

氏 名 三宅 康夫

授与した学位 博士

専攻分野の名称 工学

学位授与番号 博甲第3992号

学位授与の日付 平成21年 9月30日

学位授与の要件 自然科学研究科 生体機能科学専攻

(学位規則第5条第1項該当)

学位論文の題目 Studies of Starfish Protein Kinase C Isoforms and Cdc25 Protein Phosphatase

(ヒトデ・プロテインキナーゼ C アイソフォームおよび Cdc25 プロテインホスファターゼに関する研究)

論文審査委員 教授 虎谷 哲夫 教授 大森 齊 教授 酒井 裕

学位論文内容の要旨

本研究は動物の卵成熟のモデルとして、棘皮動物であるイトマキヒトデを選び、卵成熟の制御に関わる因子を解明することを目的として行った。ヒトデの卵母細胞は、卵成熟誘起ホルモンである 1-メチルアデニンにより、卵成熟促進因子 (MPF) が活性化され、減数分裂が再開し、受精可能な状態になる。これを卵成熟という。MPF は、サイクリン依存性キナーゼ Cdc2 と、サイクリン B との複合体であり、卵成熟の過程において、Cdc25 ホスファターゼにより活性化される。また、1-メチルアデニンによるヒトデの卵成熟は、プロテインキナーゼ C (PKC) の活性化因子として知られている 12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) や teleocidin により強く阻害される。PKC は脊椎動物において少なくとも 10 種類のアイソフォームが知られているが、ヒトデの PKC アイソフォームの種類や役割はまだ明らかになっていない。本研究では、PKC 及び Cdc25 の 2 つのタンパク質について、以下の研究を行った。

棘皮動物における PKC の役割を調べるための第 1 歩として、ヒトデの novel、atypical、conventional 型 PKC cDNA をクローン化した。これらはそれぞれ PKC δ 、 ι 、 α と最も高い相同性を示した。全ゲノム配列と PCR の結果から、ウニではこれらと相同な 3 種類の PKC のみが存在することがわかった。よって、PKC δ 、 ι 、 α は各型 PKC の原型であると考えられる。進化系統樹より、AGC ファミリーの Ser/Thr キナーゼの原型からまず atypical 型、次いで novel 型、conventional 型が生じたと推定される。mRNA の量を調べると、atypical 型、novel 型はヒトデの各組織に発現しているが、conventional 型は主として卵巣、卵母細胞に発現し、管足と胃にも少量発現していた。大腸菌で発現させると、各型とも不溶性画分に大量に発現した。バキュロウィルスの系を用いて昆虫細胞で発現させると、atypical 型は可溶性画分に発現し、酵素活性を有することが確認された。

ヒトデの Cdc25 ホスファターゼについては、酵母 two-hybrid 法を用いて相互作用するタンパク質の検索を行った。Cdc25 の調節領域である N 末端領域と相互作用するタンパク質の 1 つの候補として、新規にヒストン H2B タンパク質を見出した。また、ヒストン H2B について、Cdc25 ホスファターゼと遺伝子レベル及び/又はタンパク質レベルで相互作用や機能を調べるための第 1 歩として、全長ヒストン H2B cDNA をクローン化した。大腸菌で発現させると、可溶性画分に大量に発現した。

論文審査結果の要旨

ヒトデ卵は卵巣内に卵母細胞として存在し、卵成熟誘起ホルモンである 1-メチルアデニン (1-MA) の作用を受けて成熟分裂を再開し、受精可能な状態になるので、動物の卵成熟機構を研究する上で好適なモデル系となってきた。本研究では、卵成熟の制御に関わるプロテインキナーゼ C (PKC) 及び Cdc25 プロテインホスファターゼという 2つの酵素に着目して、以下の研究を行っている。

1-MA による卵成熟は、PKC 活性化剤である 12-*O*-Tetradecanoylphorbol 13-acetate(TPA)等により強く阻害される。PKC は脊椎動物において約 10 種類のアイソフォームが知られているが、棘皮動物ではその種類や役割は未解明であった。本申請者は、棘皮動物における PKC の役割を調べるため、ヒトデの novel, atypical, conventional 型 PKC cDNA をクローン化した。これらはそれぞれ PKC δ , ι , α と最も高い相同性を示した。全ゲノム配列と PCR の結果から、ウニではこれらと相同な 3 種類の PKC のみが存在することが分かった。よって、PKC δ , ι , α は各型 PKC の原型であると考えられる。進化系統樹より、AGC ファミリーの Ser/Thr キナーゼの原型からまず atypical 型、次いで novel 型、conventional 型が生じたと推定される。mRNA 量を調べると、atypical 型、novel 型はヒトデの各組織に発現しているが、conventional 型は主として卵巣、卵母細胞に発現し、管足と胃にも少量発現していた。大腸菌で発現させると、各型とも不溶性画分に高発現した。バキュロウィルスの系を用いて昆虫細胞で発現させると、atypical 型は可溶性画分に発現し、酵素活性を有することが確認された。これらの研究により、TPA 等による卵成熟阻害に関与する PKC アイソフォームの同定が可能となった。

Cdc25 ホスファターゼについては、酵母ツーハイブリッド法を用いて相互作用蛋白質の検索を行い、候補の 1 つとして、新規にヒストン H2B を見い出した。これは Cdc25 の調節領域である N 末端領域と相互作用することが確認された。この相互作用は卵母細胞の成熟やアポトーシスの制御に関わる可能性があるため、ヒトデ・ヒストン H2B の全長 cDNA をクローン化し、大腸菌で高発現させて H2B を単一にまで精製することに成功している。これにより、Cdc25 ホスファターゼとの相互作用の生化学的解析が可能となった。

以上のように本研究では、卵成熟と細胞周期の制御に関わる 2つの重要な酵素に関して、基礎的かつ独創的な新知見が得られている。よって、本論文は博士 (工学) の学位に値するものと認める。