

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 程 圓

哺乳類の雌では、胎児期に卵祖細胞が有糸分裂を終了した後減数分裂を開始して卵母細胞となり、これが減数分裂をディプロテン期で休止している状態で出生する。この卵母細胞は卵胞上皮細胞（顆粒層細胞）に包まれて卵胞を形成し、これが性成熟に達した成体の卵巣には数十万個含まれている。性周期毎に一定数の卵母細胞が減数分裂を再開して発育・成熟して排卵されるが、この過程で99%以上の卵胞が選択的に閉鎖する。この卵胞閉鎖の誘起に顆粒層細胞のアポトーシスが支配的に関与しているが、これを制御する機構やアポトーシスシグナルの細胞内伝達経路については多くの点が未解明である。これまでに、重要な家畜であるブタの顆粒層細胞ではアポトーシスが細胞死リガンドと受容体を介して誘起されること、そのシグナルがミトコンドリアを介して伝達するII型アポトーシス細胞であること、卵胞の発育開始時からリガンドと受容体がともに発現していること、受容体の直下でシグナル伝達を阻害している cellular FLICE-like inhibitory protein (cFLIP) によって調節されていることなどが分かってきている。

申請者は、顆粒層細胞の死滅を制御している cFLIP の発現を調節している分子機構を詳細に調べ、加えてアポトーシスシグナルを阻害している因子が cFLIP 以外に存在していることが推測されたのでその探索も行った。はじめに培養顆粒層細胞を様々な成長因子、ホルモン、サイトカインなどを添加した培養液中で培養した後 cFLIP の発現を調べ、tumor necrosis factor (TNF) α が cFLIP の発現を亢進することを見いだした。ついで TNF α は、申請者がクローニングを行ったブタ2型受容体 (TNFR2) と結合して転写因子の nuclear factor- κ B (NF- κ B) を活性化し、これを介して cFLIP の転写を亢進していることを明らかにした。さらに膜に結合している TNF α と受容体を細胞膜から切り離すことで TNF α シグナル伝達を阻害するブタ TNF α -converting enzyme (TACE) のクローニングを行い、培養顆

粒層細胞を用いて TACE が TNFR2 を切断すると cFLIP 発現が抑制されること、TACE 発現を阻害すると cFLIP 発現が亢進することを示した。ブタの卵巢組織では、卵胞発育開始時から TNF α 、TNFR2 および cFLIP が発現しており、健常卵胞の顆粒層細胞においてはこれらが高発現しているが、閉鎖卵胞では減少すること、TACE は健常卵胞顆粒層細胞には発現していないが、閉鎖卵胞顆粒層細胞に高発現しており、この発現部位とアポトーシス細胞の局在とが一致することなどを組織化学的に示した。最期に cFLIP とは異なりミトコンドリアの直下でアポトーシスを阻害しているブタ X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) のクローニングを行い、これが健常卵胞顆粒層細胞において高発現し、閉鎖卵胞では減少することを示した。

以上のように多くの新規知見を含む申請者の研究によって、ブタの健常卵胞においては顆粒層細胞が TNF α を産生し、これが自身の TNFR2 に結合して NF- κ B を活性化し、これを介して cFLIP 産生を亢進することでミトコンドリアより上流のアポトーシスシグナル伝達が阻害されていること、閉鎖卵胞では TACE が TNFR2 を切断してシグナル伝達を阻害して速やかにアポトーシスを進行させること、および健常卵胞顆粒層細胞においては cFLIP に加えて XIAP がミトコンドリアより下流のシグナル伝達を阻害していることが示され、このような機構によって卵胞の健常性が調節されていることが分かった。これらの細胞死阻害因子は生殖工学に供する卵胞・卵母細胞の健常性を評価するためのパラメーターとして有用であると考えられる。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。