

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 嶋岡 琢磨

哺乳類の卵母細胞は、卵巣内では減数分裂を第一減数分裂前期で停止（一次停止）しており、排卵直前に減数分裂を再開して受精可能な状態になる。この減数分裂再開は卵内のM期促進因子(MPF)の活性化に伴って起こり、MPFの活性は触媒サブユニットであるCdc2の抑制的リン酸化と調節サブユニットであるサイクリンBの量的変動によって制御される。齧歯類では一次停止時のMPF活性の抑制はCdc2のリン酸化のみに依存し、この抑制的リン酸化に機能するキナーゼWee1Bが近年マウスで発見された。一方、齧歯類以外の哺乳類卵ではMPFの抑制的リン酸化が一次停止維持に果たす役割は齧歯類と異なる可能性が指摘されており、一次停止維持機構の詳細は不明である。また、現在Wee1Bはマウスのみで報告されており、他種でも普遍的に存在し機能するかは不明である。本研究は齧歯類以外の哺乳類卵であるブタ卵を用いWee1Bの存在と一次停止への機能を探ることを目的としたものである。

第1章では、マウスWee1Bの配列を基にプライマーを設計し、RT-PCR、5'-および3'-RACEを行いブタWee1Bの完全長cDNAを得た。その配列を解析し、塩基配列、アミノ酸配列共にマウスWee1Bと非常に相同性が高く、マウス・ブタ間でWee1Bが高度に保存されていることから、Wee1Bが哺乳類に普遍的に存在する可能性が示唆された。

第2章では、ブタ卵においてWee1BがCdc2を抑制的にリン酸化し減数分裂再開を抑制する機能を持つかを調べた。ブタ卵は卵巣から取り出し体外で培養すると自発的に減数分裂を再開することが知られている。そこで、得られたブタWee1B cDNAよりmRNAをin vitroで合成し、ブタ一次停止卵に顕微注入してWee1Bの過剰発現を試みた。その結果、一次停止の最上流因子であるcAMPが低濃度存在する条件で、ブタWee1B mRNA注入卵は著しく減数分裂再開が抑制されており、抑制的リン酸化を受けたCdc2量も顕著に増加していた。これらの結果から、ブタWee1BはCdc2を抑制的にリン酸化する機能を持つこと、また、その活性化にはcAMPが必要であることが示された。

第3章では、内在性のWee1Bがブタ卵の一次停止に機能しているかを調べるため、ブタWee1Bのantisense RNAをin vitroで合成し、ブタ一次停止卵に顕微注入して発現抑制を試みた。その結果、卵巣内の状態を反映する高濃度のcAMP存在下で減数分裂再開をほぼ完全に抑制してもantisense RNA注入卵は減数分裂を再開した。このことから、ブタ卵に

において内在性 Wee1B が一次停止維持に不可欠である事が示された。また、ブタ卵内のサイクリン B 量の増加は、cAMP 濃度の低下によって起こる Wee1B 活性低下に続く MPF の活性上昇の後に開始される事もつきとめた。

以上の結果により、ブタの卵母細胞において一次停止は Wee1B の活性によって維持される事が示され、一次停止解除はサイクリン B 量の増加ではなく Wee1B の活性の低下による MPF 活性の上昇が引き金となることが示唆された。

第 4 章ではブタ Wee1B の活性制御機構の解明を試み、ブタ Wee1B は一次停止卵では卵核胞内に局在し、この局在が Cdc2 の効率的な抑制的リン酸化に必要であることを示唆した。さらに、ブタ Wee1B 活性制御部位を明らかにするため、cAMP 依存性タンパク質キナーゼ (PKA) によるリン酸化部位をデータベースを用いて予測し、可能性が高い 4 カ所のセリンをそれぞれアラニンに置換して活性を調べた。その結果 77 番のセリンが Wee1B の活性制御に関与することを示唆した。

以上、本研究は齧歯類以外の哺乳類卵において、従来の減数分裂一次停止制御機構の理解を否定するとともに、その中心的因子である Wee1B の機能を明らかにした初めての報告であり、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。