

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 藤井 渉

減数分裂の進行は、分裂期促進因子 (MPF) の活性とそれを制御する因子によって調節されている。MPF の触媒サブユニットである CDC2 の 161 番スレオニン (T161) のリン酸化は MPF の活性化に必須であることが生化学的な検討や体細胞分裂において報告されている。しかし、哺乳類卵子の減数分裂過程における T161 のリン酸化状態やその意義、および制御機構については報告がない。本研究は、ブタ卵子の体外成熟培養系をモデルとし、哺乳類卵子の成熟進行過程において、これらについて検討したものである。

第一章では減数分裂における CDC2 の T161 リン酸化状態と機能について調べた。その結果、培養 18 時間からリン酸化が上昇し、これは CDC2 と複合体を形成する MPF 調節サブユニットの Cyclin B の発現開始時期と一致し、減数分裂の再開時期とも良く相関していた。Cyclin B が分解され MPF 活性が低下する培養 36 時間には脱リン酸化も確認された。すなわち、卵成熟過程における生理的な T161 リン酸化変動が明らかとなり、この変動が MPF 活性と同期していることが示唆された。また、このリン酸化の変動は T161 をリン酸化する CDK 活性化キナーゼ (CAK) の活性変動ではなく、Cyclin B 合成による CDC2 の複合体形成に依存することが示唆された。次に、減数分裂進行への必要性を調べるため、T161 をアラニンに置換した非リン酸化型 CDC2 (TA-CDC2) の過剰発現を行った結果、TA-CDC2 は減数分裂の進行を有意に阻害したことから、減数分裂の促進には T161 のリン酸化が必要であることが強く示唆された。以上より、卵の減数分裂において CDC2 は T161 のリン酸化修飾を受け、これは減数分裂進行や Cyclin B 発現と同期して変動すること、また、このリン酸化は卵の減数分裂進行に必要であることが示唆された。

第二章では T161 をリン酸化する CAK の同定を行った。哺乳類の体細胞分裂では CDK7、Cyclin H、MAT1 からなる複合体が CAK として機能するが、哺乳類卵子においては未だこれらの存在と CAK 作用を示した報告は無い。そこで、先ずブタ卵子由来 cDNA よりこれらの遺伝子をクローニングし、卵成熟過程を通して転写産物の存在と、翻訳産物の細胞内局在を明らかにした。次に、これらの機能を調べるため、それぞれの mRNA による過剰発現とアンチセンス RNA による発現抑制を試みた。その結果、CDK7 および Cyclin H は減数分裂期において CAK として積極的に機能しており、MAT1 は CAK としては機能していないことが示唆された。また、CDK7 過剰発現下では単量体 CDC2 も T161 のリン酸化を受けることが示され、CAK の適切な発現量が生理的な卵成熟進行に重要であることも明らか

となった。

第三章では T161 を脱リン酸化する因子を検討した。体細胞の報告から、PP2C  $\alpha/\beta$ と、CDKN3 を候補遺伝子として、先ずこれらの遺伝子をクローニングし、転写産物の卵成熟過程を通じた存在を確認した。次に、生理機能を調べるためにアンチセンス RNA による発現抑制を行った結果、いずれの抑制においても早期に T161 のリン酸化と減数分裂の再開が促進され、これらが T161 を脱リン酸化することと矛盾しなかった。しかし、同時に Cyclin B 合成も早期に起こり、CDC2 が早期に複合体形成することによる 2 次的な作用とも考えられた。そこで次に Cyclin B 合成を阻害した結果、PP2C または CDKN3 を抑制した区では、阻害剤存在下においても Cyclin B の合成が認められ、これらの因子の Cyclin B 合成制御への関与が示唆され、T161 脱リン酸化への機能は結論付けられなかった。そこで、Cyclin B 非結合型 CDC2 を用いた機能解析、および、生理的脱リン酸化時の同期的 Cyclin B 低下に伴う T161 脱リン酸化を解析した。その結果、PP2C または CDKN3 を抑制した卵子に脱リン酸化の遅延は認められなかった。以上の結果から、卵成熟過程において PP2C や CDKN3 は T161 の脱リン酸化には働いていないと考えられた。

以上、本研究では哺乳類卵母細胞の減数分裂過程において、これまで報告が無かった CDC2 の T161 リン酸化修飾の状態変化やその意義、およびそのリン酸化と脱リン酸化の制御機構について詳細な解析を行ってきた。本研究の成果は哺乳類卵母細胞の減数分裂過程における MPF 活性制御に新たな知見を提供し、卵成熟の生理機構の理解に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。