

審査の結果の要旨

氏名 藤岡 良江

細胞分裂の進行には、サイクリン B (CCNB) などのタンパク質量の増減が重要であり、タンパク質分解制御の理解が不可欠である。タンパク質分解経路の 1 つにユビキチン/プロテアソーム系があるが、この制御に関する知見は体細胞分裂過程での研究が多く、卵の減数分裂過程である卵成熟全体を通して総合的に調べた報告は極めて少なく検討は不十分である。そこで本研究ではブタ卵を用いて、ユビキチン/プロテアソーム系で働くユビキチンリガーゼである APC/C の阻害因子 EMI1 と EMI2、ユビキチン結合酵素の UBE2C (2C) と UBE2S (2S) に着目し、RNA 注入による過剰発現と発現抑制により、卵成熟過程を通してこれら因子が CCNB 蓄積をはじめとする卵成熟進行にどのような役割を果たしているのかについて検証している。

第一章では EMI の影響を解析した。その結果、減数分裂再開は、EMI1 と EMI2 の過剰発現により早まること、発現抑制では EMI1 抑制でのみ CCNB1 の蓄積が減少し卵成熟開始が遅延することを示した。EMI2 抑制では変化は見られず、EMI2 はこの時期卵内に存在しないと考えられた。一方、第 2 分裂中期 (M2 期) に至った成熟卵は、通常、受精まで M2 期に維持されるが、EMI2 発現抑制を行うと M2 期を脱出し前核の形成が見られたのに対し、EMI1 発現抑制では M2 期に維持されていた。また、M2 期の卵に人為的な刺激を与えた結果、EMI2 過剰発現でのみ前核形成が阻害され、EMI1 過剰発現は影響を与えなかった。この結果は、成熟卵では生理的に EMI2 のみが働いていることを示唆している。以上より EMI1 は CCNB1 を蓄積させ、卵成熟開始時期の制御を行うのに対し、EMI2 は M2 期の維持に必要であり、活性化後には EMI2 が分解されることで前核形成を可能にしていることを示唆した。

第二章では UBE2 の影響を解析した。その結果、2C 発現抑制は CCNB1 の蓄積が増加し卵成熟開始を早期化したのに対し、2S 発現抑制は影響を与えなかった。2C は基質に対する最初のモノユビキチン化に、2S はその後のポリユビキチン鎖形成に働くことが知られており、今回の結果は卵成熟開始時にはモノユビキチン化のみで CCNB 分解が起こることを示唆している。なお、過剰発現では、2C は CCNB 蓄積を阻害し卵成熟開始を遅らせるのに対し、2S 過剰発現では CCNB の蓄積は阻害するにもかかわらず予想に反し早期に減数分裂が再開した。この矛盾については第三章で検討している。一方、M2 期の卵に対しては 2S の過剰発現では前核の形成が見られたのに対し、2C の過剰発現では前核形成は見られなかった。このことは M2 期卵ではポリユビキチン化が基質分解に与える影響が大きいことを示唆している。なお、人為的 M2 脱出刺激

後の前核形成はどちらの発現抑制でも阻害された。この結果は M2 期卵の基質分解にはポリユビキチン化が必要であることと矛盾はしない。以上から、基質分解に影響するユビキチン化の形態が卵成熟の時期により異なる可能性が推察された。

第三章では第二章において 2S の過剰発現により予想に反し卵成熟開始が早期化したことの原因究明を行っている。まず、2S のポリユビキチン化機能との関連を検討するため、APC/C 結合領域を欠損させた UBE2S Δ APC を作成し過剰発現したところ卵成熟開始に影響を与えなかった。そのため 2S 過剰発現時の早期卵成熟開始は、APC/C との結合を介した基質ユビキチン化との関連が示唆され、CCNB 以外の基質を検索することとした。その候補として M 期促進因子 (MPF) を不活性な pre-MPF へと移行させる WEE1B を調べた結果、2S は WEE1B 分解を促さないことが解かった。次に、PKA の制御サブユニットであり、ブタ卵ではアンカータンパク質の AKAP 5 発現抑制により卵成熟開始直前に核内に移行し減数分裂を誘起することが知られる RII の局在変化を検討した。その結果、RII は卵全体に存在し、2S を過剰発現しても核に局在はしなかった。そのため 2S は AKAP5 の分解にも関与しないと考えられた。以上より、2S 過剰発現時の早期卵成熟開始は、CCNB 蓄積、WEE1B 分解、AKAP5 分解のいずれかでもないことから、卵成熟の制御に関連する新たな分解基質と新たな制御機構の存在を示唆した。

以上、ブタ卵成熟過程においてユビキチン/プロテアソーム経路関連因子が関与する様々な影響について示した今回の研究成果は、哺乳類卵の減数分裂制御機構の基盤を形成すると共に、畜産学分野に貢献すると期待され、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。