

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 高 紅梅

性成熟した雌の哺乳類の卵巣内には減数分裂を複糸期で停止している卵母細胞が一層の卵胞上皮細胞（顆粒層細胞）に包まれた一次卵胞が多数存在する。性周期毎に一定数の卵胞が発育を開始し、これに含まれる卵母細胞も発育して減数分裂を再開し、排卵されて受精に供される。この卵胞発育の過程で 99%以上が選択的に閉鎖してしまい、排卵にまで至るものは 1%にも満たない。この卵胞閉鎖には顆粒層細胞のアポトーシスが支配的に関与していることが分かっているが、その制御機構やアポトーシスシグナルの細胞内伝達経路などに関しては多くの点が未解明である。

申請者は、重要な家畜であるブタを材料として、卵胞閉鎖における顆粒層細胞の細胞内アポトーシス調節因子の発現変化を精密に調べるために、成ブタの卵巣から実体顕微鏡下に個々の卵胞を分離して卵胞閉鎖ステージを正確に判定した後、各卵胞別に顆粒層細胞におけるアポトーシス関連因子の発現を調べられる実験系を確立した。アポトーシス実行因子である TRAIL などの細胞死リガンドとそれらの受容体、アポトーシスで特徴的な caspase-3、caspase-8、caspase-9 などのタンパク分解酵素の活性化を介した不可逆的細胞内シグナル伝達因子および促進因子である Bax の発現は卵胞閉鎖初期に高まっていること、閉鎖していない健常卵胞の顆粒層細胞では高発現している inhibitor of apoptosis (IAP) family に属する阻害因子の cFLIP と XIAP および Bcl-2 が閉鎖に伴って速やかに低下することを示した。加えて主になんがんと化した細胞で発現している IAP family に属する阻害因子のひとつである survivin が健常卵胞の盛んに細胞分裂している顆粒層細胞において高発現していることを見出した。健常卵胞の顆粒層細胞においては、survivin の正しいフォールディングを維持して機能を保つことを助けるシャペロンである heat shock protein (Hsp) 90 も高発現していることが分かった。Hsp90 は非ストレス環境下においても細胞内で発現して標的タンパクの構造を安定化させることでその機能を維持する役割を果たしていると考えられており、健常卵胞の顆粒層細胞においても細胞の生存に必要なアポトーシス阻害因子の安定化に貢献しているものと考えられた。

様々な細胞において細胞内に異常なタンパクが蓄積することを防いだり、過剰に合成されたタンパクを分解してリサイクルに供したりすることで細胞の恒常性を維持していると考えられているオートファジーの顆粒層細胞における役割は不明であったので、卵胞閉鎖ステージを正確に判定した個々の卵胞別にオートファジーの誘導に必要な Beclin-1 とオートファジーに特徴的なオートファゴソームの形成に不可欠な microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) の発現を調べた。盛んに細胞分裂を繰り返している健常

卵胞の顆粒層細胞でオートファジーが亢進し、逆にアポトーシスが誘起されている閉鎖卵胞の顆粒層細胞ではほとんど停止していることが分かった。がん化した細胞の多くではアポトーシス阻害因子の Bcl-2 がオートファジーを阻害することや細胞死リガンドの TRAIL がアポトーシスを誘起するとともにオートファジーも誘起することなどが報告されているが、卵胞閉鎖のような生理的な細胞死の過程におけるアポトーシス調節因子のオートファジーへの作用は、がん化した細胞の場合とは異なると考えられた。

以上のように、個々の卵胞別に顆粒層細胞におけるアポトーシス調節因子の発現変化を精密に調べられる新しい手法を確立した申請者の研究によって、哺乳類の卵胞においては顆粒層細胞に IAP family に属するアポトーシス阻害因子の cFLIP と XIAP のみならず survivin が高発現していること、加えて survivin の構造を安定化して機能を保たせる役割を果たすシャペロン Hsp90 が高発現してアポトーシスを防いでいることが分かった。さらに、盛んに分裂している健常卵胞の顆粒層細胞においてオートファジーが亢進し、閉鎖卵胞の顆粒層細胞では停止していることから生理的な細胞死の場合とがん細胞の細胞死の場合でアポトーシス調節因子のオートファジーへの作用が異なることが推察されたなどの学術的に重要な新知見が得られた。これらの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、審査委員一同は博士（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、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。