

所属 (主指導教官)	バイオサイエンス研究科・細胞増殖学講座（竹家達夫教授）		
氏名	与語圭一郎	提出	平成 14 年 1 月 8 日
題目	コネクシン 43 のリン酸化によるギャップ結合チャネル制御		

要旨

哺乳類の卵胞発育において、ギャップ結合は非常に重要な働きを持つ。卵胞内では、卵母細胞—顆粒膜細胞間あるいは顆粒膜細胞—顆粒膜細胞間がギャップ結合により直接連絡し代謝的に共役している。このギャップ結合を通じ、cAMP や Ca^{2+} イオンなどのセカンドメッセンジャー、アミノ酸、核酸等が細胞間を通過することが、卵母細胞への栄養供給や減数分裂再開抑制機構、あるいは顆粒膜細胞の増殖や分化に関与していると考えられている。ギャップ結合の構成タンパク質であるコネクシンには、多数のファミリー遺伝子が存在し、卵巣においては 7 種類のコネクシン遺伝子が発現しているが、なかでも顆粒膜細胞において発現しているコネクシン 43 (Cx43) は、そのノックアウトマウスの解析から卵胞発育過程において必須の役割を果たしていることが知られている。卵胞発育は主として下垂体から分泌される卵胞刺激ホルモン (FSH) によって制御されている。FSH は卵胞細胞の増殖・分化に重要な役割を担っており、FSH のノックアウトマウスは卵胞の発育が初期の時点で停止する。FSH 受容体は卵胞内の顆粒膜細胞に存在しており、下垂体を除去すると卵胞におけるギャップ結合は減少する一方、FSH 投与により顆粒膜細胞における Cx43 発現量が増加することが知られている。また、Cx43 は発育過程初期から後期に至るまで発現しており、その発現量・リン酸化レベルは発育とともに増加する。これらの知見は FSH による Cx43 制御機構の存在を示唆するが、その分子メカニズムについての詳細は不明であった。そこで、本研究では、卵胞発育における FSH の Cx43 制御機構の解明を目的とし、特に顆粒膜細胞において FSH が Cx43 タンパク質のリン酸化・細胞内局在・チャネル活性におよぼす影響を中心に解析した。

未成熟ラットの顆粒膜細胞初代培養系を用い、FSH を添加したところ、Cx43 タンパク質量が増加するとともに、リン酸化レベルの上昇が見られた。タンパク合成阻害剤であるシクロヘキシミドを添加してもリン酸化レベルの上昇は観察されたことから、これら二つの効果に相関関係はなく、FSH は Cx43 に対し多面的な制御を行っていることが分かった。次に、ギャップ結合を形成している Cx43 タンパク質は、非イオン性界面活性剤に不溶性となる特性を利用して、1% Triton X-100 を含むバッファーで溶解後、超遠心による細胞分画を行った。その結果、FSH 刺激により不溶性画分に存在する Cx43 量が増加することが分かり、また、不溶性画分の Cx43 は高度にリン酸化されていた。細胞内輸送の阻害剤であるブレフェルディン A (BFA) を顆粒膜細胞に作用させると、

FSH の存在下でもリン酸化および不溶性画分への集積は阻害された。そこで、BFA を作用させたあと BFA を除去し FSH の存在下で培養すると、コントロールに比べ Cx43 のリン酸化および不溶性画分に集積する時間が早くなった。これらの結果から、FSH は Cx43 の細胞内輸送を促進することでギャップ結合プラークの形成を促進していることが示唆された。

次に、FSH によって亢進されるリン酸化部位の同定を試みた。*in vivo* および *in vitro* においてリン酸化された Cx43 のリン酸化アミノ酸分析およびペプチドマッピングを行ったところ、Cx43 の細胞内 C 末端領域にある複数のセリン残基のリン酸化が亢進されていることが分かった。そこで、FSH の下流で活性化されることが知られているセリン／スレオニンキナーゼの阻害剤を用い、Cx43 のリン酸化レベルを調べたところ、PKA 阻害剤である H89 で阻害された。続いて、Cx43 の細胞内 C 末端領域に存在する PKA リン酸化コンセンサス部位であるセリン残基をアラニンに置換した点変異体を作製した。これらを基質とした *in vitro* リン酸化実験から、セリン 365、368、369、373 の 4 つの残基をリン酸化部位と同定した。これらすべてのセリン残基をアラニンに置換した変異体 (Cx43-S4A 変異体) は、精製 PKA によってリン酸化されなかった。これらの結果から、PKA は Cx43 の主要リン酸化酵素であり、また、4 つのセリン残基が PKA によってリン酸化され得ることが明らかとなった。

続いて、これらのリン酸化が Cx43 の機能に及ぼす影響を検討した。そのために、内在性の Cx43 をほとんど発現せず、ギャップ結合による細胞間相互作用を持たない HeLa 細胞を用いた。まず、HeLa 細胞に野生型 Cx43 を一過性に発現させてペプチドマップを行ったところ、この細胞においては強制的に発現させるだけでセリン 365、368、369、373 におけるリン酸化が認められた。そこで、Cx43 野生型および S365A, S368A, S369A, S373A, S4A 変異体 Cx43 を HeLa 細胞に導入し、トライトン可溶性アッセイを行ったところ、いずれの Cx43 変異体もギャップ結合を形成しうることがわかった。しかし、それぞれの安定発現株を構築し、ギャップ結合のチャンネル活性を色素の透過によって調べたところ、野生型 Cx43 株および単独 S→A 変異体株では活性が見られ、またそれらの間で差は認められなかったのに対し、S4A 変異体株では、空ベクター導入株と同程度にしか活性が認められなかった。また、内在性 Cx43 によるチャンネル活性の高い NRK 細胞においては、上記のセリン残基がリン酸化されていることが確認できた。これらの結果は、Cx43 のチャンネル活性にこれら複数の部位のリン酸化が必須であることを示唆する。

以上の実験により、FSH は卵胞内 Cx43 の発現量を増加させるとともに細胞内輸送を促進し、リン酸化レベルを増加させることにより、卵胞細胞間のギャップ結合を介した分子の移動を正に制御していると推測された。この制御は、卵胞発育における非常に重要な機能であると考えられる。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 与語圭一郎

ギャップ結合は、隣接する細胞間での cAMP や Ca^{2+} イオンなどのセカンドメッセンジャー、アミノ酸、核酸等の輸送を介した情報伝達を担っており、多細胞生物の発生、維持に必須な膜構造分子である。申請者は、哺乳類の卵胞発育におけるギャップ結合の役割に注目して研究を行った。これまで、ギャップ結合を構成するコネクシン遺伝子のノックアウトマウスでは、コネクシン 43 からなるギャップ結合が存在しないと卵胞発育に異常が生じ生殖不妊になることが知られている。しかし、その分子メカニズムの詳細については不明であった。一方、卵胞発育は主として下垂体から分泌される卵胞刺激ホルモン (FSH) によって制御されている。FSH は卵胞細胞の増殖・分化に重要な役割を担っており、FSH のノックアウトマウスにおいても卵胞発育が初期の時点で停止する。そこで、申請者は卵胞細胞初代培養系を設定し、FSH が Cx43 タンパク質のリン酸化・細胞内局在・チャネル活性におよぼす影響を中心に解析した。

培養系に FSH を添加したところ、Cx43 タンパク質量の増加、リン酸化レベルの上昇が見られた。その際、不溶性画分に存在する Cx43 量が増加しており、不溶性画分の Cx43 は高度にリン酸化されていた。これらの結果から、FSH は Cx43 の細胞内輸送を促進することでギャップ結合プラークの形成を促進していることがまず示唆された。

次に、FSH によって亢進されるリン酸化部位の同定を試み、リン酸化アミノ酸分析およびペプチドマッピングにより、C—末端領域に存在するセリン 365、368、369、373 の 4 つの残基をリン酸化部位と同定した。さらに、これらを基質とした *in vitro* リン酸化実験からも確認した。一方、これらのリン酸化反応が PKA 阻害剤である H89 で阻害されたこと、すべてのセリン残基をアラニンに置換した変異体 (Cx43-S4A 変異体) では、精製 PKA によるリン酸化が著しく減少したことなどから、PKA が Cx43 の主要リン酸化酵素であり、4 つのセリン残基のリン酸化に PKA が関わっていることが明らかとなった。

続いて、これらの部位のリン酸化が Cx43 の機能に及ぼす影響を検討した。そのために、内在性の Cx43 をほとんど発現せず、ギャップ結合による細胞間相互作用を持たない HeLa 細胞を用いた。Cx43 野生型および S365A, S368A, S369A, S373A, S4A 変異体 Cx43 を HeLa 細胞に導入したところ、いずれの Cx43 変異体もギャップ結合を形成しうることがわかった。しかし、それぞれの安定発現株を構築し、ギャップ結合のチャネル活性を色素の透過によって調べたところ、野生型 Cx43 株および単独 S→A 変異体株では活性が見られたのに対し、S4A 変異体株では、空ベクター導入株と同程度にしか活性が認められなかった。これらの結果は、これら複数の部位の同時リン酸化が Cx43 のチャネル活性に必須であることを示唆している。

以上の実験から、FSH は卵胞内 Cx43 の発現量を増加させるとともに、細胞内輸送を促進し、リン酸化レベルを増加させることにより、卵胞細胞間のギャップ結合を介した分子の移動を正に制御していると推測され、この制御が卵胞発育における非常に重要な機能であることが結論された。

以上のように、本論文は生殖に関わる卵胞発育におけるギャップ結合の分子制御機構を明らかにしたもので、学術上貢献するところが少なくない。よって審査員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。