

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 関口 敏

ユビキチン-プロテアソーム系は選択的な蛋白処理を行うための主要な代謝経路である。ユビキチンは標的となる蛋白質に付加、連鎖しポリユビキチン鎖を形成し、ユビキチン化された蛋白質はプロテアソームと呼ばれる蛋白分解酵素複合体に認識、分解される。Ubiquitin Carboxyl-Terminal Hydrolases (UCHs) はポリユビキチン鎖のアミド結合を切断し、ユビキチンを再利用する脱ユビキチン化酵素である。ユビキチンC末端加水分解酵素1型 (UCH-L1) はUCHs ファミリーの一つで、神経細胞、精巢 (精粗細胞、セルトリ細胞)、卵巣 (卵母細胞) および胎盤 (脱落膜細胞) で特異的に発現する。本論文ではマウスの卵巣と初期胚における UCH-L1 およびその異なるサブタイプである UCH-L3 蛋白の発現様式と、マウス卵母細胞における UCH-L1 の機能解析を行った。

マウス卵母細胞の成熟および着床前胚発生における UCH-L1 および UCH-L3 の発現様式

これまで UCH-L1 が卵巣の卵母細胞に特異的に発現することは報告されているが、発現する卵母細胞を包む卵胞の成熟ステージや排卵後の成熟卵母細胞および着床前胚の存在様式は明らかではなかった。そこで、マウス卵母細胞の成熟および着床前胚発生における UCH-L1 および UCH-L3 の発現様式を検索した。その結果、卵巣内では UCH-L1 および UCH-L3 とともに原始卵胞から成熟卵胞の卵母細胞で、排卵後の発生過程では、成熟卵母細胞から胚盤胞において発現がみられた。このことから両蛋白は卵成熟、受精および胚の発生過程で重要な働きをすることが示唆された。

マウス卵母細胞における UCH-L1 の役割

gad マウスは UCH-L1 遺伝子のエクソン7と8が欠失している自然発症神経軸索変性マウスで、UCH-L1 ノックアウトマウスと同等と考えられている。本章では *gad* 雌マウスの排卵能および受精能を解析するため、*gad* 雌マウスに過排卵処置を行い、総排卵数とその中に含まれる正常成熟卵子数を検索した。さらに *gad* マウス卵母細胞と野生型マウス精子を用いて体外授精を行い、受精率を野生型マウス卵母細胞と比較した。その結果、*gad* 雌マウスの総排卵数、正常成熟卵子率および受精率は野生型の雌マウスのそれと有意な差はみられな

かったが、*gad* マウス卵母細胞の多精子受精率が野生型マウス卵母細胞に比べて有意に高い値を示した。さらに *gad* 雌マウスの繁殖能を解析するために、性成熟した *gad* 雌マウスに野生型の雄マウスを交配させ、産子数を野生型の雌マウスと比較したところ、*gad* 雌マウスの産子数が野生型に比べ有意に低いことがわかった。以上のことから、*gad* 雌マウスの産子数の低下は多精子受精による胎生致死に起因するものと考えられ、卵母細胞における UCH-L1 は多精拒否に関与していることが示唆された。

ユビキチン-プロテアソーム系の多精拒否機構への関与

マウスやヒトの多精拒否機構は主に透明帯反応と膜ブロックの二段階からなることが知られている。そこで、表層顆粒内物質の一つである Lens Culinaris Agglutinin の放出と透明帯の構成成分である糖タンパク質 (ZP2) の分解を指標に、*gad* マウスの卵母細胞の透明帯反応について検索したところ、それぞれの反応はともに正常に認められた。次に、透明帯を除去した *gad* マウスの卵母細胞を用いて体外授精を行い、卵母細胞と融合した精子数を野生型のそれと比較した結果、*gad* マウスの卵母細胞に融合した精子数が野生型に比べ有意に高い値を示した。このことから *gad* マウスの卵母細胞でみられた多精子受精は膜ブロックの機能不全によるものと考えられた。

UCH-L1 はモノユビキチンを安定化させる働きがあることから、*gad* マウスの卵母細胞におけるモノユビキチン量を野生型マウスのそれと比較したところ、*gad* マウスでモノユビキチン量の著しい減少がみられた。また正常マウス卵母細胞におけるユビキチン蛋白の局在を免疫組織化学的に検索したところ、UCH-L1 と同様に主に卵細胞膜に局在していた。このことから多精拒否機構、特に膜ブロックにはユビキチン-プロテアソーム系が関与している可能性が示唆された。しかし、透明帯を除去した正常マウス卵母細胞に対するプロテアソーム阻害剤の影響はみられなかった。以上のことからユビキチン-プロテアソーム系はプロテアソーム非依存性に膜ブロックに関与していることが示唆された。

本研究結果は個体の初期発生においてユビキチン-プロテアソーム系が深く関わっていることを証明したものであり、発生および繁殖学の基盤研究に重要な知見をもたらした。よって、審査委員一同、本論文が博士（獣医学）の学位論文をして価値あるものと認めた。