

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：12611

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04783

研究課題名(和文) 卵細胞におけるG2/M期移行：cyclin B-Cdk1活性化の閾値設定機構

研究課題名(英文) Threshold-setting for activation of cyclin B-Cdk1 at meiotic G2/M-phase transition in oocytes

研究代表者

岸本 健雄 (Kishimoto, Takeo)

お茶の水女子大学・サイエンス&amp;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) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：卵細胞周期制御の特徴は、それが細胞外刺激に連携している点にある。本研究では、卵成熟誘起ホルモンが卵細胞周期のG2/M期移行をもたらすにあたって、cyclin B-Cdk1 (M期開始因子) 活性化のための閾値が如何にして設定されるのかの解明を目指した。その結果、恒常的に活性のある脱リン酸化酵素と cyclin B-Cdk1 初期活性化キナーゼとの拮抗、ノイズレベルに活性化した cyclin B-Cdk1 による負のフィードバック(自己鎮静化)、初期活性化した cyclin B-Cdk1 による正のフィードバック(自己活性化の始動)という、三重のシステムによって閾値が設定されることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、細胞分裂期の開始を決定する(decision-making)分子メカニズムの一端を明らかにした。実験材料にはヒトデ卵を用いているが、そこから得られた知見は、ヒトも含めた全真核生物にインパクトを及ぼすものである。純粋な基礎科学としての研究ではあるが、細胞分裂期および卵細胞を対象としていることから、その成果は、がんなどの異常な細胞増殖とともに卵細胞に起因する不妊の原因を探り、対策を講じる手掛かりとなるものでもある。

研究成果の概要(英文)：Meiotic cell cycle progression in oocytes is characterized by its link with extracellular stimuli. Here, we investigated the mechanism for threshold establishment in activation of cyclin B-Cdk1, a universal inducer of M-phase, after maturation-inducing hormonal stimulus. Our results indicate the presence of triple barrier against cyclin B-Cdk1 activation: first, constitutively active phosphatase that counteracts phosphorylation by a trigger kinase for initial activation of cyclin B-Cdk1; second, noise-cancelling through negative feedback that depends on partially activated cyclin B-Cdk1 after subthreshold hormonal stimulus; and third, start of autoregulatory activation of cyclin B-Cdk1 through positive feedback that depends on initially activated cyclin B-Cdk1. We propose that hormonal dose-dependent competition with these barriers establishes a threshold.

研究分野：細胞生物学

キーワード：シグナル伝達 細胞周期 G2/M期移行 cyclin B-Cdk1 卵細胞

## 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するが、これは体細胞周期における G2/M 期移行に相当し、卵成熟誘起ホルモン作用の直接の帰結は、M 期統御分子である cyclin B-Cdc2/Cdk1 の卵細胞内における活性化である (発表論文リスト中の Kishimoto, PJAB, 2018 に総説)。顕微鏡下ではまずは卵核崩壊 (germinal vesicle breakdown, GVBD; 核膜崩壊) として観察され、その下流でいわゆる卵成熟が起こって卵細胞の分化が完成し、その後受精した場合は胚発生を開始する。

(2) しかし、cyclin B-Cdk1 の細胞内における活性制御機構については相当程度に理解が深まっているにも拘わらず、なぜ卵成熟誘起ホルモンが一定濃度 (閾値) 以上に達しないと cyclin B-Cdk1 は活性化に至らないのかについては、未だいかなる動物種の卵細胞においても、解析はほとんどなされていない。卵成熟誘起ホルモン刺激のもとでの cyclin B-Cdk1 活性化の閾値設定機構は、卵細胞にとっては「伸るか反るか」の一大事であるにも拘わらず、不明といえる。

(3) そうした状況にあつて、研究代表者らは最近、卵成熟誘起ホルモン濃度が不十分 (つまり閾値以下) の場合には、卵細胞内に情報は一旦伝達されるはするが、卵細胞内においてそれをノイズとして抹消し自己鎮静化をはかるシステム (「ノイズ抹消システム」と呼称) が機能していること; および、卵成熟誘起ホルモン刺激のもとでの新たなシグナル伝達経路 (「atypical 経路」と呼称) が存在している可能性を見出した。いずれも論文としては未発表であったが、これらは、本研究課題を究明するにあつて、大きな突破口になると期待された。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究では、卵成熟誘起ホルモンが卵細胞周期の G2/M 期移行をもたらすのにあつて、cyclin B-Cdk1 活性化のための閾値が如何にして設定されるのかを明らかにすることを目指した。そのために、研究代表者らが知見を蓄積してきたヒトデ卵を活用し、最近に見出した「ノイズ抹消システム」機能と、「atypical 経路」の存在の可能性を手掛かりとした (下記(2)を参照)。それにより、全動物卵を通じて初めて、G2/M 期移行の開始を決定する (decision-making) 分子機構を解明しようとした。

(2) ヒトデの卵成熟誘起ホルモンは 1-methyladenine (1-MeAde) で、これは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。以来、ヒトデ卵は、カエル卵とともに、卵成熟誘起ホルモンによる G2/M 期移行を解析するためのモデル系となっている。1-MeAde から cyclin B-Cdk1 に至る主経路は、「1-MeAde の卵表受容体 (GPCR と予測されているが未同定) —Gbg 解離—PI3 キナーゼ (PI3K) 活性化—PI-(3,4,5)P3 生成—Akt 活性化—Akt (trigger kinase) での直接のリン酸化による、Cdc25 活性化と Myt1 抑制—Cdc25 と Myt1 の活性バランスの逆転による、cyclin B-Cdk1 初期活性化—PP2A-B55 抑制に基づく、自己活性化経路を介した cyclin B-Cdk1 の完全活性化」であると、研究代表者らを中心とした解析から判明している (図 1; Kishimoto, PJAB, 2018)。

これらの過程にタンパク質の新たな合成は不要なため、ヒトデ卵は、卵成熟誘起ホルモンによる cyclin B-Cdk1 活性化の閾値設定機構を解明するにあつて、最適 (おそらく無二) の研究材料といえる。しかし、それにもかかわらず、1-MeAde の閾値 (つまり cyclin B-Cdk1 を初期活性化させる閾値) を決める分子機構は不明であった。そこで、「ノイズ抹消システム」と「atypical 経路」の分子実体や役割を追求することを通して (下記「3. 研究の方法」を参照)、閾値設定機構の実体を明らかにすることを目指した。

## 3. 研究の方法

(1) 「ノイズ抹消システム」として、以下のような事実を見出している。すなわち、1-MeAde 濃度が閾値以下でも、一旦は Cdc25 と Myt1 上の Akt によるリン酸化部位 (「Akt 部位」と略称) でリン酸化が起こり、cyclin B-Cdk1 も低レベルに活性化する; しかし、この Akt 部位のリン酸化は cyclin B-Cdk1 活性に依存して脱リン酸化され (このフォスファターゼを「PPase X」と仮称)、cyclin B-Cdk1 は不活性状態に戻る。これは cyclin B-Cdk1 依存性の負のフィードバック (Cdk1-dependent negative feedback; 「Cdk-NF」と略称) であり、この Cdk-NF の分子実体を明らかにすることを、閾値設定機構解明の手掛かりとした。

(2) 「atypical 経路」として、以下のような事実を見出している。すなわち、Cdc25 と Myt1 の Akt 部位のリン酸化には、Gbg からの PI3K—PI-(3,4,5)P3—Akt 経路 (「typical Gbg 経路」と仮称) だけでは不十分で、Gbg の下流には、PI3K を介さずに Akt 部位のリン酸化を促進する未知の経路が存在する可能性が判明していた。これは「atypical Gbg 経路」と称するべきものであり、Cdk-NF を克服 (override) する可能性も考えられた。そこで、atypical Gbg 経路の分子実体、特にその標的を明らかにすることを、閾値設定機構解明の手掛かりとした。

#### 4. 研究成果

(1) まず、atypical Gbg 経路の存在の確証を得るために、PI3K には結合しない Gbg 変異体 (D246S; 1-MeAde 刺激によって、typical Gbg 経路は活性化しないが、atypical Gbg 経路は活性化するはず) および恒常活性型 PI3K (CA-PI3K) (1-MeAde 刺激無しに typical Gbg 経路は活性化するが、atypical Gbg 経路は活性化しないはず) を作製して解析した。その結果、Cdc25 と Myt1 の Akt 部位のリン酸化には、typical Gbg 経路と atypical Gbg 経路の両方が必要で、どちらか一方では不十分であると判明した。この事実、atypical Gbg 経路が実際に存在することを支持している (発表論文リスト中の Hiraoka et al., J. Cell Sci., 2016) (図 1)。

(2) 上記(1)の解析の際、Cdc25 と Myt1 の Akt 部位のリン酸化には typical Gbg 経路と atypical Gbg 経路の両方が必要であるにも拘わらず、typical Gbg 経路だけで Akt は活性型になると判明した。この事実、第一の可能性としては、ヒトデ卵細胞内において活性型 Akt が Cdc25 と Myt1 の Akt 部位のリン酸化を実現するには、atypical Gbg 経路を介した何かの“支援”(例えば、Cdc25 と Myt1 のリン酸化 Akt 部位を脱リン酸化する PPaseX の抑制) を必要としていることを示唆している。

他方、活性型 Akt を検出するために今回新たに作製した抗体 (抗リン酸化型 A-loop 抗体) は、1-MeAde 処理後のヒトデ卵では、Akt に加えて、Akt よりわずかに分子量の大きいバンドも特異的に認識した。この事実からは、Akt の属する AGC キナーゼファミリーでは A-loop のアミノ酸配列が比較的類似していることを考慮すると、今回の抗リン酸化型 A-loop 抗体は Akt だけでなく他の AGC キナーゼも検出したことが第二の可能性として考えられる。

(3) そこで、第二の可能性に着目して哺乳類の AGC キナーゼファミリーを精査したところ、SGK (serum- and glucocorticoid-regulated kinase) が浮上した。SGK と Akt では、アミノ酸残基数は類似 (ヒトデでは SGK/490; Akt/487); リン酸化部位の保存配列は同一 (RXXRXS/T); 活性化には、キナーゼは同一だが (PDK1 と PDK2/TORC2)、Akt には PI3K—PI-(3,4,5)P3 経路で必要十分であるのに対し、SGK にはそれに加えて PI3K 非依存性経路も必要、との知見が報告されていた。これらの情報は、ヒトデ卵においても SGK が活性化している可能性を強く示唆している。

(4) 上記(3)に基づき、ヒトデ SGK を得て解析したところ、1-MeAde 処理したヒトデ卵において cyclin B-Cdk1 の初期活性化をもたらす“引金キナーゼ (trigger kinase)”として機能しているのは、Akt ではなく、SGK であると判明した (発表論文リスト中の Hiraoka et al, J. Cell Biol., 2019)。すなわち、1-MeAde 処理後、SGK は typical Gbg 経路と atypical Gbg 経路の両方に依存して活性化し、Cdc25 と Myt1 の Akt 部位 (いまや「SGK/Akt 部位」と改称すべき) をリン酸化して cyclin B-Cdk1 を初期活性化する。しかも、この cyclin B-Cdk1 の初期活性化には、SGK は必須であったが、Akt は必要ではなかった (Akt を抑えても、SGK があれば十分であった)。

この発見は、本計画の立案時での予想をはるかに越えたものであった。しかし、ヒトデ卵での 1-MeAde から cyclin B-Cdk1 の活性化に至るシグナル伝達経路において、最大の鍵である引金キナーゼの分子本体が Akt から SGK に変更されるわけである。そのインパクトは、単に本計画での閾値設定機構を越えて、1-MeAde の下流での cyclin B-Cdk1 の活性化機構全般にまで及ぶといえる。

(5) 実際、typical Gbg と atypical Gbg の両経路の収束先が SGK であるならば、上記(2)での第一の可能性を追究する必要はなくなる。むしろ、atypical Gbg 経路の分子実体を、哺乳類体細胞などの知見から推測することができる。つまり、SGK の活性化には PI-(3,4,5)P3 だけでなく PI-(3)P も必要で、PI-(3)P は PI-(3,4,5)P3 から SHIP2 や INPP4 によって生成される可能性が報告されている。ヒトデ卵においてもそうであるならば、atypical Gbg 経路は、typical Gbg 経路において PI3K によって生成された PI-(3,4,5)P3 を PI-(3)P に脱リン酸化する経路 (端的には、Gbg の下流で SHIP2 や INPP4 を活性化する経路) であると想定できる (図 1)。

現在、PI-(3,4,5)P3 を PI-(3)P に変換するシステムの分子実体については、哺乳類体細胞においても未決着といえる。そのため、本研究の成果は、真核細胞全般におけるイノシトールリン酸の代謝研究にまでインパクトが及ぶと予想される。

(6) typical Gbg と atypical Gbg の両経路の effector kinase が SGK であり、それこそが引金キナーゼであるとの新展開を踏まえて、Cdk-NF の解析を進めた。

まず、Cdk-NF が機能する際に見られる、Cdc25 と Myt1 のリン酸化 SGK/Akt 部位の脱リン酸化をもたらす PPaseX に関わる解析をした。その結果、この PPaseX は 1-MeAde 未処理の未成熟卵において既に活性を持ち、その活性レベルは 1-MeAde 処理によっても大きくは変わらなかった (少なくとも SGK や Akt よりも上流のシグナルには影響されず、Cdk-NF によってはわずかな活性上昇が見られたが、PPaseX は恒常的に活性があると一括りにできる程度であった)。

(7) 一方、Cdk-NF によっては、Cdc25 と Myt1 の SGK/Akt 部位の脱リン酸化だけでなく、その上流にある SGK と Akt の両方で precocious な不活性化が見られた。この事実からは、Cdk-

NF における cyclin B-Cdk1 の標的は、atypical Gbg 経路ではなく、typical Gbg 経路の抑制か 1-MeAde 受容体そのものが想定される。

しかし、Cdk-NF は閾値以上の 1-MeAde によっては克服されるであろうことを考慮すると、Cdk-NF の効果は reversible である可能性が高く、1-MeAde 受容体の分子修飾は考えにくい。

それに対し、typical Gbg 経路については、哺乳類体細胞などの知見から、PI3K に拮抗するフォスファターゼである PTEN がヒトデ卵においても存在することが予想される (図 1)。この PTEN は、PI3K が生成した PI-(3,4,5)P<sub>3</sub> を PI-(4,5)P<sub>2</sub> に脱リン酸化させるが、Cdk-NF に際して活性化される可能性は考慮に値するといえる。

(8) 以上の研究成果から、ヒトデ卵における 1-MeAde から cyclin B-Cdk1 の初期活性化に至るシグナル伝達経路と、そこにおける 1-MeAde の閾値設定機構は、下記①~③および図 1 のようにまとめられる。

①シグナル伝達経路としては、まず、卵表の 1-MeAde 受容体に共役して Gbg が生じるが、(i)その直下では、PI3K によって PI-(3,4,5)P<sub>3</sub> を産生させる typical Gbg 経路だけでなく、PI-(3,4,5)P<sub>3</sub> を PI-(3)P に変換する atypical Gbg 経路も作動する。(ii)この両経路の収束のもとに SGK が活性化し、これが trigger kinase (引金キナーゼ) として Cdc25 と Myt1 の両者にある SGK/Akt 部位をリン酸化する。(iii)そうすると Cdc25 と Myt1 の活性バランスが逆転して、cyclin B-Cdk1 の初期活性化がもたらされる。(iv)このあとは、cyclin B-Cdk1 の自己活性化経路を介して、cyclin B-Cdk1 は完全活性化に至る。

②閾値設定の関門としては、まず、(i)Cdc25 と Myt1 の両者の trigger kinase によるリン酸化に対して拮抗する PPaseX に打ち克ち、とにかく Cdc25 と Myt1 の活性バランスを逆転させる必要がある。次に、(ii)これにより低レベルに活性化した cyclin B-Cdk1 がもたらす Cdk-NF を克服する必要がある。この Cdk-NF における cyclin B-Cdk1 の標的としては、PI3K に拮抗する PTEN の可能性が考えられる。その場合、Cdk-NF では、negative feedback の性質から、その活性レベル (PTEN 活性化の程度を想定) は一定水準を越えないと予想される。それに対し、PI3K 活性化の程度は単純に Gbg 量、従って 1-MeAde 濃度に依存していると予想される。そのため、閾値以上の 1-MeAde によっては、Cdk-NF の克服が実現するはずである。

そうではあるが、この Cdk-NF—PTEN 経路については、目下のところ作業仮説の域を出ず、今後の検証が必要である。

③このように、cyclin B-Cdk1 の初期活性化には、二重の関門が設定されているとみなされる。しかし、このあと、上記①(iv)の自己活性化の始動には、次の関門が設定されているはずである。従って、cyclin B-Cdk1 が完全活性化に至るには、1-MeAde の濃度に依存した Gbg の生産がこれら三重の関門を越える量に達する必要がある、そのボーダーとなる 1-MeAde 濃度が閾値に相当することになる。

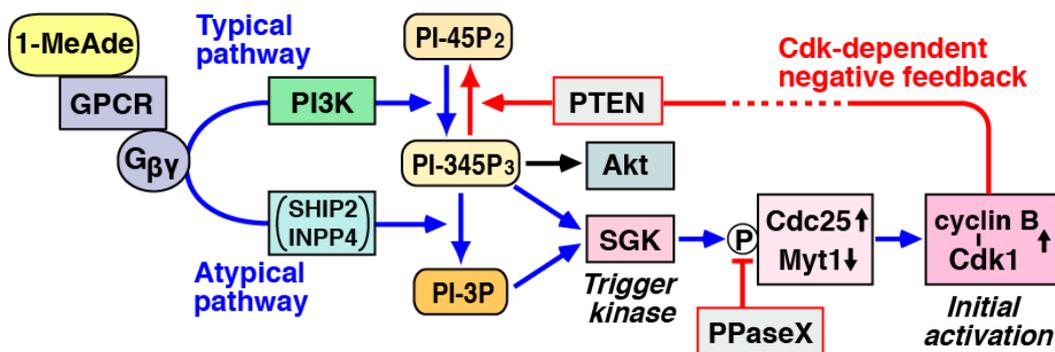


図 1. ヒトデ卵における cyclin B-Cdk1 初期活性化のための閾値設定システム (作業仮説)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 KISHIMOTO Takeo	4. 巻 94
2. 論文標題 MPF-based meiotic cell cycle control: Half a century of lessons from starfish oocytes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the Japan Academy, Series B	6. 最初と最後の頁 180 ~ 203
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2183/pjab.94.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hiraoka Daisaku, Hosoda Enako, Chiba Kazuyoshi, Kishimoto Takeo	4. 巻 218
2. 論文標題 SGK phosphorylates Cdc25 and Myt1 to trigger cyclin B-Cdk1 activation at the meiotic G2/M transition	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 3597 ~ 3611
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.201812122	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hiraoka, D., Aono, R., Hanada, S., Okumura, E., and Kishimoto, T.	4. 巻 129
2. 論文標題 Two new competing pathways establish the threshold for cyclin B-Cdk1 activation at the meiotic G2/M transition.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 J. Cell Sci.	6. 最初と最後の頁 3153-3166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.182170	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kubiak, J.Z., and Kishimoto, T.	4. 巻 60
2. 論文標題 MPF, starfish oocyte and cell-free extract in the background - an interview with Takeo Kishimoto.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Int. J. Dev. Biol.	6. 最初と最後の頁 193-200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1387/ijdb.160348jk	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takeo Kishimoto
2. 発表標題 In commemoration of the half-centennial anniversary: 1-Methyladenine identification in starfish oocytes and beyond
3. 学会等名 International Oocyte Meeting V (Villefranche-Sur-Mer, France) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岸本健雄
2. 発表標題 1 - メチルアデニンに始まる卵細胞周期制御の解明
3. 学会等名 日本動物学会第90回大阪大会シンポジウム「ヒトデ卵成熟誘起ホルモン 1 - メチルアデニンの同定50周年記念シンポジウム」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岸本健雄
2. 発表標題 1 - メチルアデニンが切り開いた卵細胞周期の制御機構に関する研究
3. 学会等名 日本動物学会第88回富山大会シンポジウム「ヒトデの生殖生物学 - 1 - メチルアデニンの発見から半世紀」(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 平岡大作、細田絵奈子、千葉和義、岸本健雄
2. 発表標題 PI3KとGbg依存的な新規経路の協調的な働きによるヒトデ卵減数分裂再開の分子機構
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 平岡大作、岸本健雄
2. 発表標題 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。
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Murabe, N., Okumura, E., Chiba, K., Hosoda, E., Ikegami, S., and Kishimoto, T.	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer Science+Business Media, New York	5. 総ページ数 -
3. 書名 Methods in Molecular Biology "Developmental Biology of the Sea Urchin and Other Marine Invertebrates: Methods and Protocols, Second Edition" (eds. Stephen A. Stricker and David J. Carroll)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

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 岸本健雄客員教授 <a href="http://www.cf.ocha.ac.jp/sec/kishimoto/profile.html">http://www.cf.ocha.ac.jp/sec/kishimoto/profile.html</a>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	奥村 英一  (Okumura Ei-ichi)  (00323808)	東京工業大学・生命理工学院・助教    (12608)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力 者	平岡 大作  (Hiraoka Daisaku)	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・特任リサーチフェロー   (12611)	