

氏名	つかもと さとし 塚本 智 史
学位(専攻分野)	博士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1606 号
学位授与の日付	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	農学研究科応用生物学専攻
学位論文題目	マウス卵母細胞および初期胚で特異的に発現する母性効果遺伝子 Oog1 の機能解析
論文調査委員	(主査) 教授 今井 裕 教授 矢野 秀雄 教授 久米 新一

### 論 文 内 容 の 要 旨

卵巣内の卵母細胞で発現し、受精後の発生時に機能する遺伝子として母性効果遺伝子と呼ばれる遺伝子群が知られるようになり、哺乳動物においては、これまでに11種類の関連遺伝子が同定されている。本研究は、以前我々が同定し、母性効果遺伝子の新たな候補と考えられる Oog1 遺伝子に着目し、その機能を分子生物学的な手法を用いて明らかにすることを目的とした。Oog1 は全長 1387 bp の cDNA で、326 アミノ酸、分子量約 37 kD のタンパク質をコードする。Oog1 タンパク質をコードするアミノ酸配列中には、タンパク質間の相互作用に関与するロイシンジッパー構造やロイシンリッチ領域が存在する。Oog1 遺伝子の転写産物は、15.5日齢の胎子卵巣で発現を開始し、受精後の2細胞期まで発現が続くが、4細胞期以降は発現しない。さらに、Oog1 タンパク質は1細胞期後期から2細胞期前期に核移行するという興味深い事実が明らかになっている。この時期は、受精後最初に遺伝子発現が起こる時期であり、胚性ゲノムの活性化とよばれている。この現象は、受精卵のその後の発生を維持するためには必要不可欠な生命現象であり、Oog1 が母性効果遺伝子として胚性ゲノムの活性化に深く関わっている可能性が高い。

まず、Oog1 タンパク質の構造的特徴に着目し、Oog1 と相互作用するタンパク質を酵母 two-hybrid 法を用いて探索した。その結果、Oog1 結合タンパク質として RalGDS を同定することに成功した。Oog1 と RalGDS の相互作用は特異的であり、RalGDS の Ras 結合ドメインが Oog1 との相互作用に必須であることも分かった。培養細胞において、RalGDS タンパク質は、単独では細胞膜や細胞質に局在しているが、Oog1 の発現によってその局在が核へと変化した。卵巣内においては、RalGDS は卵母細胞特異的に発現しており、初期胚における発現パターンも Oog1 と類似していることも明らかとなった。また、RalGDS タンパク質は、卵母細胞と初期胚では、主に細胞膜周辺に局在しているが、受精後の1細胞期後期から2細胞期前期にかけて Oog1 と同様に、核に局在することが明らかとなった。RalGDS は、低分子量 G タンパク質 Ras のエフェクター分子であることから、Oog1 が Ras シグナル伝達経路に関与していることが予測されたため、Oog1 と Ras との相互作用を解析した。その結果、Oog1 は GTP 依存的に Ras と結合することが明らかとなった。以上の結果から、Ras の活性化によって、Oog1 と RalGDS の複合体が形成され、その局在が核へと変換することが示唆された。

次に、Oog1 の核移行に着目し、核—細胞質間の分子輸送に関連するタンパク質との相互作用を検討した。一般的に核—細胞質間の分子輸送は、低分子量 G タンパク質 Ran と importin  $\alpha$ ,  $\beta$  複合体によって制御されており、細胞質側で importin  $\alpha$ ,  $\beta$  複合体と相互作用したタンパク質は核膜孔を通過して核内へと移行することが分かっている。近年、核局在化シグナルを持たないタンパク質が核移行する際には、importin  $\beta$  を介して核移行することが明らかとなっている。Oog1 には、核局在化シグナルが存在しないことから、importin  $\beta$  との相互作用を調べた。その結果、Oog1 は GTP 依存的に importin  $\beta$  と結合することが明らかとなった。また、Oog1 の構造的特徴から Ran と相互作用することも予測されたため、Ran との相互作用を調べた結果、Oog1 は Ran と直接結合することも分かった。さらに、Ran との相互作用は、受精後の1細胞期後期から2細胞期前期の初期胚でのみ特異的に起こることも明らかとなった。以上の結果から、Oog1 の核移行は Ran と im-

portin  $\beta$  を介したメカニズムで起こっていることが示された。

最後に、卵母細胞内における Oog1 機能の抑制を RNA 干渉法により検討した。RNA 干渉法は、細胞内に導入された二本鎖 RNA と相同な配列を有する mRNA の分解が特異的に促進されることで、その遺伝子の機能を効果的に抑制する手法である。この実験のために Oog1 を標的にしたヘアピン型二本鎖 RNA を *in vitro* で合成し、卵核胞期の卵母細胞に顕微注入した。顕微注入24時間後に、注入卵子より RNA を回収し、RT-PCR 法によって Oog1 の転写産物量を調べた。その結果、二本鎖 RNA 注入卵子では、Oog1 の転写産物量が劇的に減少していることが明らかとなった。この抑制効果は、Oog1 と配列相同性が高い Oog2, Oog3, Oog4 には起こらなかったことから、Oog1 特異的な抑制が起こっていることが示された。以上の結果から、RNA 干渉法は Oog1 の機能を解析するための非常に優れた手法であることが示された。Oog1 タンパク質は卵子形成の初期から細胞内に蓄積されることが明らかとなっており、その機能をタンパク質レベルにおいて完全に抑制するためには卵子形成の初期から Oog1 に対する二本鎖 RNA を発現させることが今後の検討課題である。

本研究は、受精後の初期胚に Oog1 を介した新たなシグナル伝達経路が存在することを明らかにしたものであり、胚性ゲノム活性化の分子メカニズムを解明する手がかりを提供するものである。

### 論文審査の結果の要旨

近年、受精前の卵母細胞に蓄積され、受精後の初期胚の発生を制御するうえで重要な働きをするタンパク質をコードする遺伝子群が次々と見出され、母性効果遺伝子とよばれている。その中で、以前我々が同定した Oog1 は、胎子卵巣で発現するとともに、受精後の胚ゲノムに依存した遺伝子活性化後に発現が消失してゆく、母性効果遺伝子と類似の遺伝子発現パターンを示した。さらに、胚ゲノムの活性化時期に、Oog1 タンパク質は核内に移行することから、胚発生のプログラムを決定づけるこの時期に、重要な役割を果たしている可能性がある。本実験では、この Oog1 のマウス初期胚発生期における機能を解明することを目的としている。評価できる点は、以下の通りである。

1. Oog1 タンパク質がロイシンジッパー構造やロイシンリッチ領域などをもつことから、Oog1 と相互作用するタンパク質を酵母 two-hybrid 法によって同定を試みた。その結果、Oog1 結合タンパク質として RalGDS を同定するとともに、RalGDS の Ras 結合ドメインが Oog1 との相互作用に必須であることを明らかにした。
2. 卵巣内において、RalGDS は卵母細胞特異的に発現しており、初期胚における発現パターンも Oog1 と類似していることを明らかにした。また、RalGDS タンパク質は、卵母細胞と初期胚では、主に細胞膜周辺に局在しているが、受精後の1細胞期後期から2細胞期前期にかけて Oog1 と同様に、核に局在することを明らかにした。
3. RalGDS は、低分子量 G タンパク質 Ras のエフェクター分子であることから、Oog1 と Ras との相互作用を解析した。その結果、Oog1 は GTP 依存的に Ras と結合することが明らかとなった。このことから、Ras の活性化によって、Oog1 と RalGDS の複合体が形成され、細胞核へとその局在を変化していることが示唆された。
4. Oog1 の核移行について、核—細胞質間の分子輸送に関連するタンパク質との相互作用を検討した。一般的に核—細胞質間の分子輸送は、低分子量 G タンパク質 Ran と importin  $\alpha$ ,  $\beta$  複合体によって制御されており、細胞質側で importin  $\alpha$ ,  $\beta$  複合体と相互作用したタンパク質は核膜孔を通過して核内へと移行することが分かっている。Oog1 には、核局在化シグナルが存在しないことから、importin  $\beta$  との相互作用を調べた。その結果、Oog1 は GTP 依存的に importin  $\beta$  と結合することが明らかとなった。また、Oog1 の構造的特徴から Ran と相互作用することも予測されたため、Ran との相互作用を調べた結果、受精後の1細胞期後期から2細胞期前期の初期胚でのみ、Oog1 は Ran と特異的に結合することが明らかとなった。
5. 卵母細胞内において Oog1 の機能を抑制する目的で、RNA 干渉法により検討した。Oog1 を標的にしたヘアピン型二本鎖 RNA を *in vitro* で合成し、卵核胞期の卵母細胞に顕微注入した。その結果、二本鎖 RNA 注入卵子では、Oog1 の転写産物量が劇的に減少していることが明らかとなった。この抑制効果は、Oog1 と配列相同性が高い Oog2, Oog3, Oog4 には起こらなかったことから、Oog1 特異的な抑制が起こっていることが明らかとなった。

以上のように、本論文は、哺乳動物初期胚の発生プログラムの開始に重要な胚ゲノムの活性化に、新規に同定された Oog1 遺伝子を介した新たなシグナル伝達経路の存在を明らかにし、胚性ゲノム活性化の分子メカニズムを解明するうえで

大きな手がかりを提供するものであり、家畜繁殖学、生殖生物学、実験動物学、発生工学の分野に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成19年2月15日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。