

# テトラヒメナに存在するカエル 卵母細胞の減数分裂再開始誘導物質の研究

杉井 学\*・堀 学\*・藤島政博\*

## 1. はじめに

真核の単細胞動物である繊毛虫類は、その細胞質中に栄養核と呼ばれる大核と生殖核と呼ばれる小核の機能の異なる2種類の核を持つ。単細胞動物は、多細胞動物とは異なり、一つの細胞が、環境要因に応じて二分裂と減数分裂を可逆的に行うことが可能である。この二分裂から減数分裂へ、あるいは、その逆への移行の時期には、減数分裂や二分裂を誘導する何らかの因子が存在することが推測される。実際、藤島らは、核移植技術を用いて、繊毛虫ゾウリムシの減数分裂前期初期の細胞質中には、移植された減数分裂前S期の小核を減数分裂へと方向づける因子が存在する可能性を示した<sup>1)2)</sup>。更に、この因子が存在する時期の細胞抽出液を、第一減数分裂前期で停止したカエル卵母細胞に注射すると卵核崩壊 (GVBD) を誘導し、第二減数分裂中期まで進行させることを見つけた<sup>3)</sup>。又、無菌培養法や同調培養法が確立され、生化学的研究に広く用いられる繊毛虫 *Tetrahymena pyriformis* にも、この因子と同等の因子が含まれることが明らかになり、その後の生化学的研究は、*T.pyriformis* を中心に展開された<sup>4)5)6)</sup>。そして、その結果、この因子が、カエル卵母細胞に減数分裂の再開始を誘導できる事、又、この因子の活性は、サイクロヘキシミドで卵母細胞のタンパク質合成を阻害すると、GVBDを誘導できなくなる事から、卵成熟を制御する事が知られている MPF (M-phase promoting factor) とは区別して Meiosis-reinitiation-inducing factor (MRIF) と名付けられた。

\*理学部

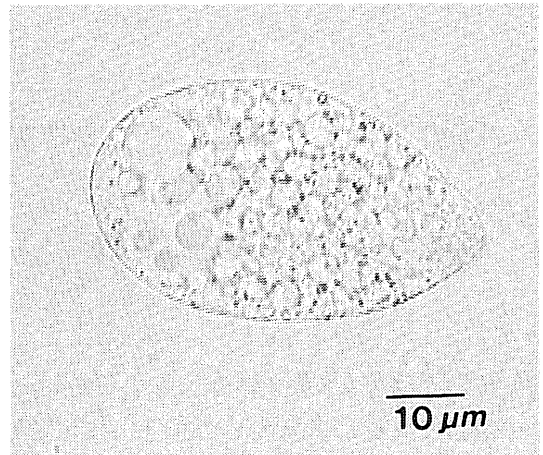


図1. *Tetrahymena thermophila*

ところが、昨年、我々は、同じ繊毛虫テトラヒメナ属の *T.thermophila* (図1) には、*T.pyriformis* で見つけていた MRIF とは、異なる GVBD 誘導活性が存在することを見つけた。これらの GVBD 誘導活性は、*T.thermophila*, *T.pyriformis* のどちらにおいても、分子量約60 KDa の分画に検出できるが、サイクロヘキシミドで卵母細胞のタンパク質合成を阻害すると、*T.pyriformis* に存在する因子は GVBD 誘導活性を失うが、*T.thermophila* に存在する活性は、GVBD を誘導することができた<sup>7)</sup>。つまり、*T.pyriformis* には MRIF 活性が存在し、*T.thermophila* には MPF 様の活性が存在することを示唆している。

そこで、今回、新たに見つかった *T.thermophila* に存在する GVBD 誘導活性が、MPF であるのかどうかを調べるために、この活性物質を精製し、その性質について調べた。

## 2. 方 法

25°C で 5 日間培養した細胞に、プロテアーゼイ

ンヒビターを加えたバッファーを等量加えホモジナイズする。これを $-85^{\circ}\text{C}$ で凍結し、融解後、 $132,000\text{g}$ で遠心した上清をテトラヒメナ細胞抽出液とした。細胞抽出液は、分画分子量 $50\text{KDa}$ の限外ろ過膜：ザルトコンマイクロを用いて、分子量 $50\text{KDa}$ 以下のタンパク質を除去し、濃縮された分子量 $50\text{KDa}$ 以上の分画を液体クロマトグラフィーの為の試料とした。

精製は、ファルマシア FPLC を用いて、以下に示す条件で行った。

1. ゲルろ過：TSK 3000swカラム，溶出バッファー  $20\text{mM Na}\cdot\text{K-PB}$  ( $\text{pH } 6.8$ ) を用いて，流速 $0.4\text{ml}/\text{min}$ で溶出した。
2. 陽イオン交換クロマトグラフィー：Mono S HR5/5カラムにサンプルをアプライし，開始バッファー  $10\text{mM Tris-HCl}$  ( $\text{pH } 6.8$ ) を用いて，流速 $0.6\text{ml}/\text{min}$ で溶出し，非吸着画分を分取した。
3. 陰イオン交換クロマトグラフィー：Mono Q HR5/5カラムに開始バッファー $10\text{mM Tris-HCl}$  ( $\text{pH } 7.0$ ) を用いて，活性タンパク質を吸着させ，開始バッファーに $1\text{M NaCl}$ を加えた溶出バッファーで，穏やかに塩濃度勾配をかけながら，流速 $0.6\text{ml}/\text{min}$ で溶出した。
4. ゲルろ過：TSK 3000swカラムで， $20\text{mM Na}_2\text{SO}_4$ を含む  $20\text{mM Na}\cdot\text{K-PB}$  ( $\text{pH } 6.8$ ) バッファーで，流速  $0.3\text{ml}/\text{min}$ で溶出した。

又，FPLC を用いた精製過程での脱塩やバッファー交換操作は，分画分子量  $30\text{KDa}$  の限外ろ過膜：セントリザルトを用いて行った。

活性の検出には，試料を $100\text{nl}$ ずつ10個の *Xenopus* 卵母細胞に注射して，9時間後にGVBDの有無を観察した。

電気泳動とイムノブロット法は，前述した方法<sup>5)</sup>にしたがって行った。

### 3. 結果

今回，見つかった活性物質の性質を調べるために，最初に，この活性物質の精製条件について検討した。

先に示した方法で細胞抽出液を調整し，これを限外ろ過膜で濃縮した分子量 $50\text{KDa}$ 以上の画分を TSK 3000sw カラムを用いてゲルろ過処理した。そして，分画されたタンパク質のGVBD誘導活性を調べたところ，分子量 $60\text{KDa}$ 前後に強い活性と $10\text{KDa}$ 以下に弱い活性が，検出された(図2)。

次に，この2種類の活性画分のうち，タンパク量が多く，高いGVBD誘導活性を示した分子量 $60\text{KDa}$ 前後の画分を Mono S 陽イオン交換クロマトグラフィーにかけた。しかし，Mono S ビーズは， $\text{pH } 6.8$ の条件下で，夾雑物のみを吸着し，活性画分は，そのまま溶出された。

そこで，吸着しなかった画分を次の試料として，Mono Q 陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。その結果，図3に示したように，この活性タンパク質は， $\text{pH } 7.0$ で陰イオン交換体に吸着し，約 $0.2\sim 0.3\text{M NaCl}$ によって溶出された。これを分画分子量 $30\text{KDa}$ の限外ろ過膜で，脱塩・濃縮した後，比活性を調べたところ，約35倍まで精製できることがわかった。

しかし，目的とするタンパク質が，常にメジャーなタンパク質と挙動が一致するために，更に，protein A ビーズ処理と分画分子量 $100\text{KDa}$ の限外ろ過膜処理を行った後，再び TSK 3000sw カラムを用いてゲルろ過処理を行った。その結果，図4に示すように，大部分の夾雑物は除去され，最終的な比活性が，約410倍に達するまで精製することができた(図4，表1)。

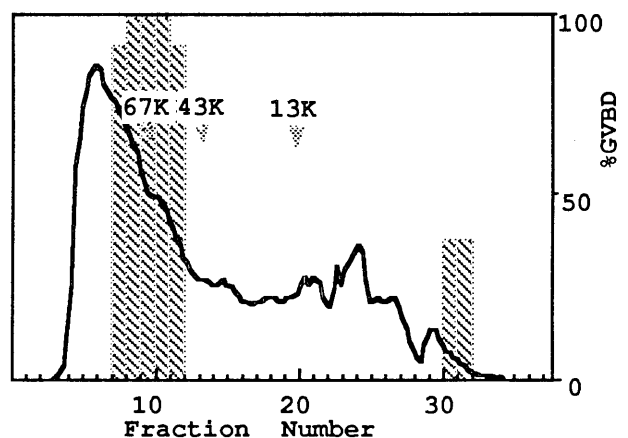


図2. ゲルろ過による溶出パターンと活性画分

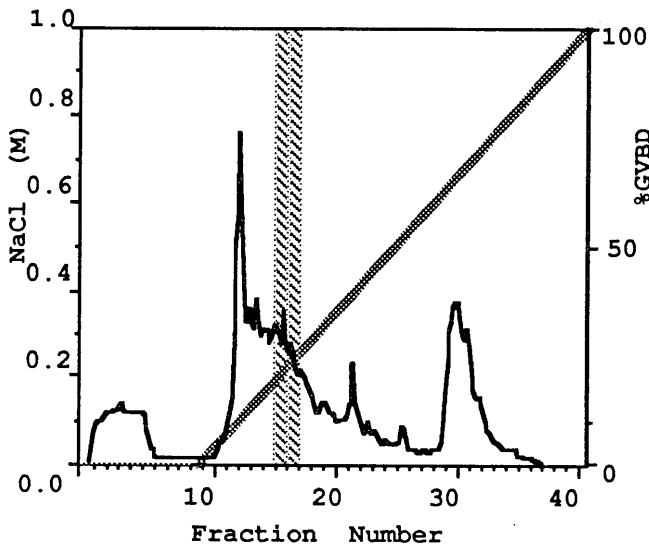


図3. Mono Q カラムによる溶出パターンと活性画分

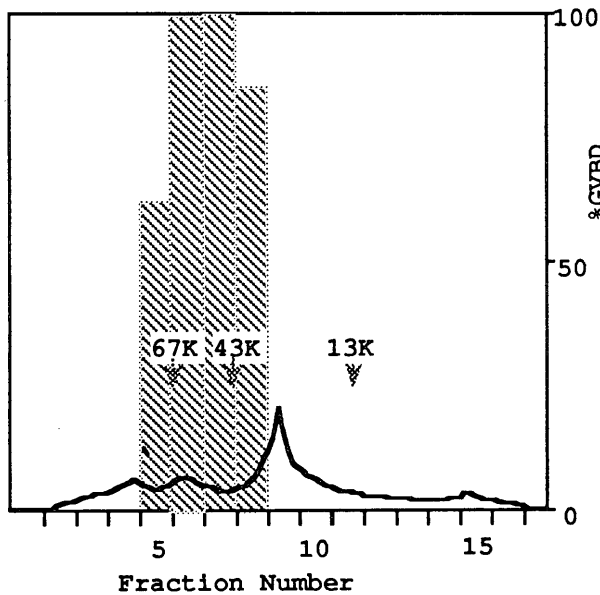


図4. protein A beads 処理後のゲルろ過溶出パターンとその活性画分

表1. 部分精製試料のタンパク量と比活性の推移

試料	総タンパク量 (mg)	Units	比活性 (units/mg protein)
細胞抽出液	164.1	6.0	0.5
>50K分画	123.3	21.3	0.5
ゲルろ過分画	23.1	6.4	2.8
MonoS分画	18.5	3.7	2.0
MonoQ分画	0.6	5.3	17.7
ゲルろ過分画	0.017	3.5	205.0

次に、この *T.thermophila* に存在する GVBD 誘導活性物質が MPF であるかどうかを確かめるため、上述した各ステップの分画試料を SDS-PAGE にかき、その後 PSTAIR 抗体によるイムノブロットを行った。すると、Mono Q 陰イオン交換クロマトグラフィーまでの活性分画には PSTAIR 抗体で認識される 37KDa, 35KDa, 34.5KDa のタンパク質が存在することがわかった。しかし、protein A ビーズ処理、限外ろ過膜処理を加えた 2 度めのゲルろ過分画には、PSTAIR 抗体で認識されるこれらのタンパク質が活性分画から除去されていたにもかかわらず、強い GVBD 誘導活性が残存していた。又、この活性は、インジェクションから GVBD 誘導までに要する時間が、MPF のそれよりも明らかに長かった。

以上の結果は、活性物質の本体が MPF ではなく、又、*T.pyriformis* で見つけていた MRIF とは、異なる新たな活性因子であることを強く示唆している。

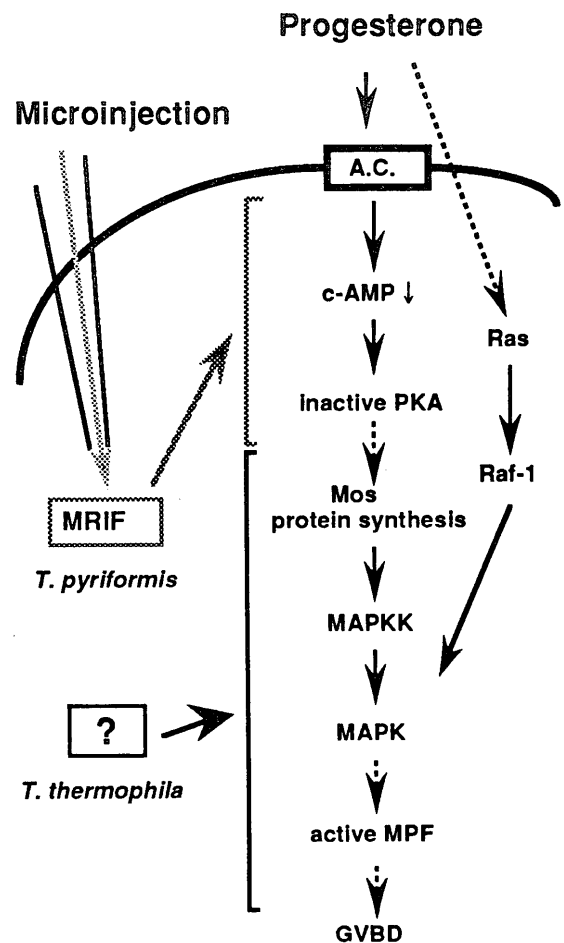


図5. 卵成熟過程での様々な因子の作用位置

図5に、これまで、卵成熟過程で作用することが知られているがん遺伝子産物などとの関連を含めて、今回見つかった因子の作用位置を示した<sup>8)9)10)11)12)13)</sup>。

今後は、このGVBD誘導物質を精製し、アミノ酸配列、DNA配列、またリン酸化、脱リン酸化による活性変化の有無など、その詳細を明らかにしていく予定である。

## 文 献

- 1) Fujishima, M. and Hiwatashi, K. (1978) *Exp. Cell. Res.*, 111, 468-471.
- 2) Fujishima, M. and Hiwatashi, K. (1981) *Exp. Cell. Res.*, 131, 63-71.
- 3) Fujishima, M. and Iwao, Y. (1984) *III. Int. Cell Biol., Abstract*, 391.
- 4) Fujishima, M. and Hori, M. (1989) *Dev. Biol.*, 136, 455-458.
- 5) Fujishima, M., Kodama, I., Hori, M., Hori, M., Katsu, Y., Imai, R. (1991) *Exp. Cell Res.*, 193, 155-160.
- 6) Fujishima, M., Katsu, Y., Ogawa, E., Sakimura, M., Yamashita, M., Nagahama, Y. (1992) *J. Protozool.*, 39, 683-690.
- 7) Sugii, M., Hori, M. and Fujishima, M. (1996) *Zoological science*, 13 supplement, 63.
- 8) Haccard, O., Sarcevic, B., Lewellyn, A., Hartley, R., Roy, L., Izumi, T., Erikson, E. and Maller, J., L. (1993) *Science*, 262, 1262-1265.
- 9) Kosaka, H., Gotoh, Y. and Nishida, E. (1994) *EMBO J.*, 13, 2131-2138.
- 10) Hattori, S., Fukuda, M., Yamashita, T., Nakamura, S., Gotoh, Y. and Nishida, E. (1992) *J. Biol. Chem.*, 267, 20346-20351.
- 11) Leever, S., J. and Marshall, C., J. (1992) *EMBO J.*, 11, 569-574.
- 12) Sagata, N., Oskarsson, M., Copeland, T., Brumbaugh, J. and Vande Woude, G., F. (1988) *Nature*, 335, 519-525.
- 13) Furuno, N., Nishizawa, M., Okazaki, K., Tanaka, H., Ishiwata, J., Nakajo, N., Ogawa, Y. and Sagata, N. (1994) *EMBO J.*, 13, 2399-2410.