

論文審査の結果の要旨

氏名 鈴木 元

本論文は、マウスの卵母細胞における減数分裂に関与する因子の同定と、その転写制御機構および機能を明らかにしたものである。全体は 3 章からなり、以下のような内容となっている。

第 1 章では、卵特異的に発現し、そして機能している遺伝子を網羅的に同定することを試みた。まず、成熟卵 (MII) 及び 1 細胞期胚 (1 cell) における RNA-sequence データを用いて、受精後に急速に mRNA が分解される遺伝子を抽出することにした。具体的には、発現量が 1 cell において MII の 30% 以下となる遺伝子を探索した。その結果、344 遺伝子を得た。これらの遺伝子の組織における発現を UCSC Genome Bioinformatics により検索することで卵巣でのみ発現していることが示唆される 50 遺伝子に絞り込んだ。さらにこの 50 遺伝子のうち機能が既知である 4 つの遺伝子を除いた 46 遺伝子について、RT-PCR により卵・初期胚、体組織と細胞株における発現を解析した結果、卵特異的に発現する 4 つの遺伝子を得る事ができた。そのうちの 2 つ、Fbxw13 と Fbxw18 は F-box ドメインを持ちアミノ酸配列のよく似た他の 13 個の遺伝子とともに第 9 染色体上にクラスターを形成している遺伝子であった。そこでこのクラスターに属する 15 遺伝子について様々な組織、卵及び初期胚における発現パターンを解析した結果、すべての遺伝子が卵特異的に発現し、その mRNA は受精後速やかに分解されている事が明らかとなった。

第 2 章では、Fbxw クラスター遺伝子の発現制御機構を明らかにすることを試みた。Fbxw クラスターが卵特異的に発現する機構を明らかにするために reporter gene による解析を行った。クラスターに属する遺伝子のひとつである Fbxw12 の転写開始点 (TSS) 上流 1 k base (Kb) が組み込まれた Luciferase vector を成長卵 (GO) と 2 細胞期胚 (2 cell) の核へ顕微注入し、一定時間培養後に Luciferase 活性を測定した。その結果、Fbxw12 の TSS 上流 1 Kb を含む Luciferase vector は GO でのみ高い発現を示し、2 cell では転写活性を持たない事が明らかとなった。次に Fbxw クラスター遺伝子の発現に働く配列を特定するため、クラスターに属する全遺伝子の TSS 上流 1 Kb において転写因子結合配列予測を行った。その結果、クラスターに属するすべての遺伝子が TSS 上流 200-300 bp 付近に Hsf-1/2 と Pbx-1 の結合配列を持つ事が明らかになった。そこでこれらの認識配列に変異を導入した Luciferase vector を作製し GO における転写活性を測定した結果、変異により転写活性が顕著に減少することがわかった。また Hsf-2、Pbx-1 mRNA を顕微注入し強制発現させた GO を用いて Luciferase assay を行った結果、mRNA の濃度依存的に転写活性が上昇する傾向が見られた。以上の結果から Fbxw クラスターに属する

遺伝子の TSS 上流 1 Kb は卵特異的発現を示すプロモーターとして機能し、その転写には Hsf-2 と Pbx-1 が重要であることが示唆された。

第 3 章では、Fbxw クラスター遺伝子が持つ機能について解析を行った。Fbxw クラスターに属する全遺伝子に共通する配列に対して siRNA を設計し、生後 12 日齢のマウスより採取した GO に顕微注入し、12 日間体外で培養する事で卵形成期における Fbxw クラスター遺伝子の発現抑制を試みた。その結果、培養終了後に得られた成長卵では Fbxw クラスターに属する全遺伝子の mRNA が顕著に抑制されていることが観察された。そこでこの実験系を用いて得られた成長卵を成熟させたところ、減数分裂の再開により生じる卵核胞崩壊はすべての実験群において時間的差異無く観察されたが、それに引き続いておこる第一極体の放出が Fbxw クラスター遺伝子の発現抑制胚では見られない事が明らかになった。そこで、卵内における細胞周期調節因子の解析を試みた。減数分裂再開後の成長卵中では p34^{cdc2} kinase と cyclin B の複合体である M 期促進因子 (MPF) が活性化される事で 2 回の連続した M 期が進行するが、この間には MPF の活性化と一時的な活性の低下が必要である事が知られている。そこで Fbxw クラスター遺伝子の発現を抑制した成長卵の減数分裂再開誘導後 6 時間、9~12 時間の卵を採取し、histone H1 kinase assay を行った。その結果、Fbxw クラスター遺伝子の発現を抑制した卵では減数分裂再開後の MPF 活性化は観察されたものの、第一極体放出に必要な活性の低下が十分でないことが明らかとなった。この結果より Fbxw クラスター遺伝子の発現を抑制した卵では MPF の不活化に必要とされる cyclin B の分解が起っていないことが考えられ、Fbxw クラスター遺伝子は APC/C 依存的経路等、これに必要ないずれかの経路に関与している可能性が示された。

以上のように、本論文は、卵の減数分裂に関与する因子を新たに同定し、その機能と発現調節機構を明らかにしたものであり、これまで未解明の部分が多い減数分裂の調節機構の解明に大きく寄与するものであると考えられる。

したがって、博士 (生命科学) の学位を授与できると認める。

以上 1,871 字