

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 西村 鷹則

哺乳類卵は、第一減数分裂前期で分裂を停止した状態で、卵巣内で体積を大きく増加させる(卵成長)。卵成長を終えた成長卵(FO)は、ホルモン刺激や体外培養により減数分裂を再開するが、卵成長の途中にある成長途上卵(GO)は、たとえその直径が FO の 90%に達していても減数分裂を再開できない。この卵成長の過程で減数分裂再開の能力を獲得する詳細な分子機構は不明である。本研究はブタ卵を材料とし、この機構を分子レベルで明らかにすることを目的としたものである。

第一章では、減数分裂の再開に重要な、CDC2/Cyclin B 複合体の M 期促進因子(MPF)や、MOS を最上流とする MAP キナーゼカスケードに着目し、GO ではこれらの活性に必要な構成因子が不足していることを確認した。そこで Cyclin B、CDC2、MOS の合成 mRNA を GO の細胞質に注入して強制発現した結果、CDC2 を発現させた場合にのみ減数分裂の再開が誘起され、CDC2 の不足が減数分裂を再開しない原因の一つであることを示した。しかし、CDC2 を強制発現しても減数分裂再開率が FO と比較し低かったので、次に MPF 活性制御に重要な CDC2 のリン酸化に着目した。抑制的リン酸化部位の脱リン酸化酵素の強制発現やリン酸化酵素の発現抑制をした結果、減数分裂再開が誘起され、さらにこれらの処置と CDC2 強制発現を同時に行うと FO に匹敵する減数分裂再開率が得られた。以上より、ブタ GO では CDC2 の不足と、その抑制的リン酸化により MPF 活性を低く維持し、減数分裂の再開を積極的に抑制していることが明らかとなった。

第二章では、CDC2 の抑制的リン酸化部位に働く酵素の活性を制御する cAMP 依存性キナーゼ(PKA)に注目し、FO では体外培養により cAMP 濃度と PKA 活性が低下するが、GO では cAMP 濃度のみ低下し PKA は高活性が維持されることを示した。この GO の PKA 活性を阻害すると減数分裂が再開したことから、GO の減数分裂は cAMP 非依存的に維持される PKA 活性が抑制しており、卵成長の段階によって PKA 活性制御機構が変化することを示唆した。そこで次に GO の PKA 活性制御に焦点を当て、その活性抑制や局在制御を担う制御サブユニット(PKA-R)について、発現量と細胞内局在の両面から解析した。まず、ブタ卵に発現する 2 種の PKA-R(PKA-R1、-R2)をクローニングし、これらを GO に強制発現したが、PKA 活性の低下や減数分裂再開は認められず、PKA-R の不足が PKA 活性維持の原因ではないことを示した。一方、細胞質に局在する PKA-R2 は、FO では減数分裂再開直前に核内に移行するが GO では細胞質に局在し続けていた。そこで GO の PKA-R2 に NLS

を付加し強制的に核に移入させたが減数分裂の再開に影響はなかった。これに対し PKA-R1 の強制核移入では減数分裂再開が誘起され、FO と GO では PKA-C の制御に機能している PKA-R が異なっていることを示唆した。以上より、ブタ GO の減数分裂再開は cAMP 非依存的な PKA 活性によって抑制されるが、この活性は制御サブユニットの不足ではなく、機能する PKA-R やその局在制御が変化することに起因することが示唆された。

第三章では、PKA-R に結合し局在を制御するアンカータンパク質(AKAP)に注目した。まず Far western blotting 法を応用して、多数知られる AKAP のうちブタ卵に発現する AKAP を網羅的に検出し、AKAP1、AKAP5、AKAP7 α の 3 種を同定した。次に各 AKAP の発現抑制と PKA-R の局在解析により機能を検討し、FO では AKAP5 による PKA-R2 局在制御、また GO では AKAP5 に加えて AKAP7 α による PKA-R1 の局在制御が減数分裂再開を抑制していることを示した。これらの PKA-R の局在が PKA-C との結合を介して減数分裂再開を抑制していると考え、各 PKA-R の結合阻害を行ったところ、FO では PKA-R2、GO では PKA-R1 を特異的に阻害したときに減数分裂が再開することを確認し、FO と GO とで機能する AKAP や PKA-R の種類が異なり、これこそが成長段階による PKA の活性や局在の相異、ひいては減数分裂再開の能力の相違の原因であることを見いだした。

以上、本研究によって、「CDC2 発現の増加や機能する PKA/AKAP の切り替えこそが、ブタ卵の成長過程における減数分裂再開の能力獲得の本質である」という全く新しい知見を見出すことができた。本研究の成果は哺乳類卵の成長過程における MPF 活性制御に新たな知見を提供し、卵成長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。