

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：12611

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25291043

研究課題名(和文) 卵成熟誘起ホルモン刺激の受容と応答によるG2/M期移行の分子機構

研究課題名(英文) Meiotic G2/M-phase transition in response to 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&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) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：卵細胞では、卵成熟誘起ホルモンが卵表に作用することにより、卵内で細胞周期停止が解除されて分裂期が再開する。これを実現するための、卵細胞内情報伝達経路の解明を目指した。その結果、卵表中に存在する卵成熟誘起ホルモン結合タンパク質の分子実体を同定した。それとともに、卵成熟誘起ホルモン刺激が不十分の場合は、卵細胞内においてその情報をノイズとして未梢して自己鎮静化をはかるシステムが機能していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Immature oocytes arrest at the G2/M-phase border, and the maturation-inducing hormone stimulates release of this arrest via activation of cyclin B-Cdk1, the M-phase governor. Here we investigated the intracellular signal transduction mechanism underlying this release of the cell cycle arrest. We identified molecular components of the binding protein of the maturation-inducing hormone which is located on the oocyte surface. We further revealed the presence of the self-calming system that cancels the stimulus of insufficient levels of maturation-inducing hormone, leading to prevention of an unexpected activation of cyclin B-Cdk1.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞周期 ホルモン 分裂期 卵成熟 Cdk1 ホルモン受容体 細胞内情報伝達 閾値

## 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 期移行に相当しており、卵成熟誘起ホルモンの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。顕微鏡下ではまずは卵核胞崩壊 (germinal vesicle breakdown, GVBD; つまり核膜崩壊) として観察され、その下流でいわゆる卵成熟が起こり、卵細胞の分化が完了するとともに、その後受精した場合は胚発生を開始する。

(2) 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、cyclin B-Cdk1 の活性化に至るシグナル伝達経路において、最大かつ長年の missing link となっている。

(3) 他方、cyclin B-Cdk1 の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。しかし、それにも拘わらず、卵成熟誘起ホルモンを受容して cyclin B-Cdk1 の活性化に至るまでの応答経路の全容は、未だ不明である。特に、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、つまり、卵成熟誘起ホルモン閾値の設定機構については、未だいかなる動物種の卵細胞においても、解析は手つかずの状況にある。

(4) しかも、cyclin B-Cdk1 の活性化については、自己活性化経路 (autoregulatory loop) の存在が知られている。このことは、cyclin B-Cdk1 の活性化には、自己活性化経路を起動させるための初期活性化と、その後の自己活性化経路に依存した完全活性化との二段階があること; および、自己活性化経路を起動させるためには、初期活性化のレベルに閾値が存在する可能性を意味している。しかし、この点の解析は全くなされておらず、さらには、それが上記(3)で述べた卵成熟誘起ホルモンの閾値とどのようにリンクするのかは、未解明の課題とすら意識されていないといえる。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究では、成熟誘起ホルモンの受容から cyclin B-Cdk1 の活性化に至るまでの全経路を確定することを目指した。そのために、研究

代表者らがこれまで解析を蓄積してきたヒトデ卵を活用し、上記 1 の(2)~(4)、つまり、卵成熟誘起ホルモン受容体の分子実体と、cyclin B-Cdk1 活性化の閾値設定機構の解明を手掛かりとした。具体的には、以下の 2 点に焦点を絞った。

(2) ヒトデの卵成熟誘起ホルモンは、1-methyladenine (1-MeAde) である。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 (Kishimoto, MRD, 2011 に概説)。そこで本研究では、まず、卵表中にある 1-MeAde 結合タンパク質の実体を明らかにし、それに基づいて、1-MeAde 受容体を同定することを目指した。

(3) 1-MeAde 刺激後に卵内で cyclin B-Cdk1 の活性化に至る過程については、研究代表者らの解析により、主経路を把握できるまでに至っている (Kishimoto, MRD, 2011; Hara et al., Nat. Commun., 2012)。その鍵となる仲介分子は Akt/PKB であり (Okumura et al., Nat. Cell Biol., 2002)、主経路の全容は「1-MeAde による卵表受容体を介した G $\beta\gamma$  解離—PI3K 活性化—Akt 活性化—Cdc25 活性化と Myt1 抑制—cyclin B-Cdk1 初期活性化—Gwl (Greatwall キナーゼ) が PP2A-B55 を抑制することによる自己活性化経路を介した cyclin B-Cdk1 の完全活性化」(後述の図 3 参照) である。ヒトデ卵でのこれらの知見は、全動物卵を通じて最先端をいくものである。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) も、その後に自己活性化経路を起動させる閾値 (つまり cyclin B-Cdk1 を完全活性化させる閾値) も、説明できない状況にある。そこで本研究では、この二つの閾値設定には、未知の経路が関わると考え、その存在を明らかにしようとした。

## 3. 研究の方法

(1) 1-MeAde 結合タンパク質の単離・同定にあたっては、1-MeAde アフィニティービーズを作製して活用した (半田宏、和田忠士両博士との共同研究)。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。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、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った。

(2) 1-MeAde 刺激から cyclin B-Cdk1 活性化に至る経路の解析は、これまでは閾値以上の 1-MeAde 刺激に対するものである点に着目した。すなわち、閾値以下の 1-MeAde 刺激に対する応答が果たして検出できるのか、もしそうならそれがどのようなものであるのかを知ること、1-MeAde 刺激による cyclin B-Cdk1 活性化の閾値設定機構解明の出発点とした。

(3) cyclin B-Cdk1 自己活性化経路を起動させる閾値の解析にあたっては、ヒトデ無核卵(卵核胞除去卵)に着目した。すなわち、従来の知見では、この自己活性化経路は核内に局在する Gwl に依存するとされている。ところがヒトデ無核卵では、Gwl が存在しないにも拘わらず、この経路は正常に作動する。この事実は、Gwl 非依存性の自己活性化経路の存在を示唆しており、その実体解明をまずは目指した。

#### 4. 研究成果

(1) ヒトデ未成熟卵表層からの可溶化画分を 1-MeAde 固定化 FG ビーズを用いてアフィニティー精製したところ、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。しかも、これらは、ゲル濾過で挙動をともにした。従って、1-MeAde 結合タンパク質は、p97, p92, p42 からなる複合体であるとみなされる。

(2) p97, p92, p42 の部分アミノ酸配列 (合計 15 種) を決定し、それぞれの cDNA のクローニングを試みた。ところが、最終的には、終止コドンを含む全長約 5.4 kb の cDNA が 1 種だけ得られ、しかもその中には、p97, p92, p42 の全ての部分アミノ酸配列がコードされていた。この cDNA がコードするタンパク質は、Rendezvin (Rdz ; 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) のヒトデホモログであった。そこでさらに解析を進めた結果、まずは Rdz 全長をコードする mRNA が翻訳され、そのあと、Rdz タンパク質が二カ所、プロテアーゼ Furin によって切断されて p97, p92, p42 が産生されることが明らかとなった。

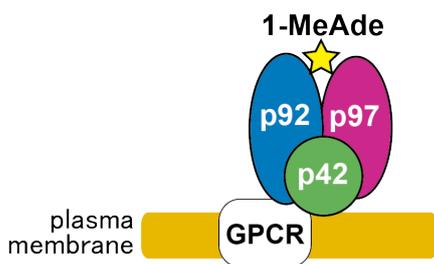


図 1. 1-MeAde 結合タンパク質複合体

(3) 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 解析をした結果、1-MeAde に結合するのは p97 と p92 であると判明した。

以上の(1)–(3)の結果は、1-MeAde 結合タンパク質は p97, p92, p42 複合体である；これらは、Rdz の翻訳後プロセッシング産物である；そのうちの p97 と p92 に 1-MeAde が結合することを示唆している (図 1)。しかし、1-MeAde 受容体は GPCR と想定されているにもかかわらず、Rdz 中には GPCR に特徴的な配列は見当たらず、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は、今後の検討課題となった。

(4) ヒトデ未成熟卵を閾値以下 (閾値よりわずかに低い濃度) の 1-MeAde で処理し、その際に、閾値以上の場合に cyclin B-Cdk1 の活性化に至る卵内情報伝達経路がどのように応答しているのかを追跡した。その結果、閾値以下の 1-MeAde 刺激によっても、Akt は閾値以上の刺激の場合とほぼ同レベルまで活性化する；それにより Cdc25 と Myt1 もリン酸化されて、一旦、cyclin B-Cdk1 は低レベルに活性化する；ところが、この低レベルの cyclin B-Cdk1 活性に依存して Cdc25 と Myt1 が脱リン酸化され、その結果、cyclin B-Cdk1 は不活性化状態に戻ることが判明した。

この事実は、閾値以下では 1-MeAde の効果は “noise” として抹消されるが、そのためには noise 抹消システムが存在する；その実体は、低レベルに活性化した cyclin B-Cdk1 がもたらす自己鎮静化 (self-calming) である；つまり、低活性 cyclin B-Cdk1 が未知のフォスファターゼ PPaseX を活性化し、自身の活性化に関わる Cdc25 と Myt1 を脱リン酸化して、自身を不活性化型に戻す (Cdk1-dependent negative feedback, Cdk-NF と命名) ことを示している (図 2)。

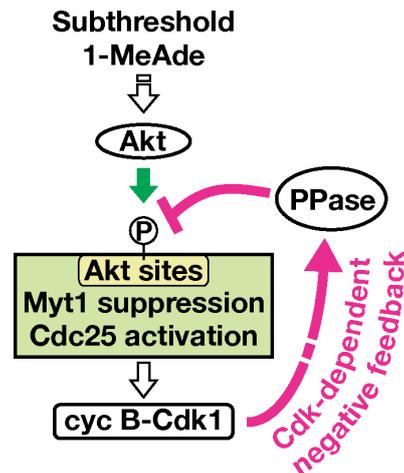


図 2. 閾値以下刺激でのノイズ抹消

(5) 他方、Gβγから、PI3K-PIP3-Akt 経路を介さずに、Akt によるリン酸化を促進する新規経路 (“atypical 経路”と命名) が存在する可能性が判明した。1-MeAde の閾値はこの atypical 経路と上述の Cdk-NF とのバランスで決まり、閾値以上では、前者が後者を乗り越える (override) ことが予想されるが、その証明は今後の課題である。

(6) ヒトデ無核卵では、Gwl が存在しないため、Gwl-Arpp19/Ensa-PP2A-B55 経路が機能しない。ところが、実際には、Gwl がなくても、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 が抑制されて、cyclin B-Cdk1 の自己活性化経路 (autoregulatory loop) が回りうることが判明した (図 3)。この自己活性化経路が起動することと、上述の 1-MeAde 刺激の閾値とがどのように連携 (couple) しているのかの解明は、今後の課題である。

### 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 4 件 ; 全て査読有)

① Kishimoto, T. (2015). Entry into mitosis: a solution to the decades-long enigma of MPF (review). *Chromosoma*, 124, 417-428.

② 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.

③ 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.

[学会発表] (計 28 件)

① 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.

② 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.

③ Kishimoto, T. Signalling module that generates a switch-like activation of cyclin B-Cdk1 at meiotic G2/M-phase transition. Jacques Monod Conference on “Cell cycle: bridging scales in cell division”. Roscoff, France, 2014 / 10 / 11-15.

④ 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、ウインクあいち (愛知県産業労働センター)、2013 / 6 / 19-21.

⑤ 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.

[図書] (計 7 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 (total pp. 347), Springer Science+Business Media, New York.

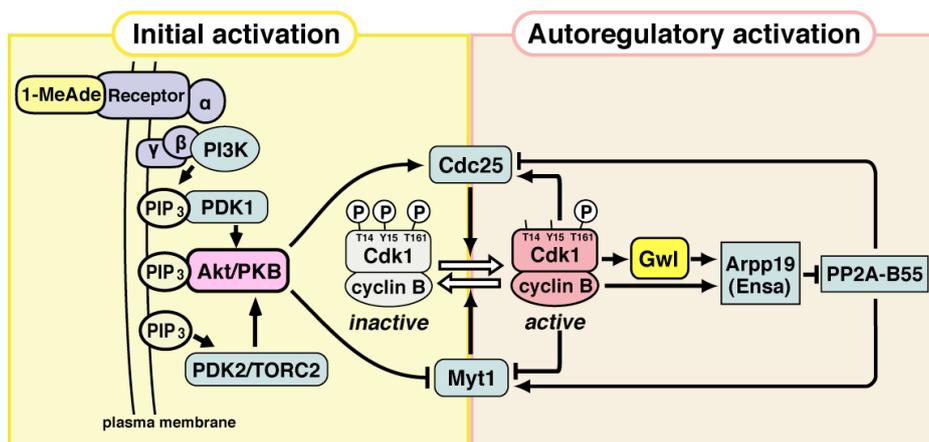


図 3. ヒトデ卵における cyclin B-Cdk1 の初期活性化と自己活性化

② 岸本健雄 (2013). 細胞分裂制御における Greatwall キナーゼの新規機能. バイオサイエンスとインダストリー、71、536-537.

③ 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.

[その他]

アウトリーチ活動 (3件)

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>

## 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・大学院生命理工学研究科・助教

研究者番号：00323808

### (3) 研究分担者

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