

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 久米 佐知

哺乳類の卵巣内に多量に存在する卵は第一減数分裂前期で細胞周期を停止しており、受精可能な第二減数分裂中期(M2)に至る減数分裂過程は卵成熟と呼ばれる。この制御には細胞周期のM期制御因子であるCdc2 活性が重要な役割を果たし、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、未だ全容は不明で未知の因子の関与が示唆されている。近年、卵成熟の制御に関与する新規遺伝子としてRINGO(Rapid inducer of G2/M progression in oocytes)が*Xenopus*で報告された。哺乳類でもRINGO遺伝子の存在は報告されているが、卵における機能解析は全く行なわれていない。本研究は、ブタ卵を材料として哺乳類卵の減数分裂過程におけるRINGOの機能を解析し、卵成熟制御機構の一端を明らかにしたものである。

第1章では、ブタ卵減数分裂過程に RINGO が関与している可能性を調べるため、*Xenopus* の RINGO mRNA をブタ未成熟卵に注入し、強制発現させ作用を調べた。その結果、RINGO 強制発現卵では卵成熟開始が有意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、Cyclin B1、B2 の合成が早期に誘導された。一方、通常卵成熟が完了する培養 48 時間において第1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 発現によってブタ卵の成熟誘起が促進されたことから、ブタ卵成熟において RINGO が機能している可能性が高いと考えられた。

そこで2章では、ブタ RINGO 遺伝子をクローニングし、ブタ卵成熟におけるブタ RINGO(pRINGO)の機能を調べた。クローニングの結果、ヒトやマウスとアミノ酸配列で90%以上の相同性をもつ配列が得られブタに RINGO が保存されていること、さらにRT-PCRにより卵成熟過程を通して mRNA が存在していることがわかった。次に pRINGO を強制発現させた結果、xRINGO と同様に卵成熟が促進され、また Cdc2 の活性上昇や、Cyclin B1、B2 の合成も早期に誘導された。一方、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。mRNA 注入後の RINGO の発現を ³⁵S-メチオニン取り込みで調べた結果、xRINGO は多量に蓄積していたのに対し、pRINGO は全く蓄積しなかった。分解の標的配列とされる PEST 配列は xRINGO と pRINGO で相同性が非常に低いことから、ブタ卵内では xRINGO を分解できないと考えられ、そのため M1 を脱出できず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った結果、培養 48 時間後の成熟率は有意に低下した。しかし Cyclin B1、B2、Cdc2 の合成パターンには大きな変化は見られず、培養 24 時間後の GVBD 率は若干低下す

るのみであった。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、発現抑制が GVBD 率に有意な差を与えなかったの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。

そこで第 3 章では RINGO ファミリーの作用について解析した。哺乳類の RINGO は、A から E の 5 つが報告されており、2 章でクローニングした pRINGO は、アミノ酸の配列比較より A であった。RINGO ファミリーの中では C が一番 A と相同性が高く、機能が近いと考えられた。そこでブタ RINGO C(pRINGO C)をクローニングしヒト・ウシと相同性が非常に高い部分配列を得た。そこで Antisense RNA 注入による発現抑制を試みた結果、GVBD 率の有意な低下が観察された。最後に RINGO ファミリーに相同性の高い RINGO Box のみの発現により、全 RINGO ファミリーの競合阻害を試みたところ、ブタ卵では RINGO Box のみで卵成熟の促進作用があることが明らかとなり、全 RINGO ファミリーの阻害はできなかったが、ブタ RINGO の特性が明らかとなった。

これらの結果から、ブタ RINGO A および C の合成がブタ卵成熟の進行に関与し、特に減数分裂の再開には RINGO C が、またその後 M2 へ至る過程の進行には主に RINGO A が機能している可能性が示唆された。

以上、本研究は哺乳類卵に対する RINGO の機能を初めて解析し、減数分裂過程の制御に重要な作用ももつ可能性を示唆したものであり、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。