

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 井上 直子

成熟した哺乳類の卵巣には減数分裂を途中で停止している卵母細胞が数十万から数百万個含まれている。性周期毎に一定数の卵母細胞とそれを取り囲んで保育する顆粒層細胞からなる卵胞が発育を開始するが、排卵に至るまでに 99%以上が選択的に閉鎖してしまい、排卵されて遺伝子を次世代に受け継がせることが可能なものは 1%未満にすぎない。近年になってこの卵胞閉鎖の調節には顆粒層細胞におけるアポトーシスが支配的に関与していることがわかってきたが、未だにこれを制御している分子機構の詳細は明らかにされていない。申請者は、主要な家畜のひとつであり多産であることが有用形質であるブタを対象として、卵胞閉鎖時に顆粒層細胞に発現している細胞死受容体とそのアポトーシスにどのように関わっているのか調べた。

齧歯類の卵胞顆粒層細胞ではアポトーシス誘導因子として作用する tumor necrosis factor (TNF) α がブタ卵胞では増殖因子として働いていることを申請者らは示した。すなわち、ブタ卵胞顆粒層細胞ではアポトーシスシグナルを伝達する TNF receptor (TNFR) -1 が発現しておらず、逆に細胞増殖シグナルを伝達する TNFR-2 のみが発現していることを見出した。そこで申請者はブタ卵胞の閉鎖に係わる細胞死リガンド-受容体系を検索し、tumor necrosis factor related inducing ligand (TRAIL) とその受容体 (TRAIL receptor: TRAILR) および Fas ligand (FasL) とその受容体 Fas がブタ顆粒層細胞においてアポトーシスを誘導しているドミナントな細胞死リガンド-受容体系であることを見出した。TRAIL-TRAILR 系については次の知見を得た。すなわち、ブタ卵胞顆粒層細胞は腫瘍化していない健常細胞であるが、従来腫瘍化した細胞の死滅にのみ関わっていると考えられてきた TRAIL およびその受容体のひとつ death receptor 4 (DR4) と囮受容体 (decoy receptor 2: DcR2) が発現していること、生化学および組織細胞化学的にこれらの mRNA とタンパクの発現と局在の卵胞

の発育と閉鎖にともなう推移を調べたところ卵胞閉鎖にともなう TRAIL の発現が上昇し逆に DcR2 の発現が減少するが DR4 は変化しないことなどがわかった。さらに初代培養ブタ顆粒層細胞を用いて TRAIL にアポトーシス誘導能があること、DcR2 を取り除くと極低用量の TRAIL でもアポトーシスが誘導されることなどを示した。ついで FasL-Fas 系についても同様に生化学および組織細胞化学的に卵胞の発育と閉鎖にともなう mRNA とタンパクの発現と局在の推移を調べ、FasL は健常卵胞の顆粒層細胞には発現しておらず閉鎖を開始した卵胞の顆粒層細胞にのみ発現しており発現量が閉鎖に伴って増加すること、受容体 Fas は健常卵胞の顆粒層細胞でも発現しており発現量は閉鎖に伴って増加することなどを明らかとした。これらの知見を踏まえて細胞内アポトーシスシグナル伝達系を調べ、ブタ顆粒層細胞では特異的タンパク分解酵素である procaspase-8、procaspase-9、procaspase-3 などが次々と活性化して下流の基質タンパクを部分分解することで活性化させてシグナルを伝達する caspase カスケード系を介してシグナルが伝達されていることを明らかとした。この研究過程で未だ全塩基配列が明らかでなかったブタの Fas associating death domain (FADD) タンパク(リガンドと結合して活性化した受容体と結合してシグナルを下流に伝えるアダプタータンパク)と procaspase-8 (caspase カスケードの上流に位置するタンパク分解酵素で基質タンパク Bid を部分分解して活性化させる)のクローニングを行い、培養細胞を用いてこれらが種を超えてアポトーシスシグナル伝達機能を保存していることを示すとともに、顆粒層細胞はアポトーシスシグナルが Bid を介して一度ミトコンドリアに伝わってチトクローム C を放出させてから procaspase-9 の活性化がおこるミトコンドリア依存性の II 型アポトーシス細胞であることなどを明らかとした。

このようにブタ顆粒層細胞においては腫瘍細胞のアポトーシスにのみ関わっていると考えられてきた TRAIL-TRAILR 系が生理的細胞死である卵胞顆粒層細胞のアポトーシスの制御において重要な役割を果たしているという新規知見を含む申請者の研究業績をとりまとめた論文の内容および関連事項について試験を行った結果、審査委員一同が博士(農学)の学位を受けるに必要な学識を有する者と認め、合格と判定した。