

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 金 鉉

---

Ski は proto-oncogene、*c-ski* の翻訳産物で、核内転写調節因子として機能することが知られている。Ski は多くの組織で発現し、細胞の増殖や分化に伴い発現量が変化することから、細胞機能の調節に重要な役割を担っていることが推察されている。本研究では、卵胞発育や黄体形成などの卵巣機能の調節における Ski の役割を明らかにすることを目的とした。

第 1 章では、卵胞の発育および閉鎖過程における Ski の発現の解析を行った。まず正常性周期を回帰しているラット卵巣の凍結切片を作成し、Ski の局在を免疫染色により調べるとともに、proliferating cell nuclear antigen (PCNA) の免疫染色により増殖細胞を、TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 染色により細胞死を観察した。その結果、Ski 陽性の顆粒膜細胞を含む卵胞には多数の TUNEL 陽性細胞が観察されたことから閉鎖卵胞であることが示唆され、また、Ski 陰性の顆粒膜細胞を含む卵胞には多数の PCNA 陽性細胞が観察されたことから発育卵胞であることが示唆された。そこで、Ski と TUNEL の二重染色を行った結果、Ski 陽性細胞と TUNEL 陽性細胞は一致することが示された。これらの結果から、卵胞閉鎖に伴い顆粒膜細胞に Ski 発現が誘導されることが示唆された。次に、equine chorionic gonadotropin (eCG) 処理した下垂体除去未成熟ラットを用いて、この可能性についてさらに検討した。eCG 投与前には Ski、TUNEL ともに陽性細胞は観察されなかった。一方、eCG 投与 48 時間後には PCNA 陽性の顆粒膜細胞が多数見られ、卵胞発育が起こっていることが示されたが、Ski、TUNEL ともに陽性細胞は見られなかった。しかし、96 時間後になると PCNA 陽性の顆粒膜細胞は見られないものの、多数の TUNEL 陽性細胞が見られたことから、卵胞閉鎖が起こっていることが示された。この時、同時に Ski も陽性細胞が多数出現していた。これらの結果から、卵胞閉鎖に伴い顆粒膜細胞に Ski の発現が誘導されることが明らかとなり、Ski は卵胞閉鎖に伴う顆粒膜細胞の細胞死に関与する因子であることが示唆された。

第 2 章では、黄体形成過程における Ski の発現の解析を行った。eCG 投与により卵胞発育を誘導した未成熟雌ラットに human chorionic gonadotropin (hCG) を投与し、経時的に採取した卵巣の凍結切片を作成し、Ski と TUNEL の染色を行った。その結果、hCG 投与後 3 時間で *c-ski* およびその翻訳産物である Ski の発現が顆粒膜細胞にみられ、この発現は引き続き黄体細胞でも観察された。これらの結果より、hCG に暴露された卵巣では Ski は顆粒膜細胞の黄体細胞への分化やその機能維持に関与していることが示唆された。このことは、生体内では luteinizing hormone (LH) サージが顆粒膜細胞の Ski 発現を誘導する可能性を示している。そこで次に、eCG 投与により卵胞発育を起こした未成熟ラットの卵巣から顆粒膜細胞を採取して LH 添加、非添加の条件で培養し、*c-ski*

mRNA の発現を RT-PCR により調べた。その結果、*in vitro* での LH 添加による *c-ski* mRNA の増加は観察されなかった。そこで、*in vivo* で hCG を投与し、経時的に採取した顆粒膜細胞における *c-ski* mRNA の発現を調べた結果、やはり *c-ski* mRNA の増加は観察されなかった。これらのことから、Ski は遺伝子レベルではなく、翻訳や分解のレベルで発現が調節されていることが考えられた。Ski については Arkadia と呼ばれるユビキチンリガーゼが分解に関わることが示されている。そこで、その遺伝子発現が LH により変化するかどうかについて調べた。*In vivo* で hCG を投与し、採取した顆粒膜細胞では Arkadia mRNA が発現していたが、その発現量に経時的な変化は見られなかった。LH サージによる Ski の増加は遺伝子発現の変化を伴わないことからタンパク質レベルでの制御機構が存在する可能性が示されたが、少なくとも Arkadia はその過程に関与していないことが示唆された。

以上、Ski は発育過程にある卵胞の顆粒膜細胞では発現が見られないが、卵胞閉鎖や黄体形成の開始に伴い発現が誘導され、顆粒膜細胞の細胞死や黄体化に関与することが初めて示された。これらの知見は転写因子による卵巣機能の制御機構を考える上で特筆すべき結果であると考えられ、学術的、応用的意義は少なくない。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。