

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12611

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2009～2013

課題番号：21247030

研究課題名(和文)MPFの分子実体についての再考

研究課題名(英文)Reconsideration on the molecular identity of MPF

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) 34,600,000円、(間接経費) 10,380,000円

研究成果の概要(和文)：MPF(maturation/M phase-promoting factor、卵成熟/M期促進因子)は真核細胞に普遍的なM期誘起因子であり、cyclin B-Cdc2/Cdk1複合体と同義であることが通念となっている。しかし実際にはそうではなく、MPFは、cyclin B-Cdk1とGreatwall kinase(Gwl)の両者によって構成されること(MPF = cyclin B-Cdk1 + Gwl)を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：MPF(maturation/M phase-promoting factor) is the universal inducer of M-phase in eukaryotic cells. It is currently accepted that MPF is identical to the kinase cyclin B-Cdk1. Here we show that MPF and cyclin B-Cdk1 are not synonymous, and instead, that MPF is a system consisting of cyclin B-Cdk1 and another kinase, Greatwall kinase.

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 MPF サイクリン B-Cdk1/Cdc2 Greatwallキナーゼ Ensa/Arpp19 PP2A-B55

1. 研究開始当初の背景

(1) MPF は、当初、Masui & Markert (1971) によって、カエル成熟卵 (M期に相当) の細胞質を未成熟卵 (G2 期に相当) に移植したとき、被移植卵において卵成熟を引き起こす (G2/M期移行に相当) 活性に対して命名

(maturation-promoting factor、卵成熟促進因子) された (図 1)。その後、同じ活性が、ヒトデやマウスなどの他の動物卵や、さらには酵母から哺乳類に至る体細胞のM期にも存在すると判明した。それにより MPF は、1980 年代初頭に略称は同じままで、真核細胞に普遍的なM期誘起因子 (M-phase promoting factor、M期促進因子) へと変容した。さらに、1980 年代末には、カエル卵 MPF が精製され、cyclin B-Cdk1/Cdc2 が主成分であることが示されるに至った。この発見は、20 世紀末の細胞周期研究のビッグバンの引き金となり、2001 年のノーベル医学生理学賞の主要因ともなった。こうした経過から、今日では、MPF と cyclin B-Cdk1 を同義とするのが通念である。

(2) しかし、そうは言い切れないとの思いを、研究代表者は長年抱いてきた。カエル卵 MPF の命名実験と同様の細胞質移植は、ヒトデ卵でも成り立つ (Kishimoto & Kanatani, 1976) (図 1)。しかしこの場合、donor 卵 (供与卵) において核 (卵核胞; germinal vesicle, GV) をあらかじめ除去しておく、cyclin B-Cdk1 は普通に活性化しても MPF は検出できず、核内容物をもどすと MPF が検出できるようになる

(Kishimoto et al., 1981)。この事実は、MPF と cyclin B-Cdk1 は同義ではなく (Okumura et al., 1996)、「MPF = cyclin B-Cdk1 + 核内因子」であることを示している。しかし、この MPF に必須の“核内因子”の分子実体は不明のままであり、その解明は 20 余年にわたって棚上げ状態となっていた。

(3) それでは、MPF と cyclin B-Cdk1 の不一致の理由を解き明かす手掛りはどこにあるのであろうか? cyclin B-Cdk1 は単純にキナーゼ活性であるのに対し、MPF は、活性型 cyclin B-Cdk1 を含む細胞質を donor 細胞から他の細胞に移植した時に、その recipient 細胞 (被供与細胞) 中に元々存在していた不活性型 cyclin B-Cdk1 を活性化させる“能力”といえる。この自己活性化については、MPF ではその同定の当初から amplification と称されており

(Masui & Markert, 1971; Kishimoto & Kanatani, 1976)、cyclin B-Cdk1 の細胞内での活性化においても positive feedback が知られている。しかし、cyclin B-Cdk1 が cyclin B-Cdk1 を直接自己活性化するわけではなく、間には自己活性化に関与する制御分子が介在している。こうした cyclin B-Cdk1 の自己活性化に関わる

制御分子こそが、“核内因子”である可能性が考えられる。

(4) 近年、cyclin B-Cdk1 とともにM期制御に関わるキナーゼとして、Plk1、Aurora A と B (Aur)、Greatwall キナーゼ (Gwl; Yu et al., 2006)、MAPK の解析が急速に進んでいる。これらのM期キナーゼは、M期の実現 (紡錘体の形成、染色体の分離・分配など) に機能するだけでなく、cyclin B-Cdk1 の活性化やその positive feedback に関わることが、詳細は不明とはいえ、確かになりつつある。こうしたM期キナーゼについての知見の集積は、“核内因子”と cyclin B-Cdk1 の自己活性化制御分子とに密接な関係を予想したとき、MPF と cyclin B-Cdk1 の不一致問題を分子レベルで落着させるための機がようやく熟したことを意味している。

2. 研究の目的

本計画では、MPF と cyclin B-Cdk1 との不一致が何に由来するのかを明らかにし、「MPF 問題」に決着をつけることを目的とした。そのために、まずは、cyclin B-Cdk1 以外で MPF に必須の“核内因子”の分子本体を突きとめて、MPF の分子実体を確定することを目指した。それにあたっては、M期キナーゼ (Plk1、Aur、Gwl、MAPK) との関連を手掛かりとした。次に、その分子実体の判明した“核内因子”が、MPF としての機能と役割をいかにして発揮するのかの解明を目指した。これらにより、往年の懸案を落着させるとともに、M期開始機構についての認識を刷新することを目論んだ。なお、Gwl は核タンパク質であるとの報告にもとづき、想定したゴールは「MPF = cyclin B-Cdk1 + Gwl」である。

3. 研究の方法

(1) 実験系としては、研究代表者らが従来から活用しているイトマキヒトデ卵を主材料とし、アフリカツメガエル卵を併用した。特にヒトデ卵は、研究代表者らによる長年の研究の蓄積により、細胞外刺激 (卵成熟誘起ホルモン、1-MeAde) から cyclin B-Cdk1 の活性化に至る分子経路が最も解明されている実験系の一つであり、そのため解析の道具・方法もそろっている。ヒトデ卵では 1-MeAde シグナルのもとに cyclin B-Cdk1、Plk1、Aur、Gwl が活性化し、それとほぼ同時に核膜崩壊が起こるが、これらの全ては新規のタンパク質合成を必要としない。このことは、既存のタンパク質の分子修飾で解釈できることを意味している。しかもヒトデ卵成熟開始時においては、cyclin A と Wee1 はタンパク質としては存在せず、関与しない。

(2) 現在の通念ではMPFと cyclin B-Cdk1は同義とされているので、どちらの活性も、cyclin B-Cdk1がhistone H1をリン酸化する活性 (H1キナーゼ活性) で表示されるのが通例である。しかしMPFは、元来、“卵成熟誘起ホルモン処理を受けた卵の細胞質中において、それを未成熟卵内に移植した場合、卵成熟誘起ホルモンの処理なしに卵成熟を誘起する活性”として同定・命名されたものである(図1)。そこで本研究では、cyclin B-Cdk1の活性はH1キナーゼ活性として検出する一方、MPF活性は未成熟卵内に微小注射して卵成熟を誘起する(核膜崩壊と、その後の分裂中期への進行をもたらす)活性として検出(MPF assayと省略; 図1参照)した。これにより、MPF活性とcyclin B-Cdk1活性とを峻別し、定量的に比較することが可能となった。

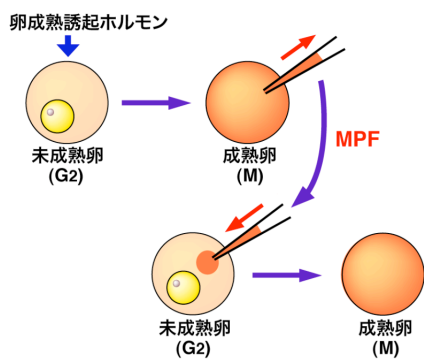


図1. MPF活性の検出

4. 研究成果

(1) まず、M期キナーゼのうちのPlk1、Aur、MAPKについて、これらの活性を抑制してもMPF活性が検出できる(MPF assay; 図1参照)ことを示し、MPFの要素としては必須ではないことを明らかにした。

(2) ヒトデのGwlのcDNAをクローン化し、抗体を作製して解析した結果、ヒトデ卵においては、Gwlは核内(GV中)に局在し、M期開始に際してcyclin B-Cdk1の下流で活性化すると判明した。これらの事実は、GwlがMPFに必須の“核内因子”である可能性は、追求するに値することを支持している。

(3) そこで、Gwlの組換えタンパク質を作製し、ヒトデ除核卵に注入してからM期の開始を誘起すると、MPF assayにおいて、MPF活性は回復して検出されるようになった。逆に、Gwlの活性中和抗体を作製し、それを正常に核(GV)をもつヒトデ卵に注入してからM期の開始を誘起すると、cyclin B-Cdk1は正常に活性化するにも拘わらず、MPF活性は検出できなかった。これらの結果は、MPFに必須の“核内因子”としてGwlが必要かつ十分であることを示しており、「MPF = cyclin B-Cdk1 + Gwl」

という結論に至った(図2)。

(4) しかし、精製cyclin B-Cdk1だけの微小注射でも核膜崩壊を誘起できる(MPF assayにおいて“MPF活性”を検出できる)のは、周知の事実である。ところが、ヒトデ未成熟卵を用いて、MPF活性に必要なcyclin B-Cdk1活性(つまりH1キナーゼ活性)を定量比較したところ、精製cyclin B-Cdk1だけでは、細胞質移植(図1参照)に比べて1ケタ高い活性が必要である; しかし、精製cyclin B-Cdk1に生理的な濃度のGwlを加えると、必要なcyclin B-Cdk1活性量が1ケタ下がり、ほぼ細胞質移植のレベルとなった。

同様の定量的解析をカエル未成熟卵を用いて実施したところ、この卵ではGwlは細胞質局在であるにも拘わらず、Gwlはやはり、MPF assayに必要なcyclin B-Cdk1活性量を細胞質移植のレベルに減少させた。

本研究の実施と並行して、他の研究者により、cyclin B-Cdk1がGwlを直接活性化する; Gwlによってリン酸化されたEnsa/Arpp19は、PP2A-B55に結合してその活性を抑制する; これにより、cyclin B-Cdk1の自己活性化が促進されることが明らかにされた(Mochida et al., 2010; Gharbi-Ayachi et al., 2010等)。この事実を考慮すると、Gwlは、PP2A-B55の抑制を介したcyclin B-Cdk1の自己活性化の促進により、MPFに必要なcyclin B-Cdk1活性量を低下させていると考えられる。

つまりMPFは、M期を誘起するcyclin B-Cdk1と、その作用に拮抗するフォスファターゼを抑制するGwlとの、2つのキナーゼからなるfunctional entityといえる(図2)。

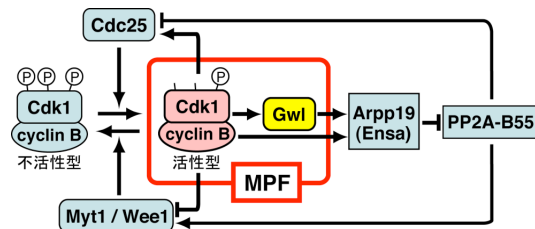


図2. MPFはcyclin B-Cdk1とGwlで構成される

(5) では、MPFにおいて、Gwlがcyclin B-Cdk1の必要量を下げる必然性はどこにあるのであろうか? 核膜崩壊後のM期の進行を解析した結果、Gwlなしで高レベルのcyclin B-Cdk1(内在性活性に比べて、微小注射標品としてはx10; 被注入細胞内ではx2の高レベル)によってG2/M期移行を誘起した場合は、核膜崩壊は起こっても、分裂期紡錘体は正常に形成されない; ところが、Gwlがcyclin B-Cdk1の必要量を下げると、分裂期紡錘体も正常に形成できるようになる、ことが判明した。この

事実は、MPFにおけるGwlの必要性について、生理的意義を示すものである。

(6) 他方、ヒトデ無核卵では、Gwlが存在しない（つまり、上記(4)で述べたGwl—Ensa/Arpp19—PP2A-B55経路が機能しない）にも拘わらず、cyclin B-Cdk1は正常に活性化される。その理由を解析したところ、cyclin B-Cdk1はArpp19を直接リン酸化し（部位はGwlとは異なる）、それだけでPP2A-B55が抑制されることが判明した（図2）。しかし、Arpp19は、そのリン酸化がcyclin B-Cdk1単独の場合よりは、cyclin B-Cdk1とGwlの両者による場合の方が、PP2A-B55の抑制能が高かった。この差が、GwlがMPF活性に貢献している原因の一つと考えられる。

(7) ところがヒトデ卵において、Gwl活性の抑制下でcyclin B-Cdk1が活性化した場合は、核膜崩壊はほぼ正常なタイミングで起こっても、その後の染色体の分離・分配が異常になると判明した。その原因としては、PP2A-B55の不十分な抑制と、Ensa/Arpp19以外にGwlの新規標的が存在する可能性の両方が考えられる。

以上を要約すると、M期の司令塔分子はcyclin B-Cdk1であることは確かであるが、当初の定義（図1）にもとづくMPFの構成分子は、cyclin B-Cdk1だけでは不十分で、Gwlもまた不可欠であると結論される（図2）。その生理的意義としては、Gwlが共存することによってはじめて、M期を誘起するのに必要なcyclin B-Cdk1活性量を下げることができ、その結果、分裂期紡錘体が正常に形成され、染色体の分離分配が正常に起こるのが保障されることとなる。

こうして、本研究により、往年の「MPF問題」を落着させることができたといえる。願わくば、「MPFとcyclin B-Cdk1とは同義である」とする通念について、再考を促したい。まさに“過ぎたるは及ばざるが如し”であり、本研究の展開は、定量的解析と生理的意義の追求の重要性をあらためて示すものである。

なお、(1)-(5)の成果はまとめてNat. Commun. (2012)に、(6)(7)の成果はまとめてJ. Cell Biol. (2014)に、論文として公表した。

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11件；全て査読有）

① Okumura, E., Morita, A., Wakai, M., Mochida, S., Hara, M., and Kishimoto, T. (2014). Cyclin B-Cdk1 inhibits protein phosphatase PP2A-B55 via a Greatwall kinase-independent mechanism. *J. Cell Biol.*, 204, 881-889.

② Ucar, H., Tachibana, K., and Kishimoto, T. (2013). The Mos-MAPK pathway regulates Diaphanous-related formin activity to drive cleavage furrow closure during polar body extrusion in starfish oocytes. *J. Cell Sci.*, 126, 5153-5165.

③ Hara, M., Abe, Y., Tanaka, T., Yamamoto, T., Okumura, E., and Kishimoto, T. (2012). Greatwall kinase and cyclin B-Cdk1 are both critical constituents of M-phase promoting factor. *Nat. Commun.*, 3:1059, doi: 10.1038/ncomms2062.

④ Hiraoka, D., Okumura, E., and Kishimoto, T. (2011). Turn motif phosphorylation negatively regulates activation loop phosphorylation in Akt. *Oncogene*, 30, 4487-4497.

⑤ Kishimoto, T. (2011). A primer on meiotic resumption in starfish oocytes: The proposed signaling pathway triggered by maturation-inducing hormone (Short Note). *Mol. Reprod. Dev.*, 78, 704-707.

⑥ Abe, Y., Okumura, E., Hosoya, T., Hirota, T., and Kishimoto, T. (2010). A single starfish Aurora kinase performs the combined functions of Aurora-A and Aurora-B in human cells. *J. Cell Sci.*, 123, 3978-3988.

⑦ 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.

⑧ 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.

〔学会発表〕（計45件）

① 岸本健雄. 卵細胞周期の制御機構：MPFの再考（Plenary Lecture）. 第65回日本細胞生物学会大会、ウイנקあいち（愛知県産業労働センター）、2013/6/19-21.

② Kishimoto, T. Starfish oocyte maturation (Key Note Talk). EMBO Workshop on “Oocyte Maturation and Fertilization: Lessons from Canonical and Emerging Models”, Banyuls-sur-Mer, France, 2013/6/12-15.

③ 岸本健雄. 再考MPF:MPFはcyclin B-Cdc2キナーゼとGreatwallキナーゼからなる（招待講演）. 第83回日本動物学会大会シンポジウム「MPFとCSFの発見から40年 卵成熟再

訪」、大阪大学、2012 / 9 / 13-15.

④ Hara, M., Abe, Y., Tanaka, T., Okumura, E., Kishimoto, T. Greatwall kinase and cyclin B-Cdk1 are both critical constituents of MPF. 第34回日本分子生物学会年会ワークショップ “To the comprehensive view of cell division mechanism in terms of balance control”, パシフィコ横浜、2011 / 12 / 13-16.

⑤ Kishimoto, T. Greatwall kinase is an essential component of MPF. The 15th European Cell Cycle Conference & EMBO Workshop “Exploring the Logic of the Cell Cycle”, Montpellier, France, 2011 / 9 / 2-5.

⑥ Kishimoto, T. Cooperation of Greatwall kinase with cyclin B-Cdk1 in starfish oocytes (Invited Talk). The 6th UK-Japan Cell Cycle Workshop, Ambleside, UK, 2011 / 4 / 11-13.

⑦ 岸本健雄. 細胞周期制御—卵細胞からみる—. 日本学術会議・第4回形態科学シンポジウム「生命機能の発現と制御」. 北大医学部学友会館フラテ、札幌、2010 / 11 / 4.

⑧ Kishimoto, T. The Cell Cycle Control: Lessons from Starfish Oocytes (Key Note Talk for The Gregor Johann Mendel Honorary Medal). Czech-Japan Joint Symposium for “Animal Reproduction: From Gametes to Stem Cells”, Castle Liblice, Czech Republic, 2010 / 9 / 20-21.

⑨ Kishimoto, T. Signaling pathway leading to meiotic maturation in starfish oocytes (Invited Talk). FHL International Symposium on “Mechanisms of Egg Maturation and Fertilization: From Sea to Land”, Friday Harbor Laboratories, USA, 2010 / 9 / 10-12.

⑩ 岸本健雄. 卵細胞における細胞周期の調節機構 (特別講演). 日本生殖再生医学会第5回学術集会. 砂防会館、東京、2010 / 2 / 21.

⑪ Kishimoto, T. Dual lock for cell cycle arrest in unfertilized mature starfish eggs (Invited Talk). Les Treilles Conference “Meiotic Division in Oocytes”, Les Treilles, France, 2009 / 6 / 22-27.

[図書] (計9件)

① Okumura, E., Hara, M., and Kishimoto, T. (2014). Antibody inhibition of protein activity in starfish oocytes. In “Developmental Biology of the Sea Urchin and other Marine Invertebrates” (Carroll, D. and Stricker, S.A., eds.). *Methods in Mol. Biol.*, vol. 1128, Chap. 21, pp. 311-330, Springer Science+Business Media, New York. (total pp.347)

② 岸本健雄 (2013). オーバービュー：細胞

周期研究の歴史と生命現象解明への展開。「ヒトと医学のステージへ拡大する細胞周期 2013：がん治療と生命現象の解明をめざして」(中山敬一編)、実験医学 (増刊号)、31、144-153.

③ 立花和則、岸本健雄 (2011). 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)、第VII章-29、pp.312-328、京都大学出版会.

④ Nishiyama, T., Tachibana, K., and Kishimoto, T. (2010). Cytostatic arrest: Post-ovulation arrest until fertilization in metazoan oocytes. In “*Oogenesis: The Universal Process*” (Verlhac, M.H. and Villeneuve, A., eds.), Chap. 14, pp. 357-384, Wiley-Blackwell, UK.

⑤ 佐方功幸、稲垣昌樹、岸本健雄 (編集) (2010). 「細胞周期フロンティア」. pp.252、共立出版.

[その他]

アウトリーチ活動

公開講演会「国民との科学・技術対話」(東工大・総合プロジェクト支援センター・社会人教育院が実施)「東工大の最先端研究」において、「細胞をコピーする」と題して講演 (東工大・田町キャンパス、2012 / 3 / 16)。

ホームページ

東工大・生命理工・立花研究室 (その中で岸本名誉教授として表示)

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

(平成25年3月までは東京工業大学・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

奥村 英一 (OKUMURA, Eiichi)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教

研究者番号：00323808

(平成25年3月までは連携研究者)

(3) 連携研究者

立花 和則 (TACHIBANA, Kazunori)

東京工業大学・バイオ研究基盤支援総合センター・准教授

研究者番号：60212031