j.html>

お茶の水女子大学 (作成中)

<http://www.cf.ocha.ac.jp/sec/kishimoto.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岸本 健雄 (KISHIMOTO, Takeo)

お茶の水女子大学・サイエンス&エデュケーションセンター・客員教授

研究者番号: 00124222

(2) 研究分担者

奥村 英一 (OKUMURA, Eiichi)

東京工業大学・生命理工学院・助教

研究者番号: 00323808