

氏名(本籍)	ほし 星	の 野	ゆ 由	み 美
学位の種類	博士 ( 農 学 )			
学位記番号	農 博 第 8 5 8 号			
学位授与年月日	平 成 1 8 年 3 月 2 4 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	農学研究科応用生命科学専攻 (博士課程)			
学位論文題目	マウス卵成熟過程における Akt の発現, 局在およびその 機能に関する研究			
論文審査委員	(主 査)	教 授	佐 藤 英 明	
	(副 査)	教 授	西 田 朗	
		教 授	内 田 隆 史	
		助教授	佐々田 比呂志	

# 論文内容要旨

## 1. 緒言

多くの哺乳動物において、雌性生殖細胞である卵母細胞は卵巣内で第一減数分裂前期の卵核胞期 (GV) で停止しているが、ゴナドトロピンの刺激により減数分裂を再開し卵核胞崩壊 (GVBD) を引き起こす。その後、卵母細胞は第一減数分裂中期 (MI) を経て第1極体を放出し第二減数分裂中期 (MII) で再停止し、成熟卵母細胞となる。一般に、このような第一減数分裂前期で停止した卵母細胞が減数分裂を再開し第二減数分裂中期にいたる過程を「卵成熟」と定義している。現在、卵母細胞を体外で卵成熟させる技術は産業動物の改良・増殖へ貢献する重要なものとして世界的に広く利用されている。すなわち、この技術は卵巣で数十万個生産されるものの、その大多数は卵胞発育過程で死滅する卵母細胞の救助を可能にするものであり、卵成熟させた卵子を体外で受精させ発生培養し移植可能な胚を生産する、いわゆる IVMFC または IVP の技術の一つとして開発されている。しかしながら、体外で卵成熟させた卵子には産子への発生能が低いなどの問題点が多く残されている。

その一因として、卵成熟を制御する機構について、魚類、両生類やヒトデといった下等動物で研究が盛んに行われ、卵成熟促進因子 (MPF) の発見、MAPキナーゼ (MAPK) の活性化や減数分裂再開における cAMP 濃度低下などの制御因子の知見が報告されているものの、哺乳動物の卵成熟機構の詳細が未だ明らかになっていないことがあげられる。したがって、この卵成熟機構を明らかにすることは、高い発生能力のある胚を体外で生産する技術を確立するのみならず、ヒトの不妊治療といった補助生殖医療分野へも貢献するものであると考えられる。

以上の背景下、本研究では哺乳動物における卵成熟に関わる分子を明らかにすることを目的とし、マウス卵成熟過程における Akt (protein kinase B) について、その意義を明らかにしようとした。特に、卵成熟では染色体数が減数することが必要であり、GV 期から MII 期までの進行過程で染色体の整列や紡錘体形成などの細胞骨格系が関与する現象が観察されるが、現在までのところ、これらを制御する分子機構は明らかにされていない。最近、細胞骨格系の構築に関わるシグナル伝達に phosphatidylinositol-3-OH-kinase (PI3K) が重要で

あることが明らかにされ、この PI3K の下流に Akt が存在し、PI3K/Akt が細胞内シグナル伝達経路の一つとして細胞の生存や増殖に中心的な役割を果たしていることが示された。さらに、ごく最近、Akt は魚類や両生類における卵成熟での研究で卵成熟に関与する上流の因子である証拠が報告されている。

そこで本研究では、まず卵成熟過程における Akt の発現、PI3K/Akt 経路の存在と Akt の役割を調べ、次に GV 期から MII 期進行における活性型 Akt の役割を明らかにし、最後に卵成熟過程におけるリン酸型 Akt の役割について検索した。

## 2. 卵成熟過程における Akt の発現、PI3K/Akt 経路の存在と Akt の役割

### 卵母細胞における Akt の発現と卵成熟過程における動態

卵巣より採取した GV 期の卵母細胞を体外で成熟培養し卵成熟過程における Akt の発現とその局在について、ウエスタンブロット解析および免疫蛍光染色により調べた。その結果、GV、Pro-metaphase I (PMI)、MI および MII 期までの卵成熟各過程において Akt の発現は同レベルで認められた (Fig.1A)。さらに、Akt は GV 期で卵細胞質全体に均一に存在し、PMI 期では核周辺に、MI および MII 期では紡錘体の位置に存在した (Fig.1B)。このような Akt の発現は体細胞分裂中期 (STO 細胞および Hela 細胞) では認められず (Fig.2)、減数分裂特異的に局在することが明らかとなった。

次に、Akt は 2 カ所のリン酸化部位 (Thr308 および Ser473) を持ち、これらがリン酸化することで活性型となることが報告されている。そこでリン酸型 Akt の局在を調べた結果、Thr308 リン酸型 Akt は MI および MII 期の中心小体周辺物質 (PCM) に、一方、Ser473 リン酸型 Akt は紡錘体に局在することがわかった (Fig.3 および Fig.4)。

### PI3K/Akt 経路の存在と Akt の役割

GV 期卵母細胞における PI3K の発現をウエスタンブロット法により解析したところ、卵丘細胞および卵母細胞で発現が認められた (Fig.5)。そこで、卵成熟過程における PI3K の関与を調べるため、PI3K 阻害剤 (LY294002) 存在下で

卵丘細胞 - 卵母細胞複合体 (COCs) を培養した。その結果, GVBD 率および MII 期への成熟率は LY294002 濃度依存的に抑制された (Table 1)。また, 卵丘細胞の膨化も抑制された (Fig.6)。これに対し, 裸化卵母細胞 (DOs) を FF-MAS 添加培地で培養したところ, LY294002 添加により MII 期への成熟率は有意に低下したが, GVBD 率に影響はみられなかった (Table 2)。これらの結果から, マウス卵成熟過程において PI3K が発現し GVBD および MII 期への進行に関与していることが示唆された。

次に, PI3K/Akt 経路の存在を調べるために LY294002 存在下で 18 時間体外成熟培養を行い, キナーゼアッセイによる Akt 活性の測定および免疫蛍光染色によるリン酸型 Akt の検出を行った。その結果, LY294002 添加区において Akt 活性は有意に低下した (Fig.7)。各リン酸型 Akt の局在を調べたところ, 阻害剤添加により Thr308 リン酸型 Akt は PMI 期以降で検出されず, Ser473 リン酸型 Akt は MI 期で異常を示し, MII 期では検出されなかった。

さらに, 卵成熟過程における Akt の役割を調べるため, Akt 特異的活性阻害剤 (SH-6) 存在下で COCs を 18 時間培養した。その結果, 卵丘膨化に影響はみられず GVBD 率も対照区と有意差はなかったが, MII 期への進行が阻害された (Table 3)。免疫蛍光染色で微小管と核相を解析した結果, SH-6 添加区では紡錘体の形成と染色体の整列に異常が観察された (Fig.8)。

以上, 本章の結果, マウス卵成熟過程において Akt が発現し減数分裂特異的な局在を示し, PI3K/Akt 経路として役割を果たしていることが明らかとなった。

### 3. GV 期 - MII 期進行における活性型 Akt の役割

前章の結果から, マウス卵成熟過程において Akt が減数分裂特異的に紡錘体の位置に局在することがわかり, SH-6 添加で紡錘体の形成と染色体の整列に異常がみられ MII 期への進行が阻害されることが示された。そこで本章では, GV 期から MII 期までの卵成熟進行における Akt の役割を SH-6 添加成熟培地で調べた。

## GVBD, MI および MII 期進行に及ぼす影響

卵成熟各過程までに要する体外成熟時間を, GVBD と MI 期までをそれぞれ 8 および 10 時間, MII 期までを 18 時間とした。核相の判定を Propidium iodide 染色で行った。その結果, 減数分裂再開において核相を見ると GVBD を起こしていたものの, 核膜の消失が不完全であった (Fig.9)。また, 体外培養を 10 時間まで継続しても核膜の一部が残存し, 正常な紡錘体を形成できず, MI 期への進行は有意に抑制された (Fig.10 および Table 4)。一方, 体外成熟 10 時間以降で SH-6 を添加すると第 1 極体を放出し MII 期へは進行したが, 形成された紡錘体の形態は丸く小さいものであった (Table 5 および Fig.11)。

## 受精後の Akt の挙動および第 2 極体放出における Akt の役割

受精後のリン酸型 Akt の挙動を調べるため, 体外受精させた卵母細胞を免疫蛍光染色したところ, Akt は第 2 極体放出とともに極体側に移行し, 前核形成期以降卵細胞質内には存在しないことが明らかとなった (Fig.12)。

さらに, SH-6 処理した成熟卵子の受精能を判定するため, 体外受精を行い精子侵入および第 2 極体の放出を観察した。その結果, 精子侵入は確認されたものの, 第 2 極体放出は有意に抑制され, 減数分裂を正常に完了できないことが示された (Table 6)。

以上, 本章の結果, Akt は減数分裂再開において卵核胞崩壊時の核膜消失に関与していること, さらに, 減数分裂後期では MII 期の紡錘体形成・維持, さらに受精後の第 2 極体放出に機能し減数分裂完了に関与していることが明らかとなった。また, 受精後リン酸型 Akt は第 2 極体放出とともに卵細胞質から放出され前核形成期以降発現しないことから, 減数分裂特異的に Akt が機能していることがわかった。

## 4. 卵成熟過程におけるリン酸型 Akt の役割

一般に, 体細胞では Akt は 2 つのリン酸化部位がリン酸化することにより活性化となり機能をもつことが知られている。しかしながら, 本研究の結果から,

卵母細胞では Akt が減数分裂特異的に紡錘体に局在し、2 つのリン酸型 Akt は異なる局在性を示すことが明らかとなり、リン酸型 Akt はそれぞれが独立して機能している可能性が示唆された。そこで本章では、片方のリン酸化部位のリン酸化を阻害することで他方のリン酸型 Akt の機能を調べる方法を用い、卵成熟における 2 種類のリン酸型 Akt の役割を調べた。

#### MII 期進行に及ぼすリン酸型 Akt 抗体および阻害ペプチドの影響

リン酸型 Akt の機能を阻害するために、リン酸型 Akt 抗体あるいは阻害ペプチドをマイクロインジェクション法により卵細胞質に注入した。体外成熟培養後 10 時間に MI 期卵母細胞に片方のリン酸型抗体あるいは阻害ペプチドを注入し、もう一方のリン酸型 Akt を免疫蛍光染色により観察した。その結果、Thr308 あるいは Ser473 リン酸型 Akt を阻害した卵母細胞いずれでも紡錘体が小さく丸くなる傾向であったが、MII 期への進行は認められ、リン酸型 Akt が検出された (Fig.13)。これらの結果は、減数分裂期においては一方のリン酸型 Akt のみでも機能できる可能性を示した。

#### 受精および第 2 極体放出に及ぼすリン酸型 Akt 阻害の影響

体外成熟培養後 15 時間で MII 期卵母細胞にリン酸型 Akt 抗体と阻害ペプチドをマイクロインジェクション法により注入し、体外成熟培養後 18 時間に体外受精を行い、受精後の第 2 極体放出および前核形成を免疫蛍光染色により観察した。その結果、Thr308 リン酸型 Akt 抗体あるいは阻害ペプチドを注入した場合、第 2 極体が放出されたものの、その後卵細胞質内で新たな紡錘体様ものが構築され、減数分裂が正常に完了できないことがわかった。一方、Ser473 リン酸型 Akt のリン酸化を阻害すると、第 2 極体の放出が起こらないことが示された (Fig.14)。

以上、本章の結果、減数分裂期において Akt の機能は、異なる役割をもつ 2 つのリン酸型 Akt による紡錘体の維持と受精後の第 2 極体の放出、すなわち減数分裂の完了に機能していることが明らかとなった。

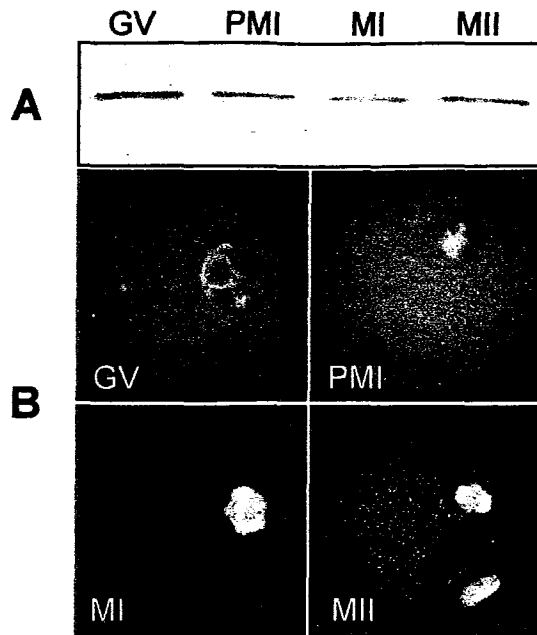
## 総括

本研究では哺乳動物の卵成熟に関わる分子を明らかにすることを目的とし、マウス卵成熟過程における Akt の役割について、

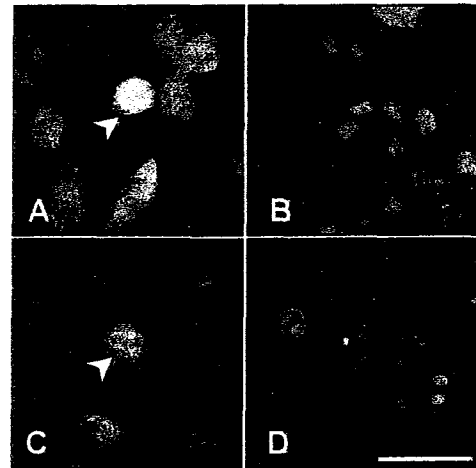
1. Akt は GV 期卵母細胞に存在し、PI3K/Akt 経路が機能することで卵成熟が進行すること、
2. Akt は MI および MII 期の紡錘体に局在し、その Thr308 リン酸型は PCM に、一方、Ser473 リン酸型は紡錘体に存在し、受精後第 2 極体放出とともに極体側に移行し、前核形成期以降発現しないこと、
3. Akt の局在は体細胞の分裂中期では観察されないことから、Akt が減数分裂特異的な機能を持つこと、
4. Akt は減数分裂再開において、卵核胞崩壊時の核膜の消失と減数分裂後期の紡錘体形成・維持、さらに受精後の第 2 極体放出に機能し、減数分裂の再開と完了に関与すること、
5. 2 つのリン酸型 Akt は独立して機能すること、すなわち、Thr308 リン酸型 Akt は減数分裂中期紡錘体維持と受精後の第 2 極体放出から減数分裂の完了に関与し、一方、Ser473 リン酸型 Akt は減数分裂中期紡錘体維持と第 2 極体放出に機能すること

を明らかにした。

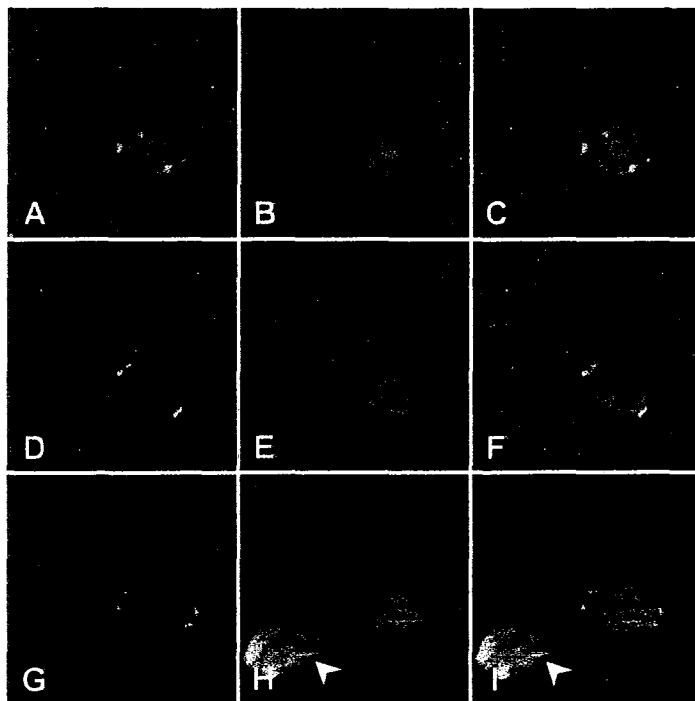
本研究で得られた知見は、マウスの卵成熟過程に PI3K/Akt が関与し、Akt が減数分裂の再開と完了に機能していることを明らかにした初めてのものである。さらに、Akt の 2 つのリン酸型 Akt はそれぞれが独立して機能することを明らかにし、本研究で得られた成果は、マウスだけでなく、他の哺乳動物における卵成熟機構の解明に貢献するものである。



**Fig. 1. Detection of Akt during meiotic maturation in mouse oocytes.** (A) Western blot analysis for total Akt expression in 50 oocytes at each stage. (B) Immunofluorescence localization of total Akt. Green and red colors show Akt and nuclear status, respectively. Oocytes at prometaphase I (PMI), MI and MII were collected at 8, 10 and 18 hr after culture, respectively.

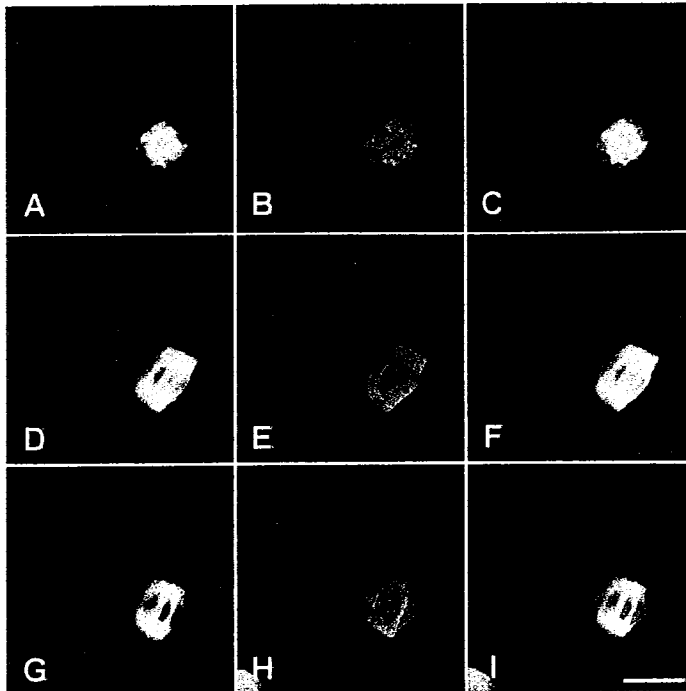


**Fig. 2. Cellular localization of Akt in somatic cells at metaphase.** Panel A and B show ST0 cells. Panel C and D show HeLa cells. B and D are negative controls. Green and red colors show Akt and nuclear status, respectively. The arrowheads indicate the metaphase cells. Bar = 10  $\mu$ m.

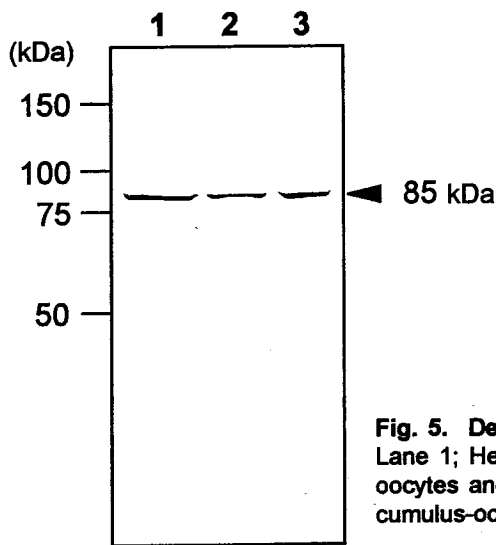


**Fig. 3. Cellular localization of Thr308-phosphorylated Akt during meiotic maturation.** Oocytes at prometaphase I (PMI), MI and MII were collected at 8, 10 and 18 hr after culture, respectively. The meiotic stages are prometaphase I (A-C), metaphase I (D-F) and metaphase II (G-I), respectively. Nuclear status and microtubules (B,E,H) were visualized by counterstaining, and merged (C,F,I) with staining of Thr308-phosphorylated Akt (A,D,G). Green, red and blue colors show Akt, nuclear status and microtubules, respectively. The arrowheads indicate the first polar body.

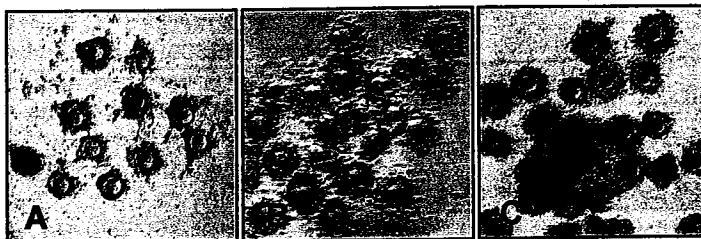




**Fig. 4. Cellular localization of Ser473-phosphorylated Akt during meiotic maturation.** Oocytes at prometaphase I (PMI), MI and MII were collected at 8, 10 and 18 hr after culture, respectively. The meiotic stages are prometaphase I (A-C), metaphase I (D-F) and metaphase II (G-I), respectively. Nuclear status and microtubules (B,E,H) were visualized by counter-staining, and merged (C,F,I) with staining of Ser473- phosphorylated Akt (A,D,G). Green, red and blue colors show Akt, nuclear status and microtubules, respectively. Bar = 10  $\mu$ m.



**Fig. 5. Detection of PI3K in mouse oocytes and cumulus cells.** Lane 1; Hela cells were used as a positive control, lane 2 and 3; oocytes and cumulus cells. The samples were collected from fifty cumulus-oocyte complexes.



**Fig. 6. Effect of LY294002 on cumulus expansion.** COCs were cultured for 18 hr. The status of cumulus expansion in hypoxanthine (A), FSH (B) or 10  $\mu$ M LY294002 (C)-supplemented medium.

**Table 1. Effect of LY294002 on FSH-induced meiotic maturation of cumulus-oocyte complexes (COCs)**

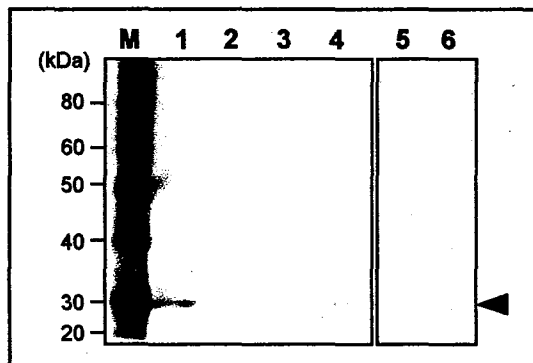
Maturation medium supplemented with	LY294002 added ( $\mu\text{M}$ )	No. of COCs examined	Percentage of oocytes progressed to:	
			GVBD	MII
Hx	0	77	27.0 $\pm$ 3.0 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>
Hx+FSH	0	159	88.2 $\pm$ 2.3 <sup>b</sup>	75.0 $\pm$ 2.2 <sup>b</sup>
Hx+FSH	10	156	78.3 $\pm$ 3.8 <sup>b,c</sup>	58.7 $\pm$ 9.5 <sup>c</sup>
Hx+FSH	100	183	60.1 $\pm$ 3.8 <sup>d</sup>	26.3 $\pm$ 4.4 <sup>d</sup>

Values are mean  $\pm$  S.E.M. of three replicates. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Fisher's PLSD. <sup>a-d</sup>Values with different superscripts within each column are significantly different ( $P < 0.05$ ).

**Table 2. Effect of LY294002 on FF-MAS-induced meiotic maturation in denuded oocytes (DOs)**

Maturation medium supplemented with	LY294002 added ( $\mu\text{M}$ )	No. of DOs examined	Percentage of oocytes progressed to:	
			GVBD	MII
Hx	0	96	17.7 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>
Hx+FSH	0	55	25.7 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>
Hx+FF-MAS	0	108	62.7 $\pm$ 9.2 <sup>b</sup>	38.0 $\pm$ 6.5 <sup>b</sup>
Hx+FF-MAS	10	27	59.0 $\pm$ 4.9 <sup>b</sup>	21.7 $\pm$ 4.9 <sup>c,d</sup>
Hx+FF-MAS	100	121	50.7 $\pm$ 1.8 <sup>b</sup>	15.7 $\pm$ 1.2 <sup>d</sup>

Values are mean  $\pm$  S.E.M. of three replicates. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Fisher's PLSD. <sup>a-d</sup>Values with different superscripts within each column are significantly different ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 7. Akt activity in LY294002 treated mouse oocytes.** Lane 1; Hela cells as a positive control, lane 2; GV oocytes, lane 3 and 4; MI and MII oocytes without treatment, lane 5 and 6; MI and MII oocytes treated with 10  $\mu\text{M}$  LY294002. One hundred of oocytes were loaded in each lane.

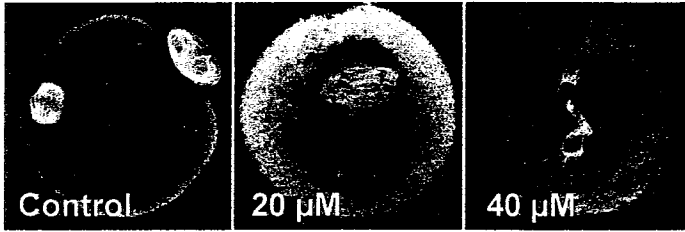
**Table 3. Effect of SH-6 on FSH-induced meiotic maturation in mouse cumulus-oocyte complexes**

SH-6 added ( $\mu\text{M}$ )	No. of oocytes examined	Percentage of oocytes showing:				
		PMI	MI	MII	Abnormal *	Others
0	43	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	98.6 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	1.4 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>
20	44	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	19.5 $\pm$ 6.7 <sup>b</sup>	14.0 $\pm$ 9.8 <sup>c</sup>	62.5 $\pm$ 13.6 <sup>a</sup>	4.0 $\pm$ 4.0 <sup>b</sup>
40	45	3.1 $\pm$ 3.1 <sup>a</sup>	12.1 $\pm$ 9.5 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>c</sup>	67.1 $\pm$ 9.4 <sup>a</sup>	17.7 $\pm$ 6.9 <sup>b</sup>

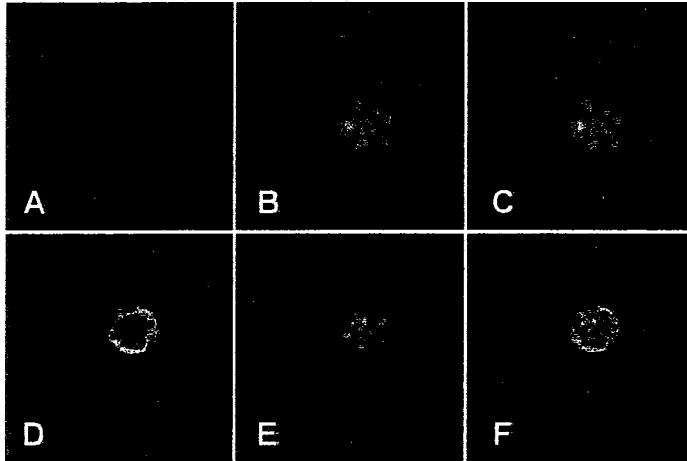
\*Abnormalities of chromosome and microtubule distribution.

Values are mean  $\pm$  S.E.M of five replicates. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Fisher's PLSD.

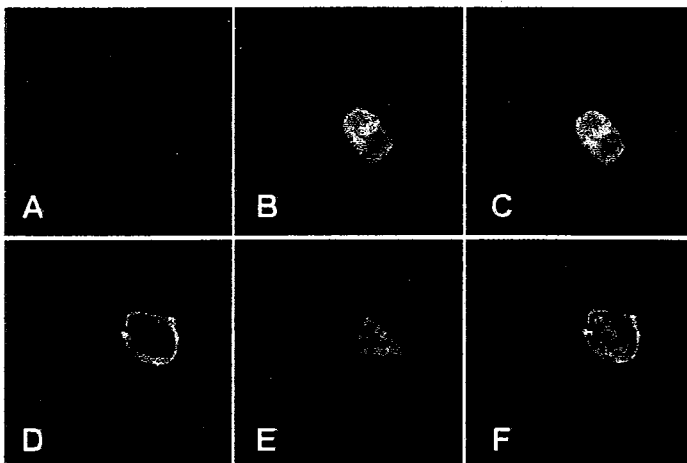
<sup>a-c</sup>Values with different superscripts within each column are significantly different ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 8. Effect of SH-6 on FSH-induced meiotic maturation in mouse COCs.** COCs were cultured for 18 hr in the medium containing 20 or 40  $\mu$ M SH-6. Green and red colors show microtubules and nuclear status, respectively.



**Fig. 9. Cellular localization of Lamin B during meiotic maturation in mouse oocytes treated with 20  $\mu$ M SH-6 for 8 hr.** Top (A-C) and bottom (D-F) panels show control and SH-6 treated oocytes, respectively. Lamin B (A and D), microtubules and nuclear status (B and E), and merged (C and F). Green, red and blue colors show Akt, nuclear status and microtubules, respectively.



**Fig. 10. Cellular localization of Lamin B during meiotic maturation in mouse oocytes treated with 20  $\mu$ M SH-6 for 10 hr.** Top (A-C) and bottom (D-F) panels show control and SH-6 treated oocytes, respectively. Lamin B (A and D), microtubules and nuclear status (B and E), and merged (C and F). Green, red and blue colors show Akt, nuclear status and microtubules, respectively.

**Table 4. Effects of SH-6 on GVBD and progress to MI in mouse GV oocytes**

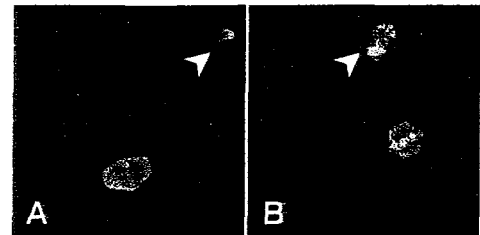
SH-6 added ( $\mu\text{M}$ )	No. of oocytes examined at 8 hr / 10 hr	Percentage of oocytes with	
		GVBD at 8 hr	MI at 10 hr
0	53 / 35	98.3 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	97.7 $\pm$ 2.2 <sup>a</sup>
20	47 / 35	95.4 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>	72.2 $\pm$ 4.0 <sup>b</sup>
40	47 / 35	95.7 $\pm$ 2.2 <sup>a</sup>	27.8 $\pm$ 4.0 <sup>b</sup>

Values are mean  $\pm$  S.E.M. of three replicates. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Fisher's PLSD. <sup>a,b</sup>Values with different superscripts within each column are significantly different ( $P < 0.05$ ).

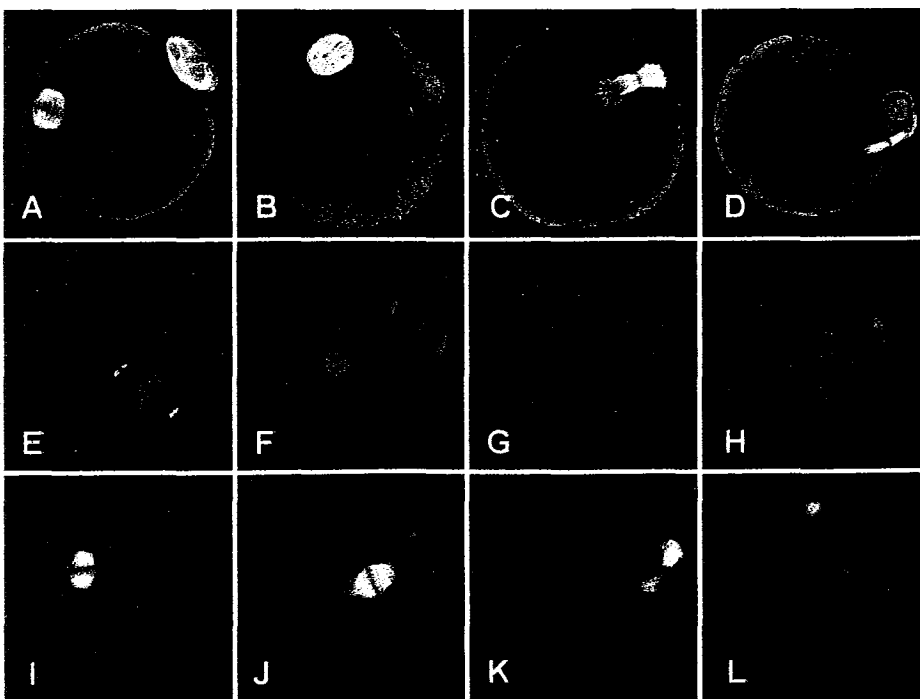
**Table 5. Effect of SH-6 on progress to MII in mouse MI oocytes**

SH-6 added ( $\mu\text{M}$ )	No. of MI oocytes examined	Percentage of oocytes progressed to MII
0	66	99.0 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>
20	64	93.4 $\pm$ 3.4 <sup>b</sup>
40	60	93.3 $\pm$ 1.7 <sup>b</sup>

Values are mean  $\pm$  S.E.M. of three replicates. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Fisher's PLSD. <sup>a,b</sup>Values with different superscripts within a column are significantly different ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 11. Organization of microtubules and alignment of chromosomes in mouse MI oocytes cultured with SH-6.** Most of the treated oocytes reached to MII. Panel A; control, Panel B; oocytes cultured with 20  $\mu\text{M}$  SH-6. Red and blue colors show nuclear status and microtubules, respectively. The arrowheads indicate the first polar body.

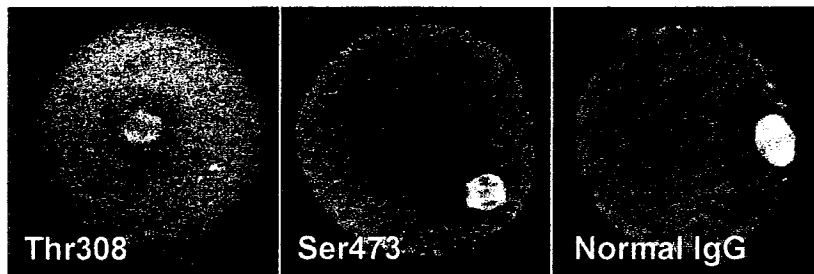


**Fig. 12. Distribution of Thr308- and Ser473-phosphorylated Akt immediately after *in vitro* fertilization.** Top (A-D), middle (E-H) and bottom (I-L) panels show microtubules, Thr308-, and Ser473-phosphorylated Akt, respectively. IVF 0 hr (A, E, I), IVF 1 hr (B, F, J), IVF 2 hr (C, G, K) and IVF 4 hr (D, H, L). Green and red colors show microtubules or phosphorylated Akt and nuclear status, respectively.

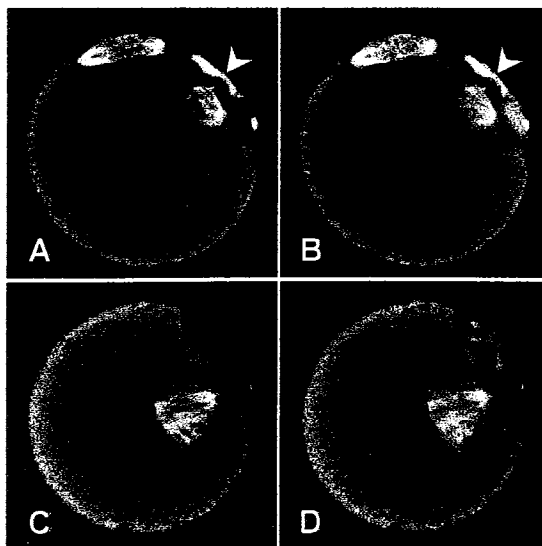
**Table 6. Effects of SH-6 on sperm penetration and second polar body (2PB) extrusion in mouse oocytes treated with SH-6**

SH-6 added ( $\mu\text{M}$ )	No. of oocytes examined	Percentage of oocytes with	
		Sperm penetration	2PB
0	70	$89.5 \pm 2.7^a$	$87.3 \pm 4.0^a$
20	59	$85.6 \pm 0.9^a$	$18.7 \pm 1.3^b$
40	57	$84.0 \pm 1.4^a$	$0 \pm 0^c$

Values are mean  $\pm$  S.E.M. of three replicates. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Fisher's PLSD. <sup>a-c</sup>Values with different superscripts within each column are significantly different ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 13. Effect of anti-Thr308- or Ser473- phosphorylated Akt antibody on MI to MII transition in mouse oocytes.** Oocytes at MI were injected with each antibody, and cultured up to 18 hr. Normal rabbit IgG was injected in the negative control. Green and red colors show microtubules and nuclear status, respectively.



**Fig. 14. Effect of Thr308- or Ser473- phosphorylated Akt inhibitory peptide on second polar body extrusion after *in vitro* fertilization.** Panel A and B; oocytes received with Thr308 peptide, Panel C and D; oocytes received with Ser473 peptide. Panel B and D show merged figures. Green and red colors show microtubules and nuclear status, respectively. The arrowheads indicate the second polar body.

## 論文審査結果要旨

体外成熟させた卵子の産子への発生能は低い。その一因として、哺乳動物の卵成熟機構の詳細が未だ明らかになっていないことがあげられる。したがって、卵成熟機構を明らかにすることは重要であり、その解明は、高い受精能・発生能のある胚を体外で生産する技術の確立に貢献する。特に卵成熟（GV期からMII期）過程における染色体の整列や紡錘体形成などを制御する分子機構は明らかにされていない。最近、細胞骨格系の構築に関わるシグナル伝達に phosphatidylinositol-3-OH-kinase (PI3K) が重要であることが明らかにされ、このPI3Kの下流にAktが存在すること、また、PI3K/Aktが細胞内シグナル伝達経路の一つとして細胞の生存や増殖に中心的な役割を果たしていることが示された。このような背景下、マウスを材料とし卵成熟過程におけるAkt (protein kinase B) の生理的役割を明らかにしようとした。本研究では、まず卵成熟過程におけるAktの発現、PI3K/Akt経路の存在とAktの役割を調べ、次にGV期からMII期進行における活性型Aktの役割を明らかにし、最後に卵成熟過程におけるリン酸型Aktの役割について解析し、次のことを明らかにした。(1) AktはGV期卵母細胞に存在し、PI3K/Akt経路が機能することで卵成熟が進行する、(2) AktはMIおよびMII期の紡錘体に局在し、そのThr308リン酸型はPCMに、一方、Ser473リン酸型は紡錘体に存在し、受精後第2極体放出とともに極体側に移行し、前核形成期以降発現しない、(3) Aktの局在は体細胞の分裂中期では観察されないことから、Aktが減数分裂特異的な機能を持つと推察される、(4) Aktは減数分裂再開において、卵核崩壊時の核膜消失と減数分裂後期の紡錘体形成・維持、さらに受精後の第2極体放出に関与し、減数分裂の再開と完了に関わる、(5) 2つのリン酸型Aktは独立して機能する、すなわち、Thr308リン酸型Aktは減数分裂中期紡錘体維持と受精後の第2極体放出から減数分裂の完了に関与し、一方、Ser473リン酸型Aktは減数分裂中期紡錘体維持と第2極体放出に機能する。本研究で得られた知見は、マウスの卵成熟過程にPI3K/Akt経路が関与し、Aktが減数分裂の再開と完了に関わることを明らかにした初めてのものである。さらに、Aktの2つのリン酸型Aktはそれぞれが独立して機能することを示した。

本研究は応用動物科学において高く評価される。よって博士（農学）の学位を授与できるものと判定した。