

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 岩崎 広 英

本研究は、卵成熟過程および受精におけるカルシウムイオンの役割を明らかにすることを目的として行われた。卵成熟誘起ホルモンが既に同定されているイトマキヒトデを用い、細胞内ストアからのカルシウムイオンの放出に関与するイノシトール 1,4,5-3 リン酸（以下 IP_3 ）受容体の機能に特に着目して行われた。下記の結果を得ている。

1. イトマキヒトデ卵巣の IP_3 受容体 cDNA を同定し、その塩基配列を決定した。イトマキヒトデ IP_3 受容体は 2698 個のアミノ酸からなり、配列より計算されるタンパク質の分子量は 308 kD であった。哺乳類の IP_3 受容体には 3 つのタイプが知られているが、イトマキヒトデ IP_3 受容体のアミノ酸配列はタイプ 1 IP_3 受容体のアミノ酸配列と最も高い相同性を示した。
2. これまでの研究から、卵成熟過程において卵の IP_3 に対する感受性が增大することが知られている。イトマキヒトデ IP_3 受容体のアミノ酸配列を元に抗体を作製し、卵成熟過程における IP_3 受容体の発現量をウエスタンブロッティング法を用いて調べた。卵成熟過程において IP_3 受容体の発現量は変化しなかった。したがって、卵成熟過程における卵の IP_3 に対する感受性が增大するのは、 IP_3 受容体の発現量が増大するためではないと考えられる。
3. IP_3 受容体に対する抗体を用いて、免疫組織化学染色を行った。共焦点レーザー顕微鏡を用いた。未成熟卵では卵核胞の外側にシグナルが認められたのに対し、卵核胞崩壊を開始した卵では元々卵核胞のあった領域に強いびまん性のシグナルが認められた。また、卵核胞が完全に消失した成熟卵では再びシグナルが卵全域に分散するのが観察された。

4. 最近開発された IP₃ sponge を用いて、イトマキヒトデ卵成熟および受精過程における IP₃ 受容体の役割を調べた。IP₃ sponge は、IP₃ 受容体の ligand binding domain の一部をグルタチオン S-トランスフェラーゼとの融合タンパク質として大腸菌に大量発現させたもので、高い IP₃ 結合能を有し、細胞に導入すると内在性の IP₃ 受容体への IP₃ の結合が拮抗的に阻害する。その結果、IP₃ を介した細胞内カルシウムストアからのカルシウムイオンの放出が阻害される。イトマキヒトデ卵に IP₃ sponge を注入した結果、卵成熟は正常に起こったが、受精膜の形成や卵賦活化が阻害されていることが分かった。

これらの結果から、イトマキヒトデ卵において IP₃ 受容体は受精時のカルシウムイオン濃度の上昇に重要な役割を担っており、受精膜形成や卵賦活化に関わっているが、卵成熟には必須ではないことが明らかになった。

以上本論文は、イトマキヒトデ卵で卵成熟ホルモンが同定されているという事実を利用し、また IP₃ 受容体の同定、抗体の作成、IP₃ sponge の利用など種々の技術を駆使して、卵成熟と受精過程における IP₃ 受容体の役割について新しい知見を提供したものであり、学位の授与に値するものと認められる。