

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 鹿島 光司

近年、哺乳類の初期胚はバイオテクノロジーの材料として多用され重要性を増しているが、その生理機構には不明な点が多く、カエル胚など他種で得られた結果がそのまま当てはめられている部分も多く見受けられる。本研究は哺乳類初期胚の分裂能に影響を及ぼすと考えられている **Cytostatic Factor (CSF)** の作用を詳細に解析することにより、哺乳類初期胚が持つ固有の生理機構の一端を明らかにしたものである。

まず緒言では、本研究で着目した **CSF** の説明、およびこの物質に着目するに至った経緯が述べられている。すなわち脊椎動物の未受精卵は第 2 減数分裂中期 (MII) で停止している必要があり、この停止を誘起する細胞内の因子が **CSF** であること、一方、未受精卵と対照的に受精後の初期胚は短時間に卵割を繰り返し、細胞数を著しく増加させる必要があり、この **CSF** に対する反応性は大きく異なる可能性があること、カエルでは **CSF** は未受精卵のみならず、初期胚をも M 期で停止させる強力な M 期停止因子であると定義され、哺乳類も同様と一般に信じられているが、哺乳類では **CSF** により初期胚が M 期で停止することを明確に示した報告は無いことを指摘している。

第 1 章では、**CSF** に対する哺乳類胚の反応を再確認するため、**CSF** の本体と考えられている **MAP** キナーゼ (**MAPK**) 経路について検討している。初期胚の **MAPK** を活性化するために、上流因子 **MEK** の恒常的活性型変異体を作製し、マウス受精卵の前核に発現ベクターを顕微注入した結果、カエル胚とは異なりマウス初期胚は M 期停止しなかった。さらに、**MAPK** 経路の最上流因子で、より強い M 期停止作用も持つ可能性がある **Mos** を初期胚に強制発現させた結果、野性型 **Mos** は急速に分解されたため、分解抑制型変異体を作製して検討したところ、**MAPK** 経路の活性化には成功したが、やはり M 期停止は起こらないことが確認された。

本実験は、未受精卵に MII 停止を誘起する **Mos/MAPK** 経路が、マウスでは受精後にその機能を失っているという事実を初めて明確に示したものであり、マウス初期胚には M 期停止を回避するためのカエル胚にはない独自の機構が存在していることを示唆している。そこで次章以降では、この M 期停止回避機構の解明を目指し、マウス初期胚に M 期停止を実験的に引き起こすことを試みている。

第 2 章では、カエル初期胚に M 期停止を誘導する因子として近年報告された **Emi1**、**Emi2**

に焦点を絞り、これらと EGFP の融合タンパク質発現ベクターを作製し、1 章と同様の方法でマウス初期胚に発現させている。まず EGFP 蛍光により細胞内の局在を検討した結果、Emi1/2 とともにマウス初期胚における特異的な細胞内局在を示すことに初めて成功している。Emi1 は野生型に加え活性化型変異 Emi1 も作製し解析したが、ともに M 期停止機能は見られなかった。一方、Emi2 にはわずかながら M 期停止能力が確認され、有意な作用は示されなかったものの、EGFP 蛍光が時間に伴い著しく減衰することが示され、マウス初期胚では Emi2 が速やかに分解されていることが示唆された。この結果より、マウス初期胚は Emi2 を速やかに分解するという独自の機構により、初期胚の分裂能を保障しているのではないかと予想している。

第 3 章ではこの予想を検証するため、Emi2 に分解抑制型の変異を導入した ds-Emi2 を作製し、マウス初期胚で発現させ、M 期停止作用を検討している。その結果、多くの初期胚が M 期で停止し、M 期促進因子(MPF)の構成因子である Cyclin B の分解抑制が確認された。この結果は ds-Emi2 による初期胚の停止が、M期脱出に働く APC の抑制による Cyclin B 蓄積を原因とする、MPF の活性化に起因することを示唆している。さらにカエルにおける定義にしたがい、マウス 2 細胞期胚の片側の割球に ds-Emi2 を注入したところ、注入割球のみが M 期で停止することが示された。

これらの結果をもとに総括において、本研究がマウスにおいて CSF とされる因子により初期胚を M 期で停止させることに成功した初めての実験結果であることを述べ、さらに CSF のうち唯一 Emi2 がマウスにおいて初期胚を未受精卵と同様に停止させ得る因子であり、マウスでは初期発生を容易に M 期で停止させないために、Emi2 を非常に強力に分解するという独自の機構を獲得していることを示唆している。

以上、本研究はマウス初期胚に対する従来の理解を否定するとともに、マウス初期胚が特有に持つ生理機構の一端を明らかにしており、発生生物学分野における学術的な面のみならず、近年のバイオテクノロジーに対する応用面においても貢献するところが少なくな。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。