

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 24 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780299

研究課題名（和文） MAP キナーゼ経路によるマウス未受精卵の分裂停止のメカニズム

研究課題名（英文） Molecular mechanism of meiotic arrest through Mos-MAPK pathway in mouse oocytes

研究代表者

兼森 芳紀（KANEMORI YOSHINORI）

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：40529088

研究成果の概要（和文）：マウスの排卵後の未受精卵は、第二減数分裂中期（Meta-II）で分裂を停止している。この Meta-II 停止は、受精の効率を上げるための重要な現象である。本研究では、長年不明であった Meta-II 停止の分子メカニズムを解明することを目的とした。減数分裂特異的に機能する MAP キナーゼ（MAPK）の下流因子に着目して実験を行った結果、MSK1 キナーゼが細胞分裂因子 EMI2 をリン酸化および活性化することで Meta-II 停止を引き起こすことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Ovulated oocytes are arrested at the metaphase of second meiotic division (metaphase-II). In this study, we showed possible role of mitogen- and stress-activated kinase 1, MSK1 known as a downstream kinase of the Mos-MAPK pathway, in the mouse oocytes. MSK1 exhibited the ability to phosphorylate four Ser/Thr residues of meiotic cell-cycle regulator EMI2. The phosphorylation was required for up-regulation of the EMI2 activity in the oocytes. These results suggested that mouse MSK1 may play a key role in the metaphase-II arrest through phosphorylation of EMI2.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：発生・分化制御

1. 研究開始当初の背景

一般に脊椎動物の未受精卵は、第二減数分裂中期（Meta-II）で分裂を停止して受精を

待つ。この Meta-II 停止は、卵が受精なしの発生、すなわち単為発生を防ぐための重要な生理現象である。そのため、未受精卵の

Meta-II 停止の分子経路（分子機構）を解明することは、減数分裂の素過程を理解するだけでなく、人工授精などの生殖補助技術の改善につながると考えられている。

Meta-II 停止を誘起する因子は、約 40 年前に細胞分裂抑制因子（CSF ; cytostatic factor）として初めて提唱され、長年その実体（分子経路）を解明するための研究がツメガエル卵やマウス卵を用いて盛んに行われてきた。Mos キナーゼは、CSF の候補として初めて同定された因子であり、これまでにそのキナーゼ経路（Mos-MAPK 経路 : Mos→MEK→ERK1/2→RSKs）が Meta-II 停止に必須であることが示唆されている。一方で、Emi2 と呼ばれるタンパク質も CSF の候補であることが報告されている。Emi2 は、APC/C ユビキチン結合酵素を抑制することで Meta-II 停止を誘起させる。このような中で我々は、ツメガエル卵では Mos-MAPK 経路と Emi2 が“直接的なつながり”を持つことを見出した (Inoue, D., et al., *Nature*, 2007)。すなわち、ERK1/2 の下流キナーゼの RSKs が、Emi2 の Ser335 と Thr336 を直接リン酸化することで、Emi2 の代謝的な安定化や APC/C の抑制能を増加させることが明らかになった。これにより、CSF の分子経路が Mos→MEK→ERK1/2→RSKs→Emi2 というシグナル経路から成り立っていることが初めて実証された。しかしながら、ツメガエル卵の Meta-II 停止に必須な RSKs は、マウス卵では不要であることがノックアウトマウスを用いた研究により示唆されている。換言すると、マウス卵では、RSKs に代わる他のキナーゼが Meta-II 停止を誘起していることを意味している。

我々は、最近、MAPK 下流因子で RSKs と進化的に近縁ある MSK キナーゼに着目し、いくつかの予備的な実験を行ったところ、MSK が EMI2 を直接リン酸化できることを見出した。この結果は、マウス卵では、MSK が RSKs の代わりに Meta-II 停止を制御している可能性を示唆するものであり、重要な発見である。

2. 研究の目的

本研究では、マウス未受精卵での第二減数分裂中期（Meta-II）停止を誘起する新規分子経路を明らかにする。特に、ツメガエル卵とマウス卵での知見を足がかりにして、MAP キナーゼ（MAPK）下流因子である MSK キナーゼに着目し、2 項目の研究を行う。また、それらの研究成果をもとに、種間（マウスとツメガエル）での分子経路の類似点や相違点を議論し、動物卵における Meta-II 停止の分子基盤を確立させることを最終的な目的とする。

3. 研究の方法

(1) MSK キナーゼの発現および活性化メカニズムの解析

① マウス卵での MSK の発現を RT-PCR で確認する。また、特異的抗体を用いて免疫染色を行い、未受精卵での局在を調べる。さらに、MSK の活性化の状態を調べるため、MSK の活性化の指標として使用されている MSK のリン酸化抗体を用いて免疫染色を行い、卵内での MSK の活性化状態を調べる。

② MSK の上流キナーゼは、MAPK ファミリーに属する ERK と p38 キナーゼが知られている。卵内でどちらのキナーゼが MSK を活性化しているのかを調べるため、それぞれのキナーゼの特異的な阻害剤（ERK は U0126、p38 は SB239063）を用いて MSK の活性化状態を調べる。

(2) MSK による EMI2 を介した Meta-II 停止機構の解析

① 培養細胞（HEK293 細胞）から活性化 MSK タンパク質を回収し、EMI2 のリコンビナントタンパク質を基質として、in vitro キナーゼアッセイを行う。次いで、MSK による Emi2 内のリン酸化部位を特定するために、Emi2 の様々なペプチド断片を作製し、同様なキナーゼアッセイを行う。MSK による EMI2 内のリン酸化部位の決定後、その部位のリン酸化を特異的に認識するリン酸化抗体を作製する。この抗体を用いて、卵内でのリン酸化状態を免疫染色で確認する。

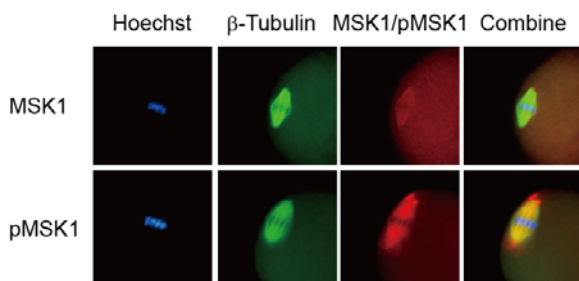
② MSK が Meta-II 停止に関与するか調べるため、MSK の特異的な阻害剤 (H89) を用いた活性

阻害実験や siRNA を用いた発現阻害実験を行う。この時、Meta-II 停止の解除の指標として、染色体や紡錘体の様子を免疫染色して確認する。次いで、上記①で作製したリン酸化抗体による免疫染色を行い、リン酸化のシグナルが減少することも確認する。

③ EMI2 は、ユビキチン結合酵素の APC/C を阻害する活性を持つ。その活性が Meta-II 停止のために必須である。そこで、卵内での野生型 EMI2 とリン酸化部位欠損 EMI2 変異体の活性を比較する。具体的には、siRNA で内在性の EMI2 を発現阻害させた卵に外来的な EMI2 タンパク質を発現させる。この時、野生型 EMI2 は正常な Meta-II 停止が誘起されるが、リン酸化部位欠損 EMI2 変異体では Meta-II 停止が誘起されないことが予想される。

4. 研究成果

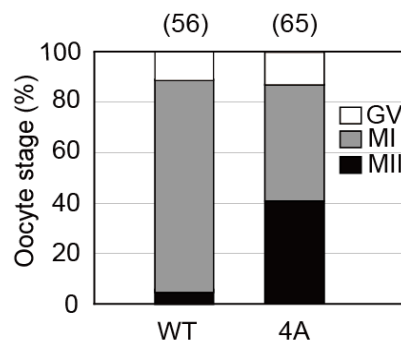
MSK には MSK1 と MSK2 のアイソフォームがあり、それらの mRNA はマウスの組織で普遍的に発現している。卵核胞 (GV) 期卵と Meta-II 停止卵で *Msk1* と *Msk2* の発現を RT-PCR で調べたところ、両方の時期の卵で *Msk1* のみが発現していた。そこで、MSK1 抗体を用いた免疫染色を行うと、MSK1 は GV 期卵と Meta-II 停止卵でそれぞれ GV と細胞質に存在することや、リン酸化 (活性化) された MSK1 は Meta-II 停止卵の紡錘体付近に局在することが観察された。したがって、マウス卵では MSK1 が発現・機能していることが示唆された (下図)。



次いで、MSK1 の Meta-II 停止での役割を調べるために、MSK の特異的阻害剤である H89 や Ro31-8220 を用いて Meta-II 停止卵の培養実験を行った。その結果、培養時間の経過と

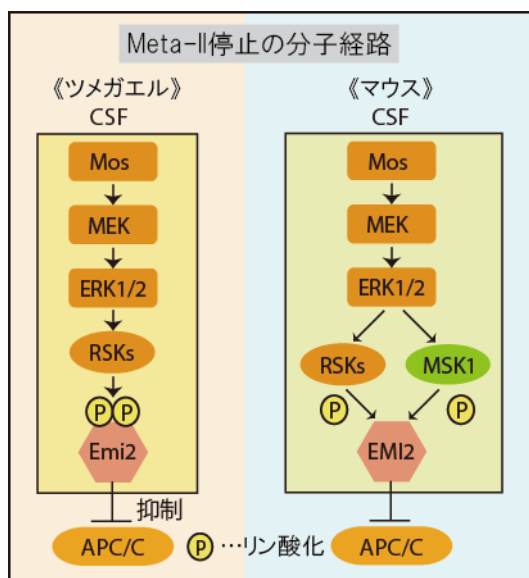
ともに染色体の分離や紡錘体の消失が見られ、同時に EMI2 の脱リン酸化やサイクリン B の分解がおきていることが明らかになった。すなわち、MSK の活性は Meta-II 停止の維持に必要であることが示唆された。ツメガエル卵では、RSKs は Emi2 の Ser335、Thr336、Ser342、および Ser344 をリン酸化することで Emi2 を活性化させる。この 4 個のアミノ酸は種間で高度に保存されており、マウス EMI2 ではそれぞれ Ser326、Thr327、Ser333、および Thr335 に相当する。MSK1 が EMI2 のアミノ酸をリン酸化するか否かを検証するため、それぞれのアミノ酸残基を Ala に置換した EMI2/4A 変異体を作製し、in vitro でキナーゼアッセイを行った。その結果、MSK1 は野生型 EMI2 をリン酸化することや、野生型 EMI2 に比べ EMI2/4A 変異体は MSK1 によってほとんどリン酸化をうけないことが判明した。

最後に、これら 4 個のアミノ酸のリン酸化と EMI2 の活性化との関連性について調べた。野生型 EMI2 と EMI2/4A 変異体の mRNA を GV 期卵にインジェクションし、卵内でタンパク質に翻訳させて、卵成熟過程での細胞分裂停止を観察した。野生型 EMI2 をインジェクションした卵は、84% が第一減数分裂中期で停止したのに対して、EMI2/4A のインジェクション卵は 40% しか第一減数分裂中期で停止せず、46% が第二減数分裂へ移行した (下図)。



このため、マウス EMI2 の Ser326、Thr327、Ser333、および Thr335 のリン酸化が卵内での EMI2 の活性化に関与することが示唆された。以上の結果を基盤として、マウス卵では MSK1 が RSK に代わり、あるいは協調的に EMI2 をリン酸化し、Meta-II 停止を誘起するモデ

ルが提唱された(下図)(Miyagaki, Y., et al., *Developmental Biology*, 2011)。



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3件)

(1) *Miyagaki, Y., *Kanemori, Y., and Baba, T. (*These authors contributed equally) Possible involvement of mitogen- and stress-activated protein kinase 1, MSK1, in metaphase-II arrest through phosphorylation of EMI2 in mouse oocytes. *Developmental Biology* 359: 73-81 (2011) 査読有

(2) Isoda, M., Sako, K., Suzuki, K., Nishino, K., Nakajo, N., Ohe, M., Ezaki, T., Kanemori, Y., Inoue, D., Ueno, H., and Sagata, N. Dynamic regulation of Emi2 by Emi2-bound Cdk1/Plk1/CK1 and PP2A-B56 in meiotic arrest of *Xenopus* eggs. *Developmental Cell* 13: 506-519 (2011) 査読有

(3) Ohe, M., Kawamura, Y., Ueno, H., Inoue, D., Kanemori, Y., Senoo, C., Isoda,

M., Nakajo, N., and Sagata, N. Emi2 inhibition of the Anaphase-promoting Complex/Cyclosome absolutely requires Emi2 binding via the C-terminal RL tail. *Molecular Biology of the Cell* 15: 905-913 (2010) 査読有

[学会発表] (計9件)

(1) Miyagaki, Y., Kanemori, Y., and Baba, T. Direct phosphorylation of EMI2 by MSK1 in the Mos-MAPK pathway during oocyte maturation. 第34回日本分子生物学会、2011年12月13日、横浜

(2) Miyagaki, Y., Kanemori, Y., and Baba, T. Possible involvement of mitogen- and stress-activated protein kinase 1, MSK1, in metaphase-II arrest through phosphorylation of EMI2 in mouse oocytes. World Congress on Reproductive Biology & Society for Reproductive Biology. Oct 9-12, 2011, Cairns (Australia)

(3) 兼森芳紀、宮垣佑、馬場忠 マウス未受精卵での減数分裂停止の分子メカニズム 第52回日本哺乳動物卵子学会、2011年5月21日、大田原

(4) 宮垣佑、兼森芳紀、馬場忠 MAPKの下流キナーゼであるMSKのマウス未受精卵での機能解析、第33回日本分子生物学会年会、2010年12月10日、神戸

(5) Miyagaki, Y., Kanemori, Y., and Baba, T. Possible role of mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) in meiotic arrest of mouse oocytes. Gordon Research Conferences, Reproductive Tract Biology, Aug 15-20, 2010 (USA)

[その他]

ホームページ等

<http://www.acroman.org/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

兼森 芳紀 (KANEMORI YOSHINORI)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：40529088