

|           |                           |
|-----------|---------------------------|
| 氏 名       | おおはし あきひろ<br>大 橋 紹 宏      |
| 学位(専攻分野)  | 博 士 (農 学)                 |
| 学 位 記 番 号 | 農 博 第 1238 号              |
| 学位授与の日付   | 平成 14 年 3 月 25 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 科 学 専 攻 |
| 学位論文題目    | マウス初期胚の発生と細胞周期に関する研究      |

|        |                    |               |           |
|--------|--------------------|---------------|-----------|
| 論文調査委員 | (主 査)<br>教 授 今 井 裕 | 教 授 佐 々 木 義 之 | 教 授 宮 本 元 |
|--------|--------------------|---------------|-----------|

### 論 文 内 容 の 要 旨

マウス胚を体外で1細胞期から培養を行うと、2細胞期で特異的にその発生が停止する現象が観察される。この2細胞期発生停止胚では、細胞周期をG2期からM期に移行させるために必要なMPFの活性化経路に何らかの欠損があることが示唆されているが、その詳しい機構についてはほとんど明らかにされていない。

本論文では、MPF主要構成成分であるCdc2とそのキナーゼ活性を調節するタンパク質であるcyclin A2とcyclin B1に着目し、これらの発現が2細胞期発生停止胚におけるCdc2キナーゼの活性化の制御に及ぼす影響について検討した。さらに、2細胞期発生停止胚をG2期に特異的な細胞周期解析モデルとして位置づけ、マウス初期胚におけるcyclin B1の核内移行を制御する因子の同定およびマウス初期胚のG2/M期におけるcyclin B1とcyclin A2の機能の解明を試みた。本論文によって以下の点が明らかとなった。

1. 2細胞期発生停止胚では、リン酸化によってCdc2キナーゼの活性が抑制されていることが明らかとなった。
2. Cdc2キナーゼ活性を調節しているcyclin A2およびcyclin B1のタンパク質発現量は正常発生胚と発生停止胚で差はなかったことから、2細胞期発生停止の原因は、Cdc2の脱リン酸化に関与するCdc25ホスファターゼを介したCdc2キナーゼの活性化経路に何らかの欠陥があるためと考えられた。
3. 正常発生胚ではG2/M期移行時にcyclin B1が核内に蓄積されたのに対し、発生停止胚では細胞周期を通じて細胞質に局在していた。このことから、2細胞期発生停止胚ではCdc2/cyclin B1複合体の核内移行メカニズムに何らかの欠陥があることを示唆した。
4. 2細胞期発生停止胚へのオキサダ酸処理では、Cdc2キナーゼの活性化とともにcyclin B1の核内移行が観察された。一方、オキサダ酸処理胚をCdc2キナーゼの阻害剤であるブチロラクトンIで処理するとcyclin B1の核内移行は阻害された。このことから、マウス2細胞期胚では、Cdc2キナーゼがcyclin B1の核内移行を制御していることが示唆された。
5. マウス2細胞期胚の細胞周期がG2期からM期中期に移行する過程でcyclin A2はリン酸化による修飾を受けることを明らかにした。このリン酸化修飾は哺乳動物の初期胚の細胞周期調節に特徴的な現象である可能性が示唆された。
6. 細胞質分裂の開始時直前にcyclin A2のタンパク質量が顕著に減少したことから、マウス2細胞期におけるcyclin A2の分解時期は培養細胞とは異なり細胞質分裂の直前から始まることが明らかとなった。

本論文によって、マウス2細胞期発生停止胚をモデルとして、胚発生停止機構を解明するとともに、初期胚におけるcyclin A2とcyclin B1のG2/M期移行に及ぼす機能を解析した。近年、様々なモデル動物を利用して細胞周期の研究が進められているが、哺乳動物初期胚における細胞周期に関する研究は少なく、本論文によって、初期胚に特異的な細胞周期調節機構の存在が明らかとなった。

## 論文審査の結果の要旨

哺乳動物の初期胚を体外で培養すると、多くの場合それぞれの種に特異的な時期で胚発生を停止する。マウスでは、体外受精後の1細胞期の卵子を体外で培養すると、2細胞期の後期にその発生が停止する現象が観察され、2細胞期発生停止と呼ばれている。これまでの研究から、発生停止胚では細胞周期をG2期からM期に移行させるために不可欠なMPFの活性化経路に何らかの欠損があることが示唆されているが、その詳しい機構についてはほとんど明らかにされていない。

本論文では、MPFの主要構成成分であるCdc2キナーゼとCdc2キナーゼと結合しMPFの機能に重要な働きをしているcyclin A2とcyclin B1に着目し、マウス初期胚における胚発生停止機構の解明とCdc2キナーゼの活性化制御機構を明らかにすることを目的としている。評価できる主な点は以下の通りである。

1. 2細胞期発生停止胚におけるcyclin A2とcyclin B1のタンパク質レベルでの発現量は正常発生胚と差はなく、Cdc2キナーゼのリン酸化修飾による活性抑制が発生停止胚に特徴的に見られた。このことから、2細胞期発生停止の主たる要因は、Cdc2の脱リン酸化を制御するCdc25フォスファターゼを介したCdc2活性化経路に起因することを明らかにした。
2. cyclin B1の細胞内局在は発生停止胚と正常発生胚とは大きく異なり、前者では細胞質、後者では核内での局在が観察された。このことから発生停止胚ではCdc2/cyclin B1複合体の核内移行に欠陥のあることが示唆された。
3. 発生停止胚のcyclin B1の核内移行はフォスファターゼ阻害剤であるオキサダ酸によって誘導され、発生停止が解除された。一方、オキサダ酸処理胚をCdc2キナーゼ活性の阻害剤であるブチロラクトンIで処理するとcyclin B1の核内移行が阻害されたことから、マウス2細胞期胚では、Cdc2キナーゼがcyclin B1の核内移行を制御していることが示唆された。
4. マウス2細胞期胚では、G2期からM期中期に移行する過程でcyclin A2はリン酸化による修飾を受けることを明らかにした。さらに、細胞分裂に先立ちcyclin A2のタンパク質量は顕著に減少することを明らかにした。cyclin A2に見られるこれらの変化は従来報告されている培養細胞のそれとは異なり、哺乳動物の初期胚の細胞周期調節に特徴的な現象である可能性を示唆した。

以上のように本論文は、マウス2細胞期発生停止胚をモデルとして、胚発生停止機構を解明するとともに、哺乳動物初期胚のG2/M期移行の細胞周期の制御機構を明らかにしたものであり、細胞生物学、発生学、生殖生物学の発展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14年2月18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。