

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 小沼 あすか

真核生物の核と細胞質は核膜によって明確に隔てられており、50 kDa 以上の大物質の核移行には、各種の核移行レセプターが結合することが必要である。現在までに、主に体細胞を用いた研究によってこのシステムの機能が報告されてきた。一方、哺乳類の卵母細胞は、胎児期から第一減数分裂前期で減数分裂を停止し、体細胞核とは異なる4倍体の巨大な核（卵核胞：GV）を形成し卵巣内に保持されているが、GVの核移行システムの報告は極めて少ない。この状態の卵母細胞（GV期卵）は長期間維持され続け、体積を増加させる成長途上卵を経て成長卵となり減数分裂を再開する。この間、このシステムを制御する因子が存在し機能しているか、またGV期維持、減数分裂再開に対してどのような機能を持つか、については検討されていない。そこで本研究ではブタ卵を用いてこれらの点について解析している。

まず、第一章では核内で機能する因子の活性制御に対する核移行システムの関与について、発生工学的観点から人工ヌクレアーゼ Cas9 の GV 期卵における局在と機能について検討した。Cas9 は近年着目されているゲノム編集技術である CRISPR/Cas システムで用いられる人工制限酵素であり、発生胚や体細胞ではゲノム改変個体の作出に寄与するが、GV 内に移行し機能するかは不明であった。そこでブタ GV 期卵に Cas9 を顕微注入しゲノムへの変異導入を解析したところ、核膜崩壊を起こした卵の 81%で変異が導入されたが GV を維持した卵では変異が全く確認されなかった。緑色蛍光タンパク質を付加した Cas9 を卵内で発現させ卵内局在を調べたところ Cas9 は核外への移行によりその活性を制限されることが考えられた。そこで、核外移行レセプターエクスポーチン (XPO) 1 の特異的阻害剤である leptomycin B (LMB)を処理すると GV 内の Cas9 存在量が増加し、16.7%の卵でゲノムに変異が導入された。以上より、GV 期卵でも核移行システムは機能しており、核内で機能する因子の活性が制御され得ることが示唆された。

続いて第二章では、第一章で存在が確認された核外移行レセプターXPO1に加え、XPO6に着目し、それぞれの卵での発現や機能活性を検討した。まず内因性タンパク質の発現を検出したところ、卵成熟に伴いその量は減少するが、GV期卵では内因性XPO1は合成や分解による制御を受けずに安定して存在すること、一方XPO6は合成と分解のバランスによりその量が一定に保たれることが示唆された。続いて *in vitro* 合成した mRNA の注入による過剰発現を行い、XPO1、XPO6 の成長途上卵、成長卵、受精卵での機能を解析した結果、XPO1 は全ての時期の卵で明確な核外移行機能を有することが示された。一方、XPO6 は成長卵でのみ核外移行機能が確認され、成長途上卵ではタンパク質量が低く調節され、卵の時期依存的にアクチン局在を調節しているこ

とが示唆された。

最後に第三章では、XPO1、XPO6 が GV 期維持や減数分裂再開の制御に関与するかを検証した。まず、LMB の添加培養により XPO1 の機能阻害を行うと、減数分裂再開の指標である卵核胞崩壊 (GVBD) が遅延し、反対に XPO1 過剰発現により機能促進を行うと GVBD が早期化することが示された。さらに、この XPO1 の作用は、GV 内で成熟促進因子(MPF)活性を阻害している WEE1B の核外移行を介することが WEE1B と XPO1 の発現実験から示唆された。驚くべきことに、生理的条件下では減数分裂再開能を持たない成長途上卵においても、XPO1 過剰発現により半数程度の卵で GVBD が誘起されることが確認された。つまり XPO1 による局在制御のみで、成長途上卵の減数分裂再開が誘起可能であることが示唆された。一方、XPO6 はアクチンの核外移行を介して GV 膜崩壊の進行時間を短縮し減数分裂再開に要する時間経過に影響を与えることが示唆された。以上より、XPO1、XPO6 の関与する核移行バランスの制御は、GV 期維持や減数分裂再開の制御機構に大きく関与していることが明らかとなった。

本研究は、哺乳類の卵母細胞で核外移行レセプターの XPO1、XPO6 が機能すること、さらにその機能が核内因子の活性や GV 期維持、減数分裂再開の制御機構において重要な役割を果たしていることを明確に示した初めての報告であり、遺伝学や生殖学分野とともに発生工学分野の発展にも役立つと考えられ、学術上応用上寄与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。