

論文の内容の要旨

応用動物科学 専攻

平成 17 年度博士課程 進学

氏 名 久米佐知

指導教員名 内藤邦彦

論文題目 ブタ卵の減数分裂に対する RINGO の機能解析

哺乳類の卵巣内の卵は第一減数分裂前期で細胞周期を停止しており、mRNA やタンパク質を合成・蓄積しながら大きく成長する。十分成長した卵は、ホルモン刺激を受けると減数分裂を再開し、多くの動物では第二減数分裂中期で再び停止する。この第一減数分裂前期脱出から第二減数分裂中期までを卵成熟と呼び、卵成熟が完了すると受精が可能となる。

卵成熟の制御には Cdc2 の活性が重要であることが知られており、この制御には Cyclin B をはじめとする種々の因子の関与が報告されているが、未だ全容は明らかではない。

近年、卵成熟の制御に関与するRINGO(Rapid inducer of G₂/M progression in oocytes)が新規遺伝子として*Xenopus*で報告された。RINGOは、約 300 アミノ酸残基からなり、サイクリンなどの既知タンパク質と相同性が無いが、Cdc2 と結合し、その活性を上昇させること、またその合成を阻害すると卵成熟が極端に遅れることから*Xenopus*の卵成熟進行に重要であることが示唆されている。

哺乳類では RINGO の存在は遺伝子レベルで報告されているものの、卵における機能解析は全く行なわれていない。そこで本研究では、哺乳類卵の減数分裂過程における RINGO の機能を調べることを目的とし、ブタ卵を用いて解析した。

【第1章】

第1章では、ブタ卵減数分裂過程に RINGO が関与する可能性を調べることを目的に、*Xenopus* RINGO(xRINGO)の cDNA の譲渡を受け、ブタ未成熟卵に xRINGO を強制発現させて作用があるか否かを調べた。

mRNA の注入と、それによるタンパク質発現を、RT-PCR および ³⁵S メチオニン取り込みにより確認したところ、mRNA を注入した卵ではどちらも特異的なバンドが検出でき、mRNA の注入により xRINGO が発現されることが確認できた。そこで xRINGO 発現による影響を調べた結果、卵成熟開始の指標である卵核胞崩壊 (GVBD) の率が、培養 12 時間後において対照卵では 0%であるのに対し、xRINGO 発現卵では約 80%と、成熟開始が非常に早まることが示された。また成熟制御の中心因子である Cdc2 の活性上昇や、Cdc2 の活性に重要である Cyclin B1、B2 の合成が早期に誘導された。しかし、通常卵成熟が完了する培養 48 時間において第一減数分裂中期 (M1) で停止しており、成熟が完了しないという異常も見られた。

xRINGO 発現によって成熟進行が途中で停止するものの、ブタ卵の成熟が非常に早期に誘起されたことから、ブタ卵成熟において RINGO が機能している可能性が考えられた。

【第2章】

次に第2章では、ブタ RINGO(pRINGO)遺伝子をクローニングし、ブタ卵成熟における RINGO の機能を強制発現および発現抑制により調べた。

クローニングの結果、ヒトやマウスで報告されたアミノ酸配列と 90%以上の相同性が得られブタに RINGO が保存されていることが明らかになった。さらに RT-PCR により、卵成熟過程を通して RINGO mRNA が存在していることがわかった。このことから、ブタ卵成熟過程において RINGO が機能している可能性が示唆された。

そこで次に、ブタ RINGO(pRINGO)を強制発現させてブタ卵成熟への影響を調べた。その結果、対照卵では培養 12、18 時間後において GVBD が全く起きていないのに対し、ブタ RINGO 発現卵では、培養 12 時間で 50%以上、18 時間ではほぼ 100%卵が GVBD を起こしており、xRINGO と同様に卵成熟が非常に早期に誘導された。また Cdc2 の活性上昇や、Cyclin B1、B2 の合成も早期に誘導された。このことからブタの RINGO の強制発現によっても xRINGO と同様に卵成熟関連因子の活性化や発現が早期に誘導されることが明らかになった。卵成熟開始以降についても調べたところ、pRINGO は xRINGO とは違い、培養 48 時間後には対照卵と同様に成熟が完了していた。また、pRINGO を強制発現した場合の新規合

成タンパク質を ^{35}S -メチオニン取り込み実験により調べた結果、xRINGO は多量に蓄積していたのに対し、pRINGO A2 は全く蓄積しなかった。このことからブタ卵における RINGO A2 は発現後にすみやかに分解されることが推測された。*Xenopus* とブタで RINGO の分解の違いが見られたため、分解の標的となる配列の比較を行なった。*Xenopus* では、分解に関与するとされる PEST 配列を持っているが、ブタのその領域における相同性は非常に低く、そのため *Xenopus* とブタでは、RINGO の分解に必要な認識配列が異なり、ブタ卵内では xRINGO を分解できなかったために M1 で停止したと考えられた。

次に、pRINGO の Antisense RNA 注入により発現抑制を行なった。その結果、培養 24 時間後における GVBD 率が、Antisense RNA 注入卵では若干低下する傾向が得られた。なお、培養 48 時間後に第 2 減数分裂中期 (M2) に達した成熟率も低下する傾向が得られた。Antisense RNA 注入卵の Cyclin B1 B2、Cdc2 の合成パターンについても調べたが、これらには大きな変化は見られなかった。

2 章の結果より、ブタに RINGO が保存されており、卵成熟過程で mRNA が発現していることが初めて明らかになった。また pRINGO は卵成熟を強力に促進し、卵成熟の正常な進行において発現後にすみやかに分解されることが示された。そして、発現抑制により卵成熟進行が遅れる傾向があることから、pRINGO が機能している可能性が示唆された。しかし発現抑制の結果は有意な差ではなかった。最近の研究より哺乳類には RINGO ファミリーが存在することが報告されており、哺乳類の卵成熟では今回クローニングした RINGO 以外の RINGO ファミリーも機能しているからではないかと考えた。

【第 3 章】

哺乳類の RINGO ファミリーは、A、B、C、D、E の 5 つが報告されている。本研究の 2 章でクローニングした pRINGO は、アミノ酸の配列比較により A に属し、さらにスプライシングバリエーションの A2 であることがわかった。RINGO ファミリーの中では、RINGO C が一番 RINGO A2 に相同性が高く、RINGO C は RINGO A2 と機能が近い可能性があると考え、まずブタ RINGO C (pRINGO C) の部分配列をクローニングし、Antisense RNA 注入により発現抑制を行なった。

RINGO C 部分配列のクローニングを試みた結果、ヒト・ウシの RINGO C に相同性が非常に高い配列がクローニングでき、ブタに RINGO C が保存されていることが示された。さらに RT-PCR により、卵成熟過程を通して RINGO C mRNA が存在していることがわかった。そこでブタ RINGO C に対する Antisense RNA を作製し、ブタ卵に注入して卵成熟への影響を調べた。その結果、GVBD 率および成熟率が RINGO A2 と同様に低下する傾向が得られた。また、培養 24 時間後

における **Cyclin B2** の合成量が減少し、また **ERK** や **RSK** の活性化が遅れ、**pRINGO A2** 抑制時には見られなかった阻害効果が現れた。

これらの 3 章の結果と 2 章の結果から、**RINGO A** および **C** の合成がブタ卵成熟の進行に関与し、特に **RINGO C** が主に機能している可能性が示唆された。しかし、それぞれを単独で抑制しても卵成熟進行の抑制効果が有意な差ではないことから、**RINGO A2** と **C** の同時抑制、および全 **RINGO** ファミリーの同時抑制を試みた。まず **Antisense RNA** 共注入により **RINGO A2** と **C** の同時抑制をおこなったところ、**pRINGO A2** および **C** それぞれを抑制したときに見られた卵成熟進行の阻害傾向がまったく見られなくなった。この原因は、**in vitro translation** を用いた実験により、**pRINGO A2** および **C** の **Antisense RNA** を共注入するとそれぞれの抑制効果が失われるためであるとわかった。**pRINGO A2**、**C** の **Antisense RNA** をそれぞれ注入したときに見られた **GVBD** 誘起が遅れる傾向は有意な差ではなかったが、**Antisense RNA** の阻害効果の消失によりその傾向がなくなることから、確かに **Antisense RNA** の阻害効果によるものであることが強く示唆された。

次に **RINGO** ファミリーすべてが持っている、**CDK** に結合するために必要であるが、それのみでは **CDK** を活性化させることはできない **RINGO Box** のみを強制発現させることで、**RINGO** ファミリーの競合阻害を試みた。その結果、予想に反して卵の減数分裂進行が促進された。このことは、少なくともブタ卵内において **RINGO** は、**RINGO Box** のみで **Cdc2** を活性化できることを示唆している。**RINGO Box** 強制発現により **RINGO** ファミリーすべてを阻害することはできなかったが、ブタ卵内では **RINGO Box** も **Cdc2** の活性化に関与する可能性があるという初めての知見が得られた。

これらの結果から、ブタ卵の減数分裂過程における **RINGO** の機能としては、**GVBD** が誘起される前に合成され、**Cyclin B** など卵の減数分裂の制御因子の翻訳促進に働き、その後速やかに分解されるのではないかと考えられる。そして **RINGO** ファミリーの内、少なくとも **RINGO A2** および **C** が機能している可能性が示された。