



|              |                                                                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | Functional Involvement of Xenopus LIM-kinases in Progression of Oocyte Maturation                                                               |
| Author(s)    | 高橋, 知之                                                                                                                                          |
| Citation     | 大阪大学, 2001, 博士論文                                                                                                                                |
| Version Type |                                                                                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/43218">https://hdl.handle.net/11094/43218</a>                                                             |
| rights       |                                                                                                                                                 |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

|               |                                                                                                                                     |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名           | たか はし とも ゆき<br>高 橋 知 之                                                                                                              |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (医 学)                                                                                                                           |
| 学 位 記 番 号     | 第 1 6 5 8 7 号                                                                                                                       |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平 成 13 年 11 月 30 日                                                                                                                  |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 4 条第 2 項該当                                                                                                                    |
| 学 位 論 文 名     | Functional Involvement of <i>Xenopus</i> LIM-kinases in Progression of Oocyte Maturation.<br>(アフリカツメガエル卵成熟過程における LIM キナーゼの機能的役割の解明) |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 中 村 敏 一<br><br>(副査)<br>教 授 高 井 義 美    教 授 谷 口 直 之                                                                       |

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【目的】

LIM キナーゼ (LIMK) は HGF レセプターである c-Met 遺伝子のファミリー分子をスクリーニングする過程でクローニングされた LIM ドメインを有する新しいキナーゼ分子である。LIM ドメインは蛋白質間の相互作用に関わる機能ドメインであり、この LIM ドメインを有する蛋白質 (LIM 蛋白質) の多くのものは個体発生や細胞の増殖・分化・生存等に重要な働きをしていることが知られているが、キナーゼ等の触媒領域を持つ LIM 蛋白質はこれまでに例が無い。近年、LIMK はアクチン結合蛋白質であるコフィリンをリン酸化することにより、アクチン骨格の再構築に関与することが明らかとなった。さらにアクチン骨格を制御することがよく知られている Rho ファミリー分子が LIMK の活性化を担っていることも示されており、Rho ファミリー分子の新しい標的分子としても LIMK の機能が注目されている。その発現様式から LIMK は脳神経系の発生やその機能発現に重要であると考えられているが、実際の *in vivo* における機能的役割についてはほとんど報告が無いのが現状である。本研究はアフリカツメガエルを用いて、発生過程、特に卵成熟過程における LIMK の機能的役割を明らかにすることを目的とした。

#### 【方法ならびに成績】

哺乳動物 LIM キナーゼ (LIMK) において LIMK1 ならびに LIMK2 の二つのサブファミリー分子の存在が知られている。アフリカツメガエルにおいて LIMK ホモログ遺伝子をクローニングしたところ、アフリカツメガエル LIMK1 (Xlimk1) ならびに LIMK2 (Xlimk2) はそれぞれ哺乳動物 LIMK1 ならびに LIMK2 と高い相同性を示し、そのコフィリンに対するリン酸化能も保存されていた。その発現様式を Northern blot によって調べたところ、Xlimk 1/2 はほぼ同様の発現パターンを示し、卵母細胞や卵割期胚において強い発現が認められ、囊胚期においていったん発現が消失するものの、神経管が形成される神経胚後期には再び発現が認められるようになった。

次に Xlimk 1/2 mRNA ならびに蛋白質が卵母細胞に強く発現していることに着目し、その卵成熟過程に及ぼす影響について検討した。第一減数分裂前期の卵母細胞をプロゲステロンで刺激すると減数分裂が進行し、受精可能な成熟卵となる。その際に野生型 Xlimk1/2 mRNA を卵母細胞に顕微注入し、強制発現させたところ、卵成熟の進行に伴い出現する白色成熟斑の形成が有意に遅延した。さらに LIM ドメインを欠失した恒常活性型変異体を用いて同様の検討を行ったところ、白色成熟斑の形成はほとんど見られず、卵成熟の進行阻害が認められた。また恒常活性型 Xlimk1/2 導入卵では微小管構造の形成基点となる微小管形成中心 (microtubule organizing center; MTOC) の

形成が異常になっており、その後の紡錘体形成は全く認められなかった。この Xlimk1/2 mRNA の過剰発現はプロゲステロン刺激による MAPK、MPF の活性化には影響を及ぼさないが、内因性コフィリンのリン酸化（不活性化）を著しく亢進した。さらに Xlimk1/2 による卵成熟阻害活性はコフィリンの恒常活性型変異体を共発現させることにより、完全に阻止することができた。

#### 【総括】

卵成熟進行過程における LIMK の強制発現は MTOC の形成を阻害し、卵成熟の進行を妨げることを明らかにした。この LIMK による減数分裂進行の阻害活性はその基質であるコフィリンの恒常活性体との共発現によって救済された。このことは LIMK がコフィリンを介して卵成熟の進行に重要な細胞骨格系の制御に関わることを示している。これまで LIMK は脳神経系組織の発生・構築における重要性が示唆されてきたが、本研究により LIMK が生殖細胞形成過程においても重要な役割を担っていることが明らかとなった。実際にマウスでは精巣特異的な LIMK2 アイソフォーム分子が分化した精細胞に発現しており、LIMK2 欠損マウスにおいては精子形成の異常が認められている。

以上、本研究は LIMK-コフィリンを介した細胞骨格系の制御が減数分裂の進行・維持に重要な分子機構の一つであることを明らかにした。これまで LIMK はコフィリンを介してアクチン細胞骨格へ作用することが知られてきたが、本研究のような LIMK の微小管系への関与を示した例は無い。現在、LIMK-コフィリン-アクチンの系路、あるいは LIMK、コフィリンが直接微小管系に作用する可能性を考えて、LIMK による微小管系の制御機構の詳細な解析を進めている。

#### 論文審査の結果の要旨

LIM キナーゼ (LIMK) は LIM ドメインと呼ばれるモチーフ構造を有する新しいキナーゼ分子で、LIM 蛋白質ファミリーの新しいカテゴリーに属する情報伝達分子として生理的役割に関心が持たれている。LIMK は低分子量 G 蛋白質 Rho ファミリー分子による活性化を受け、アクチン脱重合因子のコフィリンをリン酸化するアクチン細胞骨格の再構成にとって重要な制御因子であるが、固体レベルにおける生理的な機能は不明であった。学位申請者は古くから発生生物学等の固体レベルの研究で有用な実験動物として知られるアフリカツメガエルの実験系を用いることで、LIMK が卵成熟（減数分裂）の進行過程に重要な役割を担う事を明らかにした。すなわち、卵母細胞をはじめとした発生初期過程に LIMK 遺伝子ならびに蛋白質が高度に発現していることに着目し、卵母細胞に対する遺伝子組み換え型 LIMK 遺伝子等の顕微注入を行った結果、LIMK の過剰発現は分裂装置の形成不全により減数分裂を阻害する事を明らかにした。この LIMK による減数分裂の阻害活性はその基質であるコフィリンの恒常活性体との共発現によって救済された。このことは LIMK がコフィリンを介して卵成熟の進行に重要な細胞骨格系の制御に関わることを示している。本研究は学位申請者によって初めてなされた研究であるが、本研究により LIMK-コフィリンを介した細胞骨格系の制御が減数分裂の進行・維持に重要な分子機構の一つであることが示されるとともに、これまで LIMK はコフィリンを介してアクチン細胞骨格を制御することが知られてきたが、初めて LIMK がコフィリンを介して微小管系へ作用することを明らかにした点でも極めてオリジナリティーの高い研究成果である。

以上の理由により高橋知之氏の論文は博士の学位授与に値するものである。