

氏名（本籍）	宮垣 佑（ 兵庫県 ）		
学位の種類	博 士（ 学術 ）		
学位記番号	博 甲 第 6946 号		
学位授与年月日	平成26年 3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Molecular Mechanism of Metaphase-II Arrest in Mouse Oocytes (マウス卵での第二減数分裂中期停止メカニズム)		
主査	筑波大学教授	農学博士	馬場 忠
副査	筑波大学教授	農学博士	小林 達彦
副査	筑波大学准教授	博士（農学）	柏原 真一
副査	筑波大学准教授	博士（工学）	橋本 義輝

論 文 の 要 旨

脊椎動物の卵巣で減数分裂に移行した卵母細胞は、第一減数分裂の前期で細胞周期を停止し成熟期に入る。このあいだに、卵内では栄養分の蓄積などが行われ、核は巨大な卵核胞となる。母体が排卵期に入ると、十分に成長した卵はホルモン刺激によって卵核胞が崩壊し減数分裂を再開する。減数分裂を再開した卵は第一極体の放出と共に第一減数分裂を終え、第二減数分裂へと移行し、第二減数分裂の中期で再び停止する。この第二減数分裂中期での停止は、受精刺激によって解除されるまで維持され、単為発生を防ぐ重要な役割を果たしている。

近年の研究で、アフリカツメガエル卵の第二減数分裂中期での細胞周期停止メカニズムが明らかとなった。すなわち、キナーゼカスケードである Mos-MAPK 経路 (Mos→Mek1/2→Erk1/2→Rsk) の最下流に位置する Rsk が Emi2 をリン酸化して活性化させる。次いで、活性化した Emi2 がユビキチンリガーゼ APC/C に結合してその活性を抑えるため、細胞周期制御因子サイクリン B のタンパク質量が保たれ、細胞周期停止が成立する。これまでに、マウス卵で Mos ノックアウトや EMI2 ノックダウンによって、正常な細胞周期停止が起こらなくなることから、Mos や EMI2 が重要な役割を果たしていることが示唆された。一方で、RSK 欠損卵が正常に細胞周期の停止を起こすことや MEK1/2 ノックダウンでも顕著な異常が見られないことが報告されている。したがって、マウス卵では RSK や MEK1/2 に代わる別のキナーゼが EMI2 のリン酸化を担っていることが強く示唆されていたが、その詳細に関しては不明であった。そこで、本研究ではマウス卵で EMI2 をリン酸化するキナーゼを同定し、第二減数分裂中期停止に関する新しい理論を構築することを目的とした。

(1) MSK1 が EMI2 のリン酸化を介して第二減数分裂中期停止を維持する

培養細胞を用いた研究から、ERK1/2 の下流に位置するキナーゼとして RSK のほかに MSK1 が存在することが報告されていた。そこで、EMI2 リン酸化に関わるキナーゼの候補として MSK1 に着目し、卵成熟過程での局在と機能解析を行った。MSK1 は第一減数分裂前期で卵核胞に局在しており、卵核胞崩壊後には細胞質全体に存在することが観察された。また、リン酸化を受け活性化状態にある MSK1 は第二減数分裂中期で紡錘体に局在することがわかった。第二減数分裂中期停止卵を MSK1 阻害剤存在下で培養したところ、サイクリン B

の分解が起こり、細胞周期の進行が見られた。さらに試験管内キナーゼ分析で、MSK1 が EMI2 をリン酸化することが明らかとなり、リン酸化部位を同定した。加えて、そのリン酸化部位を置換した EMI2 変異体は、細胞周期停止活性が著しく低いことが明らかとなった。以上の結果からマウスでは MSK1 が EMI2 をリン酸化し第二減数分裂中期での停止を維持していることが示唆された。

(2) Mos-MAPK 経路に加えて p38 MAPK 経路が第二減数分裂中期停止に関わっている

MEK1/2を阻害しても第二減数分裂中期での停止が起こることから、Mosに依存的な別のキナーゼ経路の存在が示唆された。そこでEMI2リン酸化に関わるキナーゼ経路の候補として、p38 MAPK経路に着目した。まず、Mosの翻訳をモルフォリノオリゴで阻害したところ、p38の活性化部位のリン酸化が大きく減少することが見出された。次いで、p38とMEK1/2の阻害剤を共に含む培地で卵を培養したところ、EMI2のリン酸化が著しく減少し、サイクリンBの分解を伴うMeta- II停止の解除がみられた。これら二種類の阻害剤をそれぞれ単独で添加したときには、EMI2のリン酸化とMeta-II停止に大きな影響はなかった。さらに、試験管内キナーゼ分析によってp38の下流キナーゼであるMNK1がEMI2を直接リン酸化することが判明した。以上の結果から、マウス卵では以前から報告されているMos- MAPK経路に加えて、Mos依存的なp38経路がMeta- II停止の維持に関わっていることが示唆された。

以上の(1)、(2)の結果からマウス卵ではカエル卵に比べ、複雑なキナーゼ経路が構築されており、EMI2のリン酸化を介して第二減数分裂中期停止を制御していることが示唆された。本研究から、動物種間での卵成熟メカニズムの類似性と多様性が明確になった。また本研究成果が、第二減数分裂中期停止不全が原因となる奇形腫や不妊などの疾患原因の解明につながることも期待される。

審 査 の 要 旨

卵子の第二減数分裂中期停止は、単為発生を防ぎ効率のよい受精を行うために必要である。カエル卵を用いた研究から、第二減数分裂中期停止メカニズムが明らかとなっているが、哺乳動物卵での制御機構は不明な点が多く残っている。

本研究ではマウス卵を用いて、第二減数分裂中期停止メカニズムの解明を試みた。その結果、カエル卵で同定されていた Mos-MEK1/2-ERK1/2-RSK キナーゼ経路に加えて ERK1/2-MSK1 と Mos-p38-MNK1 経路が EMI2 のリン酸化を介して第二減数分裂中期停止に関わっていることが示唆された。

これまで不明であったカエルとマウス卵での第二減数分裂中期停止メカニズムの差異を積極的に明らかにしようとした点が挑戦的で十分に評価できるが、最終的な結論を下すまでの実験結果を得ることはできず、未だ不明確な点が残っている。しかし、研究自体は論理的に行われており、当該研究分野の発展に貢献したと考えられる。

平成26年1月24日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質務応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（学術）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。