

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 杉浦 幸二

卵形成過程の最後に起こる減数分裂は卵の成熟と呼ばれ、受精・発生能を獲得する重要な期間である。卵成熟の制御機構は生殖生物学の重要な研究分野であり、その中心因子として成熟促進因子 (MPF) の存在が明らかにされている。MPF 活性上昇と同時に成熟が開始し、卵核胞 (GV) と呼ばれる巨大な核の核膜は消失する。MPF 活性が低下すると卵は第 1 極体を放出し、MPF が再活性化することによって第 2 減数分裂中期に達し成熟が完了する。GV は巨大な核であり、核膜消失によって内容物が細胞質中に放出されるため GV 内に卵の減数分裂を制御する因子が含まれているとの考え方もある。しかし哺乳動物では、卵成熟制御に対する GV の必要性、特に MPF 活性の制御と GV 内因子との相互作用に注目した十分な研究は見られない。本論文は、ブタ卵を用い卵成熟特異的な MPF 活性制御に対する GV 内因子の必要性を検討したものであり、緒言と 3 章からなる本論より構成されている。本論文を要約すると以下の通りである。

第 1 章では、ブタ卵から GV を除去した卵 (除核卵) を培養して MPF 活性の経時変化を調べている。その結果、除核卵でも卵成熟開始時の MPF の活性上昇は見られ、この時の活性化に GV は必要ないこと、しかし第 2 減数分裂へ進行するための再活性化が起こらないことを明らかにした。さらに、MPF 活性が低下した除核卵に、GV 内容物を注入すると再活性化が見られるようになることを示し、この再活性化に GV 内因子が必要であることを確認している。そこで以降の章では、MPF 再活性化に対する GV 内因子の必要性に絞って研究を行っている。

第 2 章では、MPF 再活性化への必要性が示唆されている MAP キナーゼに注目し、除核卵でこのキナーゼ活性に異常がある可能性について検討している。その結果、除核卵でも MAP キナーゼの活性化には異常が無いこと、しかし核膜消失以降の局在が異常であることを示している。一般にタンパク質が機能を発揮するには局在が重要であることから、MAP キナーゼの下流へのシグナル伝達機構に異常がある可能性を考え、次にこのキナーゼの下流因子である RSK に着目している。まず、哺乳動物卵では十分な報告がなかった RSK の酵素活性、リン酸化状態、MAP キナーゼとの関連について正常な卵を用いて調べ、RSK が MAP キナーゼによりリン酸化され活性化することを示唆している。その上で除核卵において RSK の動態を調べ、リン酸化、活性化、および局在に異常が無いことを示し、除核卵において MPF 再活性化が起こらなかった原因は MAP キナーゼカスケードの異常ではないと結論している。

第 3 章では、MPF の活性化に、その構成因子であるサイクリン B の蓄積が必要なことに着目している。ブタのサイクリン B にはサイクリン B1 (B1) とサイクリン B2(B2)が存在するが、これらの蓄積量を調べた結果、除核卵でも B2 量は正常であること、一方、B1 は一旦蓄積するがすぐに分解され、その後は蓄積が見られないこと、さらに、除核卵

に GV の核質を注入すると、B1 の蓄積が見られるようになることを明らかにしている。この結果から、除核卵の MPF 再活性化の異常は B1 蓄積量の不足によること、GV 内には、B1 蓄積を促す因子が存在することを示唆している。次に、GV 内因子が B1 の合成と分解のどちらを制御するか調べるため、B1 の分解に関与する APC に注目し、APC の B1 認識部位を除核卵に過剰発現させ B1 分解の特異的阻害を試みている。その結果、B1 認識部位の過剰発現除により、除核卵の B1 蓄積量が増して対照卵以上にまで至り、除核卵においても B1 合成は対照卵と同等以上であること、GV 内因子は B1 分解を阻害する因子であることを示唆している。

第 4 章では、種々の細胞種において APC 抑制が示されている Cdk2 に注目し、MPF 再活性化に必要な GV 内因子が Cdk2 である可能性を検討している。まず、正常な卵に Cdk2 の抗体を注入してこれを阻害し、B1 蓄積量が低下することから、プタ卵成熟過程でも Cdk2 が APC を制御していることを示唆している。次に、除核卵に活性型 Cdk2 タンパク質を注入すると B1 の蓄積が見られるようになること、さらに免疫染色により Cdk2 が GV 内に局在していることを明らかにしている。以上より、除核によって失われた、MPF 再活性化に必要とされる GV 内因子が Cdk2 である可能性を強く示唆している。

以上、本研究は減数分裂特異的な MPF 活性の制御に GV 内因子が関与することを哺乳動物卵で初めて明らかにし、卵が第 2 減数分裂期へ進行するための分子機構を提示している。本論文の成果は、基礎分野のみならず、畜産・医療等の多く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。