

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19380155
 研究課題名 (和文) プロテオーム制御因子と蛋白質キナーゼを中心とした
 家畜卵の細胞分裂制御機構の解析
 研究課題名 (英文) Analyses for the mechanism of M-phase regulation in livestock oocytes
 with special focus on proteome control factors and protein kinases.
 研究代表者
 内藤 邦彦 (NAITO KUNIHICO)
 東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授
 研究者番号：2018858

研究成果の概要：

本研究において、卵の生理機構のより深遠な理解を目標とし、家畜卵のプロテオーム制御因子、およびタンパク質機能修飾を司るキナーゼを中心に、家畜卵の細胞分裂制御機構の解析を行った結果、プロテオーム制御因子として、ヒストンアセチル化制御因子とその制御機構、タンパク質翻訳に関与する mRNA の 3' -UTR の構造、CPEB、Aurora A の機能、タンパク質分解に関与する APC 活性化因子の FZR1、Cdc20 の機能、細胞分裂制御の中心となる MPF 活性を制御するキナーゼとして主として Wee1B、CAK の機能を明らかにすることができた。これらの成果は畜産学を始めとする多くの分野に多大な貢献をしている動物バイオテクノロジーの技術効率を格段に高め、更に発展させる原動力になるものと期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	8,700,000	2,610,000	11,310,000
2008 年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
年度			
年度			
年度			
総計	15,500,000	4,650,000	20,150,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用動物科学

キーワード：繁殖、遺伝子、哺乳類卵、プロテオーム制御因子、タンパク質キナーゼ
 細胞分裂制御、M期促進因子(MPF)、

1. 研究開始当初の背景

動物バイオテクノロジーの技術の進歩に伴い、人為的に遺伝子を改変した動物の作出法が確立され、畜産学を始めとする多くの分野に多大な貢献をしている。この技術に不可欠の材料が哺乳類卵であり、この技術効率を格段に高め、更に発展させるためには卵の発生能力すなわち細胞分裂能の生理機構を正しく理解することが重要である。申請者は家畜卵であるブタ卵の初期発生能

の制御機構を中心テーマとして20年にわたり研究を行っており、これまでに分裂制御因子の動態と機能を世界に先駆けて報告してきた。最近、逆遺伝学的手法により、これらのほぼ全容を明らかにし、現在、研究は分裂制御因子の動態を制御する、さらに上位の制御機構に注目している。

近年、ヒトの全ゲノム配列が解読され「ポストゲノムプロジェクト」の時代において、タンパク質の発現、および機能解析が生物

学における重要な研究課題となっている。ある細胞が発現するタンパク質の全体はプロテオームと定義され、申請者が対象とする卵の減数分裂、受精、卵割の過程では著しい卵内のプロテオーム変化が起こることが古くから確認されている。プロテオーム変化はタンパク質の合成と分解によって制御され、またタンパク質機構の制御には翻訳後修飾が関与し、その代表例であるリン酸化を担うのがタンパク質キナーゼである。しかし、家畜卵のプロテオーム変化を制御するこれらの因子について注目されたことは無く、この変化の制御機構については全く報告が無い。このような背景から、卵の生理機構の理解には家畜卵のプロテオーム制御因子の解析が必須である。

2. 研究の目的

以上の背景の下、本研究では、プロテオーム制御因子、すなわちタンパク質の合成と分解に関与する因子、さらにタンパク質の機能を修飾する種々のキナーゼの発現動態および機能を、ブタ成長途上卵から成長後の減数分裂過程を含めて解析し、発生能力すなわち細胞分裂能を制御する機構の詳細を追及することを目的とする。

タンパク質の発現は、転写と翻訳の2つのレベルでの制御があるが、転写の制御としてヒストンアセチル化などのエピジェネティックな制御がある。そこで卵のヒストンアセチル化レベルとその制御について調べる。また翻訳レベルでは mRNA の 3' 非翻訳領域 (UTR) の配列が関係すること、ここに存在する cytoplasmic polyadenylation element (CPE) 配列に結合する CPE 結合タンパク質 (CPEB) のリン酸化により制御されるタンパク質が報告されていることから、3' UTR の状態と CPEB の制御に関与する因子を中心に解析する。また、プロテアソームによるタンパク質の分解にはユビキチン化酵素が重要である。そこでユビキチンリガーゼの分裂後期促進複合体/サイクロソームに焦点をあてる。さらにキナーゼに関しては分裂制御因子の活性抑制に関与するリン酸化を触媒するキナーゼとして Myt1, Wee1B, フォスファターゼとして MASTL、また、逆に活性化に関与するリン酸化を触媒するキナーゼとして CAK の機能を中心に調べていくことを具体的な目的とした。

3. 研究の方法

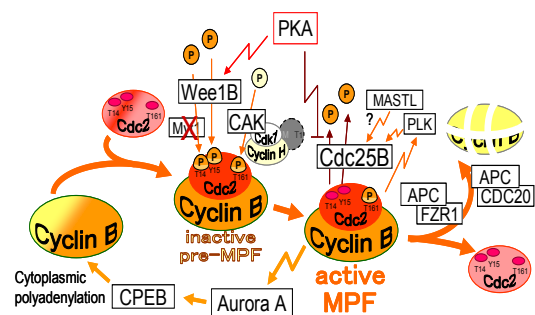
屠場より採取したブタ卵巣の中卵胞より吸引採取した成長卵を用い、体外培養により減数分裂を起こさせ、その過程における分裂制御を解析することにより、上記の制御因子について調べるという手法を用いた。なお、小卵胞を切開して採取した直径の小さい成

長途上卵も用いるが、この卵は減数分裂を起こさないため、上記の制御因子について成長卵と比較することにより、発生能獲得過程における因子の動態を解明することとした。

ヒストンアセチル化については、各ヒストンのアセチル化に特異的抗体を用いて免疫染色することにより、減数分裂過程のヒストンアセチル化状態の変化と調べると共に、アセチル化を制御する機構についてヒストン脱アセチル化酵素の働き、分裂促進因子 (MPF) 活性、および核膜の状態との関連を調べた。またヒストンアセチル化が起こらない変異ヒストンを卵に発現させる、あるいは培養細胞で発現させ精製した変異ヒストンタンパク質を卵に導入して分裂との関連を調べることにした。

mRNA の 3' 非翻訳領域 (UTR) の配列については、MPF のサブユニットであり活性制御因子である cyclin B (B1 および B2) に焦点をあて、これの発現時期と 3' -UTR に存在するエレメントの関連を詳細に解析した。CPEB の制御に関与する因子としては Aurora A キナーゼが知られている。また、タンパク質分解に関与する分裂後期促進複合体/サイクロソームについては、これの活性化因子である FZR1 と Cdc20 の機能に焦点をあてる。さらに MPF 活性抑制キナーゼである Myt1, Wee1B, フォスファターゼの MASTL、および活性化キナーゼの CAK についてはその構成因子である Cdk7, cyclin H, MAT1 を中心に調べていくこととし、CPEB, Aurora A, FZR1, Cdc20, Myt1, Wee1B, MASTL, Cdk7, cyclin H, MAT1 の遺伝子をクローニングした。これらに緑色蛍光タンパク質 (EGFP) あるいは flag タグをつけた mRNA を合成するためのベクターを構築し、in vitro で合成した mRNA をブタ卵に顕微注入して過剰発現させた。これによりそれぞれの卵内における局在についても解析した。またアンチセンス RNA を合成して同様にブタ卵に顕微注入することにより、発現を抑制した。これらの人為的なタンパク質発現操作による逆遺伝学的手法により、卵のプロテオーム制御因子の機能について詳細に検討を行った。

本研究において解析を行った主な因子の関係は以下の図の通りである



4. 研究成果

卵のヒストンアセチル化状態を解析したところ、減数分裂を停止している卵では極めて高度にアセチル化されているのに対し、減数分裂を開始した卵では脱アセチル化されていることが分かった。このヒストン脱アセチル化の制御を調べた結果、卵の核膜崩壊に依存して脱アセチル化されることが判明し、これには卵細胞質に存在するタイプ I のヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) が関与し、MPF 活性は必要ないことが明らかとなった。ヒストンの脱アセチル化は転写の抑制と関連することが知られており、この変化は減数分裂から初期発生におけるプロテオームの変化とも関連すると考えられた。なお、アセチル化されない変異ヒストン H4 を導入したが、ヒストン交換活性および減数分裂過程には特に影響を及ぼさないことも示唆された。

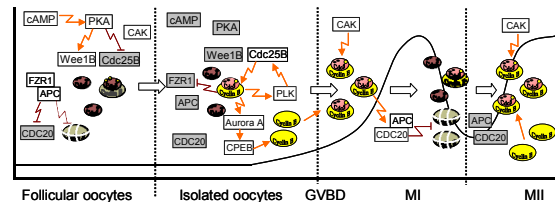
減数分裂過程の cyclin B は、比較的早期に B2 が発現し後期に B1 が発現することを我々は以前から報告していたが、今回 mRNA の 3' -UTR を調べたところ、cyclin B1 はタンパク質は 1 種類だが mRNA には 3' -UTR の長さが異なる long form と short form の 2 種類が存在し、それぞれのエレメント解析から long form は減数分裂の序盤に発現し short form は終盤に発現することが示唆された。また cyclin B2 には CPE を始めとするエレメントが存在せず mRNA の分解に伴って発現が低下するものと考えられた。この研究から、3' -UTR の相違がプロテオームの変化に大きく関係することが示唆された。タンパク質の合成については CPEB, Aurora A のクローニングも行い、逆遺伝学的な発現人為操作により、Aurora A が CPEB をリン酸化し CPE 配列を持つ mRNA の翻訳を高めることが示された。また、逆にこれらの抑制が翻訳を阻害することも明らかとなり、mRNA の 3' -UTR に CPE 配列が存在するかがプロテオームの変化の要因になりうることを示唆された。

タンパク質の分解に関しては Cdh1 と Cdc20 をクローニングし、上記同様に逆遺伝学的手法による解析を行った。その結果、減数分裂停止中の卵では恒常的に Cdh1 が働き cyclin B を分解することにより MPF 活性の上昇が抑制されていること、また Cdc20 はこの過程に作用せず、第 1 分裂から第 2 分裂以降の際の cyclin B 分解に関与することが示された。Cdh1 と Cdc20 では異なったアミノ酸配列を認識してタンパク質分解に導くことも確認され、これらの認識配列の相違がプロテオームの変化の一端を説明しうることも示唆された。

MPF 活性の抑制に関与するキナーゼとして Myt1 と Wee1B をクローニングし、逆遺伝学的手法によりその機能を調べた結果、ブタ卵の減数分裂停止は Wee1B に依存しており、

はこの時期顕著な作用を持たないことが示された。従来、家畜卵の減数分裂の再開は cyclin B の翻訳開始が引き金になるとの概念があったが、今回のプロテオーム解析、およびキナーゼ解析により、MPF の抑制的リン酸化の脱リン酸化が第一の引き金になることが明らかとなった。さらに、この機構に中心的な作用をもつ Wee1B は、機能を発揮するために核内に移行する必要があること、また 77 番目のセリンのリン酸化が活性発現に重要であることが明らかとなった。一方、MPF を活性化するキナーゼとして CAK の各因子をクローニングし作用を解析した結果、161 番目のスレオニンのリン酸化を介し減数分裂の進行に不可欠の作用をもつことが明らかとなった。

これらの因子の作用については主な発論文等の②に総説としてまとめて発表した。一部の因子について機能の一端をまとめた図を以下に示す。



最後に成長途上卵について、発生能の欠如とこれらの因子との関連を検討するため、成長途上卵の採取法を確立した。すなわち、卵胞直径および卵直径による 2 段階分類法を確立し、細胞分裂能力の異なる卵をかなり厳密に分類することが可能となった。これらの卵のプロテオームを SDS 電気泳動により調べたが、細胞分裂能の違いを直接示唆する相違を見出すことはできなかった。またプロテオーム制御因子の Aurora A, cdc20 および FZR1 の mRNA や antisense RNA を成長卵に注入したところ、減数分裂能には有意な変化が見られたものの、SDS 電気泳動によるプロテオーム解析には変化が見られないことが明らかとなった。細胞分裂制御因子は卵全体のタンパク質量と比較し、極めて微量であるためと考えられ、この方法でプロテオーム全体を網羅的に調べていくには限界があることが判明した。そこで、成長途上卵の細胞分裂能の違いから制御因子の機能を調べる方向に切り換え、これらの卵で制御因子の存在量を調べた結果、MPF の構成因子である Cdc2 が少ないこと、Wee1B が恒常的に活性化していることが原因であることをつきとめることができた。このことは哺乳類の成長途上卵が積極的に発生を抑制していることを示唆しており、興味深い。今後は Wee1B の恒常的活性化の原因となる発生抑制機構に焦点を当てて生理機構を解析していく必要がある。

以上、本研究により哺乳類卵がもつ生理機構におけるプロテオームの変化の制御に関与する多くの因子の機能が明らかとなった。またキナーゼとして従来報告の無かった Wee1B, CAK の発生制御における役割が明らかとなった。これらの成果は畜産学を始めとする多くの分野に多大な貢献をしている動物バイオテクノロジーの技術効率を格段に高め、更に発展させる原動力になるものと期待される。

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 10 件)

- ①Nishimura Y, Kano K, Naito K.
Porcine CPEB1 is involved in Cyclin B translation and meiotic resumption in porcine oocytes.
Animal Science Journal
査読有, 81, 2010, in press.
- ②Naito K. (他 7 名、1 番目)
Upstream factors regulating the maturation/M-phase promoting factor activity during oocyte maturation.
Journal of Mammalian Ova Research
査読有 27, 2010, 27-34.
- ③Nishimura T, Naito K. (他 2 名、4 番目)
Insufficient amount of Cdc2 and continuous activation of Wee1 B are the cause of meiotic failure in porcine growing oocytes.
Journal of Reproduction and Development
査読有, 55, 2009, 553-557.
- ④Shimaoka T, Naito K. (他 2 名、4 番目)
Critical effect of pigWee1B on the regulation of meiotic resumption in porcine immature oocytes.
Cell Cycle, 査読有, 8, 2009, 2375-2384.
- ⑤Nishimura Y, Naito K. (他 2 名、4 番目)
Porcine Aurora A accelerates Cyclin B and Mos synthesis and promotes meiotic resumption of porcine oocytes.
Animal Reproduction Science
査読有, 113, 2009, 114-124.
- ⑥Yamamuro T, Kano K, Naito K.
Functions of FZR1 and CDC20, activators of the anaphase-promoting complex (APC), during meiotic maturation of porcine oocytes.
Biology of Reproduction, 査読有, 79, 2008, 1202-1209.
- ⑦Endo T, Kano K, Naito K.
Nuclear histone deacetylases are not required for global histone

deacetylation during meiotic maturation in porcine oocytes.

Biology of Reproduction, 査読有, 78, 2008, 1073-1080.

- ⑧遠藤 壘, 内藤邦彦.
哺乳類卵の減数分裂過程におけるヒストンアセチル化制御について.
動物遺伝育種研究, 査読有, 36, 2008, 167-175.
 - ⑨Kashima K, Kano K, Naito K.
Mos and the mitogen-activated protein kinase do not show cytostatic factor activity in early mouse embryos.
Journal of Reproduction and Development
査読有, 53, 2007, 1175-1182.
 - ⑩Morikawa M, Naito K. (他 5 名、7 番目)
Meiotic resumption of porcine immature oocytes is prevented by ooplasmic Gs α functions.
Journal of Reproduction and Development
査読有, 53, 2007, 1151-1157.
- [学会発表] (計 12 件)
- ①藤井 渉
ブタ Cdk 活性化キナーゼ(CAK)のクローニングおよび卵成熟過程における関与
第 102 回日本繁殖生物学会
2009 年 9 月 11 日
近畿大学農学部 (奈良)
 - ②山室 匡史
ブタ卵の Cyclin B1 は成熟段階に伴い 2 種類の異なる mRNA から翻訳される
第 110 回日本畜産学会
2009 年 3 月 27 日
日本大学 (藤沢)
 - ③西村 鷹則
ブタ未成熟卵の Mos, cyclin B, Cdc2, 強制発現、及び Myt1, Wee1B 発現抑制の減数分裂再開への影響
第 110 回日本畜産学会
2009 年 3 月 27 日
日本大学 (藤沢)
 - ④遠藤 壘
ブタ卵成熟過程のヒストン交換反応とヒストンアセチル化状態の関連性
第 110 回日本畜産学会
2009 年 3 月 27 日
日本大学 (藤沢)
 - ⑤西村 行雄
ブタ卵成熟過程における Aurora-A キナーゼの機能阻害による影響
第 101 回日本繁殖生物学会
2008 年 9 月 18 日
九州大学 (福岡)
 - ⑥嶋岡 琢磨
ブタ卵成熟における Wee1B 活性と cAMP 濃度の影響

第 101 回日本繁殖生物学会
2008 年 9 月 18 日
九州大学 (福岡)

⑦ENDO TSUTOMU

Class I histone deacetylases in the nucleus are not required for global histone deacetylation during meiotic maturation in mammalian oocytes.

1st World Congress Reproductive Biology
2008 年 5 月 25 日
Kailua-Kona, Hawaii

⑧鹿島 光司

マウス初期胚における Emi1, Emi2 の CSF 活性の解析

第 100 回日本繁殖生物学会
2007 年 10 月 22 日
東京大学農学部

⑨遠藤 壘

ブタ卵成熟過程に関与するヒストン脱アセチル化酵素の解析

第 100 回日本繁殖生物学会
2007 年 10 月 20 日
東京大学農学部

⑩西村 行雄

ブタ Aurora-A の卵成熟過程における過剰発現の影響

第 108 回日本畜産学会大会
2007 年 9 月 26 日
岡山大学

⑪森川茉莉江

ブタ未成熟卵の減数分裂再開に対する卵内 Gs α の影響

第 108 回日本畜産学会大会
2007 年 9 月 26 日
岡山大学

⑫遠藤 壘

哺乳類卵の減数分裂におけるヒストンアセチル化制御機構の解析

生命科学研究ネットワーク・シンポジウム 2007
2007 年 9 月 15 日
東京大学工学部

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内藤 邦彦 (NAITO KUNIHICO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号 : 20188858

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

青木 不学 (AOKI FUGAKU)

東京大学・大学院新領域創生科学研究科・准教授

研究者番号 : 20175160

千田 和広 (CHIDA KAZUHIRO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号 : 00192188