

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 西村 行雄

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(GV 期)で細胞周期を停止しており、卵成熟開始ホルモンの刺激を受けると減数分裂を再開し、受精能を持つ成熟卵となる。この減数分裂の再開機構の解明は、生物学の主要な研究テーマの一つである。GV 期卵の卵内には母性由来の大量の mRNA が翻訳抑制状態で蓄積されており、これらの mRNA 翻訳制御が減数分裂再開には極めて重要であると考えられている。近年、アフリカツメガエルにおいて、分裂期キナーゼである Aurora A が、卵成熟進行に重要な働きを担う CyclinB や Mos などの mRNA の翻訳に主要な働きをすることが報告された。しかし、哺乳類卵においては Aurora A の翻訳制御、および卵の減数分裂再開に対する作用は明らかとなっていない。

本研究は蛋白質合成が減数分裂の再開に必須なブタ卵を材料に用い、哺乳類卵の減数分裂再開における Aurora A の機能について解析したものである。

第 1 章ではブタの Aurora A 遺伝子のクローニングとブタ卵減数分裂における存在を確認した。ブタ卵 Total RNA を用いて RT-PCR を行ったところ、予測されるサイズの PCR 産物を得られ、シーケンス解析の結果、ヒト、マウス、アフリカツメガエルの配列と高い相関性が確認され、その機能の重要性が示唆された。次に卵減数分裂過程における Aurora A の存在を mRNA と蛋白質レベルで確認し、Aurora A は GV 期で既に存在し、卵減数分裂過程を通して一定量存在することを示した。また、対照のヒト乳癌細胞と比較し、著しく大量に存在することから、減数分裂特有の重要な機能を担っている可能性を示唆した。

第 2 章ではブタ Aurora A を強制発現し卵減数分裂進行への影響を確認した。第 1 章で得た遺伝子配列を元に Aurora A mRNA を合成し、ブタ GV 期卵に顕微注入して強制発現させたところブタ卵減数分裂再開の促進効果は見られなかった。発現させた Aurora A が卵内で活性化されていない可能性を考え、次にアフリカツメガエル Aurora A のリン酸化による活性制御の知見を元に、恒常活性型のブタ Aurora A 変異体を作製し、これを卵に発現させた。その結果、CyclinB1/B2 の発現は、対照と比較して約 12 時間早い発現が確認され、減数分裂再開も顕著に早まることを示した。この結果は、哺乳類卵において Aurora A が減数分裂関連因子群の翻訳制御を通じて、減数分裂再開に機能することを示した初めてのものである。また、Aurora A が卵内においてリン酸化制御を受けている可能性も示唆した。

第 3 章では内在性のブタ Aurora A が生理的に機能している可能性を探ることとし、まずブ

タ Aurora A アンチセンス RNA をブタ卵に注入し発現抑制による影響を確認した。Aurora A はGV期で既に豊富に存在しているため、卵をGV期で維持した条件で十分に発現抑制し、Aurora A 量を極めて減少させた後に成熟培養を行い影響を調べた。その結果、Aurora A の減少条件を作り出すことはできたが、CyclinB1/B2、Mos の発現に有意な差は見られず、減数分裂進行にも影響は見られなかった。この原因は量的には有意な減少は見られるものの Aurora A の明らかなバンドが検出されたことから、この実験系では効果が現れるまで Aurora A を枯渇させられないことによると考えた。そこで次に、Aurora A の作用基質である CPEB の競合阻害による Aurora A の機能阻害を試みた。ブタ CPEB 遺伝子を前述と同様にクローニングしこれを過剰発現させたところ、野生型 CPEB 発現では抑制作用は見られなかったものの、CPEB の Aurora A による特異的リン酸化部位に変異を入れた CPEB 変異体を卵内に発現させた結果、対照と比較して CyclinB1/B2 の明らかな発現低下が確認され減数分裂再開にも顕著な遅れがみられた。さらに、変異型 CPEB 発現条件下で Aurora A を減少させることで、さらなる CyclinB1/B2 発現の低下が見られ、減数分裂再開もさらに顕著な遅れが確認された。これらの結果から、内在性 Aurora A が卵減数分裂に関わる因子群の翻訳制御に機能し、減数分裂の再開に働くことが哺乳類卵において初めて示唆された。さらに哺乳類卵においても Aurora A の作用は CPEB のリン酸化による活性制御を介して発現されることが示唆された。

以上、本研究は哺乳類卵に対する Aurora A 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をもつ可能性を示唆したものであり、生殖生物学分野における基礎研究として貢献するところが少なくない。よって審査委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。