

論文要約

卵巣内における Serum- and glucocorticoid-regulated kinase (SGK)による

細胞内 pH 上昇と cyclin B-Cdk1 活性化を介したヒトデ卵第一減数分裂の制御機構

細田 絵奈子

細胞内 pH (pH_i)の制御は、細胞の生存に必須である。 Na^+/H^+ 交換輸送体(NHE: Na^+/H^+ exchanger)は様々な細胞で pH_i 上昇を制御する膜タンパク質である。NHE 依存的な pH_i 上昇は卵母細胞の成熟過程でも報告されているが、その制御機構と生理的意義は不明である。千葉研究室では、ヒトデ卵の卵成熟過程における pH_i 制御の役割を解明してきた。

卵巣内のヒトデ卵母細胞は、第一減数分裂前期(prophase of meiosis I: ProI)で細胞周期を停止 (ProI 停止)しており、卵核胞(germinal vesicle: GV)と呼ばれる巨大な核をもつ。このとき pH_i は、約 6.7 であり、卵成熟誘起ホルモンである 1-methyladenine (1-MA) の刺激を受けると、NHE 依存的に pH_i が約 7.0 まで上昇する。その後、phosphoinositide 3-kinase (PI3K) の下流で、cyclin B-Cdk1 が活性化し、減数分裂が再開して卵核胞崩壊 (GV breakdown: GVBD) が起こる。そして、正常受精に適した第一減数分裂の中期 (metaphase-I: MI) に、減数分裂は再び停止し、放卵を待つ (MI arrest)。このように減数分裂の再開とその進行は、放卵と受精、発生に向けての重要な過程であるが、再開時の NHE 依存的な pH_i 上昇の制御因子と役割は不明である。そのため、本研究ではその解明を目指した。

哺乳類では、NHE の制御因子として serum- and glucocorticoid-regulated kinase (SGK) が知られている。SGK は、PI3K の下流で、mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2) と、phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1) により、リン酸化されて活性化し、 pH_i 上昇を促進する。千葉研究室では、減数分裂再開時の pH_i 上昇が PI3K とヒトデ NHE (starfish NHE: sfNHE) に依存すること、sfNHE の C 末端部分は *in vitro* でヒト SGK1 の基質となることを報告した。そこで、千葉研究室の先行研究では「1-MA 刺激後、PI3K の下流でヒトデ SGK (starfish SGK : sfSGK) が活性化し、sfNHE 依存的な pH_i 上昇を引き起こす」という仮説をたて、sfSGK の cDNA をクローニングするとともに、その全長を抗原とする抗体作製が行われた。そして、その抗体を用いたウェスタンブロット解析により、1-MA 刺激前の卵に1本のバンドを、刺激後にはシフトアップしたバンドを検出していた。さらに、活性化型 SGK を検出する市販の抗ヒトリン酸化 SGK 抗体により、1-MA 刺激後の卵で前述のシフトアップしたバンドと同位置に1本のバンドを検出していた。しかし、これらのバンドの位置が sfSGK の cDNA のオープンリーディングフレーム (open reading frame; ORF) から予想される分子量と異なり、そのバンドが内在性の sfSGK であるのかは確定できていなかった。

本研究では、sfSGK の解析をさらに進めるため、最初に、sfSGK の ORF を再検討したところ、sfSGK の全長が 5' 側に 50 アミノ酸分長いことを見つけ、予想分子量とバンドの移動度が一致するようになった。続けて、新しく sfSGK の C 末端部分のペプチドを抗原として抗体を作製し、内在性 sfSGK を免疫沈降して解析することで、市販のリン酸化抗体を用い検出したバンドが、活性化型 sfSGK であることの実証を得た。これにより sfSGK の活性化の検出が可能となったので、つぎに、sfSGK の活性化因子を調べるため、PI3K、TORC2、PDK1 の阻害実験

を行った。その結果、sfSGK がこれらにより、1-MA 刺激後に活性化されることが明らかとなった。そこでつぎに、sfSGK が sfNHE 依存的な pH_i 上昇の制御因子であるか検証した。前述の新しく作製した sfSGK の C 末端部分を抗原とした抗体を卵内に注入したところ、1-MA 刺激後の sfSGK の活性化を阻害でき、しかもそのとき、pH_i の上昇が阻害された。興味深いことに、抗体の注入は GVBD をも阻害した。この sfSGK 阻害卵をウェスタンブロットにより解析したところ、cyclin B-Cdk1 の活性化に必要な Cdk1 の脱リン酸化が阻害されていた。これらの結果から、sfSGK は pH_i 上昇と cyclin B-Cdk1 活性化の、2つの経路に必要であることが示された。

つぎに、pH_i 上昇の生理的意義を知るために、千葉研究室で開発した手法によりヒトデ卵の pH_i を様々な値に固定し、1-MA 処理をした後に、種々の解析を行った。まず cyclin B-Cdk1 の活性化を解析したところ、タイミングに差はあるものの、どの値の pH_i でも活性化は起きていた。一方、微分干渉顕微鏡での観察では、pH_i を、卵巣内の ProI 停止中の卵と同等の pH_i である 6.7 に固定した卵では、GVBD 後の細胞質顆粒の動態に異常がみられた。様々な値に pH_i を固定した卵を GVBD 後、経時的にサンプリング、固定し、F-アクチン、微小管、染色体を蛍光染色し観察したところ、pH_i を 6.7 に固定した卵では、F-アクチンによる染色体輸送(巨大な GV の中にランダムに散らばっていた染色体を、GVBD 後、中心体の方へと輸送する機構)と、微小管の組織化に大きな異常がみられ、結果的に紡錘体を形成しないことを見出した。これらの結果は、GVBD 後から紡錘体形成までの過程が、低い pH_i (<約 7.0) では進行しないことを示している。これにより、卵巣内環境においては、GVBD に先駆けて起こる sfSGK 依存的な pH_i 上昇が、減数分裂の進行に必要であることが明らかとなった。

本研究の結果と、千葉研究室の先行研究による卵巣内 pH_i 制御の知見を合わせ、次のような卵巣内における減数分裂再開のモデルを提唱する。1-MA の刺激により、PI3K の下流で TORC2 と PDK1 が sfSGK を活性化する。活性化した sfSGK は sfNHE による pH_i の上昇を誘起し、pH_i を 6.7 から 7.0 へと上昇させる。同時に、sfSGK は cyclin B-Cdk1 を活性化することで減数分裂を再開させ、GVBD を誘起する。pH_i 7.0 のもとでは、F-アクチン依存的染色体輸送、微小管の組織化などが正常に行われ、最終的にすべての染色体を含む紡錘体が形成される。卵はその後、pH_i 約 7.0 を維持し、MI 停止に入る。

本研究は、卵母細胞における pH_i 上昇の制御と意義を同時に明らかにした。さらに、SGK が減数分裂再開と進行に重要な役割を果たすことを初めて報告した。これらは、細胞周期と pH_i 制御の研究に新たな視点を加えるものである。