［別紙２］

論文審査の結果の要旨

申請者氏名　山室　匡史

第一減数分裂前期で停止している卵巣内の卵母細胞が、正常に減数分裂を進行するにはM期促進因子（MPF）の厳密な活性制御が必要である。減数分裂進行におけるMPF活性の複雑な変動は、その調節サブユニットであるCyclin Bの蓄積量と非常によく相関している。しかし、Cyclin Bの増減を制御する機構の詳細に関しては不明瞭な点が数多く残されている。本研究は、哺乳類卵の減数分裂過程における、このCyclin Bの量的変動の制御メカニズムを明らかにすることを目的とし、タンパク質蓄積の両側面である合成と分解の双方に着目して、それぞれの制御機構を解析したものである。

第１章ではブタ卵を用い減数分裂過程におけるCyclin B分解制御機構を解析した。Cyclin B分解は、ユビキチン鎖を付加してプロテアソームによる分解を導くユビキチンリガーゼのAnaphase-Promoting Complex（APC）によって制御されている。APCの活性化には、CDC20またはCDH1のどちらかとの結合が必要であり、これら因子の違いによって、基質や活性時期が制御される。そこで以前クローニングしたブタCDC20、CDH1のcDNA全長配列をもとに、それぞれのアンチセンスRNA(asRNA)を作製し、ブタ卵内に顕微注入して発現を抑制した。その結果、APC-CDC20はM1から後期への移行の時期に、APC-CDH1は成熟初期にCyclin B分解機能を有することが示された。

さらに、CDC20、CDH1のmRNA顕微注入による、過剰発現の影響を解析した結果、CDH1過剰発現では、予想通り減数分裂開始の抑制とCyclin B蓄積の阻害が確認された。一方、CDC20 mRNA注入卵では、成熟初期にCyclin Bの蓄積促進が見られ、むしろAPCの活性は抑制された。これは、CDC20がAPC-CDH1の標的となり、他のタンパク質の分解を拮抗的に阻害したためであることが確かめられた。

以上のことから、成熟初期にはAPC-CDH1のみが働き、Cyclin B蓄積を阻害して減数分裂開始を抑制しており、その後、CDH1は機能をCDC20に譲り、M1ではAPC-CDC20がCyclin Bを分解して卵を後期に移行させる、という減数分裂特異的な分解制御機構が明らかになった。

第２章ではブタ卵の減数分裂過程におけるCyclin B翻訳制御機構を解析した。哺乳類のCyclin Bには、Cyclin B1、Cyclin B2の２種類が存在するが、Cyclin B2がM1から後期への移行時に大幅に減少するのに対し、Cyclin B1はM1以降も蓄積しM2において最大値をとる。この差異は、前章の分解制御機構では説明出来ず、合成制御の違いによると考え

られる。卵内のタンパク質合成は、蓄積された母性 mRNA の翻訳が開始することで行われ、近年、アフリカツメガエル卵において、その時期が mRNA の 3'UTR 領域のシス作用性エレメント配列によって制御されることが報告された。本章では、同様の機構がブタ卵にも存在していると考え、Cyclin B1、B2 の 3'UTR 配列を解析し、両因子の翻訳制御の違いを明らかにしようとした。

ブタ Cyclin B mRNA の 3'UTR 領域のシークエンス解析を行った結果、Cyclin B1 mRNA には 3'UTR の長さが異なる二つの型が存在することが判明し、その配列から Long 型は序盤翻訳型、Short 型は終盤翻訳型であることが予想された。また、Cyclin B2 mRNA には有効なエレメントが存在せず、3'UTR 非依存的な翻訳が予想された。そこで Cyclin B1 の Long 型のみ抑制する asRNA を作製し、ブタ卵内に注入した結果、予想通り成熟序盤の Cyclin B1 蓄積のみが抑制された。さらに、蛍光タンパク質 EGFP または GST の翻訳領域の下流に Cyclin B1 のそれぞれの 3'UTR 領域を結合した mRNA を作製し、ブタ卵に顕微注入して発現を解析した結果、予想される翻訳時期調節が見られる傾向にあった。また、Cyclin B2 は終盤翻訳型の mRNA を持たないため M2 で蓄積することが出来ず、その差異が Cyclin B1 と B2 の発現パターンの違いに繋がるものと考えられた。

以上、本研究は複雑な変動パターンを示す Cyclin B の蓄積を制御する機構について、分解と合成の両面から詳細に検討し、一定の理解をもたらすことに成功した初めての報告であり、発生生物学分野において、哺乳類のみならず他の多くの生物種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。