

34. 卵成熟誘起ホルモン受容体の同定

岸本 健雄

お茶の水女子大学 サイエンス&エデュケーションセンター

Key words : 卵成熟, ホルモン受容体, 翻訳後プロセッシング, ヒトデ卵

緒言

動物の卵母細胞では、細胞周期は減数第一分裂の前期に停止している。こうした未成熟卵の細胞周期停止は、通常、卵成熟誘起ホルモンが解除する。それにより減数分裂が再開し、その下流でいわゆる卵成熟が起り、卵細胞の分化が完成するとともに、その後に受精した場合は胚発生を開始する。卵成熟誘起ホルモンの受容体は、卵表に存在すると想定されて久しいが、未だいかなる動物種においても決定的な同定には至っていない。これまでにカエル卵と魚類卵において一時は同定に成功したかのようであったが¹⁾、振り出しに戻っている。それに対し、卵成熟誘起ホルモンによる減数分裂再開は、体細胞周期における G2/M 期移行に相当する。直接の帰結は、M期統御分子である cyclin B-Cdc2/Cdk1 の卵細胞内における活性化であり、それに至る分子経路の解析は進んでいる²⁾。そのため、卵成熟誘起ホルモン受容体の分子実体は、cyclin B-Cdc2 の活性化に至るシグナル伝達経路において、最大かつ長年の missing link となっている。

本研究では、ヒトデ卵を用いて、卵成熟誘起ホルモン受容体の分子実体の解明を目指した。ヒトデの卵成熟誘起ホルモンは 1-methyladenine (1-MeAde) であり、これは全動物卵を通じて最初に同定された卵成熟誘起ホルモンである³⁾。1-MeAde の卵表受容体は GPCR (G protein-coupled receptor) とされており、ホルモン刺激のもとで卵内に解離した $G_{\beta\gamma}$ が cyclin B-Cdc2 活性化に至るシグナル伝達の引金をひく^{2,4)}。しかし、この GPCR の本体については、ほとんど手掛かりはない。そこで本研究では、1-MeAde 結合タンパク質を同定することから解析を進めた。

方法および結果

1. 1-MeAde 結合タンパク質 p97、p92、p42 の同定

まず、1-MeAde 誘導体 (卵成熟誘起活性を持つ) を化学合成し、それを Ferrite-GMA (FG) ナノビーズ⁵⁾ に共有結合させて、1-MeAde 固定化 FG ビーズを作製した。次に、ヒトデ未成熟卵から卵表層 (cortex) を単離し、それを Triton X-100 処理して可溶化画分を得た (図 1 a)。そうして、この画分から 1-MeAde 固定化 FG ビーズを用いてアフィニティー精製を行い、97 kDa、92 kDa、42 kDa (p97、p92、p42) の 3 種の 1-MeAde 結合タンパク質を得た (図 1 b)。

他方、可溶化画分を吸着させた 1-MeAde 固定化 FG ビーズを 1-MeAde 処理すると、上清に p97、p92、p42 が遊離してきた。しかも、この上清をゲル濾過したところ、溶出液中での 1-MeAde の存在の有無にかかわらず、p97、p92、p42 は個別には溶出されず、挙動をともにして 500-600 kDa にピークが見られた (図 1 c)。

従って、1-MeAde 結合タンパク質は、p97、p92、p42 からなるタンパク質複合体であるとみなされる。しかも、1-MeAde の存在に依存せずに、このヘテロ三量体がさらに二量体化している可能性が考えられる。しかし、そう結論するには、今後、複合体中での p97、p92、p42 の正確なモル比を検討する必要がある。

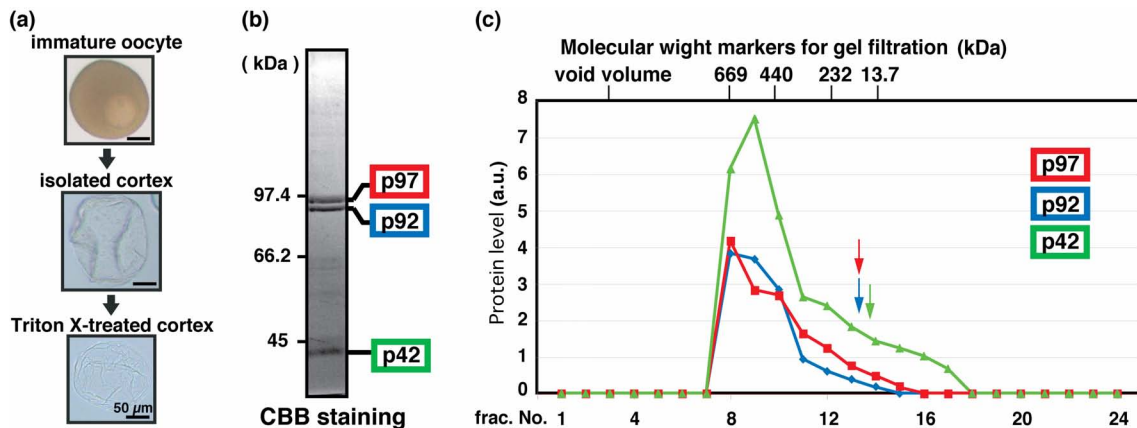


図1. 1-MeAde 結合タンパク質は p97・p92・p42 複合体である

(a) ヒトデ卵から単離した卵表層と、Triton X 可溶化処理後の単離卵表層。(b) 1-MeAde 固定化 FG ビーズへの結合タンパク質 (CBB 染色)。(c) 1-MeAde 固定化 FG ビーズへの結合タンパク質はゲル濾過すると、挙動をともにする。

2. 1-MeAde 結合タンパク質 p97、p92、p42 は Rendezvin 断片である

p97、p92、p42 それぞれの cDNA を得る目的で、それらの部分アミノ酸配列を 15 種決定した。それらをもとに cDNA のクローン化を試みたところ、最終的には、終止コドンを含む全長約 5.4 kb の cDNA が 1 種得られた。その中には p97、p92、p42 の全ての部分アミノ酸配列がコードされており、全長をコードするタンパク質は、Rendezvin (Rdz) のヒトデホモログと判明した。Rdz は、ウニ未受精卵表層顆粒中において、受精膜を構成するタンパクとして見出されたものである⁶⁾。

次に、Rdz の mRNA から、どのようにして p97、p92、p42 が得られるのかを検討した。ヒトデ卵 cDNA ライブラリー中には全長 Rdz の cDNA しか検出できなかったことは、Rdz の mRNA は全長のままでタンパク質に翻訳され、そのあとにプロセッシングを受けることを示している。得られた Rdz の cDNA は 1,787 残基のアミノ酸をコードしており、CUB ドメインと呼ばれる構造が 10 個存在した。しかも、N 末端側から 3 番目と 5 番目の CUB ドメイン中には、プロテアーゼ Furin の切断モチーフ R-X-K/R-R⁷⁾ が 1 つずつ存在した (図 2)。翻訳後のヒトデ Rdz がこれらのモチーフでプロセッシングを受けると仮定すると、それによって産生される 3 つのペプチドの分子量は、ほぼ p97、p92、p42 に相当した。しかも、得られている 15 個のペプチド断片の配列は、1 つを除いて全て対応が合った。

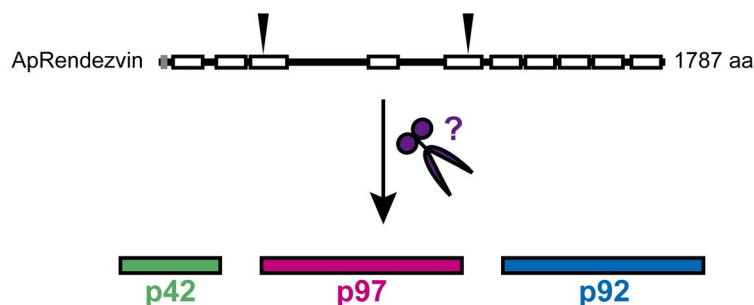


図2. 1-MeAde 結合タンパク質 p97、p92、p42 の生成についての作業仮説

ヒトデ Rendezvin は 1,787 残基のアミノ酸をコードしており、10 個の CUB ドメイン (四角形) と 2 カ所の Furin 切断モチーフ (矢頭) をもつ。この Furin による切断で、p97、p92、p42 が生じると予想される。

そこで、reticulocyte lysates 中で全長 Rdz を *in vitro* 合成し、それをヒト Furin で処理したところ、p97、p92、p42 に相当するタンパク質が検出された (図 3 a)。これらの事実は、1-MeAde 結合タンパク質は、Rdz タンパク質が Furin

によって2カ所切断されて得られる3つの断片から構成されることを支持している。ヒトデ卵内において実際にそれが起こっていることを確認するのは、今後の課題である。

さらに、RdzのFurin切断モチーフを境として3つの組換えタンパク質を作製し、*in vitro*解析をした。その結果、組換え p97、p92、p42は互いに複合体を形成したが、1-MeAde 固定化 FG ビーズに結合するのは p97 と p92 で、p42は結合しなかった。

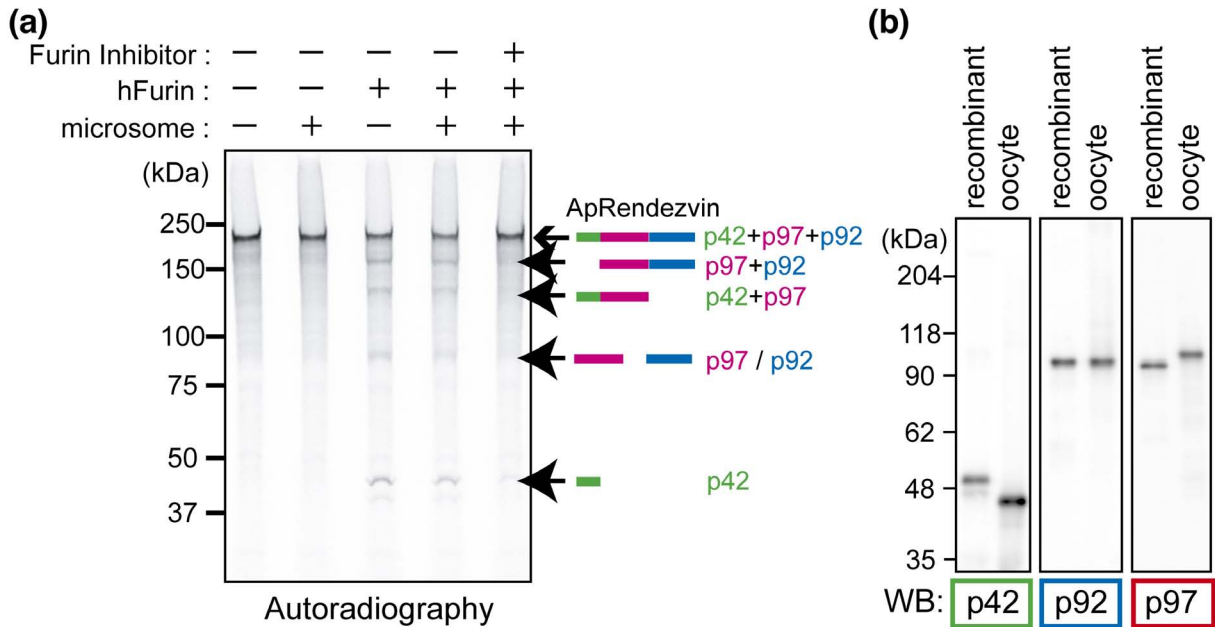


図3. ヒトデ Rendezvin 断片の *in vitro* 生成

(a) [³⁵S]ラベルしたヒトデ Rendezvin 全長を reticulocyte lysates 中で発現させ、そのあとヒト Furin で処理すると、p97、p92、p42 相当のペプチドが産生された (autoradiography)。(b) p97、p92、p42 のそれぞれは、組換えタンパク質と卵内在性タンパク質との間で、SDS-PAGE 上の移動度は必ずしも一致しない (western blot)。

3. ヒトデ Rendezvin のさらなるプロセッシング

Rdz のFurin切断モチーフを境として作製した3つの組換えタンパク質 (rec) と卵内在性 (endo) p97、p92、p42 との対応関係を western blots で検討したところ、p92 については、rec と endo の移動度が一致した。それに対し、p42 については rec の方が endo よりも分子量が大きくなり、p97 については rec の方が endo よりも分子量が小さく、かつ p92 との上下位置関係 (SDS-PAGE 移動度の多寡) が逆転した (図3 b)。これらの事実は、p42 と p97 に相当する Rdz 配列では更なるプロセッシングが起こっていることを示唆している。

そこで、あらためて Rdz 全長の配列について検討したところ、p42 のN末端 (つまり Rdz 全長のN末端) の29アミノ酸残基はシグナルペプチドとして切断されることが予測された⁸⁾。実際、Flag-p42 を reticulocyte lysates と HEK293T 細胞のそれぞれで発現させたところ、後者の方では、この切断に相当する分子量の減少が検出された。一方、p97 については、N結合型糖鎖修飾が予測される配列 (NXS/T) が3カ所見出された⁹⁾。そこで、endo-p97 を peptide-N-glycosidase F 処理したところ、SDS-PAGE 移動度が rec-p97 近くまで減少した。

これらの事実は、Rdz 上の p42 相当部分ではシグナルペプチドの切断が、p97 相当部分ではN結合型糖鎖修飾が起こっていることを支持している。

考 察

1-MeAde 結合タンパク質の分子実体およびその生成過程について、本研究で得られた成果から、以下のような作業仮説が考えられる (図4)。(1) 1-MeAde 結合タンパク質は p97、p92、p42 で構成されるタンパク質複合体であり、そ

れぞれは Rdz タンパク質を Furin が切断した断片である。(2) この複合体のうちで、1-MeAde が実際に結合するのは p97 と p92 であると考えられる。(3) この複合体の生成にあたっては、まず Rdz の全長が翻訳される；次に小胞体中で、p42 相当部分の N 末端でシグナルペプチドが切断されるとともに、p97 相当部分で糖鎖修飾が起こる；そのあと、ゴルジ体上で Furin により 2 カ所が切断される；そして最終的に、細胞膜上で p97・p92・p42 複合体として存在するようになる。

しかし、p97・p92・p42 複合体の配列上には細胞膜貫通ドメインは見出されず、さらには、GPCR に保存された配列も存在しない。この複合体が細胞膜上の G-タンパク質と連動することが期待されるが、その証明は今後の課題である。

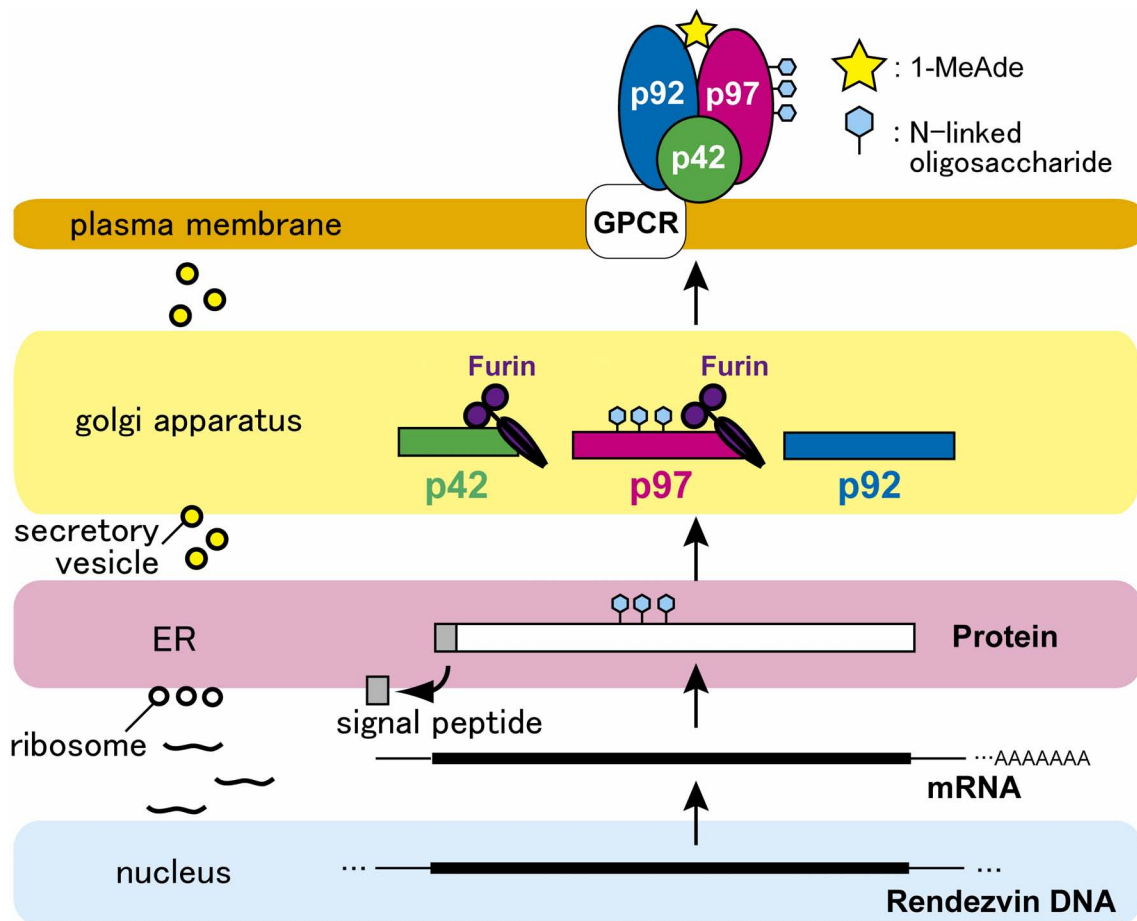


図 4. 1-MeAde 結合タンパク質 p97・p92・p42 複合体の、Rendezvin mRNA からの生成過程についての作業仮説
p97、p92、p42 は、Rendezvin 全長をコードする mRNA から翻訳され、その後にプロセッシングを受ける。詳細は本文参照。

共同研究者

本研究の共同研究者は、東京工業大学大学院生命理工学研究科の奥村英一、吉田文宣、和田忠士（現大阪大学）、半田宏（現東京医大）、お茶の水女子大学プロジェクト教育研究院の平岡大作である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文献

- 1) Maller JL. Signal transduction. Fishing at the cell surface. Science. 2003 Apr 25;300(5619):594-5. PubMed PMID: 12714732.

- 2) Kishimoto T. Entry into mitosis: a solution to the decades-long enigma of MPF. *Chromosoma*. 2015 Dec; 124(4):417-28. doi: 10.1007/s00412-015-0508-y. Epub 2015 Feb 25. PubMed PMID: 25712366; PubMed Central PMCID: PMC4666901.
- 3) Kanatani H, Shirai H, Nakanishi K, Kurokawa T. Isolation and identification of meiosis inducing substance in starfish *Asterias amurensis*. *Nature*. 1969 Jan 18;221(5177):273-4. PubMed PMID: 5812580.
- 4) Jaffe LA, Gallo CJ, Lee RH, Ho YK, Jones TL. Oocyte maturation in starfish is mediated by the beta gamma-subunit complex of a G-protein. *J Cell Biol*. 1993 May;121(4):775-83. PubMed PMID: 8491771; PubMed Central PMCID: PMC2119795.
- 5) Shimizu N, Sugimoto K, Tang J, Nishi T, Sato I, Hiramoto M, Aizawa S, Hatakeyama M, Ohba R, Hatori H, Yoshikawa T, Suzuki F, Oomori A, Tanaka H, Kawaguchi H, Watanabe H, Handa H. High-performance affinity beads for identifying drug receptors. *Nat Biotechnol*. 2000 Aug;18(8):877-81. PubMed PMID: 10932159.
- 6) Wong JL, Wessel GM. Rendezvin: An essential gene encoding independent, differentially secreted egg proteins that organize the fertilization envelope proteome after self-association. *Mol Biol Cell*. 2006 Dec; 17(12):5241-52. Epub 2006 Sep 27. PubMed PMID: 17005910; PubMed Central PMCID: PMC1679687.
- 7) Hosaka M, Nagahama M, Kim WS, Watanabe T, Hatsuzawa K, Ikemizu J, Murakami K, Nakayama K. Arg-X-Lys/Arg-Arg motif as a signal for precursor cleavage catalyzed by furin within the constitutive secretory pathway. *J Biol Chem*. 1991 Jul 5;266(19):12127-30. PubMed PMID: 1905715.
- 8) Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods*. 2011 Sep 29;8(10):785-6. doi: 10.1038/nmeth.1701. PubMed PMID: 21959131.
- 9) Drickamer K, Taylor ME. *Introduction to Glycobiology* (2nd ed.). 2006; Oxford University Press, USA. ISBN 978-0-19-928278-4.