

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 岩森 巨樹

初期胚の発生過程では細胞周期の G1 期が極端に短縮する特徴があり、これが卵割と呼ばれる特有の細胞分裂を起こす要因の 1 つとなっているが、哺乳動物では現在まで G1 期短縮の原因となる発生制御機構は明らかにされていない。本論文はこの原因の一端を明らかにしたものであり、緒言、4 章からなる本論、及び総括から構成されている。本論文を要約すると以下の通りである。

緒言では、まず G1 期短縮が卵内に母性因子が蓄積され転写が不要であるためとするカエル卵での一般的理解を紹介し、マウス初期胚では 4 細胞期以降転写を要するが、これ以降にも G1 期の著しい短縮が見られ、そのメカニズムは母性因子の存在では説明できないことを論じている。本研究ではこの原因が、S 期開始のシグナルが早期に活性化されるためとの仮説を立て、このシグナル系を調べることで哺乳動物特有の G1 期短縮の制御機構を見つけようとする実験方針を示している。

第 1 章では、S 期開始の細胞内シグナル伝達系である MAP キナーゼカスケードに着目している。このカスケードが恒常的活性化の状態であれば、S 期が早期に開始すると予想されるからである。哺乳動物の初期胚では、本カスケードは存在すら明らかではなかったが、本実験では全ての因子が初期発生過程を通し発現していることを示している。しかし 4 細胞期以降、本カスケードの活性化を示唆するリン酸化、および活性化の指標となる下流因子のサイクリン D1 の発現は検出されなかった。さらに本カスケードの阻害剤を処理しても胚の発生率は対照と変化ないことを示し、初期発生過程では MAP キナーゼカスケードは存在するものの全く活性化されないこと、したがって本カスケードが G1 期短縮の要因ではないことを考察している。

第 2 章では、より下流因子に焦点をあてている。一般に体細胞の S 期進行は、転写因子 E2F の活性を RB が阻害することにより抑制されており、RB 活性が抑制されれば S 期が早期に開始することになる。そこで初期胚の RB 発現を mRNA とタンパク質レベルで調べ、2 細胞期後期から桑実胚期まで発現が無く、胚盤胞期中期頃から発現するという動態を示している。また、E2F1 は初期発生過程を通し常に発現しており、その標的因子のサイクリン E は RB 発現と完全に逆の動態であることも確認している。以上より、2 細胞期後期から胚盤胞期中期まで RB の発現が無いことが E2F の恒常的活性化状態を生じさせ、下流の S 期進行を担う標的因子の発現を誘導することで S 期早期活性化が引き起こされ、G1 期が短縮するという可能性を示唆している。

第 3 章では、この可能性の正当性を検討するため、RB をマウス初期胚に強制発現させている。まず、RB 発現胚を選別する方法を検討し、蛍光タンパク質の EGFP と RB の発現プラスミドを共顕微注射し、EGFP の蛍光が RB 発現の指標なることを確認している。この実験系を用いて RB 発現胚の発生率を求め、4 細胞期までは正常だが、その後の発生

が著しく抑制されることを示している。この結果が環境要因によるものではないことは、2細胞期の片側の割球にのみRBを発現させ、RB発現割球のみ4細胞期の状態で停止し、発現させない側には多数の割球が存在することで確認している。また、この発生停止胚はBrdUの取り込みが無いことから、S期の前、すなわちG1期で停止することを示している。以上、初期胚へのRB強制発現が、ちょうど内在性RB発現が無くなる4細胞期のG1期で発生を停止させることを示し、先の可能性の正当性を強く示唆している。

第4章では、RB発現がG1期の延長ではなく停止を起こしたことに着目し、第1章の結果から初期胚ではRBの上流因子のサイクリンD1(D1)が発現していないことが原因と考え、RBに加えてD1を共発現させ発生率を求めている。その結果、RB/D1共発現胚は4細胞期で停止しないことから、RBの作用がD1により解除されることを示している。次に、E2F標的遺伝子の発現をmRNAレベルで調べ、RB発現胚では有意に発現が減少し、RB/D1共発現胚では回復することを示し、RBの作用が下流のE2F活性を抑制するためであることを確認している。以上から、4細胞期のG1期停止というRBの機能が、体細胞における生理的なG1期停止と同様の機構で作用したことを裏づけている。

以上の結果を総括し、哺乳動物の初期胚発生で見られるG1期の短縮は、RBの発現低下によりS期進行シグナルが恒常的に活性化するため、S期が早期に開始することが原因であるという全く新たな分子機構を導き出している。本論文の成果は生殖生物学や発生生物学といった基礎分野のみならず、畜産・医療等の応用分野の発展に有用な知見であり、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(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。