

氏 名 山 口 明 彦

学位（専攻分野） 博士（理学）

学 位 記 番 号 総研大甲第63号

学位授与の日付 平成 5 年 9 月 30 日

学位授与の要件 生命科学研究科 分子生物機構論専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 魚類の核ラミンに関する免疫・生化学的研究

論文審査委員 主 査 教 授 長 濱 嘉 孝

教 授 江 口 吾 朗

教 授 鈴 木 義 昭

論文内容の要旨

ラミンは核に局在する唯一の中間径フィラメントであり、網目状の構造を呈する核ラミナの構成蛋白質として、核の内膜の内側表面を裏打ちしている。核ラミンに関するこれまでの研究の多くは体細胞型核ラミンに関するものがほとんどで、生殖細胞型核ラミンについての研究は著しく少なく遅れている。

卵黄形成を完成し十分に成長した卵母細胞は卵成熟ホルモンの刺激により第一減数分裂を再開して成熟し、受精可能となる（卵成熟）。この過程で卵核胞の核膜は崩壊し、卵核胞の内容物は細胞質中に分散する。また、卵が受精後に付活され前核形成が起こる際には、核膜は再構成され、再び細胞核が形成されるようになる。これら一連の卵核胞の形態・生化学的変化は卵成熟（細胞分裂）の進行にとって必須であり、従ってこれらの過程に卵核胞ラミンが重要な役割を果たしている可能性が高い。

卵成熟は卵成熟誘起ホルモンの作用で卵内で生成される卵成熟促進因子（maturation-promoting factor、MPF）の働きで誘起されるが、最近このMPFの化学的実体が解明され、MPFの刺激をきっかけとして卵内で起こる一連の生化学的カスケードについての解析への道が拓けた。本研究では、MPFと卵核胞ラミンとの関連を明らかにするための第一歩として必要な魚類卵核胞ラミンの化学的実体を明らかにすることを第一の目的とした。この目的のため、まずこれまで非常に困難であった卵核胞の大量単離法をキンギョ（*Carassius auratus*）卵で確立するとともに、その単離卵核胞を材料として卵母細胞に発現するラミンを蛋白質および遺伝子レベルで解析した。また、これまで脊椎動物で比較的研究が進んでいる体細胞型核ラミンについても魚類の体細胞から精製し、その免疫・生化学的特性について他の生物種や魚類卵核胞ラミンと比較した。

実験材料として多量に得られるニジマス（*Oncorhynchus mykiss*）の赤血球から核ラミンに富んだ残存核膜を単離し、それをSDS-PAGEで分画することにより分子量67KDaと69KDaのラミン様タンパク質を精製した。次に、これら2種類の体細胞型ラミンに対するモノクロナル抗体（MabL-200）を作製した。この抗体はニジマスとキンギョの赤血球やキンギョの表皮腫培養細胞の体細胞型核ラミン、及びアフリカツメガエル（*Xenopus laevis*）の卵核胞ラミン（XL-III）を特異的に認識した。次に、キンギョの上記培養細胞のcDNAライブラリーを作製し、モノクロナル抗体MabL-200をプローブとしてキンギョ体細胞核ラミンのcDNAを単離した。得られたいくつかのcDNAクローンについて部分塩基配列を決定したが、その中でクローンC8-4の部分塩基配列は、ヒトとマウスの体細胞核ラミンに全体としてそれぞれ70%と60%のホモロジーが認められた。また、このクローンのC末端にはラミン分子の特徴とされるCaaXモチーフ配列がみられた。これらのことから、クローンC8-4はキンギョの体細胞型核ラミンをコードするcDNAと判断された。

これまで卵核胞ラミンの研究が遅れた原因として、卵黄の混在が無い卵核胞を大量に単離することが困難であったことがあげられる。従って、卵核胞ラミンを精製する鍵はいかに効率良く卵核胞を単離できるかに依存するといえる。本研究では抽出緩衝液の塩濃度を検討することにより、キンギョ卵母細胞から純卵核胞標品を大量に単離することに成功した。次いで、この単離卵核胞から得た残存核膜分画について一次元と二次元電気泳動を行なうことにより分子量66KDa、等電点値6.5のラミン様蛋白質を精製することができた。さ

らに、この単離卵核胞から調製した残存核膜分画を抗原にポリクロナル抗体(PAbGV)を作製した。66KDa蛋白質はこのPAbGV抗体とは免疫反応したが、体細胞型核ラミンに対する抗体MabL-200とは反応しなかった。PAbGV抗体はまたツメガエルの卵核胞ラミンを認識するばかりでなく、ニジマスとキンギョの赤血球およびキンギョの表皮腫培養細胞から精製された体細胞型核ラミンをも認識した。しかし、この卵核胞ラミンの抗体を用いたウェスタンブロットングで精巢抽出物を解析したが、分子量66KDa付近にはこの抗体で認識される蛋白質は認められなかった。従って、同じ生殖細胞でも卵核胞と精巢核のラミン分子はキンギョでは同一でない可能性が高い。これは細胞分化の点から考えると興味あることである。

次に、この卵核胞ラミン抗体PAbGVを用いて、卵成熟誘起ホルモン($17\alpha, 20\beta$ -ジヒドロキシ-4- pregnen-3-one, $17\alpha, 20\beta$ -DP)で誘起されるキンギョの *in vitro* 卵成熟過程での卵核胞ラミンの挙動を解析した。その結果、66KDa蛋白質はホルモン処理後卵核胞崩壊の完了とともに細胞質分画に可溶化した。脱重合した66KDa蛋白質は100,000 gの超遠心の後にも可溶化した状態を維持していたことにより、このラミンは脱重合後も膜断片とは結合せず単独の状態が存在するものと結論された。この可溶化ラミンの沈降係数は4S-9Sであった。

キンギョの種々発達段階にある卵母細胞のcDNAライブラリーを作製し、抗体細胞型核ラミン抗体(MabL-200)と抗卵核胞型ラミン抗体(PAbGV)をプローブとしたイムノスクリーニングにより、キンギョ卵核胞ラミンcDNAのクローニングを試みた。双方の抗体に反応するクローンが数個ずつ得られ、それらについて部分塩基配列を決定したが、現在のところこれらのどのクローンにもラミンに特徴的な塩基配列はみつかっていない。しかし、抗卵核胞ラミン抗体に反応するクローンの中に、疎水性アミノ酸に富む繰り返し配列を持つものがあり、この配列は7個のアミノ酸毎にロイシンが現れる特徴ある基本構造を示す。現在引き続きこれらのクローンの塩基配列の決定を行っている。

本研究により、魚類の体細胞型核ラミンと生殖細胞型(卵核胞)核ラミンの免疫・生化学的特性がはじめて明らかにされた。特に、体細胞型核ラミンに関しては、そのcDNAが単離され一部アミノ酸配列が決定された。また、卵核胞ラミンについては卵成熟(細胞分裂)時における挙動が明らかになった。魚類の体細胞型核ラミンの免疫・生化学的特性は他の生物でのこれまでの報告と類似していたが、卵核胞ラミンに関してはこれらとは明らかに異なっていた。従って、卵核胞ラミンは新しい型のラミン、すなわち卵核胞ラミン、として体細胞型核ラミンとは区別されるべきであると判断される。

この研究で魚類の卵核胞ラミンが精製され、その特異的抗体も作製された。また本研究で新しく開発されたキンギョ卵の細胞質と核の分画法を用いた予備的実験から、MPFの構成成分であるcdc2キナーゼやサイクリンBが卵成熟誘起ホルモン $17\alpha, 20\beta$ -DPで誘起されるキンギョの卵成熟時に卵の細胞質と核の間を動的に移動することが観察され、このことがMPFの活性状態の変動と密接に関わっている可能性が高いことが示唆されている。このようなMPF分子の動態と卵核胞ラミンとの関連はきわめて興味のあるところである。MPFの標的分子としてのラミン、またラミンそのものの卵成熟(細胞分裂)過程における役割を解明するための道が大きく拓けたといえる。

論文の審査結果の要旨

核ラミンは現在脊椎動物で知られた中間径繊維の中で、唯一核に局在が確認されている蛋白質で、核内でメッシュ様構造を示し、核構造維持や核機能に重要な役割を果たしていると考えられている。これまで体細胞型ラミンに関する研究はなされているが、生殖細胞、特に卵母細胞の卵核胞に存在する、いわゆる卵核胞ラミンに関する研究はほとんどなされていない。

申請者の山口明彦は、まず魚類（ニジマス赤血球およびキンギョ培養細胞）の体細胞ラミンを初めて単離し、それに対するモノクロナル抗体を作成した。次に、この抗体をプローブとしてキンギョ体細胞ラミンのcDNAを単離し、そのアミノ酸配列を解析した。その結果、魚類体細胞型ラミンはラミンに特徴的なCaaXモチーフを持ち、哺乳動物体細胞型ラミンと60-70%のホモロジーを示すことが判明した。一方、卵核胞ラミンに関しては、まずこれまで非常に困難であった卵核胞の大量単離法をキンギョ卵で確立することとともに、その単離卵核胞を材料として卵核胞ラミンを精製し、その生化学・免疫学的特性を明らかにした。キンギョの卵核胞ラミンは、分子量66kDa、等電点6.5の蛋白質であり、ホルモンで誘起された減数分裂時に細胞質分画に可溶化する。脱重合した66kDa蛋白質は100,000 g 超遠心の後にも可溶化した状態を維持することにより、このラミンは脱重合後も膜断片とは結合せず単独の状態で存在するものと結論された。この可溶化ラミンの沈降係数は4S-9Sであった。さらに、このキンギョ卵核胞ラミンを抗原として作成したポリクロナル抗体をプローブとしてキンギョ卵母細胞cDNAライブラリーから卵核胞ラミンcDNAをクローニングした。得られたcDNAの解析から、キンギョ卵核胞ラミンは疎水性アミノ酸に富む繰り返し構造を示し、7個のアミノ酸毎にロイシンを持つ特徴ある構造を示すことが明らかになった。これらの結果から、魚類の卵核胞ラミンはこれまでに報告されているいずれのラミンとも異なる新しい型のラミン（卵核胞ラミン）であると結論された。

学位論文として提出された研究結果について口頭発表させた後、審査委員が論文内容について試問した。さらに、申請者の関連研究分野の一般的知識およびその背景となる基礎的知識についても口頭試問により審査した。これら試問に対する申請者の応答はいずれも的確であった。それらの結果をもとに、審査委員会は申請者の持つ研究能力および学力は学位取得に値するものと判定した。

以上の内容により、審査委員会は当博士論文に対して合格の判定を下した。