

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22380147

研究課題名(和文) 哺乳類成長途上卵の有効利用を目指した発生能獲得の分子メカニズム解明に関する研究

研究課題名(英文) Studies for molecular mechanism of meiotic-competence-acquisition in porcine growing oocytes

研究代表者

内藤 邦彦 (Naito, Kunihiko)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：20188858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,200,000円、(間接経費) 4,560,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の成長途上の卵母細胞は、直径が完全成長卵の90%に達していても減数分裂誘起に作用するCDC2が活性化せず成熟分裂を起こせない。本研究ではこの原因を分子レベルで明らかにすることを目的とし、ブタの卵母細胞をモデルに検討を行った。

その結果、ブタ成長途上卵ではCDC2の不足とPKAの局在制御を介したCDC2活性の抑制という2つの機構により減数分裂を再開しないことが明らかとなった。また成長卵と成長途上卵とではPKAの局在制御に機能するAKAPやPKA-Rが異なる可能性が示され、卵成長過程でPKAの制御機構が切り替わるからこそ減数分裂能獲得の本質であるという全く新しい知見を見出すことができた。

研究成果の概要(英文)：Mammalian growing oocytes cannot resume CDC2-activity-mediated meiotic maturation, even if they are grown up to 90% of their final size. In the present study, the molecular mechanisms of this incompetence were analyzed using porcine oocytes.

As the results, it was revealed that porcine growing oocytes was inhibited their meiotic maturation by the two mechanisms, one was the insufficient CDC2 amount and the another one was the suppression of CDC2 activation by the regulation of PKA localization. In addition, the differences of PKA regulatory subunits (PKA-Rs) and A kinase anchoring proteins (AKAPs), which were involved in the control of PKA localization, were suggested between fully-grown and growing oocytes. I provided new insight that the change of PKA regulation mechanism during oocyte growth phase was the principle for the acquisition of meiotic competence in mammalian growing oocytes.

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：応用動物 遺伝子 畜産学 成長途上卵 発生能

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の卵母細胞は、第一減数分裂前期で分裂を停止した状態で、卵巣内でその体積を大きく増加させる。この間に減数分裂の進行や受精・発生に必要な母性 mRNA やタンパク質を蓄積し、この過程は卵成長と呼ばれる。卵成長を終えた卵母細胞(成長卵)は、ホルモン刺激や体外培養により減数分裂を再開し、第二減数分裂中期まで分裂を進行させ受精可能となる。しかし卵成長の途中にある卵母細胞(成長途上卵)は、たとえその直径が成長卵の 90%に達していても減数分裂を再開することができない。したがって卵成長の過程で減数分裂再開の能力(減数分裂能)を獲得することは自明である。

一般に卵成熟前の卵母細胞内においては cAMP の濃度が高く維持されており、その濃度が下がることにより cAMP 依存性タンパク質リン酸化酵素(cAMP-dependent Protein Kinase: PKA)の活性が低下し、PKA の活性低下が細胞周期に関連する因子のタンパク質リン酸化酵素である成熟促進因子(Maturation promoting factor: MPF)活性の上昇を誘導し、減数分裂が再開するとされている。

成長途上卵では、ホルモン刺激や体外培養をしても MPF 活性化が起こらないことが、減数分裂が再開しないことの直接の原因である。しかし、成長途上卵にも MPF の構成因子である CDC2 と Cyclin B は少ないながら存在しており、これを薬剤処理で強制的に活性化すれば、ある程度は減数分裂を再開することが報告されている。では成長途上卵で MPF が活性化しないことの成長卵との本質的な違いが何なのか、その詳細な分子機構は不明であり、十分な検討はなされていない。

2. 研究の目的

本研究では、これまで十分に解析されていない成長卵と成長途上卵の減数分裂能の相違の本質的な原因となる分子機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

屠場より購入したブタ卵巣よりブタ成長卵(直径 2~5mm の卵胞より吸引採取)と成長途上卵(卵巣を 1~2mm にスライスし直径 0.4~1.0mm 未満の卵胞より採取した直径 95~105 μ m の卵母細胞)を採取する。これらを成熟培地(TYH+20%卵胞液+1IU/ml PMSG)中で 48 時間体外成熟培養した後に、卵の染色体を観察して減数分裂能の有無を判定する実験系を基本とする。

本実験では減数分裂能を左右する本質的な分子機構として PKA の活性と局在制御が重要であることが判明し、PKA 活性を持つ触媒サブユニット(PKA-C)と、PKA-C の活性と局在を制御する PKA の制御サブユニット(PKA-R)である PKA-R1 と PKA-R2 をブタ卵の total RNA より RT-PCR を用いて

クローニングした。PKA 活性は信頼できる測定系が存在しなかったため、PKA-R2 の自己リン酸化部位をクローニングして基質とした測定系を開発した。また PKA-R の局在は EGFP および FLAG タグとの融合タンパク質を発現させ EGFP 蛍光および蛍光免疫染色により解析した。さらに PKA の局在を制御する A キナーゼアンカータンパク質(AKAP)として AKAP1, 2, 3, 4, 5, 7 α , 7 γ , 8, 10, 13, EZRIN, WAVE1 の 12 種のクローニングを試みた。AKAP の同定には PKA-R2 の部分配列に GST タグを付加した分子をプローブとした Far-western blot 法を開発し、同定に成功した AKAP1, 5, 7 α について解析を行った。

解析方法としては PKA-C や PKA-R の発現制御による PKA 活性の変化と、同定した AKAP の発現制御による PKA の局在変化を成長卵と成長途上卵で比較し、減数分裂能に影響する因子とその機能を調べた。

4. 研究成果

(1)ブタ成長途上卵の MPF と MPF 活性制御因子の機能

成長途上卵では、減数分裂の再開を制御する MPF や、減数分裂の再開に関連する MOS を最上流とする MAPK カスケードの活性化が起こらないことや、活性化に必要な構成因子の不足が確認された。そこで in vitro で合成した MPF 構成要素の CDC2 と Cyclin B、MAPK 最上流の MOS の mRNA を成長途上卵の細胞質に注入し、これらの強制発現を行った。その結果、CDC2 を発現させた場合のみ減数分裂の再開が誘起され、MOS や Cyclin B では誘起されなかった。したがって、CDC2 の不足が減数分裂を再開しない一因であることが示された(図 1)。

しかし、CDC2 を強制発現した場合でも減数分裂再開率が成長卵と比較し低かったことから、その他の要因が存在すると考えられた。そこで次に MPF 活性制御に重要である CDC2 のリン酸化に着目し、抑制的リン酸化部位の脱リン酸化酵素 CDC25B の mRNA 注入による強制発現やリン酸化酵素 WEE1B、MYT1 のアンチセンス RNA 注入による発現抑制を行った。その結果、CDC25B の強制発現と WEE1B の発現抑制で減数分裂再開が誘起され、MYT1 の発現抑制では誘起されなかった。さらに CDC2 強制発現と CDC25B 強制発現、もしくは WEE1B 発現抑制を同時に行うと成長卵に匹敵する減数分裂再開率が得られた(図 1)。

以上から、ブタ成長途上卵では MPF の構成因子である CDC2 が不足すること、およびその抑制的リン酸化という 2 つの要素により、減数分裂の再開が積極的に抑制されていることが示された。

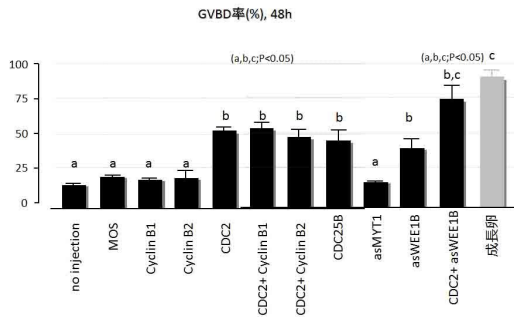


図 1. 成長途上卵への発現制御による減数分裂能への影響

(2) プタ成長途上卵の PKA 活性とその制御機構

CDC25B や WEE1B はいずれも cAMP 依存性タンパク質リン酸化酵素(PKA)によって活性を制御されることが知られており、(1)の結果は、成長卵ならば減数分裂再開時に低下する cAMP 濃度や PKA 活性が、成長途上卵では低下せずに維持されていることを示唆している。そこで成長途上卵の cAMP 濃度と PKA 活性を測定した結果、cAMP 濃度は成長卵と同様に低下したのに対して、PKA 活性は低下せず維持されたままであった。さらに、成長途上卵の PKA 活性を阻害したところ減数分裂の再開が誘起され、これと CDC2 強制発現を同時に行うと成長卵に匹敵する高い減数分裂再開率が得られた。この結果は(1)の結果とよく一致しており、CDC2 の抑制的リン酸化による減数分裂再開の抑制は、成長卵では cAMP 依存的に低下する PKA 活性が、成長途上卵では cAMP 非依存的に維持されるためであり、卵成長の段階によって PKA 活性制御機構が異なることを示唆している (図 2)。

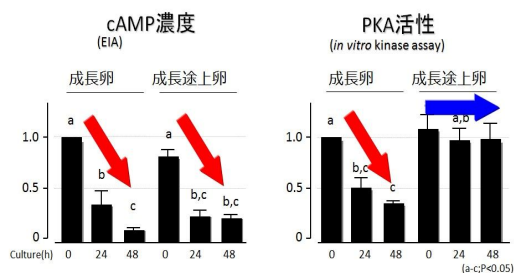


図 2. 卵胞より単離後の成長卵と成長途上卵の cAMP 濃度と PKA 活性の変化

そこで次に成長途上卵が cAMP 非依存的に PKA 活性をもつ原因を検討した。PKA は活性を持つ PKA-C とこれに結合してその活性抑制や局在制御を行う PKA-R によって構成される。PKA-R の機能は一般的には cAMP 濃度によって変化するため、PKA-R の発現

不足は cAMP 非依存的な PKA 活性化、および局在異常を起すと考えられる。そこでまず PKA 活性維持の原因が PKA-R の不足による可能性を考え、PKA-R1、PKA-R2 をクローニングし、これらの機能を成長卵で確認した後に成長途上卵に強制発現を行った。しかしどちらの強制発現によっても PKA 活性の低下や減数分裂再開は認められず、PKA-R の不足が PKA 活性維持の原因ではないことが示された (図 3)。

R1/R2の成長途上卵への強制発現

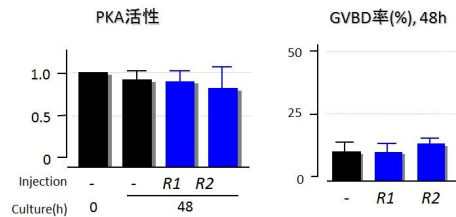


図 3. PKA 制御サブユニットの成長途上卵への強制発現による減数分裂能への効果

一方、PKA の局在異常が cAMP の応答性や PKA 活性の変化を誘起することが知られている。そこで続いて PKA-EGFP 融合タンパク質の発現による局在解析を行った。その結果、成長卵では、減数分裂再開前には細胞質に局在していた PKA-C が PKA-R2 と共に減数分裂再開直前に核内に移行した。これに対し、成長途上卵ではこのような変化は確認されず、細胞質に局在し続けていた。そこで成長途上卵の PKA-R2 を強制的に核に移入させたが、減数分裂の再開に影響はなかった。一方で PKA-R1 の強制核移入では減数分裂再開が誘起され、成長卵と成長途上卵では PKA-C の制御に機能している PKA-R が異なっていることが示唆された (図 4)。

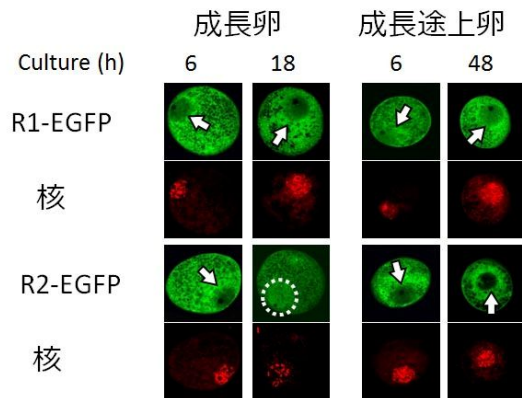


図 4. 成長卵と成長途上卵の成熟培養における PKA の細胞内局在の変化

以上より、ブタ成長途上卵の減数分裂再開は cAMP 非依存的な PKA 活性によって抑制されるが、この活性は制御サブユニットの不足によるものではなく、機能する PKA-R やその局在制御が卵成長の段階によって異なることに起因することが示唆された。

(3) ブタ成長途上卵における AKAP の発現と機能

PKA はそれ自体に局在シグナルを持たず、PKA-R に結合するアンカータンパク質 (AKAP) によって局在が制御される。そこで成長卵と成長途上卵の PKA 制御や減数分裂能の相違には AKAP の相違が関与していると考えた。AKAP は 50 種以上が存在し、それぞれ固有の局在を示すが、ブタ卵母細胞に発現する AKAP は不明である。そこで、まず Far western blotting 法を応用してブタ卵母細胞に発現する AKAP を網羅的に検出し、それらによる PKA 活性や局在の制御、及び減数分裂再開における機能について解析した。検出された複数種の AKAP の分子量から予測される AKAP 遺伝子をクローニングし、ブタ卵母細胞に発現する AKAP として AKAP1、AKAP5、AKAP7 α の 3 種を同定した (図 5)。

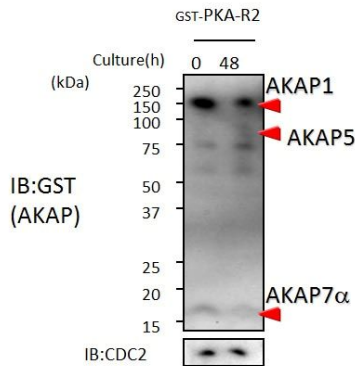


図 5. ブタ卵に発現する AKAP の同定

これらの機能を解析するため、先ず PKA 活性を高め減数分裂再開を抑制した成長卵に対し各 AKAP の発現抑制を行った結果、AKAP5 を抑制した場合にのみ減数分裂を再開することが明らかとなった。成長途上卵に対し同様に各 AKAP の発現抑制を行った場合には、AKAP5 に加えて AKAP7 α を抑制した場合に減数分裂が再開した (図 6)。

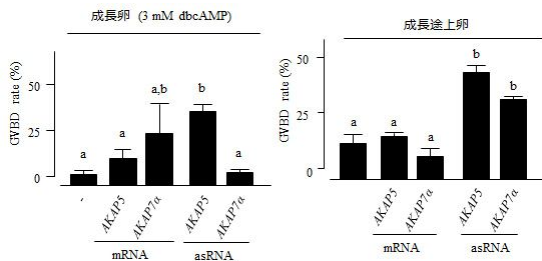


図 6. 成長卵と成長途上卵の APAK 発現抑制による減数分裂能への影響

この時、減数分裂が再開した実験区においてのみ成長卵では PKA-R2 の核内への移入が早期に誘起されており、APAP5 が PKA の細胞質局在を制御することが示された (図 7A)。一方、成長途上卵では PKA-R1 がこれら AKAP の抑制によって核内にも存在するようになった (図 7B)。

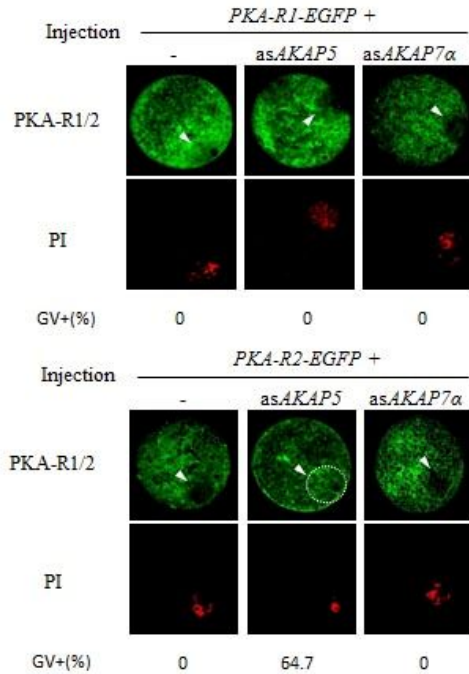


図 7A. 成長卵の AKAP 発現抑制による PKA 局在の変化

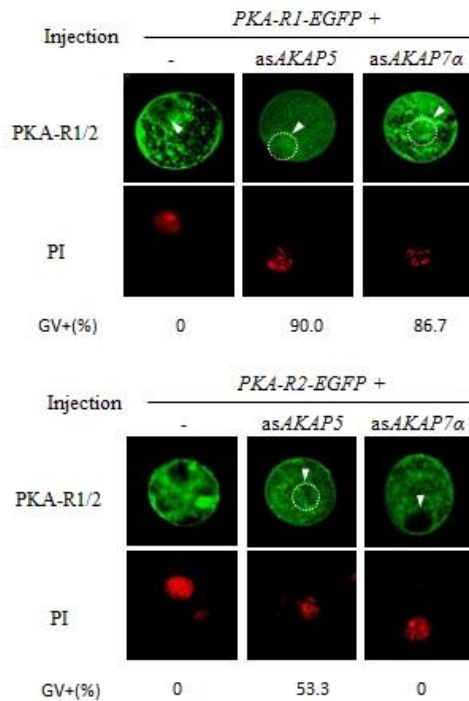


図 7B. 成長途上卵の AKAP 発現抑制による PKA 局在の変化

以上から、成長卵では AKAP5 による PKA-R2 の細胞質局在制御を介して減数分裂の再開が抑制されること、また成長途上卵では AKAP5 に加えて AKAP7 α が、PKA-R1 の細胞質局在を制御して減数分裂再開を抑制していることが示唆された。これらの結果は酵素活性を持つ PKA-C の局在を制御する PKA-R が成長段階によって異なるという(2)の結果を支持している。これらの PKA-R は PKA-C と結合することで減数分裂再開を抑制していると考えられたため、各 PKA-R の機能阻害を行ったところ、成長卵では PKA-R2、成長途上卵では PKA-R1 を特異的に阻害したときに減数分裂が再開した。

以上の結果は、成長卵と成長途上卵とで機能する AKAP や PKA-R が異なり、この違いこそが成長段階による PKA の活性や局在の相異の原因であり、成長途上卵が減数分裂を再開できない原因であると考えられた。

(4) 総括

本研究より、ブタ成長途上卵では CDC2 の不足と PKA 機能の制御に伴う CDC2 活性の抑制という 2 つの MPF 抑制により減数分裂を再開しないことが明らかとなった。生理的には卵成長の過程で予期しない減数分裂の再開が起こってしまうことを、2 つの MPF 抑制機構で強力に抑制していると考えられる。また成長卵と成長途上卵とでは PKA の局在に機能する AKAP や PKA-R が異なる可能性が示され、卵成長過程で PKA の制御機構が切り替わることが示唆された。以上本研究によって、「CDC2 発現の増加や機能する PKA/AKAP の切り替えこそが、ブタ卵成長の減数分裂能獲得の本質である」という全く新しい知見を見出すことができた。

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 6 件)

Nishimura T, Fujii W, Sugiura K, Naito K. Cytoplasmic Anchoring of cAMP-Dependent Protein Kinase (PKA) by A-Kinase Anchor Proteins (AKAPs) Is Required for Meiotic Arrest of Porcine Full-Grown and Growing Oocytes. *Biol Reprod*, 査読有, 2014, 90, 43:1-10.
doi: 10.1095/biolreprod.113.114736.

Nishimura T, Sugiura K, Naito K. A-kinase anchor protein 1 (AKAP1) regulates cAMP-dependent protein kinase (PKA) localization and is involved in meiotic maturation of porcine oocytes. *Biol Reprod*, 査読有, 2013, 88, 85: 1-9.
doi: 10.1095/biolreprod.112.106351.

Nishimura T, Fujii W, Kano K, Sugiura K, and Naito K. Analyses of the involvement of PKA regulation mechanism in meiotic incompetence of porcine growing oocytes. *Biol Reprod*, 査読有, 2012, 87, 53: 1-8.
doi: 10.1095/biolreprod.112.101279.

Fujii W, Nishimura T, Kano K, Sugiura K, Naito K. CDK7 and CCNH are components of CDK-activating kinase and are required for meiotic progression of porcine oocytes. *Biol Reprod*, 査読有, 2011, 85: 1124-1132.
doi: 10.1095/biolreprod.111.091801.

Egashira A, Kano K, Naito K. Preimplantation-embryo-specific cell-cycle regulation is attributable to a low expression of retinoblastoma protein rather than its phosphorylation. *J Reprod Dev*, 査読有, 2011, 57: 492-499.
doi: 10.1262/jrd.10-1700

Shimaoka T, Nishimura T, Kano K, Naito K. Analyses of the regulatory mechanism of porcine Wee1B: The phosphorylation sites of porcine WEE1B and mouse WEE1B are different. *J Reprod Dev*, 査読有, 2011, 57: 223-228
doi: 10.1262/jrd.2013-119

[学会発表](計 12 件)

西村 鷹則・鈴木 真理・杉浦 幸二・内藤 邦彦 : ブタ卵成熟における MASTL の機能解析 : 第 116 回日本畜産学会 : 2013 年 3 月 27-30 日

藤井 渉、西村 鷹則、加納 聖、杉浦 幸二、内藤 邦彦 : ブタ卵成熟過程における CDC2 161 番スレオニンのリン酸化制御機構 : 第 105 回日本繁殖生物学会 : 2012 年 9 月 5-8 日

西村 鷹則・杉浦 幸二・内藤 邦彦 : ブタ卵成熟における CDC25 の機能解析 : 第 105 回日本繁殖生物学会 : 2012 年 9 月 5-8 日

Fujii W, Nishimura T, Kano K, Koji Sugiura, K Naito K. The regulation mechanism of phosphorylation of CDC2 threonine 161 during porcine oocyte maturation. *45th SSR Annual Meeting*, 2012 年 8 月 12-15 日(Win the award for 2012 Animal Reproduction in Agriculture Research Fellowship, and a special "Regional Abstract Award")

西村 鷹則・杉浦 幸二・内藤 邦彦 : ブタ卵母細胞の減数分裂における AKAP の機

能解析:第12回東京大学生命科学シンポジウム:2012年6月30日

西村 鷹則・藤井 渉・杉浦 幸二・内藤 邦彦:AKAP-5・AKAP-7 の抑制がブタ成長途上卵の減数分裂を誘起する:第115回日本畜産学会:2012年3月28日(優秀発表賞受賞)

Nishimura T, Fujii W, Kano K, Sugiura K, Naito K. Involvement of PKA and AKAP in Meiotic Competence of Porcine Growing Oocytes. *2nd World Congress Reproductive Biology*, 2011年10月9-11日

西村鷹則・藤井 渉・加納 聖・杉浦幸二・内藤邦彦:ブタ卵母細胞におけるA-kinase anchoring protein (AKAP)の発現と機能:第52回日本哺乳動物卵子学会:2011年5月21日(学術奨励賞口演部門受賞)

西村 鷹則・加納 聖・杉浦 幸二・内藤 邦彦:ブタ卵母細胞における減数分裂再開能とPKA局在制御機構の関与:第11回東京大学生命科学シンポジウム:2011年5月1日

西村 鷹則・藤井 渉・加納 聖・内藤 邦彦:ブタ未成長卵の減数分裂再開能におけるPKA活性制御機構の関与:第103回日本繁殖生物学会:2010年9月2-4日(優秀発表賞受賞)

藤井 渉・西村鷹則・加納 聖・内藤 邦彦:ブタCdk活性化キナーゼ(CAK)の卵成熟過程における関与:第10回東京大学生命科学シンポジウム:2010年5月1日

西村鷹則・藤井 渉・加納 聖・内藤 邦彦:ブタ成長途上卵における減数分裂能欠損の分子機構:第10回東京大学生命科学シンポジウム:2010年5月1日

〔図書〕(計3件)

内藤邦彦:受精と初期発生:日本繁殖生物学会編、繁殖生物学:インターズー、東京:207-221(2013).

内藤邦彦、藤井 渉、西村鷹則:卵子の生物学的評価;日本哺乳動物卵子学会編、生命の誕生に向けて:近代出版、東京:56-60(2011).

内藤邦彦:初期胚発生と胚の初期分化:佐藤英明編、新動物生殖学:朝倉書店、東京:105-119(2011).

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

内藤 邦彦(Naito Kunihiko)
東京大学・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・新領域創成科学研究科・教授
研究者番号:20175160

千田 和広(Chida Kazuhiro)
東京大学・農学生命科学研究科・教授
研究者番号:00192188