

氏名	弟子丸 俊吾
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2360号
学位授与の日付	平成14年 3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科生物資源科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Studies on Some Regulatory Factors for a Starfish Cyclin-dependent Protein Kinase (ヒトデ・サイクリン依存性プロテインキナーゼの活性制御因子に関する研究)
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、イトマキヒトデの卵成熟を選び、MPFの活性制御因子を分子レベルで解明することを目的として行った。ヒトデ卵母細胞は、卵成熟誘起ホルモンである1-メチルアデニンが作用すると、卵成熟促進因子(MPF)が活性化されて減数分裂が再開され、受精可能な状態となる。この過程を卵成熟という。

MPFの本体はサイクリン依存性キナーゼCdc2とサイクリンBとの複合体である。卵成熟の過程では、Cdc25ホスファターゼによりMPFが活性化される。本研究では、これらのタンパク質のcDNAをそれぞれクローン化し、その発現および性質を調べた。

ヒトデcdc2 cDNAはRT-PCR法によりクローン化し、大腸菌に高発現させた。サイクリンB cDNAは、ヒトデ卵巣cDNAライブラリーからスクリーニングすることによりクローン化した。得られたcDNAの塩基配列は、N末端側領域が既報のサイクリンBと異なっていた。このサイクリンBの発現量を解析したところ、mRNA量は未成熟卵および成熟しつつある卵で微増し、その後著増した。一方、サイクリンBのタンパク質量は卵成熟過程においてほぼ一定で、G1期では完全に消失していることが認められた。

Cdc25ホスファターゼは、触媒部位の存在するC末端側領域のみcDNAクローン化を行い、大腸菌で高発現させた。本酵素を不活性型Cdc2キナーゼ/サイクリンB複合体(preMPF)に作用させると、Cdc2タンパク質の脱リン酸化を示唆するバンドシフトが観察され、Cdc2キナーゼの活性化も認められた。また、活性部位残基に変異を導入したところ、Cys493とArg499がホスファターゼ活性に重要であることが明らかとなったので、反応機構を推定した。さらに、不活性型Cdc2タンパク質の脱リン酸化部位を模した配列のオリゴペプチドを合成して基質特異性を調べた結果、本酵素の基質認識には2つのリン酸基の負電荷が重要であることが明らかとなった。

論文審査結果の要旨

多くの動物において卵巣内の卵母細胞は第1減数分裂前期で細胞周期を停止しており、個体の成熟を待って減数分裂を再開し、受精可能な状態となる。卵成熟と呼ばれるこの過程は、シグナル伝達と細胞周期制御の両方を含む重要な生物現象である。ヒトデは全生物種を通じて初めてその卵成熟誘起ホルモンが同定された生物で、卵成熟の研究に最も適した生物の1つである。本研究は、卵成熟のモデル系としてヒトデ卵成熟を選び、細胞分裂に普遍的な役割を演じる卵成熟促進因子(MPF)の活性制御因子の機能を分子レベルで解明することを目指したものである。MPFはキナーゼ本体であるCdc2と制御サブユニットであるサイクリンBとの複合体で、卵成熟の過程でCdc25ホスファターゼにより活性化されるので、これら2つのタンパク質に焦点を当てて、以下の成果を得ている。

ヒトデ*cdc2* cDNAはRT-PCR法によりクローン化し、大腸菌に高発現させた。サイクリンB cDNAは、ヒトデ卵巣cDNAライブラリーからスクリーニングすることによりクローン化した。得られたcDNAの塩基配列は、N末端側領域が既報のサイクリンBと異なっていた。このサイクリンBの発現量を解析したところ、mRNA量は未成熟卵および成熟しつつある卵で微増し、その後著増した。一方、サイクリンBのタンパク質量は卵成熟過程においてほぼ一定で、G1期では完全に消失していることが認められた。

Cdc25ホスファターゼは、触媒部位の存在するC末端側領域のcDNAクローン化を行い、大腸菌で高発現させた。本酵素を不活性型Cdc2キナーゼ/サイクリンB複合体(preMPF)に作用させると、Cdc2タンパク質の脱リン酸化を示唆するバンドシフトが観察され、Cdc2キナーゼの活性化も認められた。また、活性部位残基に変異を導入したところ、Cys493とArg499がホスファターゼ活性に重要であることが明らかとなったので、反応機構を推定した。さらに、不活性型Cdc2タンパク質の脱リン酸化部位を模した配列のオリゴペプチドを合成して基質特異性を調べた結果、本酵素の基質認識には隣接する2つのリン酸基の負電荷が重要であることが明らかとなった。

以上のように本研究では、サイクリン依存性プロテインキナーゼの活性制御因子であるサイクリンBとCdc25ホスファターゼに関して重要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。