学位論文題名

Molecular and cellular biological analyses of the formation of maturation-promoting factor in zebrafish oocytes

(ゼブラフィッシュ卵母細胞における 卵成熟促進因子形成機構の分子細胞生物学的解析)

学位論文内容の要旨

魚類を含む多くの脊椎動物の卵母細胞は第一前期で減数分裂を停止している。卵巣内には卵黄形成前の卵母細胞から卵黄形成を完了したものまで、さまざまな成長段階の卵母細胞が存在するが、これらは全て、受精能を持たない未成熟卵である。これらのうち、卵黄形成を終えた卵母細胞のみが、ホルモン刺激に反応して減数分裂を再開し、第二中期に到達して成熟卵となる。この過程は卵成熟と呼ばれ、脳下垂体から分泌される生殖腺刺激ホルモン(GTH)、濾胞細胞から分泌される卵成熟誘起ホルモン(MIH)、卵母細胞内で形成される卵成熟促進因子(MPF)が順次作用することで誘起される。MPFは cdc2 とサイクリンBの複合体である。魚類の未成熟卵内では cdc2 は単量体で存在し、サイクリンB蛋白質は存在しない。MIH(魚類の場合、 $17\alpha,20\beta$ -ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン、 $17\alpha,20\beta$ -DP)の刺激により、サイクリンBmRNAの翻訳が開始される。合成されたサイクリンB蛋白質は既存の cdc2 とすぐに結合し、さらにこの複合体は cdk7/サイクリン B の作用で即座にリン酸化され、MPFとなる。このように形成された MPFの作用で MIH 刺激を受けた未成熟卵は卵核胞崩壊(GVBD)などの形態変化を経て、受精可能な成熟卵となる。しかし、MIH 刺激から MPFの形成に至る分子経路の詳細は不明である。

本研究では、卵成熟における MPF の形成機構の解明を目的に、ゼブラフィッシュ (Danio rerio) を用いて分子細胞生物学的解析を行った。ゼブラフィッシュは一定 飼育条件下で一年中良質の卵を得ることができ、生殖発生生物学研究に有用な実験 材料である。

第1章 ゼブラフィッシュ卵形成過程における卵成熟誘起機構の成立

17α,20β-DP 刺激で卵成熟を起こすのは卵黄形成を終えた卵母細胞で、それ以前の卵母細胞は成熟しない。つまり、MPF 形成機構は卵形成途中の卵母細胞では完成していないと考えられる。第 1 章では、ゼブラフィッシュ卵形成における卵成熟誘起機構の成立過程の解明を目的に研究を行った。まず、卵形成過程における cdc2 とcdk7 の蛋白質定量を行い、これら蛋白質の濃度は卵形成過程で変化しないことを示した。次に、卵形成過程の種々の卵母細胞に MPF 形成に必要な要素が備わっているのかを、サイクリン B 蛋白質を直接卵母細胞に注射することで調べた。その結果、

卵黄形成以前のものも含むすべての成長段階の卵母細胞で、サイクリンB蛋白質の注射により MPF の形成と GVBD が起こることがわかった。このことは、MPF 形成に必要なサイクリン B 蛋白質以外の因子は、卵黄形成以前の卵母細胞からすでに備わっていることを示す。また、ゼブラフィッシュサイクリン B cDNA 断片をクローニングし、これをプローブにしたノーザンブロッティングの結果から、卵黄形成以前の卵母細胞でも完全に成長した卵母細胞と同程度のサイクリン B m RNA が存在する事が判明した。さらに、試験管内で合成したサイクリン B m RNA を未成熟卵に注射すると、サイクリン B の合成と GVBD が起こったことから、卵母細胞内のサイクリンBm RNA は翻訳抑制状態にあり、MIH 刺激でその抑制が解除されると考えられた。これらの結果から卵黄形成過程の卵母細胞が $17\alpha,20\beta$ -DP で処理されても卵成熟を起こさないのは、MIH 刺激からサイクリン B m RNA の翻訳開始へ至る過程、つまり $17\alpha,20\beta$ -DP の受容体やサイクリン B m RNA 翻訳開始機構が不完全なためと結論された。

第2章 ゼブラフィッシュ卵成熟におけるサイクリンBmRNA翻訳開始機構の解析 卵成熟の進行には $17\alpha,20\beta$ - DP の刺激下で開始されるサイクリン B mRNA の翻 訳が重要であることを第1章で明らかにした。一般的に、翻訳調節には RNA 結合蛋 白質や mRNA のポリ A 鎖伸張が関与することが知られているが、 $17\alpha,20\beta$ - DP に よるサイクリンBmRNAの翻訳開始機構については全くわかっていない。第2章で は翻訳制御機構についての細胞生物学的情報を得るため、ゼブラフィッシュサイク リンBmRNAの卵母細胞内での局在とmRNAの翻訳開始との関わりを調べた。卵 黄形成を完了した未成熟卵ではサイクリン B mRNA は動物極側の細胞質に局在し、 凝集体を形成していた。一方、MIH 刺激を受けて卵成熟を進行中の卵母細胞では、 サイクリン B mRNA の凝集体は、その翻訳直前に分散した。また、卵成熟過程で細 胞質内の微小繊維の分散も認められた。そこで、細胞骨格とサイクリン B mRNAと の関係を調べるため、種々の細胞骨格阻害剤のサイクリン B mRNAへの影響を調べ たところ、サイトカラシン B が顕著な効果を示すことがわかり、サイクリン BmRNA の凝集体形成と細胞内局在に微小繊維の関与が示唆された。高濃度(10 μg/ml)の サイトカラシン B で処理すると、 $17\alpha,20\beta$ -DP 処理と同様にサイクリン B mRNA の凝集体は完全に分散し、 $17\alpha,20\beta$ - DP 刺激なしで GVBD が起こった。低濃度(1 μg/ml) のサイトカラシン B で処理すると、サイクリン B mRNA の凝集体の局在 が乱され、 $17\alpha,20\beta$ - DP で誘起される GVBD も阻害された。これらのことから、MIH 刺激による mRNA の存在様式の変化 (動物極に局在する凝集体がその位置で分散す ること)が、サイクリンBの翻訳開始に重要であると結論された。これは、翻訳制 御に mRNA の存在様式そのものが関わることを示す初めての報告である。

以上、本研究は魚類卵成熟開始機構を分子細胞生物学的に解析したもので、生殖 発生生物学に多大な貢献をなすものと考える。

学位論文審査の要旨

山下正兼 教 授 主査 高 橋 孝 行 副 杳 教 授 隆 助教授 清 水 副 杳 田中 実 杳 助教授 副

学位論文題名

Molecular and cellular biological analyses of the formation of maturation-promoting factor in zebrafish oocytes

> (ゼブラフィッシュ卵母細胞における 卵成熟促進因子形成機構の分子細胞生物学的解析)

多細胞生物の一生は卵の受精から始まる。受精可能となるためには、卵母細胞は卵巣内で成長し、成熟しなければならない。卵巣内の卵母細胞は第一前期で減数分裂を停止した未成熟卵である。卵母細胞を取り囲む濾胞細胞から分泌される卵成熟誘起ホルモン(MIH)の刺激を受けると、卵母細胞内で卵成熟促進因子(MPF)が形成され、この作用で未成熟卵は減数分裂を再開し、卵核胞崩壊(GVBD)等の形態変化を経て、受精可能な成熟卵となる。この未成熟卵から成熟卵となる過程を卵成熟と呼ぶ。近年、卵成熟の誘起機構についてさまざまな生物種で盛んに解析が行われているが、その最終誘起因子である MPF の形成機構については未だ不明の点が多い。本研究は魚類の卵成熟において MPF 形成機構の根幹をなす MIH 刺激によるサイクリン B (MPF の調節サブユニット)の翻訳開始機構の解明を目的に行われた。

学位論文は2章からなる。第1章では、ゼブラフィッシュ卵形成における MPF 形成機構の成立過程を解析した。MIH 刺激に反応して卵成熟を起こすのは卵黄形成を終了した完全に成長した卵母細胞のみで、卵形成途中の卵母細胞は MIH 処理しても成熟しない。本章ではこの理由を探った。その結果、1)卵形成過程の卵母細胞にも MPF の形成に必要な cdc2 (MPF の触媒サブユニット)と cdk7 (MPF 活性に必須の cdc2 をリン酸化するキナーゼ)が十分量存在すること、2)サイクリン B 蛋白質を注射すると、すべての成長段階の卵母細胞で活性型 MPF が形成され、GVBD が起こる

ことがわかった。これらの結果は、MPF 形成に必要なサイクリン B 蛋白質以外の因子は、卵黄形成以前の卵母細胞からすでに備わっている事を示す。さらに、3)卵黄形成以前の卵母細胞でも完全に成長した卵母細胞と同程度のサイクリン B mRNA が存在すること、4)試験管内で合成したサイクリン B mRNA を未成熟卵に注射するとサイクリン B の合成と GVBD が起ることが示され、卵母細胞内のサイクリン B mRNA は翻訳抑制状態にあり、MIH 刺激でその抑制が解除されると考えられた。以上、1)~4)の結果から、卵黄形成過程の卵母細胞が MIH で処理されても卵成熟を起こさないのは、MIH 刺激からサイクリン B mRNA の翻訳開始へ至る過程、つまり MIH の受容体やサイクリン B mRNA の翻訳開始機構が不完全なためと結論された。

第2章では、第 1 章でその重要性が明らかになったゼブラフィッシュ卵 成熟におけるサイクリン B mRNA 翻訳開始機構の解析を行った。まず、 翻訳制御機構についての細胞生物学的情報を得るため、サイクリン B mRNA の卵母細胞内での局在と mRNA の翻訳開始との関係を調べた。卵 黄形成を完了した未成熟卵ではサイクリン B mRNA は動物極側の細胞質 に局在し、凝集体を形成していた。一方、MIH 刺激を受けて卵成熟を進行 中の卵母細胞では、サイクリン B mRNA の凝集体は、その翻訳直前に分 散した。また、卵成熟過程で細胞質内の微小繊維の分散も認められた。そ こで、細胞骨格とサイクリン B mRNA との関係を調べるため、種々の細 胞骨格阻害剤のサイクリン B mRNA への影響を調べたところ、サイトカ ラシン B が顕著な効果を示すことがわかり、サイクリン B mRNA の凝集 体形成と細胞内局在に微小繊維の関与が示唆された。高濃度(10 µg/ml) のサイトカラシンBで処理すると、MIH 処理と同様にサイクリンBmRNA の凝集体は完全に分散し、MIH 刺激なしで GVBD が起こった。低濃度(1 μg/ml) のサイトカラシン B で処理すると、サイクリン B mRNA の凝集 体の局在が乱され、MIH で誘起される GVBD も阻害された。これらのこ とから、MIH 刺激による mRNA の存在様式の変化 (動物極に局在する凝 集体がその位置で分散すること)が、サイクリン B の翻訳開始に重要であ ると結論された。これは、翻訳制御に mRNA の存在様式そのものが関わ ることを示す初めての報告である。

以上をまとめると、著者はゼブラフィッシュをモデル生物として、卵成熟の最終誘起因子である MPF の形成機構を分子細胞生物学的に解析し、その根幹をなすサイクリン B mRNA の翻訳開始機構が卵形成過程の最後に成立することと、翻訳開始に mRNA の存在様式の変化が関わることを初めて明らかにしたもので、MPF 形成機構の理解に貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士(理学)の学位を授与される資格あるものと認める。