

卵母細胞成熟過程におけるヒアルロン酸および  
CD44の産生調節機構とその生理的役割

木村直子

博士論文

卵母細胞成熟過程におけるヒアルロン酸および  
**CD44** の産生調節機構とその生理的役割

東北大学大学院農学研究科  
資源生物科学専攻

木村直子

指導教官 佐藤英明 教授



# 目 次

	ページ
序論	1-9
卵丘-卵母細胞複合体における卵丘膨化	2-3
卵丘膨化の生理的意義	3-4
卵丘膨化における HA と HA 結合タンパクの生理的役割	4-5
卵丘膨化の制御機構	5-6
HA の生合成	7
HA レセプター(CD44)の機能	7-8
本研究の目的	8-9
研究材料としてのブタ	9
第1章 体外成熟過程における卵丘-卵母細胞複合体の卵丘膨化に 及ぼす膨化促進因子と卵丘膨化の経時的変化	10-29
緒 言	11-12
材料および方法	13-17
結 果	18-19
考 察	20-22
要 約	23-24
図(Fig. 1-5)	25-29
第2章 卵丘-卵母細胞複合体における HA 合成酵素(has2, has3) 及び HA レセプター(CD44) mRNA の発現動態	30-54
緒 言	31
材料および方法	32-38
結 果	39-40
考 察	41-45
要 約	46-47
図(Fig. 6-11)	48-54

第3章	卵母細胞で発現している <b>has3 cDNA</b> のクローニングと その特徴	<b>55-78</b>
緒 言		56
材料および方法		57-63
結 果		64-66
考 察		67-69
要 約		70-71
図(Fig. 12-18)		72-78
第4章	体外成熟過程にある卵丘細胞-卵母細胞複合体における <b>CD44</b> の局在およびその役割	<b>79-98</b>
緒 言		80
材料および方法		81-84
結 果		85-86
考 察		87-89
要 約		90-91
図(Fig. 19-25)		92-98
総括		<b>99-106</b>
図(Fig. 26-28)		104-106
参考論文		<b>107-119</b>
付録(Appendix 1-4)		<b>120-123</b>
謝 辞		<b>124</b>

# 序 論

## 卵丘-卵母細胞複合体における卵丘膨化

哺乳動物の卵母細胞は、その周囲の顆粒膜細胞と相互作用しながら発育する。特に胞状卵胞以降、卵母細胞周囲に密に付着した顆粒膜細胞は卵丘細胞と呼ばれ、卵丘-卵母細胞複合体(cumulus-oocyte complexes: COCs)として互いに機能しながら、卵母細胞は成熟をむかえる。卵胞発育の過程で顆粒膜細胞および卵丘細胞と卵母細胞は、相互に突起をのばしギャップ結合を形成している。この細胞間コミュニケーションは卵母細胞にとって、1)卵母細胞の発育、2)イオンや代謝物質の交換、3)卵母細胞質の成熟、4)卵母細胞由来遺伝子の転写抑制、5)減数分裂停止の維持に必須とされている(Larsen ら, 1996)。排卵前の LH サージを機に、COCs は卵丘細胞間に粘性を帯びた細胞外マトリックスを形成し、その体積を著しく増し、膨化しながら(Dekel と Phillips, 1979; Salustri ら, 1989)、卵胞細胞壁から遊離する。この卵丘膨化と並行し、第一減数分裂前期で停止し卵核胞(germinal vesicle : GV)を維持していた卵母細胞は、卵核胞崩壊(germinal vesicle breakdown: GVBD)を起こし、第二減数分裂中期(MII)まで進行し再び停止する。この卵母細胞の GVBD(=減数分裂再開)から MII までの細胞周期の進行は、卵母細胞の成熟と定義されている(Appendix 1)。

卵丘膨化を形成する細胞外マトリックスの主な構成成分は、卵丘細胞から分泌されるヒアルロン酸(HA)であることが現在までの報告から明らかとなっており(Eppig, 1979; Talbot ら, 1984; Salustri ら, 1989 と 1992)。この他コンドロイチン硫酸などのグリコサミノグリカン(Nakayama ら, 1996; Salustri ら, 1999)やプロテオグリカン(Salustri ら, 1989; Camaioni ら, 1996)なども分泌されていることが報告されている。一方この細胞外マトリックスの維持および安定化に関わる因子として、血清由来因子 inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor(Chen ら, 1992)が卵胞液中に同定されている他、link protein(Camaioni ら, 1996; Kobayashi ら, 1999)、TSG-6(Fulop ら, 1997)、顆粒膜細胞由来の因子(Chen ら, 1996)が、顆粒膜細胞



あるいは卵丘細胞で分泌されていることが明らかとなっている。このように卵丘膨化は卵丘細胞による HA を主とするグリコサミノグリカンやプロテオグリカンの合成、そして HA 結合タンパク質やプロテオグリカンの HA との結合による HA の卵丘細胞間への保持により成り立っている。

卵丘膨化と並行して起こる卵母細胞における減数分裂再開のメカニズムについては、さまざまな報告がなされているが、減数分裂の再開と卵丘膨化によって生じる卵丘細胞間および卵丘細胞-卵母細胞間のギャップ結合の消失との関係について、いくつかの報告がみられる(Larsen ら, 1986; Isobe ら, 1998)。一方で卵母細胞を卵胞内から取り出すと、自然発生的に減数分裂の再開が誘起されることが報告されており(Pincus と Enzmann, 1935; Edwards, 1965)、このことから卵胞内細胞により分泌される減数分裂再開の抑制因子の存在が考えられている。これらの報告から、顆粒膜細胞あるいは卵丘細胞から卵母細胞へ減数分裂再開を抑制する因子が、ギャップ結合を介し供給されており、卵丘膨化に伴い卵丘細胞間および卵丘細胞-卵母細胞間のギャップ結合が物理的に切断されることによりこの供給が途絶え、卵母細胞の減数分裂が再開され、卵母細胞の成熟が進行すると考えられている。この減数分裂抑制因子として cAMP(Downs と Eppig, 1984)やヒポキサンチン(Downs ら, 1985)などが報告されている。一方で卵丘膨化時の卵丘細胞骨格の再構築が減数分裂の再開および進行に重要であるという報告(Allworth と Albertini, 1993; Sutovsky ら, 1993)、卵丘細胞を除去し成熟培養を行った場合、卵母細胞の GVBD が遅延したり、核成熟が正常に進行しないなどの報告(Tatemoto ら, 1993)がなされていることから、卵母細胞の成熟には卵丘細胞の存在が必須であると考えられる。

## 卵丘膨化の生理的意義(Appendix 2)

卵丘膨化の生理的意義としては、前項でも述べた卵母細胞の成熟との関わり

りに加えて、卵胞壁からの COCs の遊離(Chen ら, 1993)、卵管内移動(Mahi-Brown と Yanagimachi, 1983; Talbot ら, 1999)、精子の捕足(Yanagimachi, 1988)などが報告されている。Chen ら(1993)はマウスにグリコサミンの合成阻害剤である 6-diazo-5-oxo-1-norleucine(DON)を腹腔内投与した場合、卵丘膨化が抑制され排卵率の低下がみられたことを報告している。またプロスタグランジン E<sub>2</sub> レセプターサブタイプ EP<sub>2</sub> の欠損マウスでは卵丘膨化が不完全になり、その結果排卵率や受精率の低下が見られる(Hizaki ら, 1999)。これらの報告は、卵丘膨化が *in vivo* における排卵および受精率に重要な役割を果たすことを示している。またマウスでは体外成熟培地への DON の添加により卵丘膨化が阻害され、受精率の低下がみられたこと(Chen ら, 1993)、ウシでは十分に膨化した COCs で高い体外受精率が得られること(Ball ら, 1983; Sirard と Lambert, 1985)、卵丘膨化が体外受精後の胚発生に関与すること(Furnus ら, 1998)などの報告がみられることから、卵丘膨化は *in vitro* においても、受精およびその後の胚発生に深く関与することが示されている。

#### 卵丘膨化における HA と HA 結合タンパク質の生理的役割

卵丘膨化において、特に HA と HA 結合タンパク質との結合の生理的役割については、サルでは受精時に HA あるいは卵丘細胞外マトリックス成分が精子膜タンパク質である PH-20 と結合することにより、精子のカルシウム濃度が上昇し、受精に必要な先体反応(acrosome reaction)の誘起が起りやすくなるという知見が得られている(Cherr ら 1999)。Hess ら(1999)はマウスに HA を過剰に静脈注射して、血清因子である inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor と内在性 HA との結合を阻害した結果、卵丘膨化が阻害され排卵率の低下および卵管内における卵母細胞の生存性の低下がみられたことを報告している。また Zhuo ら(2001)は inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor のライトチェーンであるピクニン遺伝子を欠損させ、

HA と inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor との結合能を失わせたマウスでは、卵丘膨化が完全に阻害され、極端に排卵率や受精率が低下したことを報告している。このように卵丘膨化における HA と HA 結合タンパク質との結合は、*in vivo* における排卵および受精に深く関与していることが示されている。

### 卵丘膨化の制御機構

*in vivo* における排卵前卵胞の卵丘膨化は LH サージが機になる。一方 *in vitro* では FSH が卵丘膨化および卵丘細胞における HA 合成の主要因子である (Eppig, 1979; Salustri, 1989)。cAMP のアナログ、アデニレートシクラーゼアクチベーター、ホスホジエステラーゼの添加によっても卵丘膨化が誘起されることから、この FSH の作用は cAMP を介したものであり (Dekel と Kraicer, 1978; Downs と Hunzicker-Dunn, 1995)、FSH は COCs における細胞内 cAMP を上昇させることが明らかとなっている (Salustri ら, 1985)。細胞増殖因子の中では epidermal growth factor (EGF) が、唯一 FSH にかわる卵丘膨化促進作用を示すが、この場合の作用はチロシンキナーゼのカスケードを介している (Downs, 1989; Singh, 1993)。その他、血清は inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor に代表されるように、卵丘細胞で合成された HA をはじめとする細胞外マトリックス成分を卵丘細胞間に保持し、細胞外マトリックスを安定させる作用があることが報告されている (Eppig, 1980; Chen ら, 1992; Camaiani ら, 1993)。また卵胞液には卵丘膨化促進作用があることが報告されている (Yoshida ら, 1992; Daen ら, 1994)。

*in vitro* における卵母細胞と卵胞由来細胞の相互作用についての研究から、卵母細胞が卵丘細胞の機能を制御していることが明らかとなっている。マウス COCs から卵細胞質を除去した OXCs (oocyctectomixed COCs) では、FSH あるいは EGF の存在下にも関わらず、HA 合成能および卵丘膨化が減少したり、失われたりすることが報告されている (Buccione ら, 1990)。また FSH 存在下でマ

ウスの卵丘細胞を GV 期の卵母細胞と共培養したり、卵母細胞のコンディション培地で培養した場合、HA 合成や卵丘膨化が誘起される(Buccione ら, 1990; Salustri ら, 1990)。これらの報告は、卵母細胞由来の因子が FSH 誘導性の HA 合成および卵丘膨化を引き起こすことを示している。この卵母細胞由来の因子の作用は FSH 誘導性のため cAMP のカスケードを介したものと考えられているが、cAMP のアナログである dibutyryl cyclic AMP(Bt<sub>2</sub>cAMP)を添加した場合、卵丘細胞単独では HA 合成が誘起されないことから、cAMP のカスケードの下流で作用しているか、全く別のカスケードを介したものと考えられている。Tirone ら(1997)はこの卵母細胞由来の因子が、卵丘細胞における FSH により誘導される HA 合成の維持に必要であることを報告している。最近、卵母細胞で発現している細胞増殖因子である transforming growth factor(TGF)ファミリーに属する growth and differentiation factor-9(GDF-9)が同定され、これが卵母細胞由来の因子と類似した作用を示すことが報告されている(Elvin ら, 1999)。

マウスの卵丘膨化においては主要膨化促進因子である FSH に加え、血清および卵母細胞由来の因子が必須である(Eppig, 1980; Buccione ら, 1990; Salustri ら, 1990)。一方ウシやブタの卵母細胞でも卵丘膨化促進因子が分泌されていることが示されているものの、これらの家畜における卵丘膨化に卵母細胞由来の因子は必須ではないという報告がみられる(Prochazuka ら, 1991; Vanderhyden, 1993; Ralph ら, 1995)。この他、ブタの卵丘細胞や顆粒膜細胞由来の因子に膨化促進作用があることが報告されている(Prochazuka ら, 1998)。また Kobayashi ら(1994)および Abeydeera ら(1998)は、ウシまたはブタ COCs の卵丘膨化が、いくつかの細胞増殖因子あるいはホルモンの添加により無血清培地でも誘起されることを報告している。以上から、卵丘膨化の制御機構が哺乳類で必ずしも同じではないことが示されている。



## HA の生合成

HA は、N-アセチル-D-グルコサミンと D-グルクロン酸の二糖の繰り返しポリマーからなるグリコサミノグリカンの一つである。1934 年 Meyer と Parmer らによってウシの眼球の硝子液から単離されて以来、多くの組織や器官の細胞外マトリックスの主構成成分として生理機能を有していることが明らかとなっている。この HA の合成は糖転移酵素である HA シンターゼ(HA 合成酵素)により、活性化された糖ヌクレオチドである UDP-グルクロン酸と UDP-N-アセチルグルコサミンが交互に HA 鎖に転移する形で合成される(Appendix 3)。他のグリコサミノグリカンは細胞内のゴルジネットワークで合成され、コアタンパク質に結合するのに対し、HA は細胞膜で合成され、コアタンパク質と結合しない(Weigel ら, 1997)。真核生物における HA 合成酵素の細胞膜からの分離精製は、その分子の不安定性から長年の間成功せず、分子の実体については最近まで全く不明であった。しかし 1996 年に脊椎動物では初めてマウスおよびヒトで HA 合成酵素遺伝子(*HAS*)がクローニングされ、現在までに哺乳類では 3 種類のファミリーが存在することが明らかとなっている(Spicer と McDonald, 1998; Itano ら 1999)。以来、HA の生合成機構および各 HA 合成酵素の機能解析についての研究が一挙に加速している。しかし各酵素の特性および発現調節機構の詳細についてはまだ不明な点が多い。

Fulop ら(1997)は、*in vivo* で卵丘膨化したマウス COCs に Has2 のホモログが発現していることを報告している。しかし、この報告は卵丘-卵母細胞の複合体における発現であり、卵丘細胞および卵母細胞それぞれの発現については明らかになっていない。また卵丘膨化促進因子が HAS の発現に及ぼす影響についてはまだ報告がない。

## HA レセプター(CD44)の機能

HA の主レセプターである CD44(Appendix 4)は、もともとリンパ球と血管内皮細胞の接着に関与するホーミングレセプターとして 1989 年に発表されている。しかし、その後細胞外ドメインに HA 結合サイトをもつ HA レセプターであること、リンパ球の他にもさまざまな細胞で発現していることが報告されている(Aruffo ら, 1990; Lesley ら, 1993)。HA との相互作用によってその機能は非常に多岐に渡っているが大まかに分類すると、1)HA やプロテオグリカンを含む細胞外マトリックスと細胞間の架橋による細胞凝集および細胞外マトリックスの保持、2)細胞外マトリックスと細胞間のシグナリング、3)HA の分解にともなう CD44 を介した HA の細胞内取り込み、4)癌細胞の転移性獲得などが挙げられる(Kunundson K と Kunundson CB, 1999)。しかし発現している細胞がどのように CD44 を制御しているのかについてはまだ明らかになっていない。

CD44 の発現はヒトの卵母細胞、着床前胚、卵丘細胞および顆粒膜細胞で確認されている(Campbell ら, 1995; Ohta ら, 1999)。しかしその機能についてはまだ明らかにされていない。ブタ胚の体外成熟あるいは受精の培養培地への CD44 のリガンドである HA あるいはコンドロイチン硫酸の添加は、胚盤胞期胚への発生率を向上させることが報告されている(Kano ら, 1998; Miyoshi ら, 1999)。これらから CD44 と HA を含むグリコサミノグリカンおよびプロテオグリカンは、その結合を介して卵母細胞あるいは胚の発育に何らかの機能を果たしている可能性が考えられる。

## 本研究の目的

以上を背景とし、本研究ではまず卵丘膨化における HA および HA の主レセプターである CD44 合成のメカニズムの解明を目的に、ブタをモデルに、体外成熟過程の COCs における HA 合成酵素遺伝子群(*has1*, *has2*, *has3*)および CD44 の発現と、これらの発現に及ぼす卵丘膨化促進因子の影響について検討

を行った。さらに卵母細胞成熟過程における HA-CD44 の結合を介した生理的意義について検討した。

#### 研究材料としてのブタ

*in vivo* で起こっている生理現象あるいは作用のメカニズムをさらにミクロに分子レベルで解析するためには、できるだけ *in vivo* の再現性に長けている体外培養系が必要である。また本研究を果たすためには大量の COCs が必要である。この2点においてブタではいくつかの体外成熟・受精・培養系が確立されコンベンショナルに用いられており(Reed ら, 1992; Niwa, 1993; Petters と Wells, 1993; Abeydeera, 2002)、材料となるブタの卵巣も食肉処理場で大量に安定して入手可能である。哺乳類における卵母細胞の成熟と卵丘膨化のメカニズムを焦点にした報告は、マウスを材料にしたものが比較的多くみられる。しかし卵丘膨化の制御機構の項で述べたように動物種によって異なる現象が報告されていることを考慮すると、より多くの動物種で検討することにより、その現象の普遍性と種特異性を明らかにでき、より正確に生理現象の意義を考察することができる。以上の点で、本研究の解明にマウス以外の哺乳動物であるブタをモデルに用いることは、この研究分野にとって有意義と考えている。

# 第 1 章

体外成熟過程における卵丘-卵母細胞複合体の  
卵丘膨化に及ぼす膨化促進因子と  
卵丘膨化の経時的変化



## 緒 言

卵母成熟過程でみられる卵丘膨化は *in vivo* では排卵前の LH サージを機に、*in vitro* では FSH を主要因子として誘導される(Eppig, 1979; Salustri ら, 1989)。マウス COCs の卵丘膨化においては、この FSH に加え、血清および卵母細胞由来因子が必須であることが報告されている(Eppig, 1980; Buccione ら, 1990; Salustri ら, 1990)。一方、Kobayashi ら(1994)は血清の非存在下で EGF、TGF- $\alpha$ 、ホルモンの添加によりウシ COCs の卵丘膨化が誘起されること、Abeydeera ら(1998)は無血清培地でもブタ COCs の卵丘膨化が、ある程度誘起されることを報告している。またウシやブタ COCs の卵丘膨化には卵母細胞由来因子は必ずしも必須ではないという報告もあり(Prochazka ら, 1991; Vanderhyden, 1993; Ralph ら, 1995)、動物種により卵丘膨化の調節因子が異なることが考えられる。

ブタの体外成熟・受精培地には、血清の代わりにブタ卵胞液(porcine follicular fluid: pFF)を添加した場合が比較的多くみられる(Naito ら, 1988; Yoshida ら, 1992; Funahashi ら, 1994; Miyoshi ら 1999)。卵胞液は卵胞内細胞、特に顆粒膜細胞の分泌液と卵巣内血管から滲出した血漿成分から成り立ち、細胞増殖因子、ホルモンをはじめとするその他の因子を豊富に含む(Edwards, 1974; Ding と Foxcroft, 1992; Hsu ら, 1987; Ainsworth ら 1980)。この pFF には卵丘膨化促進作用があることが報告されている(Yoshida ら, 1992; Daen ら, 1994)。

そこで本章では、ブタ COCs の卵丘膨化に影響を与える因子を明らかにする目的で、まず体外成熟培養系に 1)FSH および LH の共作用をもつ eCG、2)pFF を添加し、卵丘膨化に及ぼすこれらの影響について検討を行うとともに、この条件下における卵母細胞の影響についても調べた。さらに卵丘膨化

に及ぼすゴナドトロピンの影響を明確にするために、ブタの FSH あるいは LH の添加による影響について調べた。

## 材料および方法

### 成熟培地の準備 1(eCG および pFF 添加の影響)

培養培地作製に使用した水は、全て  $18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$  以上の超純水を用いた。体外成熟には TCM-199(Medium 199, Cat. No. 31000-035, Gibco BRL Life Technologies Inc, USA)を基礎培地とし、さらに  $0.1 \text{ mg/ml}$  sodium pyruvate(Cat. No. P-2256, SIGMA, USA)、 $2.2 \text{ mg/ml}$   $\text{NaHCO}_3$ (Cat. No. 191-01305、和光純薬工業(株), 東京)、 $100 \text{ IU/ml}$  ペニシリン G カリウム( $20 \text{ 万 IU/バイアル}$ 、明治製菓(株), 東京)、 $0.1 \text{ mg/ml}$  硫酸ストレプトマイシン( $1\text{g(力価)}/\text{バイアル}$ 、明治製菓(株), 東京)、 $3 \text{ mg/ml}$  BSA(Cat. No. A-4378, SIGMA, USA)を加えた。この培地を 1) 無添加区とし、さらに 2)  $10 \text{ IU/ml}$  eCG(セロトロピン  $1,000 \text{ IU}/\text{バイアル}$ 、帝国臓器(株), 東京)添加区、3)  $10\%$ (v/v, すなわち  $0.1 \text{ ml/ml}$ ) pFF(調整法は後述)添加区、4)  $10 \text{ IU/ml}$  eCG+ $10\%$ (v/v) pFF 添加区の 4 区を設けた。それぞれの培地を孔径  $0.2 \mu\text{m}$  のシリンジフィルター(Minisart, Cat. No. 16534-K, Sartorius AG, Germany)で濾過滅菌後、使用した。培養前日にこれら培地を作製し、 $35 \text{ mm}$  の滅菌済み培養シャーレ(SUMILON, Cat. No. MS-1135R, 住友ベークライト(株), 東京)に  $200 \mu\text{l}$  のドロップを作製し、流動パラフィン(Cat. No. 26117-45, ナカライテスク(株), 京都)で覆い、 $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$ - $95\%$  空気気層下の  $\text{CO}_2$  インキュベーター内で一晩静置し、温度と気層を平衡化した。

### pFF の調整

食肉処理場で採取したブタ卵巢を  $37^\circ\text{C}$  に保温し研究室へ持ち帰り、 $37^\circ\text{C}$  に保温したオートクレーブ滅菌済みの生理食塩水( $200 \text{ IU/ml}$  ペニシリン G カリウムと  $0.2 \text{ mg/ml}$  硫酸ストレプトマイシンを含む)で洗浄後、 $2\sim 5 \text{ mm}$  の

卵胞から 20 ゲージの注射針付き 5 ml 注射筒で卵胞液を吸引採取した。この卵胞液を室温で、 $1,800 \times g$  で 20 分間遠心分離した後、上清を回収し、これを成熟培地に用いる pFF とした。pFF は使用時まで  $-20^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。

### 成熟培地の準備 2(FSH および LH 添加の影響)

成熟培地の準備 1 で示した無添加区と同様の培地にブタ FSH(Cat. No. 4561-7204, Biogenesis, USA)を最終濃度 0.1、1、10、100 ng/ml になるように加えた。すなわち 50  $\mu\text{g}$  の FSH をシリンジフィルターで濾過滅菌した超純水で溶解し、0.02 あるいは 2 ng/ml になるように希釈したものをストックとし、使用時まで  $-20^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。あらかじめ 35 mm の培養シャーレに作製した無添加培地 200  $\mu\text{l}$  ドロップに 0.1 および 1 ng/ml FSH 添加区の場合、0.02 ng/ml FSH をそれぞれ 1 および 10  $\mu\text{l}$ 、10 および 100 ng/ml FSH 添加区の場合、2 ng/ml FSH をそれぞれ 1 および 10  $\mu\text{l}$  加えた。一方、ブタ LH(Cat. No. 5720-8104, Biogenesis, USA)も FSH の場合と同様な方法で 0.02 あるいは 2 ng/ml のストックを調整した。実験時に 35 mm の培養シャーレに作製した無添加培地 200  $\mu\text{l}$  ドロップに 0.1 および 1 ng/ml LH 添加区の場合、0.02 ng/ml LH をそれぞれ 1 および 10  $\mu\text{l}$ 、10 および 100 ng/ml LH 添加区の場合、2 ng/ml LH をそれぞれ 1 および 10  $\mu\text{l}$  加えた。以上の方法で、無添加区、FSH 添加区(0.1、1、10、100 ng/ml)および LH 添加区(0.1、1、10、100 ng/ml)を設けた。

### COCs および OXCs(oocyctectomized COCs)の培養

食肉処理場で採取したブタ卵巣を  $37^{\circ}\text{C}$  に保温し、研究室へ持ち帰り、オートクレーブ滅菌済みの生理食塩水(200 IU/ml ペニシリン G カリウムと 0.2 mg/ml 硫酸ストレプトマイシンを含む)で洗浄後、2~5 mm の卵胞から 20 ゲージの注射針付き 5 ml 注射筒で卵胞液を吸引採取した。これらの卵胞液



を 10 ml の遠心チューブに入れ、30 分程度、37°C のウォーターバスで静置後、上清部分を取り除いた。さらにオートクレーブ滅菌済みの Dulbecco's PBS (Cat. No. 05913, 日水製薬(株), 東京)に 100 IU/ml ペニシリン G カリウム、0.1 mg/ml 硫酸ストレプトマイシン、3 mg/ml BSA を加えてシリンジフィルターで濾過滅菌したもの(PBS-BSA)を、沈殿部分を含む卵胞液約 4 ml に 2 倍希釈になるように加え、緩やかに攪拌した。これを 90 mm の滅菌済みシャーレに 4 ml ずつ分注し、実体顕微鏡下で COCs をピックアップした。採取した COCs を PBS-BSA で、一回洗浄した。さらに、これらの COCs から卵細胞質が均一に黒く、その周りに数層の卵丘細胞が均一かつコンパクトに付着している COCs のみを選別し、それぞれの実験区の成熟培地で 3 回洗浄後、成熟培養に供した(Fig. 1, A)。

卵丘膨化に及ぼす卵母細胞の影響を調べるための OXC の作製は、選別した COCs を PBS-BSA 中で先鋭ピンセット(SS-INOX, MEISTER, Switzerland)で潰さないように挟んでシャーレの底に固定しながら、26 ゲージの注射針の先端で透明帯および卵母細胞膜を突き刺し、わずかな穴を開け、その後ゆっくりとピンセットで押しつぶしながら卵細胞質をその穴から押し出した。このようにしてマニピレーターを使用せず、比較的簡単に短時間で卵細胞質除去が可能であった(Fig. 1, B)。

卵丘膨化に及ぼす eCG および pFF の影響(成熟培地の準備 1 を参照)を検討するために各実験区の成熟培地 200  $\mu$ l ドロップあたり 20 個の COCs あるいは OXC を供した。FSH および LH の影響(成熟培地の準備 2 を参照)を検討するために、各実験区の成熟培地 200  $\mu$ l ドロップあたり 20 個の COCs を供した。これらを 37°C、5%CO<sub>2</sub>-95%空気気層下の CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 48 時間成熟培養を行った。

## 卵丘膨化の形態的な評価

卵丘膨化の観察は経時的に培養直後(0 時間)、12、24、36、48 時間後の 12 時間毎に、個々の COCs あるいは OXCs について接眼マイクロメータを装着した倒立顕微鏡下で行った。Daen ら(1994)の方法を参考に卵丘膨化の程度を数値化した。すなわち接眼マイクロメーターで COCs あるいは OXCs の長径および短径を測定し、以下の式、

$$\text{面積(mm}^2\text{)} = \text{長径(mm)} \times \text{短径(mm)} \times 0.7854$$

に従って卵丘膨化の面積を算出した。

## 統計分析

### 1) 卵丘膨化に及ぼす eCG および pFF の影響

実験を 3 回繰り返しデータを集計した。すなわち、それぞれの実験区あたり 55 個の COCs あるいは OXCs の卵丘膨化面積値を得た。膨化面積については、観察時間毎にそれぞれの実験区における COCs あるいは OXCs の卵丘膨化面積の平均値  $\text{mean} \pm \text{SEM} (10^{-3} \text{ mm}^2)$  によって示した。各観察時間の COCs あるいは OXCs の膨化面積について無添加区、eCG 区、pFF 区、eCG+pFF 区の 4 グループ間の比較は一元配置分散分析で行い、さらに Bonferroni 多重検定を行った。COCs および OXCs 間の比較は、同実験区かつ同観察時間内での Student's *t* 検定で行った。

### 2) 卵丘膨化に及ぼす FSH および LH の影響

実験を 3 回繰り返しデータを集計した。すなわち、それぞれの実験区あたり 55 個の COCs の卵丘膨化面積値を得た。膨化面積については、観察時間毎にそれぞれの実験区における COCs の卵丘膨化面積の平均値  $\text{mean} \pm \text{SEM} (10^{-3} \text{ mm}^2)$  によって示した。各観察時間の COCs の膨化面積について FSH あるいは LH の各添加濃度の比較は、一元配置分散分析で

行い、さらに Bonferroni 多重検定を行った。

## 結 果

### 卵丘膨化に及ぼす eCG および pFF の影響

膨化面積は培養後 12 時間以降 COCs および OXCs とともに eCG+pFF 区、pFF 区、eCG 区の順に大きかった(Fig. 2)。特に培養後 48 時間では eCG+pFF 区(COCs:  $255.4 \pm 30.1$ , OXCs:  $201.9 \pm 20.4 \times 10^{-3} \text{mm}^2$ )が無添加区(COCs:  $29.8 \pm 1.2$ , OXCs:  $31.2 \pm 1.0 \times 10^{-3} \text{mm}^2$ )、pFF 区(COCs:  $97.5 \pm 16.4$ , OXCs:  $105.5 \pm 12.2 \times 10^{-3} \text{mm}^2$ )および eCG 区(COCs:  $63.6 \pm 3.5$ , OXCs:  $53.3 \pm 2.3 \times 10^{-3} \text{mm}^2$ )と比較し著しい卵丘膨化を示した。COCs では培養後 12 時間で既に eCG および pFF の添加区で有意な卵丘膨化がみられた。培養後 24 時間以降、pFF 区では特に COCs 外層の卵丘細胞の分散がみられた(Fig. 3)。また eCG+pFF 区以外では COCs 同士の結合がみられるようになった。培養後 48 時間のそれぞれの区の COCs の膨化面積を 100%とした場合、COCs に対する OXCs の割合は無添加区では 104.7%(COCs:  $29.8 \pm 1.2$ , OXCs:  $31.2 \pm 1.0 \times 10^{-3} \text{mm}^2$ )、eCG 区では 83.8%(COCs:  $63.6 \pm 3.5$ , OXCs:  $53.3 \pm 2.3 \times 10^{-3} \text{mm}^2$ )、pFF 区では 108.2%(COCs:  $97.5 \pm 16.4$ , OXCs:  $105.5 \pm 12.2 \times 10^{-3} \text{mm}^2$ )、eCG+pFF 区では 79.1%(COCs:  $255.4 \pm 30.1$ , OXCs:  $201.9 \pm 20.4 \times 10^{-3} \text{mm}^2$ )であった(Fig. 2)。この結果は eCG 区および eCG+pFF 区では卵母細胞の除去により膨化面積が減少する傾向があることを示した。特に eCG 区では、培養後 12 時間から 48 時間まで COCs と OXCs 間の膨化面積に有意な差がみられた。eCG+pFF 区のコCs における各培養時間の卵丘膨化の典型的な像を示した(Fig. 4)。培養後 48 時間の COCs の形態は過排卵処理を施した成熟雌ブタの排卵直前卵胞より採取した COCs と比較し、膨化の程度は小さいものの、卵丘細胞が卵母細胞を中心に放射状に膨化し類似していた。COCs および OXCs とともに無添加区では、卵丘膨化はみられず培養後 36 時間以降、透明帯からの卵丘細胞のかい離がみられた。

### 卵丘膨化に及ぼすブタ FSH よび LH の影響

COCs の卵丘膨化に及ぼす FSH の影響は、100 ng/ml 区のみで培養後 12 時間以降 48 時間までに、膨化面積の有意な増加がみられた(Fig. 5)。培養後 12 時間で FSH 100 ng/ml 区における膨化面積は  $43.2 \pm 2.22 \times 10^{-3} \text{mm}^2$  で FSH および LH の共作用を持つ eCG 区( $41.46 \pm 1.32 \times 10^{-3} \text{mm}^2$ )と同程度であった。しかし eCG 区で培養後 36 時間( $66.84 \pm 3.33 \times 10^{-3} \text{mm}^2$ )まで増加したのに対し、FSH 100 ng/ml 区では培養後 12 時間をピークに徐々に減少した(培養後 48 時間:  $31.88 \pm 1.28 \times 10^{-3} \text{mm}^2$ )。LH の影響はどの濃度においてもみられなかった。

## 考 察

本章の結果より、eCG および pFF はブタ COCs における卵丘膨化を誘起し、さらに eCG および pFF の同時添加によって著しい膨化が誘起されることがわかった。またこの eCG の作用は FSH の作用であることが明らかとなった。

卵丘膨化は、卵丘細胞によるヒアルロン酸を主とするグリコサミノグリカンやプロテオグリカンの合成、そして HA 結合タンパク質やプロテオグリカンの HA との結合による HA の卵丘細胞間への維持により成り立つ(Eppig, 1979; Salustri ら, 1989; Chen ら, 1992; Camaiani ら, 1993 と 1996)。FSH は *in vitro* での卵丘細胞における HA 合成および卵丘膨化の主要因子である(Eppig, 1979; Salustri, 1989)。それにも関わらずマウスでは無血清培地の場合、FSH 存在下で体外成熟させても膨化は誘起されない(Eppig, 1980; Salustri, 1989)。この理由は COCs における HA 合成は、血清の有無に関わらず FSH により誘導されるものの、血清がない場合、合成された HA は培地中に放出され、COCs には保持されないためであることが、Eppig(1980)により報告されている。一方、血清は家畜動物における卵丘膨化に必須ではないといういくつかの報告がみられる(Kobayashi ら, 1994; Abeydeera ら, 1998)。本章で用いた pFF は卵胞内細胞、特に顆粒膜細胞の分泌液と卵巣内血管から滲出した血漿成分から成り立ち(Edwards, 1974)、血清に類似した成分を含むと考えられる。従って、pFF 区や eCG+pFF 区でみられる卵丘膨化と比較して、pFF を含まない eCG 区あるいは FSH 100 ng/ml 区で膨化の程度が有意に小さかったことは、ブタ COCs の卵丘膨化において血清あるいは pFF は必須ではないものの、ない場合膨化の程度に著しい影響を与えることを示している。この点ではマウスと類似していた。Chen ら(1992)は胎子牛血清中に卵丘細胞外マトリッ

クスを安定化させる inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor ファミリーを同定している。また Daen ら(1995)は、ブタ血清から超遠心によって得られた分画で熱抵抗性の 1~6.5 kDa の因子が、COCs の卵丘膨化を著しく促進することを報告している。従って、これらの血清由来因子がブタの卵丘膨化に関与していることが考えられる。一方 Daen ら(1994)は pFF 内にも先述した血清由来因子に類似した熱抵抗性の 6.5 kDa よりも小さい膨化促進因子を見つけている。Chen ら(1992)によって同定された血清因子である inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor は、マウスの排卵直前卵胞液中にも存在することが確認されている。これは排卵直前に卵胞周囲の血管の透過性増加により、血漿とともに inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor が卵胞内に流入するものと考えられている。この他、マウスやラットの顆粒膜細胞あるいは卵丘細胞では HA と inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor ファミリーとの結合による卵丘細胞外マトリックスの安定化に関与する link protein(Camaioni ら,1996; Kobayashi ら, 1999)、TSG-6(Fulop ら,1997)、顆粒膜細胞由来の因子(Chen ら, 1996)が合成されていることが報告されている。これらのことから、卵胞液中にも HA の合成および卵丘細胞外マトリックスの安定化を促進する因子が分泌されており、pFF 区でみられた一定の卵丘膨化はこのような因子の存在によるものと考えられる。従って eCG+pFF 区でみられた著しい卵丘膨化は eCG による HA 合成および pFF による HA 合成と卵丘細胞間への HA の維持の作用によるものと結論され、これらの 2 因子の相乗的効果と考えられる。

マウスでは COCs からの卵細胞質除去により HA 合成、卵丘膨化の減少あるいは膨化が誘起されないことが報告されている(Buccione ら, 1990)。またマウス卵丘細胞を FSH 存在下で裸化卵母細胞と共培養したり、卵母細胞のコンディショニング培地で培養することにより HA 合成および卵丘膨化が誘起される(Buccione ら, 1990; Salustri ら, 1990)。これらの報告は卵母細胞由来の

因子が HA 合成および卵丘膨化を促進することを証明している。いくつかの報告(Dekel と Kracer, 1978; Salustri, 1985)から、卵丘膨化は卵丘細胞への FSH の直接刺激による卵丘細胞内の cAMP の上昇を介したカスケードによるものと考えられていた。しかし Salustri ら(1990)は cAMP のアナログである Bt<sub>2</sub>cAMP の存在下でも卵細胞質を除去した COCs では卵丘膨化が誘起されないことから、この卵母細胞由来の因子の作用は cAMP の下流のカスケードを介したものか、これらと独立したカスケードを介したものと考察している。一方、ブタやウシの卵母細胞では卵丘膨化促進因子が分泌されているにも関わらず、この因子は卵丘膨化に必須ではなく、影響を与えないと報告されている (Prochazka ら, 1991; Vanderhyden, 1993; Ralph と Telfer, 1995)。本章の結果では OXCs でも卵丘膨化が誘起される一方で、eCG 区および eCG+pFF 区では COCs と比較して約 80%の膨化面積であった。特に eCG 区では培養後 12 時間以降、卵細胞質除去の影響が顕著であった。これらは卵母細胞の存在はブタの卵丘膨化に必須ではないものの、FSH の作用を介して膨化に影響を与えることを示している。以上、本章の結果からブタの卵丘膨化において卵母細胞由来の因子の影響は FSH を介するもので、この点ではマウスと共通であるが、この因子が必須ではない点がマウスと大きく異なる点であることが明らかとなった。



## 要 約

卵丘膨化は *in vivo* では排卵前の LH サージに反応し、*in vitro* では FSH を主要因子とし誘起される。マウス COCs の卵丘膨化においてこの FSH に加え、血清および卵母細胞由来の因子が必須であることが報告されている。一方ブタやウシなどの家畜では、血清および卵母細胞由来因子は必ずしも必須ではないという報告もあり、動物種により卵丘膨化の調節因子が異なることが考えられる。そこで本章では、ブタ COCs の卵丘膨化に影響を与える因子を明らかにする目的で、体外成熟培養系に 1)FSH および LH の共作用をもつ eCG、2)ブタの体外成熟培養系に血清の代わりに用いられている pFF を添加し、これらの影響について検討を行った。さらにこの条件下における卵母細胞の影響についても調べた。TCM-199 を基礎培地とし 10 IU/ml eCG または 10% pFF の存在下で、2~5 mm のブタ卵胞から吸引採取した COCs(Fig. 1, A)および卵細胞質を除去した OXCs(oocyctectomized COCs: Fig. 1, B)を成熟培養し、卵丘膨化の経時的(0, 12, 24, 36, 48 時間)変化を観察した。さらに COCs の卵丘膨化に及ぼすゴナドトロピンの効果を明確にする目的で、市販されているブタの FSH および LH をそれぞれ 0.1、1.0、10、100 ng/ml の濃度で添加培養を行い、同様に経時的変化を観察した。卵丘膨化の程度は、COCs または OXCs で占められる面積で表した。

その結果、膨化面積は eCG+pFF 区、pFF 区、eCG 区の順に大きかった(Fig. 2)。特に培養後 48 時間では eCG+pFF 区(COCs:  $255.4 \pm 30.1$ , OXCs:  $201.9 \pm 20.4$   $10^{-3}\text{mm}^2$ )が無添加区(COCs:  $29.8 \pm 1.2$ , OXCs:  $31.2 \pm 1.0$   $10^{-3}\text{mm}^2$ )、pFF 区(COCs:  $97.5 \pm 16.4$ , OXCs:  $105.5 \pm 12.2$   $10^{-3}\text{mm}^2$ )および eCG 区(COCs:  $63.6 \pm 3.5$ , OXCs:  $53.3 \pm 2.3$   $10^{-3}\text{mm}^2$ )と比較し、著しい卵丘膨化を示した。培養後 24 時間以降 eCG 区に比べ、pFF 区では COCs 外層の卵丘細胞で顕著な膨化がみられた(Fig.

3)。eCG 区では培養後 12 時間以降、COCs および OXCs 間の膨化面積に有意な差がみられた。培養後 48 時間の eCG+pFF 区における膨化した COCs は過排卵処理を施した成熟雌ブタの排卵直前卵胞より採取した COCs と比較し、膨化の程度は小さかったものの、卵丘細胞が卵母細胞を中心に放射状に膨化しており類似していた(Fig. 4)。膨化に及ぼすブタ FSH および LH の影響は、FSH 100 ng/ml 区のみで有意な膨化面積の増加がみられた(Fig. 5)。しかし eCG および pFF を添加した場合に比較し膨化の程度は小さく、培養時間の経過に伴い減少した。

以上、eCG および pFF はブタ COCs における卵丘膨化を誘起し、さらに eCG および pFF の同時添加によって、著しい卵丘膨化が誘起されることがわかった。この eCG の作用は FSH の作用であることが明らかとなった。卵丘膨化に及ぼす卵母細胞の影響は、特に eCG 添加区でみられたことから、この卵母細胞の影響は FSH 作用を介したものであることが明らかとなった。

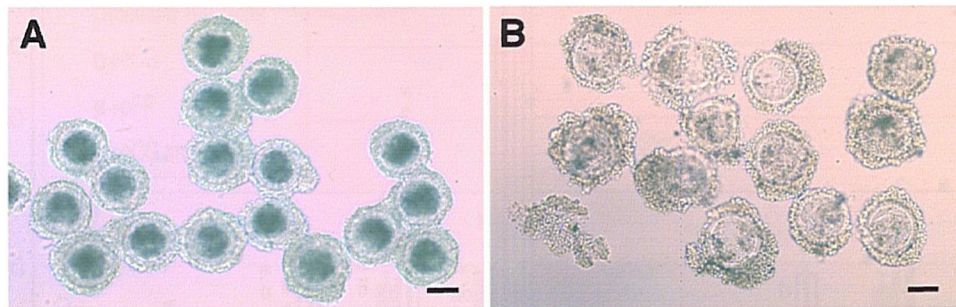


Fig. 1. Typical COCs(A) and oocyctomized COCs(OXC: B).  
Bar=100  $\mu$ m.

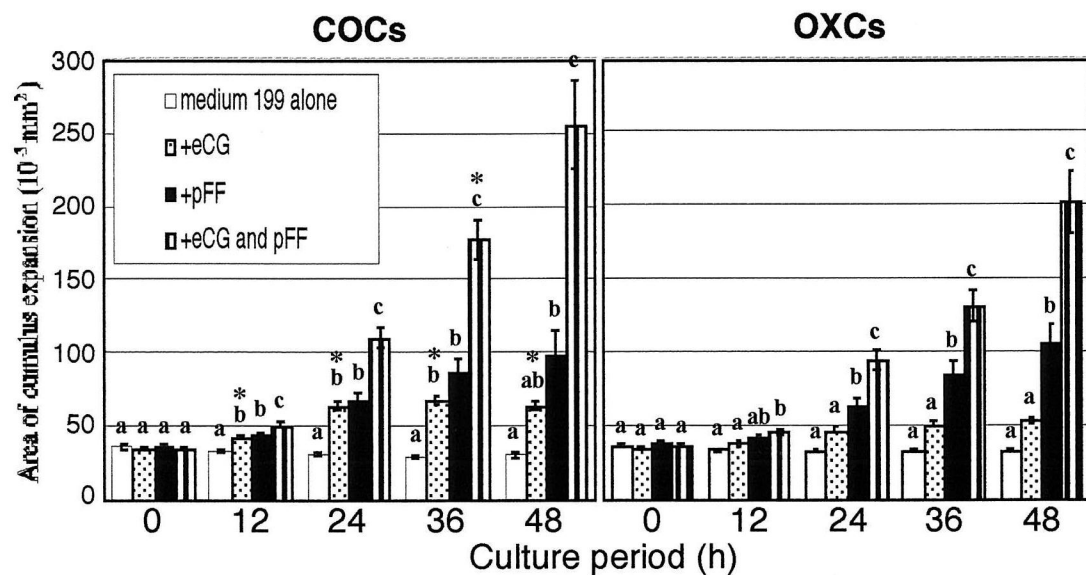


Fig. 2. Effect of eCG and pFF on cumulus expansion of porcine COCs and OXCs cultured *in vitro*. Each bar indicates the mean  $\pm$  SEM ( $10^{-3} \text{ mm}^2$ ) of cumulus expansion area ( $n = 55$ ). Bars with no common letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) among four treatments of COCs and OXCs at the same time point. Asterisks indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between COCs and OXCs at the same time point in the same treatment.

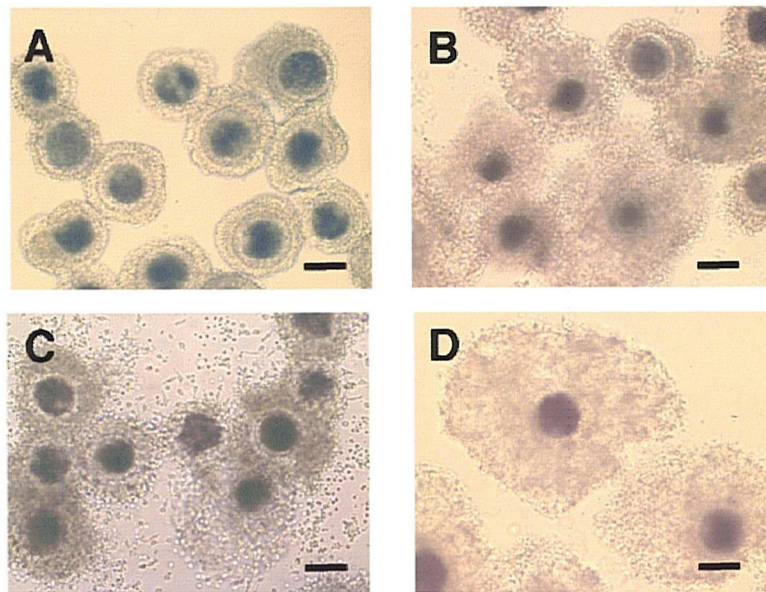


Fig. 3. Typical cumulus expansion in porcine COCs cultured under each treatment for 24 h. A: medium 199 alone; B: +eCG; C: +pFF; D: +eCG and pFF.

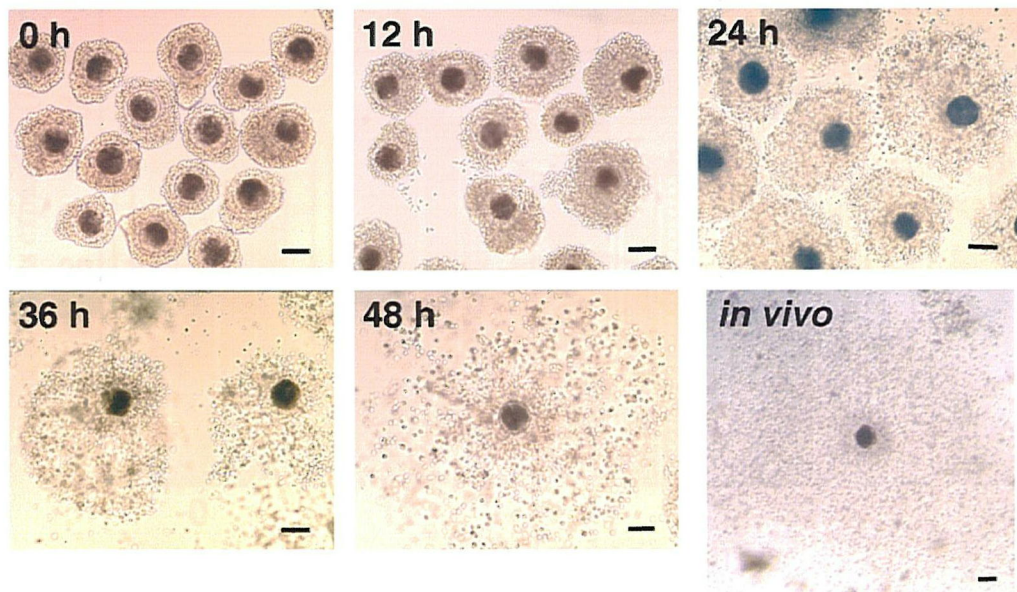


Fig. 4. Typical cumulus expansion in porcine COCs matured *in vitro* (0-48 h) and *in vivo*. Bar = 100  $\mu$ m.

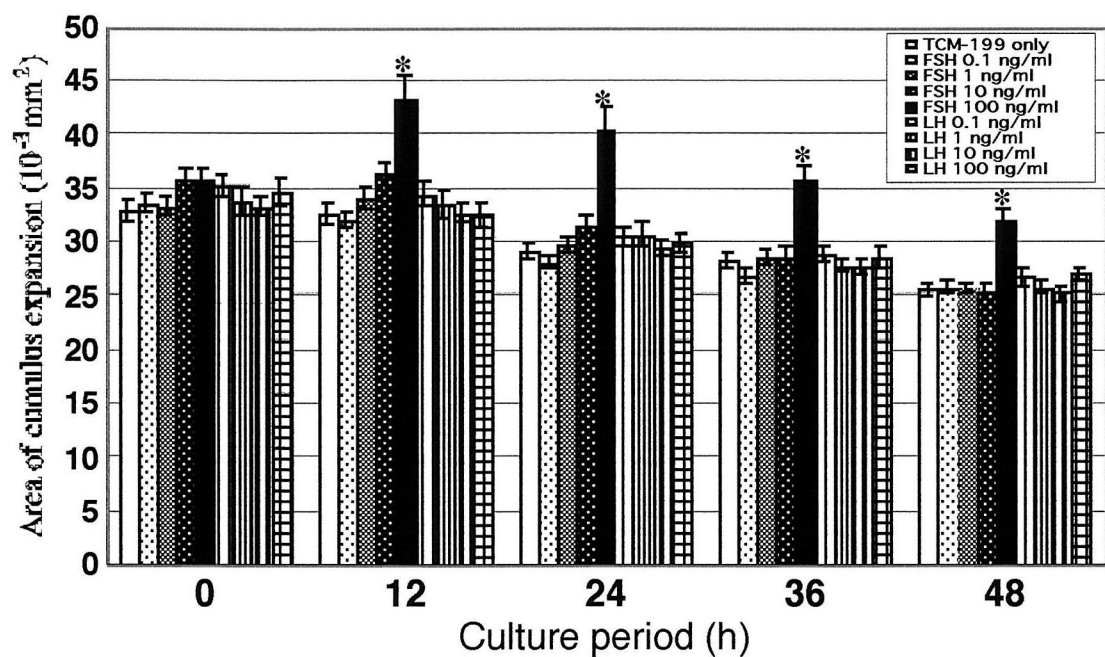


Fig. 5. Effect of FSH (0.1,1,10,100 ng/ml) and LH (0.1,1.0,10,100 ng/ml) on cumulus expansion of porcine COCs cultured *in vitro*. Each bar indicates the mean $\pm$ SEM ( $10^{-3}$  mm $^2$ ) of cumulus expansion area (n = 55). Asterisks indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) among each treatment at the same time point.



## 第 2 章

卵丘-卵母細胞複合体における HA 合成酵素  
(has2, has3)および HA レセプター(CD44)の  
mRNA の発現動態



## 緒 言

卵丘細胞で分泌される卵丘膨化の主要細胞外マトリックス成分である HA は、細胞膜貫通型の HA 合成酵素によって細胞膜の内側で合成され、細胞外へ輸送される(Weigel ら, 1997)。真核生物における HA 合成酵素の細胞膜からの分離精製は長年の間成功せず、分子の実体については最近まで全く不明であった。遺伝子工学技術の進歩により、最近になりこの HA 合成酵素が哺乳動物では 3 種類(HAS1, HAS2, HAS3)存在することが明らかにされた(Itano ら, 1996; Shyjan ら, 1996; Spicer ら, 1996; Watanabe ら, 1996; Spicer ら, 1997; Spicer と McDonald, 1998; Itano, 1999)。しかし各酵素の特性および発現調節機構の詳細については、まだ不明な点が多い。Fulop ら(1997)は *in vivo* の卵丘膨化したマウス COCs に Has2 のホモログが発現していることを報告している。しかし、この報告は卵丘-卵母細胞の複合体における発現であり、卵丘細胞および卵母細胞それぞれの発現については明らかになっていない。また卵丘膨化促進因子が HAS の発現に及ぼす影響については、まだ報告がない。

一方、HA の主レセプターである CD44 はヒトの卵母細胞、着床前胚、卵丘細胞および顆粒膜細胞で発現が確認されている(Campbell ら, 1995; Ohta ら, 1999)。しかし、現在これらの細胞における CD44 の機能および発現制御機構についてはまだ不明である。卵母細胞成熟過程でみられるゴナドトロピンに依存した一過性の HA 合成は、HA の主レセプターである CD44 と何らかの関与があるものと推測される。

そこで本章では、ブタ COCs あるいは卵丘細胞、卵母細胞で発現している *has* を同定し、さらに第 1 章で検討した卵丘膨化促進因子が HA 合成酵素と CD44 の mRNA の発現に及ぼす影響について調べた。

## 材料および方法

### 成熟培地の準備 1(eCG および pFF 添加の影響)

第 1 章と同様の方法で成熟培地の準備を行い、1) 無添加区、2) 10 IU/ml eCG 添加区、3) 10% pFF 添加区、4) 10 IU/ml eCG+10% pFF 添加区の 4 区を設けた。

### 成熟培地の準備 2(FSH および LH 添加の影響)

第 1 章と同様の方法で無添加区、FSH 添加区(0.1、1、10、100 ng/ml)および LH 添加区(0.1、1、10、100 ng/ml)を設けた。

### COCs および OXC(oocyctectomized COCs)の培養

第 1 章と同様の方法でブタ COCs および OXCs を得た。最初に has および CD44 の mRNA の発現の有無を確認する目的で、COCs および OXCs を eCG+pFF 区の培地で第 1 章と同様の条件で 24 時間培養した。その後 COCs を 0.3 mg/ml ヒアルロニダーゼ(Cat. No. H-3506, SIGMA, USA)で裸化处理し、卵母細胞のみにした。その後 OXCs と卵母細胞をそれぞれサンプリングした。has および CD44 の mRNA の発現に及ぼす eCG および pFF の影響(成熟培地の準備 1 を参照)を検討するために、各実験区の成熟培地で COCs あるいは OXCs を 24 あるいは 48 時間成熟培養を行った後、サンプリングした。一方、has2 の mRNA の発現に及ぼす FSH および LH の影響(成熟培地の準備 2 を参照)を検討するために、各実験区の成熟培地で COCs を 24 時間培養後、卵細胞質除去を行い、OXCs をサンプリングした。has3 の mRNA の発現に及ぼす FSH および LH の影響を検討するために、各実験区の成熟培地で COCs を 24 時間培養後、裸化处理を行い、卵母細胞のみをサンプリングした。

### COCs、OXCs および卵母細胞からの total RNA の抽出

採卵直後(培養 0 時間)の COCs と OXCs、それぞれの実験区で得られた COCs と OXCs および卵母細胞から total RNA を抽出した。total RNA の抽出は RNeasy Mini-Kit(Cat. No. 74104, QIAGEN K. K., 東京)および RNase-Free DNase Set(Cat. No. 79254, QIAGEN K. K., 東京)を使用し、プロトコールに従って行った。この他、0.1% diethyl dicarbonate(Cat. No. 048-21902, 和光純薬工業(株), 東京)処理水およびこの処理水で希釈した 70%エタノール(Cat. No. 057-00456, 和光純薬工業(株), 東京)を準備した。以下にその方法を示した。

### サンプリングおよびサンプルの可溶化

滅菌済み 1.5 ml エッペンドルフチューブに以下の試薬を準備し、サンプルを加える。

buffer RLT	200 $\mu$ l
$\beta$ -メルカプトエタノール	2 $\mu$ l
COCs、OXCs あるいは卵母細胞	約 200 個

↓ 1 分間のボルテックスを行う。

200  $\mu$ l の 70% エタノールを加えて混合する。

スピncラムへの total RNA の結合 ↓スピncラムにサンプルを入れる。

↓ 12,000 rpm で 15 秒間遠心する。

350  $\mu$ l の buffer RW1 をスピncラムに加える。

↓ 12,000 rpm で 15 秒間遠心する。

### スピncラム上での DNase 処理

以下の試薬を調製し、スピncラムに加える。

10×DNA digest buffer	8 μl
DNase (10 U/μl)	8 μl
RNase-free water	64 μl

↓ 室温で 15 分間保持する。

カラムの洗浄 350 μl の buffer RW1 をスピンカラムに加える。

↓ 12,000 rpm で 15 秒間遠心する。

500 μl の buffer RPE をスピンカラムに加える。

↓ 12,000 rpm で 15 秒間遠心する。

500 μl の buffer RPE をスピンカラムに加える。

↓ 15,000 rpm で 2 分間遠心する。

total RNA の溶出

↓ スピンカラムを滅菌済み 1.5 ml  
エッペンドルフチューブ上に  
セットする。

40 μl の RNase-free water を加える\*。

↓ 12,000 rpm で 1 分間遠心する。

\*を再度繰り返す。

このようにして COCs あるいは OXCs 約 200 個から得られた total RNA 量は 0.3~2.0 μg であった。卵母細胞由来の total RNA 量の分光光度計による濃度測定は不可能だったので、得られた RNA 溶液の容量を抽出に供した卵母細胞数で除し、卵母細胞 1 個当たりの RNA の容量を算出し、これを指標に RT-PCR に供した。

## 半定量的 RT-PCR

RT-PCR には Ready-To-Go RT-PCR beads(Cat. No. 27-9259-01, Amersham

Pharmacia Biotech Inc, USA)を用いた。RT-PCR に用いたそれぞれのプライマーはマウスとヒトの cDNA のホモロジーの高い領域から設計した(Table 1)。このキットのプロトコールに従い、RT-PCR ビーズの入ったチューブに以下のように反応液を調整した。

total RNA	COCs あるいは OXCs : 50 ng
	卵母細胞 : 30 個分
pd (T) <sub>12-18</sub> primer (0.5 µg/µl)	1 µl
センスプライマー (10 µM)	1 µl
アンチセンスプライマー (10 µM)	1 µl
diethyl dicarbonate 処理水	約 40 µl

反応液全量を 50 µl とし、その後ミネラルオイル(Cat. No. 16, 140-3, Aldrich Chem. Co., USA)を滴下し、反応液を覆い、P C R 装置(PCR Thermal Cycler TP2000, TaKaRa Co., 京都)にセットした。以下に RT-PCR の反応条件を示した。

RT 反応	42 °C、20 分間
	↓
reverse transcriptase の失活	95 °C、5 分間
	↓
PCR 反応	95 °C、1 分間
	55 °C、1 分間
	72 °C、1.5 分間

PCR のサイクル数は COCs および OXCs の場合、β-actin: 25 サイクル; has1: 40 サイクル; has2: 26 サイクル; has3: 28 サイクル; CD44: 25 サイクル、卵母細胞の場合、全ての検出を 30 サイクルで行った。これらのサイクル数は、半定量的 PCR を行うために、指数関数的増加上にあるサイクル数になるよう

に最適化した。RT-PCR 後、得られた RT-PCR 産物を 2%アガロースゲル (NuSieve 3:1 agarose, Cat. No. 50090, BMA product com., USA)で電気泳動を行い、0.5  $\mu\text{g/ml}$  エチジウムブロマイド (Cat. No.15585-011, Gibco BRL Life Technologies Inc, USA)染色によって検出した。さらに検出されたそれぞれのバンドの濃さを NIH イメージソフトによって定量し、同じサンプルの  $\beta$ -actin の値で除し、標準化することで発現量の定量を行った。

### RT-PCR 産物のシーケンシング

得られた RT-PCR 産物が標的とした cDNA であることを確認するためにシーケンスを行った。シーケンスはダイターミネーター法による BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Cat. No. 403051, (株) PE アプライドバイオシステムズ, 浦安)を用いた。このキットのプロトコールに従い、以下のように反応液を調整した。

RT-PCR 産物	1 $\mu\text{l}$
RT-PCR に用いたプライマー (10 $\mu\text{M}$ )	0.32 $\mu\text{l}$
(センスあるいはアンチセンス)	
プレミックス	8 $\mu\text{l}$
オートクレーブ済み超純水	10.68 $\mu\text{l}$

反応液全量を 20  $\mu\text{l}$  とし、その後ミネラルオイルを滴下し反応液を覆い、PCR 装置にセットした。サイクルシーケンス反応は、(96  $^{\circ}\text{C}$ 、30 秒間→50  $^{\circ}\text{C}$ 、15 秒間→60  $^{\circ}\text{C}$ 、4 分間)を 1 サイクルとし 25 回繰り返した。反応終了後、反応液を CentriSep スピンカラム (Cat. No. 401762, (株) PE アプライドバイオシステムズ, 浦安)で精製し、さらにドライアップした。これに Template Suppression Reagent (Cat. No. 402844, (株) PE アプライドバイオシステムズ, 浦安)を 20  $\mu\text{l}$  加え、95  $^{\circ}\text{C}$ で 2 分間加熱し、氷上で急冷した。これをシーク

エンサー(ABI PRISM™ 310, (株) PE アプライドバイオシステムズ, 浦安)にセットした。得られたそれぞれのシーケンスをマウスとヒトのシーケンスと比較し、ホモロジーを算出した。

## 統計分析

### 1) has2、has3 および CD44 mRNA の発現に及ぼす eCG および pFF の影響

採卵直後(培養 0 時間)、それぞれの実験区で 24 時間と 48 時間培養した COCs および OXCs のサンプルについて、has2、has3 および CD44 の RT-PCR をそれぞれ 3 回行った。得られた RT-PCR 産物を NIH イメージソフトによって数値化し、 $\beta$ -actin の値で標準化したものを densitometry ratio として、3 回繰り返しの平均値  $\text{mean} \pm \text{SEM} (\%)$  によって示した。採卵直後(培養 0 時間)、それぞれの実験区で 24 時間培養した COCs および OXCs における has2、has3 および CD44 mRNA の発現量の比較は一元配置分散分析で行い、さらに Bonferroni 多重検定を行った。

### 2) 卵丘細胞における has2 mRNA の発現に及ぼす FSH および LH の影響

それぞれの実験区で COCs を 24 時間培養後、卵細胞質除去を行った OXCs のサンプルについて、has2 の RT-PCR を 3 回行った。得られた RT-PCR 産物を NIH イメージソフトによって数値化し、 $\beta$ -actin の値で標準化したものを densitometry ratio として、3 回繰り返しの平均値  $\text{mean} \pm \text{SEM} (\%)$  によって示した。それぞれの実験区における has2 mRNA の発現量の比較は一元配置分散分析で行い、さらに Bonferroni 多重検定を行った。

### 3) 卵母細胞における has3 mRNA の発現に及ぼす FSH および LH の影響

それぞれの実験区の COCs を 24 時間培養後、裸化処理を行った卵母細胞のサンプルについて、has3 の RT-PCR を 3 回行った。得られた RT-PCR 産物を NIH イメージソフトによって数値化し、 $\beta$ -actin の値で標準化したものの densitometry ratio として、3 回繰り返しの平均値  $\text{mean} \pm \text{SEM} (\%)$  によって示した。それぞれの実験区における has3 mRNA の発現量の比較は一元配置分散分析で行い、さらに Bonferroni 多重検定を行った。



## 結 果

### 卵丘細胞、卵母細胞における HA 合成酵素(*has1*, *has2*, *has3*)および CD44 の mRNA の発現

ブタ COCs、OXCs および卵母細胞における HA 合成酵素(*has1*, *has2*, *has3*) および CD44 の mRNA の発現について調べたところ、推定した *has2*、*has3* および CD44 の RT-PCR 産物が得られた。すなわち、卵丘細胞では *has2* および CD44 が、卵母細胞では *has3* が発現していることが明らかとなった(Fig. 6)。一方、*has1* は Table 1 に挙げたプライマー以外にもいくつかの検討を行ったが検出されなかった。ブタの HA 合成酵素(*has1*, *has2*, *has3*)および CD44 の cDNA がまだクローニングされていないことから、シーケンスを調べマウスおよびヒトの報告例と比較したところ、ブタ *has2* はマウスと 74.9%、ヒトと 80.2%ホモロジーが確認された(Fig. 7)。またブタ *has3* はマウスおよびヒトいずれともに 90%以上のホモロジーが確認された(Fig. 8)。ブタ CD44 のホモロジーはマウスと 74.9%、ヒトと 80.2%であった(Fig. 9)。これらの結果から得られた *has2*、*has3* および CD44 の RT-PCR 断片は目的としたブタ cDNA であることが支持された。

### *has2*、*has3* および CD44 の mRNA の発現に及ぼす eCG および pFF の影響

採卵直後(培養 0 時間)の COCs において *has2* は全く発現していなかったが、CD44 はわずかに発現していた(Fig. 10)。培養後 24 時間の無添加区で *has2* および CD44 は認められなかった。これらの発現量は eCG および pFF の存在下で 24 時間培養した後有意に増加し、eCG+pFF 区で最も高い発現量を示

した。特に *has2* の発現量は pFF 区よりも eCG 区で高かった。

COCs と OXCs 間の比較で、*has2* は COCs で有意に高く発現し、CD44 の発現は有意な差がなかった(有意ではないが、eCG 区のみ OXCs で低い傾向であった)。培養後 48 時間で *has2* の発現が COCs で減少したのに対し、OXCs で増加した。一方培養後 24 時間の *has3* の発現は無添加区、pFF 区、eCG 区、eCG+pFF 区の順に高かった。培養後 48 時間の eCG+pFF 区ではほとんど発現がみられなかった。

#### 卵丘細胞における *has2* mRNA の発現に及ぼす FSH および LH の影響

卵丘細胞における *has2* の発現は、FSH の添加濃度に依存して増加した (Fig. 11)。特に FSH 10 および 100 ng/ml 添加区では、有意に高い発現であった。一方、LH 添加区ではいずれの添加区も無添加と有意な差がなく、むしろ添加濃度に依存して低くなる傾向であった。

#### 卵母細胞における *has3* mRNA の発現に及ぼす FSH および LH の影響

卵母細胞における *has3* の発現は、FSH および LH とともに添加濃度依存的な傾向はなく、どの区も無添加区と有意な差は認められなかった (Fig. 11)。

## 考 察

Spicer と McDonald(1998)は、マウスの初期発生段階(妊娠 7.5 日から 17.5 日まで)および成人ヒトの各臓器での HAS mRNA の発現動態についてノーザンブロット解析を行った。その結果、mHas1 は妊娠 7.5 日、mHas2 は妊娠 11.5 日から 17.5 日、mHas3 は妊娠 15.5 日から 17.5 日で強く発現していた。一方ヒトの臓器では hHAS1 が各臓器に広く存在していたのに対し、hHAS2 は心臓、小腸および大腸での強い発現がみられ、hHAS3 は心臓、胎盤、脾臓、前立腺、精巣、卵巣、小腸、大腸でみられた。卵巣に注目してみると、hHAS1 では約 4.6 kbp と 2.4 kbp の 2 種類の断片が、hHAS3 では約 4.3 kbp と 2.4 kbp の 2 種類の断片が得られた。Fulop ら(1997)は hCG 投与後、卵丘膨化にともない *in vivo* 由来のマウス COCs で Has2 が発現していることを報告している。本章で卵丘細胞と卵母細胞を分離し has の発現を調べた結果、卵丘細胞では has2 が、卵母細胞では has3 が発現していることが明らかとなった。ヒトの卵巣で hHAS1 の発現が確認されているにも関わらず、本章では has1 の発現は確認できなかった。従って、卵巣では卵丘細胞および卵母細胞以外の細胞で has1 が発現していることが推測される。以上、これまでの報告および本章の結果を考えると、哺乳類の 3 種類の HAS ファミリーは発育段階や各組織で緻密に発現制御され、それぞれ特定の役割を担っていることが示唆される。今後、卵巣で発現している HAS ファミリーの機能と役割の詳細を明らかにすることが必要である。

Spicer ら(1997)はこれらの 3 種類の HAS の機能特性について、それぞれの HAS で合成される HA の長さ、HA 合成速度、それぞれの HAS 由来の HA と細胞特異的なアクセサリータンパク質との相互作用、細胞のタイプに依存

した分泌 HA の形態の違い(細胞周囲の HA マトリックスの形成の有無)などを提案している。最近 Itano ら(1999)はこれら HAS タンパク質の特性について報告している。そのなかで、*HAS* 遺伝子導入細胞で HA を合成させた場合 *HAS1* 遺伝子導入細胞では細胞周囲の HA マトリックスが他と比べて小さいこと、各 HAS の酵素活性に要する時間が HAS1、HAS2、HAS3 の順に早いこと、HAS1 および HAS2 は HAS3 よりも HA 合成速度が速いこと、HAS3 により合成される HA の長さ( $1 \times 10^5$  から  $1 \times 10^6$  Da)は HAS1 および HAS2 由来の HA( $2 \times 10^5$  から  $2 \times 10^6$  Da)に比較して小さいこと、それぞれの HAS の N-アセチルグルコサミンとグルクロン酸の濃度依存性の違いによるミカエリス定数の違いなどについて論じている。それぞれの HAS の生理的役割について、ごく最近 *HAS* 遺伝子ノックアウトマウスが作製され、その解析がなされている。Spicer と Nguyen(1999)および板野ら(1998)の報告によると、*Has2* ホモ変異体は胎生期 9.5 日から 10.5 日で致死であり、重度の成長遅延、卵胞嚢における血管形成異常、心臓の形態形成異常が示された。*Has1* および *Has3* についてはホモ変異体でも外見上正常に発生したことから、形態形成過程に *Has1* および *Has3* の機能は必須ではないか、他の *Has* によって代償されていることが考えられている。本章の結果から、卵丘細胞で発現している *has2* は卵丘膨化時の HA 合成に関与することが明らかになったが、卵母細胞で発現している *has3* の役割については不明である。

ブタ COCs あるいは OXCs における *has2* mRNA の発現は、第 1 章で卵丘膨化促進作用を示した eCG および pFF によって増大した。この結果は、Fulop ら(1997)によって報告された hCG 投与後の卵丘膨化に伴う COCs における *Has2* の発現パターンと類似していた。しかしながら、第 1 章の卵丘膨化に及ぼす eCG および pFF の影響についての結果と対比させた場合、この *has2* の発現量と卵丘膨化の程度が必ずしも一致しない。卵丘膨化は eCG よ

りも pFF により強く誘起され、eCG+pFF 区で最も高い膨化促進作用がみられたことから eCG と pFF の相乗作用が示された。一方 has2 の発現は eCG により強く誘導され、その発現量は eCG+pFF 区と同程度であり、発現量に及ぼす eCG と pFF の相乗作用はみられなかった。これらの結果は第 1 章でも考察したように、卵丘膨化は HA 合成によるものだけではなく、HA を含む細胞外マトリックス構成成分の細胞間の蓄積に依存していることを示している。COCs における has3 の発現は、無添加区で最も強くみられた。本章における has2 および has3 の発現に及ぼす FSH および LH の影響の結果から、has2 の発現は FSH 依存性であるのに対し、has3 の発現は FSH および LH に依存しないことが明らかとなった。予備実験の結果でも培養条件、培養時間による has3 の顕著な発現量の変化はみられなかった。このことから has2 と has3 の発現制御機構は異なっていると考えられる。最近 HAS の発現制御に関与する報告がいくつかみられる。ヒトの皮膚の線維芽細胞では TGF- $\beta_1$  が HAS1 および HAS2、bFGF は HAS2、IGF-1 は HAS1、HAS2、HAS3 の発現を促進する(Sugiyama ら, 1998; Kuroda ら, 2001)。またケラチン生成細胞では TGF- $\beta_1$  が HAS1、EGF が HAS2 の発現を促進する(Sugiyama ら, 1998; Pienimäki ら, 2001)。結論として、これらの細胞においては TGF- $\beta_1$ 、IGF-1、EGF が HAS2 の発現を促進することを示している。このことは EGF(Singh ら, 1993)あるいは FSH との共作用で IGF-1(Singh と Armstrong, 1997)には卵丘膨化促進作用があり、FSH との共作用で TGF- $\beta_1$ (Salustri ら, 1990)には卵丘細胞における HA 合成促進作用があるという報告を裏付けている。一方、TNF- $\alpha$  は歯周膜帯細胞における HAS3 の発現を著しく増加させる(Ijuin ら, 2001)。卵母細胞では TNF- $\alpha$  およびそのレセプターが発現している(Chen ら, 1993; Naz ら, 1997)ことから、卵母細胞における has3 の発現もこの因子の影響を受けている可能性が考えられる。

卵細胞質の除去は、eCG および pFF により誘導された has2 の発現を減少させた。つまり卵母細胞は has2 の発現に関与していることを示しており、この結果はマウスの卵母細胞が、*in vitro* で FSH により誘導される cAMP の上昇を介した下流のカスケードにより HA 合成を促進するという報告を支持するものであった (Buccione ら, 1990; Salustri ら, 1990)。しかし、ブタにおいて卵母細胞は has2 の発現に必須ではなかった。中山ら(1996)はブタ COCs からの卵細胞質除去は HA の合成を減少させるものの、卵丘膨化が維持されるのは、コンドロイチン硫酸が卵母細胞の存在に関わらず、合成されているためであることを示した。このことから、HA 合成は卵母細胞に依存しているが、コンドロイチン硫酸の合成は卵丘細胞そのものによって制御されていると考察している。本章の結果から、has2 の発現は卵母細胞由来の因子を介している一方で、ゴナドトロピンによる卵丘細胞の直接的な刺激によっても誘導されると考えられる。この卵母細胞由来因子について、Salustri(1990)らは FSH 存在下、TGF- $\beta_1$  添加培地で顆粒膜細胞あるいは卵丘細胞を培養した場合の HA 合成量が、裸化卵母細胞のコンディショニング培地中における HA 合成量と同レベルであることを示した。しかしながら、TGF- $\beta_1$  の抗体を添加培養してもこの卵母細胞由来因子の作用は抑制されなかったことから、この卵母細胞由来因子は TGF- $\beta_1$  ではないが、TGF- $\beta_1$  ファミリーに関係したものと考えられている。最近 Elvin ら(1999)は、哺乳動物の卵母細胞で発現している TGF- $\beta_1$  ファミリーに属する GDF-9 が、*in vitro* において卵丘膨化を誘起することを示した。彼らはリコンビナントのマウス GDF-9 が顆粒膜細胞における Has2、cyclooxygenase2、steroidogenic acute regulator protein mRNA の発現を誘導あるいは促進し、urokinase plasminogen activator および LH レセプター mRNA の発現を抑制することを発見した。これらのことは GDF-9 が卵母細胞由来のパラクリン作用因子であり、卵丘膨化、正常な排卵および受

精のために卵母細胞の微細環境の維持に関与する標的遺伝子を制御していることを示している。

Campbell ら(1995)は免疫染色によってヒトの卵母細胞、着床前胚、卵丘細胞に CD44 が発現しているのを確認した。本章の結果では、CD44 mRNA は卵丘細胞で発現しており、Campbell ら(1995)らの結果に一致したが、卵母細胞では検出されなかった。卵母細胞における CD44 mRNA の発現量が微量であるために検出されないことが考えられたため、RT-PCR に供する卵母細胞由来の total RNA 量および RT-PCR のサイクル数を検討し試みたが、検出できなかった。

CD44 の発現量は eCG または pFF により促進され、eCG+pFF 区では相乗的に促進される傾向があった。卵母細胞の影響は pFF 区および eCG+pFF 区ではみられなかったが、eCG 区では OXCs の方で発現量が低い傾向を示し、卵母細胞が発現量に関与している可能性が示唆された。興味深いことに、培養後 24 時間の各実験区における CD44 の発現パターンは、第 1 章の卵丘膨化に及ぼす eCG および pFF の影響を示した培養後 24 時間の卵丘膨化の程度に非常に類似していた。これらのことから CD44 の発現量はゴナドトロピンや pFF により促進されるのは明らかとなったが、加えて卵丘膨化の構成成分である HA およびその他の CD44 のリガンドになり得るグリコサミノグリカンやプロテオグリカンの合成量にも影響されている可能性が考えられた。



## 要 約

卵丘膨化時の主要な細胞外マトリックス成分である HA は、細胞膜貫通型の HA 合成酵素によって細胞膜の内側で合成され、細胞外へ輸送される。最近になり、この HA 合成酵素が哺乳動物では 3 種類(HAS1, HAS2, HAS3)存在することが明らかにされている。しかし体外成熟過程の COCs における HAS の発現動態については、現在のところ全く明らかにされていない。そこで本章では、ブタ COCs あるいは卵丘細胞、卵母細胞で発現している卵丘膨化に関わる *has* を同定し、さらに第 1 章で検討した卵丘膨化促進因子が、*has* と HA の主レセプターである CD44 の mRNA の発現に及ぼす影響について調べた。第 1 章と同様に 10 IU/ml eCG あるいは 10% pFF の存在下でブタ COCs および OXCs を培養し、24 時間および 48 時間後にそれぞれの total RNA を抽出し、*has* と CD44 の mRNA の発現を RT-PCR によって調べた。*has* および CD44 遺伝子はブタではまだ単離されていないため、ヒトおよびマウスの保存性の高い領域の配列を参考にプライマーを設計した。

その結果、卵丘細胞では *has2* および CD44、卵母細胞では *has3* の発現が確認された(Fig. 6)。それぞれの RT-PCR で得られた部分 cDNA をシーケンスし、ヒトおよびマウスのシーケンスと比較したところ、ブタ *has2* では 75%以上、ブタ *has3* では 90%以上、ブタ CD44 は 77%以上のホモロジーが得られた(Fig. 7-9)。これらの結果からそれぞれの部分 cDNA はブタ *has2*、*has3* および CD44 であると判断した。採卵直後の COCs(培養 0 時間)で *has2* はほとんど発現していなかったが、CD44 はわずかに発現していた(Fig. 10)。これらの発現量は eCG および pFF 存在下で 24 時間培養後、有意に増加した。特に *has2* の発現は eCG に強く依存していた。CD44 の発現量は、eCG



および pFF の同時添加によってさらに増加する傾向が見られた。COCs と OXCs 間の比較において、has2 では COCs が有意に高い発現を示したが、CD44 では両者間で有意な差は見られなかった。培養後 24 時間の has3 の発現は無添加区で最も高かった。これらの結果から has2 は卵丘細胞で、has3 は卵母細胞で発現していることが明らかとなったので、これらの発現に及ぼすゴナドトロピンの影響について検討を行った。ブタ COCs をブタ FSH および LH (0.1,1.0,10,100 ng/ml)の存在下で 24 時間培養後、卵丘細胞あるいは卵母細胞由来の total RNA を得て、RT-PCR により mRNA の発現を調べた。卵丘細胞における has2 の発現は、FSH 10 および 100 ng/ml 添加区で有意に増加したが、LH 添加区では有意な変化はみられなかった(Fig. 11)。一方、卵母細胞における has3 の発現は、FSH および LH 添加区いずれの区でも無添加区と有意な差はみられなかった。

以上の結果から、has2 および CD44 が卵丘細胞で発現し、これらの発現は卵丘膨化を誘起する eCG および pFF により誘導あるいは促進されることが明らかとなった。has2 の発現は OXCs よりも COCs で有意に高かったことから、卵母細胞の影響を受けていることが示された。一方、卵母細胞で発現している has3 の発現動態は has2 および CD44 とは異なっていた。has2 の発現量は FSH により濃度依存的に増加したのに対し、has3 の発現量にゴナドトロピンの影響はみられなかった。これらの結果から、卵丘膨化を誘起する HA を合成する HA 合成酵素は卵丘細胞で発現している has2 であることが明らかとなった。

Table 1. Primer sequences, fragment sizes, and GenBank accession numbers for RT-PCR

Gene	Primer sequence*	Fragment size (bp)	GenBank accession No.
<i>Has1</i>	<b>for:</b> 5'-CAACTACCATCAGCCCTGGGAA-3' <b>rev:</b> 5'-TTGGCAGGCAGGAGGCCACAC-3'	938	D82964
<i>Has2</i>	<b>for:</b> 5'-GAATTACCCAGTCCTGGCTT-3' <b>rev:</b> 5'-GGATAAACTGGTAGCCAACA-3'	581	U52524
<i>Has3</i>	<b>for:</b> 5'-CCTACTTTGGCTGTGTGCAA-3' <b>rev:</b> 5'-AGGCTGGACATATAGAGAAG-3'	525	U86408
CD44	<b>for:</b> 5'-GTACATCAGTCACAGACCTAC-3' <b>rev:</b> 5'-CACCATTTCTGAGACTTGCT-3'	598	M27129
$\beta$ -actin	<b>for:</b> 5'-GACCCAGATCATGTTTGAGACC-3' <b>rev:</b> 5'-ATCTCCTTCTGCATCCTGTCAG-3'	593	X03672

\* **for**, forward; **rev**, reverse.

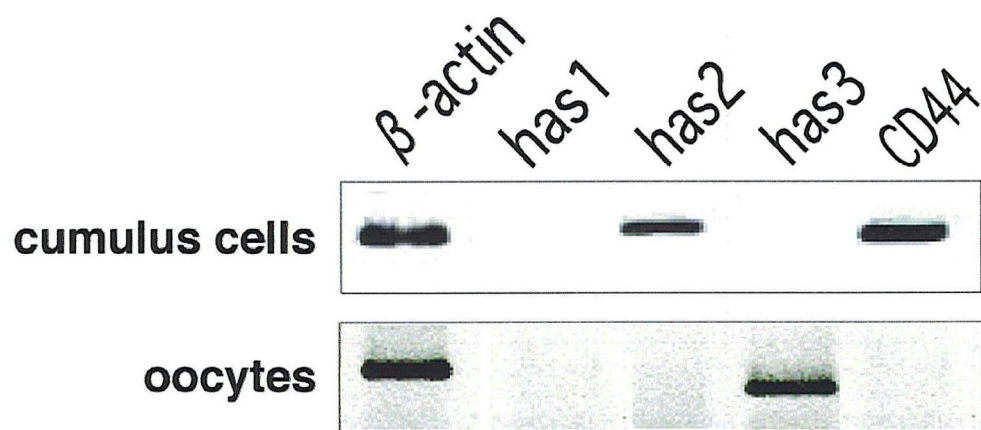


Fig. 6. Expression of  $\beta$ -actin, has1, has2, has3 and CD44 mRNAs in porcine cumulus cells and oocytes at 24 h after culture in the presence of eCG and pFF. The equivalent total RNA of 30 oocytes per sample and 50 ng of total RNA extracted from cumulus cells were subjected to RT-PCR analysis.

```

Porcine : GAATTACCCAGTCTGGCTTCCAGCAGCCATTGAACCAAGGACTTGAACCAAGCCAGCCAAAGACTTTCTCTCGATTCTACGCTTCTGGGTTCTGCT 100
Mouse  : -----G-----GG-----G-T--G--A-AC-----
Human  : -----G-----A-----A-----C-A--G-----

Porcine : GAGTTTTACCAAGGCTTTTTTCCCCCTTTCTCTGCTTTTTTTTTTTAATACAAAAAGACTTTCCGATATTAGAAGAGGGGAACAAGAGCA 200
Mouse  : ---C--G--C-- ---G-AGG- -GA-G--AAAAGAGA---G-GTCGT- GG--GGAAGGG---TGG--C-A-TA-C-- --C--
Human  : ---C--CA----T-----TTTTT-T--T--AA-AGA---C-G--A-CGGGGC-G-----ACAAA-A-AA-A--A-A-AA--G--A--A-

Porcine : AAAAAATAAGTTCATTTATTTTAAAGCACAGACAAAATTTCTTTTAAGAGTTAGAAGATTGAAGTGCAACGGAAATATTAAAGAAACATACCACTGAT 300
Mouse  : GGGGA-----A-----C----- -T-T-- CA---A-----C-T-----G-----A---G--T--TAGT-AA--
Human  : --G--A---AAA-G--A--ATTTTT-A-- -T----- -A-- --C-----C-A---G--T--TAGT-AA--

Porcine : TTTTTTTAATTGGGGGAACCTAAAGATTAAAGATCCCTATTCATTTAAATGTTGTTTTAAATTTTTATTTTTTTGGCCGGTCGCCTCAAAATTC 400
Mouse  : --C--C-C--AGA---AG-A-C--GC-----GC---C--TT-----C-----T-----
Human  : -----A-G---AAG-ATC---C-----C-----C-T-----C-----T-----

Porcine : ATCTGATCTCTATTACCTCAGTTTTGAAACTGCCGCCACCGACCTCCGGGACCACACAGACAGGCTGAGGACAACCTTATGACCAAGAACTGAACA 500
Mouse  : -----T--T-----A-----T--TT---G-----G-----G-G-C--G--G--G---
Human  : -----T-----A-----G-----G-----G-----

Porcine : AGATGCATTGTGAGAGGTTTCTATGTATCCTGAGAATAATTGGAACACACTTTTGGAGTTTCTCTCCTCCTTGAATTACCGCTGCTTATATCTGTTGG 600
Mouse  : -----G-----T-----G-----C-----C-A-----T-----
Human  : -----C-----C-----C-----C-A-----T-----

614
Porcine : CTACCAATTTATCC
Mouse  : -----G-----
Human  : -----G-----

```

Fig. 7. Partial cDNA sequence of porcine *has2*. Conserved nucleotides are indicated by a dash (-). The two underlined sequences correspond to the regions annealed with the specific primers.

```

Porcine : CCTACTTGGGCTGTGTGCAGTGTATCAGTGGGCCCTGGGCATGTACCGGAACAGCCTGCTTCAGCAGTTCTTGGAGGACTGGTACCATCAGAAGTTCCT
Mouse  : -----T-----A-----T-----TT-----C-----C-----C-----T-----
Human  : -----T-----T-----T-----C-----C-----C-----C-----

Porcine : AGGTAGCAAGTGCAGTTTGGGGATGACCGGCACCTCACCAACCGAGTCTGAGTCTCGGCTACAGGACTAAGTACACAGCACGCTCTAAATGCCTCACA
Mouse  : ---C-----C-----T-----T-----T-----C-----T-----T-----G-----
Human  : ---C-----C-----C-----C-----C-----C-----A-----T-----C-----G-----

Porcine : GAGACCCCAACCAAGTACCTCCGGTGGCTCAACCAACAGACCCGCTGGAGCAAGTCTTACTTCCGGGAGTGGCTCTACAACCTCTGTGGTTCCACAAGC
Mouse  : -----T-G-----T-A-----T-G-A-----T-----A-----T-----T-----
Human  : -----T-----G-----A-----T-----T-----T-----T-----T-----

Porcine : ACCACCTCTGGATGACCTACGAGTCAGTGGTCACAGGTTTTTCCCTTCTTCTTATTGCCACAGTCATACAGCTTTTCTACCGTGGCCGATCTGGAA
Mouse  : -----T-A--A-----C-----A-----C-----T-----A-----A-----
Human  : -----G-----C--C-----C-----G-T-----G-----G-----

Porcine : CATTCTCTCTTCTGCTGACAGTGCAGTTGGTAGGCATCATCAAGGCTACCTATGCCTGCTTTCTTCGGGGCAATGCAGAGATGATCTTCATGTCTCTC
Mouse  : -----A-----C-----G-----T-----C-----A-----C-----C-----
Human  : -----G-----C--G-----T-----C-----C-----C-----C-----

Porcine : TACTCCCTTCTCTACATGTCAGCCT
Mouse  : -----T-----
Human  : -----C-----T-----

```

Fig. 8. Partial cDNA sequence of porcine *has3*. Conserved nucleotides are indicated by a dash (-). The two underlined sequences correspond to the regions annealed with the specific primers.

```

Porcine : GTACATCAGTCACAGACCTACTTAATACCTTCGAGGCCAATTCATAACTATTGTTAACC CGCATGGCACCCGCTACACCAAGAAAGGTGAATACAGGAC
Mouse  : -----CC---T-----T-   -A-----C-----T-----T-----G-----G-C-G-T-A--
Human  : -----G-CC---G-----T--T--A-T-A-----T-----TGT-C-----A-----A--

Porcine : CAACCCCGAGGACATCAACCCAGCATGGCTCCGGAGGATGATATGAGCAGTGGATCATCCAGTGAAAGAAGCACTTCCGGGGTTACAGCATCTTCCAC
Mouse  : AC---AA--A-----G-TG-TTCA-ACAT-ATA--T--C---G-C---C--C--CA--TC--G-AG-----CC-A-AA--C----
Human  : G--T--T-A-----T-----ACC--A-T-T---CG-----C--C--C-----G---GCA-TTCA--AGGTTA-----TT--

Porcine : ACCCACCTTCCGACTACTACGCACCCAGACCAAGAAGTCCTTGGGCTCTAGCAACCCGGAGGATACCCAGCTACCAAGACCAAGACCCCTACTTTG
Mouse  :
Human  : ---TTTTC-A-TGTACACC-CAT-----G---CA---C---A--A-CGA--G-A-A--CAGA-T--T-----G-----A-A-T---CC

Porcine : ACCCCAGCGGGAGGTCTTTACTACTCACGGATCTGAATCAGCTGGCCACTCAAGTGGGAGTCAAGAAGGTGAGGCAAAACACAACCTCTGGTCTATACG
Mouse  : -----T-----C---T-----A-----C--AC--G--CA---GA-TG-C-----T-----GA-
Human  : -----T--G---CA--C---T-A-----A--A---CA-----GA-----T-----A-

Porcine : GAAATCTCAAATTCAGAATGGCTGATCATCTCTGGCGTCCCTTCTGGCCCTGGCCTTGATTCTTGCAGTTTGCAATTGCCGTCAACAGTCGGAGGAGGTGT
Mouse  : --G-C---G-----C---T---A-T--C---A---TC-----C--C---C--G---T---A---A-----
Human  : --C-C-C-----T---A---CT---T---T-----A-----A-----A-----

Porcine : GGGCAGAAGAAAAGCTGGTGATTAACAATGGCAATGGACCTGTGGAAGAGAGAAAGCCAAAGCGGACTCAATGGAGAAGCCCAAGCAAGTCTTAGGAAATG
Mouse  : -----C--GG-----GA-A-----C--G--A--C--T-AG-----C--G--G-----C-----
Human  : -----A---C---G-----G-----G--C-----T-----C-----G-----C-----

603
Porcine : GTG
Mouse  : ---
Human  : ---

```

Fig. 9. Partial cDNA sequence of porcine CD44. Conserved nucleotides are indicated by a dash (-). The two underlined sequences correspond to the regions annealed with the specific primers.

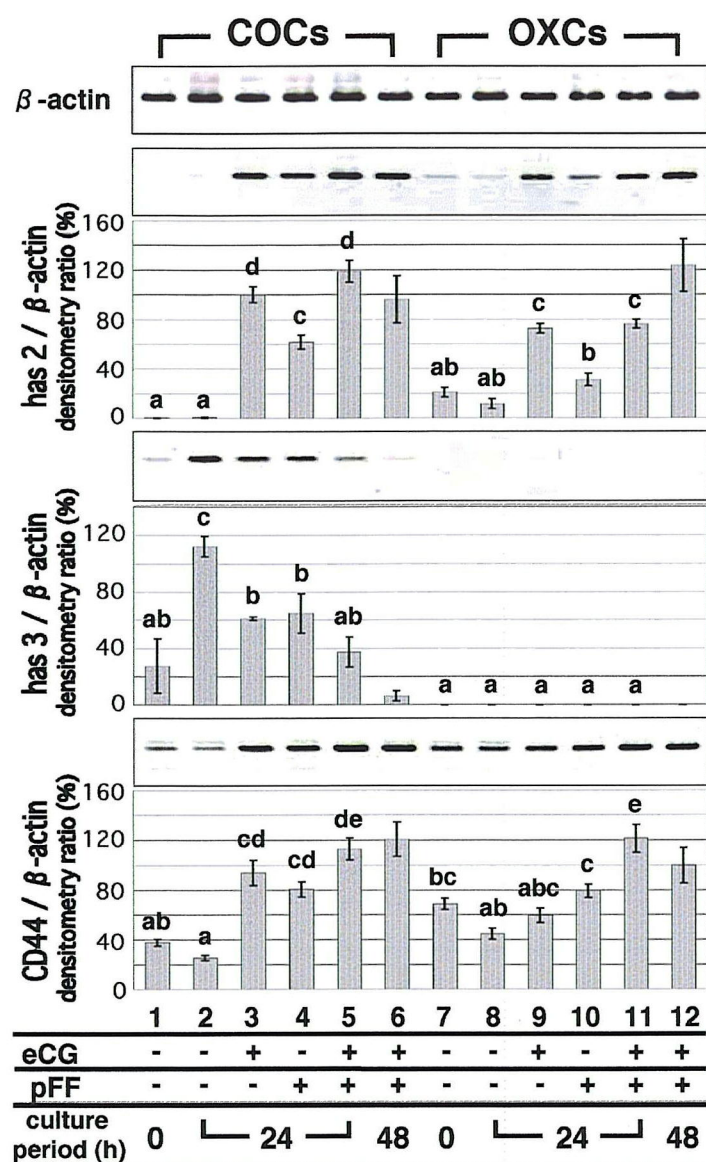


Fig. 10. Effect of eCG and pFF on the expression of has2, has3 and CD44 mRNA in porcine COCs and OXCs after 24 h and 48 h of culture.  $\beta$ -actin specific band as an internal positive control shows that the intensity was equal among RNA samples. Lanes 1-6, COCs; lanes 7-12, OXCs; lanes 1 and 7, 0 h (fresh); lanes 2-5 and 8-11, after 24 h of culture; lanes 6 and 12, after 48 h of culture; lanes 2 and 8, medium 199 alone; lanes 3 and 9, medium supplemented with eCG; lanes 4 and 10, medium supplemented with pFF; lanes 5, 6, 11 and 12, medium supplemented with both eCG and pFF. Bars with no common letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).



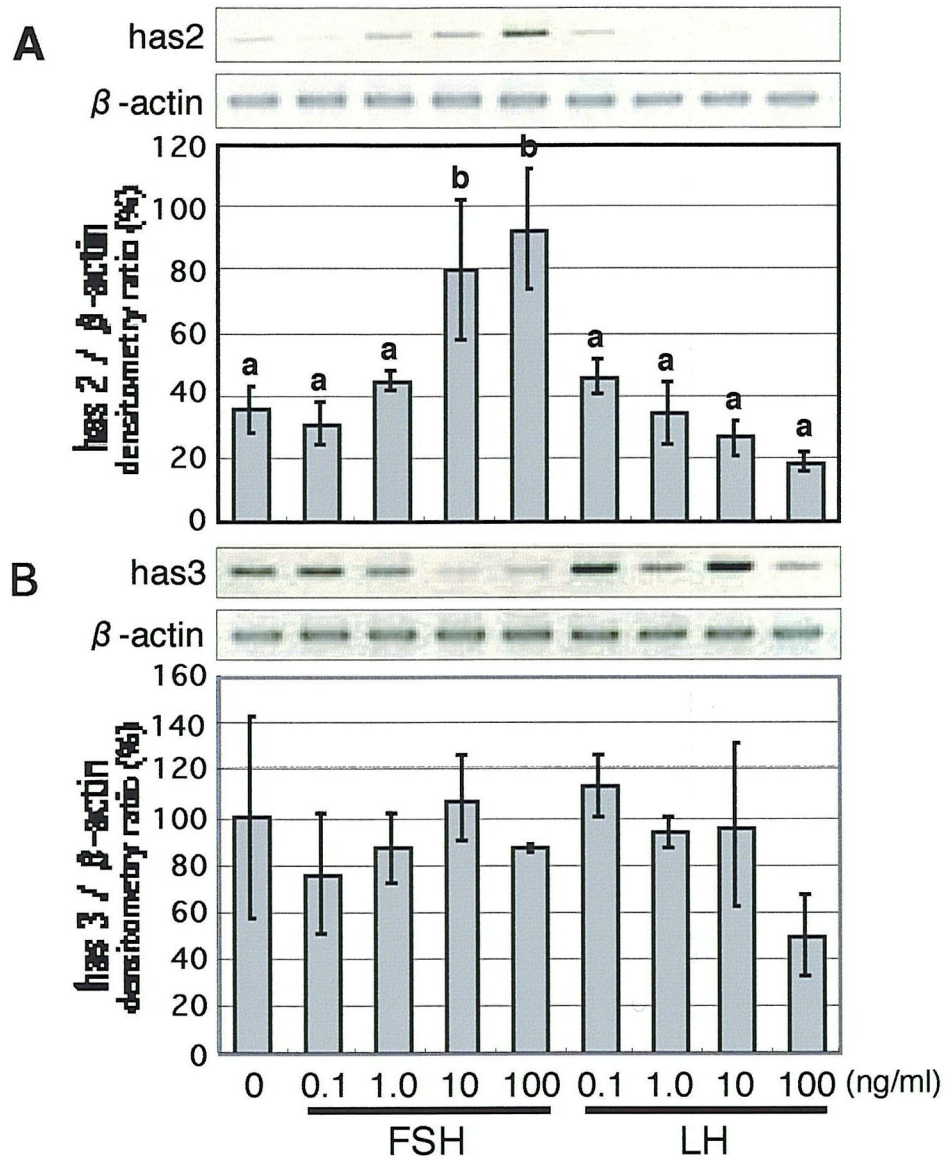


Fig. 11. Effect of FSH and LH on the expression of has2 and has3 mRNA in porcine cumulus cells and oocytes after 24 h of culture.  $\beta$ -actin specific band as an internal positive control shows that the intensity was equal among RNA samples. A: Fifty ng of total RNA extracted from cumulus cells was subjected to RT-PCR analysis. B: The equivalent total RNA of 30 oocytes per sample was subjected to RT-PCR analysis. Bars with no common letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).



## 第 3 章

卵母細胞で発現しているブタ *has3* cDNA の  
クローニングとその特徴

## 緒 言

第 2 章で卵母細胞成熟過程にある卵丘細胞では *has2* mRNA が発現し、その発現は卵丘膨化を誘起する eCG および pFF により誘導あるいは促進された。この結果から、*has2* が卵丘膨化時の HA 合成に関わる HA 合成酵素であることが明らかとなった。一方、卵母細胞では *has3* mRNA が検出され、卵母細胞でも HA を合成していることが示唆された。しかし、*has3* の発現はゴナドトロピン誘導性ではなく、卵丘膨化に伴う HA 合成との関わりは明らかではなかった。

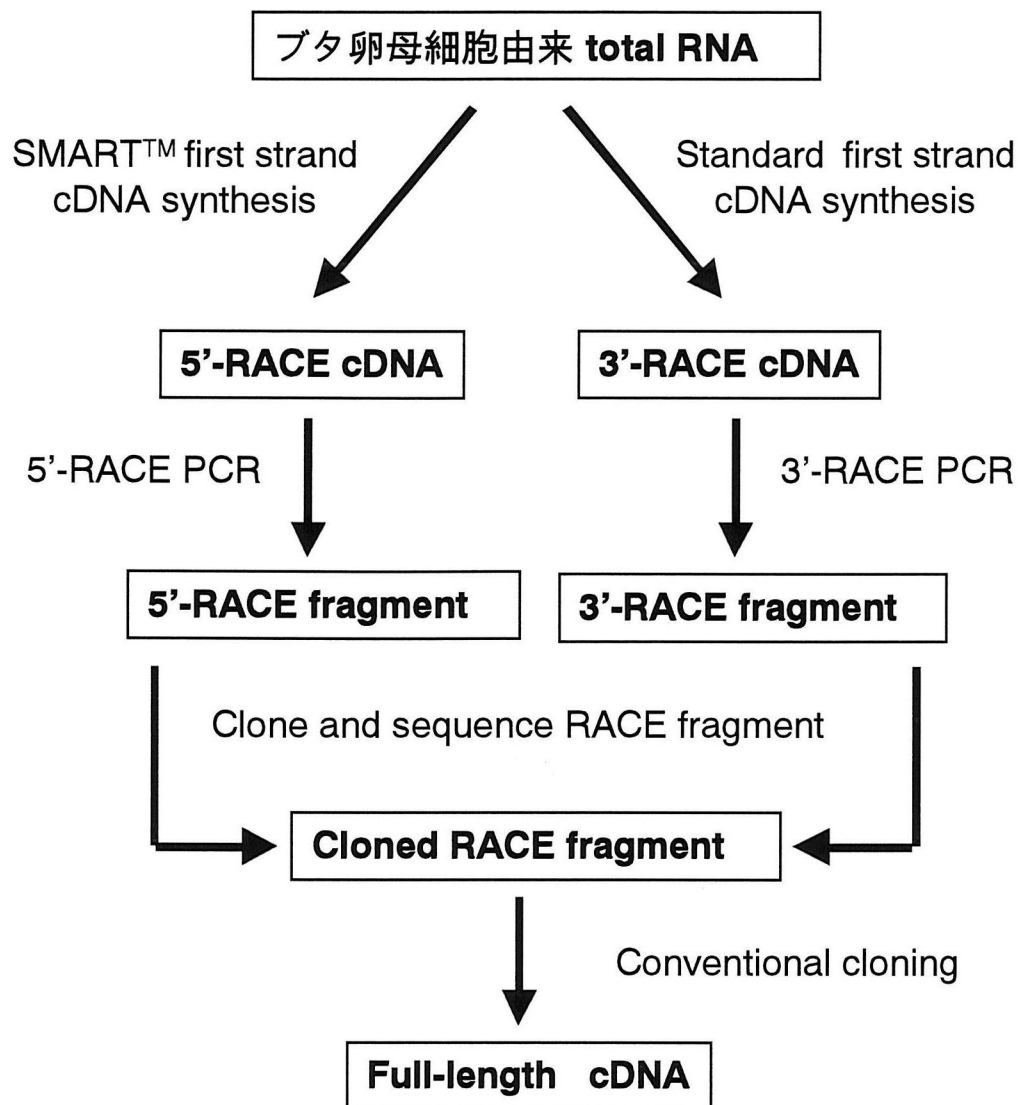
HAS3 の特性として、1)HAS2 とアミノ酸レベルで 70% のホモロジーがある、2)3 種類の HAS の中で最も酵素活性が高い、3)HAS3 により合成される HA の分子量は HAS1 および HAS2 由来の HA と比較し、小さいなどが挙げられる(板野ら, 1998; Itano ら, 1999)。Liu ら(2001)は *HAS3* 遺伝子を導入した前立腺癌細胞で、細胞増殖、細胞外マトリックスの形成、血管新生が促進されたことを報告している。現在のところ、HAS3 の細胞機能についてはこの報告のみで、その詳細は不明である。

現在までに卵母細胞における HA の合成あるいは HAS の発現を示す報告例はない。そこで本章では、まだブタでは同定されていない *has3* cDNA をクローニングし、全塩基配列を決定するとともに、卵母細胞で発現している *has3* の生理的役割を考察するために、さらに詳細な *has3* mRNA の発現動態を調べた。

## 材料および方法

### ブタ *has3* cDNA のクローニング

クローニングは RACE 法 PCR を基本に、SMART™ RACE cDNA Amplification Kit(Cat. No. K1811-1, クロンテックカンパニー, 東京)を用いて行った。このキットの特徴として、最小 50 ng のポリ A<sup>+</sup> RNA あるいは total RNA があれば first strand cDNA の合成が可能である点、さらに first strand cDNA 合成時、同時に 5'あるいは 3'末端にキットに含まれる特異的な 5'あるいは 3'オリゴプライマーが付加されるので、このプライマーと標的遺伝子特異的なプライマーとで PCR を行えば、5'RACE あるいは 3'RACE の断片が簡単に得られる点などが挙げられる。通常、cDNA ライブラリーからのスクリーニングを行う場合、cDNA ライブラリーの作製のために最低でも数  $\mu$ g オーダーの total RNA が必要である。卵母細胞(マウス卵母細胞 1 個当たりの total RNA 含量は約 0.35 ng)から数  $\mu$ g オーダーの total RNA を得るためには、最低でも 1 万個以上の卵母細胞が必要であり、サンプリングが非常に困難である。予備実験でブタ卵巢由来の cDNA ライブラリーの作製を試みたが、ブタ卵巢は齧歯類と比較してサイズが大きく、結合組織が非常に多いため、卵母細胞由来の RNA が豊富な高品質の total RNA を得ることが難しかった。このような理由から、このキットは大量に total RNA を得ることが難しい卵母細胞で発現している遺伝子のクローニングに非常に有効であると考えた。以下に、このキットを用いた全体の流れをフローチャートで示した。



#### 1) 卵母細胞由来 total RNA の抽出

第 2 章で has3 が成熟過程の卵母細胞で常に発現していることが明らかとなった。従って、成熟過程の卵母細胞であればクローニングのための total RNA の抽出に用いることが可能であるが、卵丘膨化した COCs の方が裸化しやすいことから、第 1 章に準じ eCG+pFF 添加区で 48 時間成熟培養したブタ COCs をヒアルロニダーゼ(第 2 章参照)により裸化処理し、卵母細胞のみをサンプリングした。この卵母細胞を約 600 個集め、第 2 章に準じて total RNA の抽出を行った。SMART™ RACE cDNA

Amplification Kit のプロトコールに従い、クローニングの過程で必要な水は全て超純水をオートクレーブ滅菌したものを使用した (diethyl dicarbonate 処理水は使用しなかった)。得られた卵母細胞由来 total RNA(80  $\mu$ l)を濃縮するために、8  $\mu$ l の 3 M 酢酸ナトリウム、200  $\mu$ l の 100% エタノールを加え混合し、-20°Cで 1 時間静置した。その後 4°C、12,000×g で 10 分間遠心し、上清を取り除き、さらに約 500  $\mu$ l の 80%エタノールを加え、沈殿物を室温で遠心洗浄した。その後エタノール(上清)を除去し、室温で完全に乾燥させないようにドライアップした。これを 7  $\mu$ l の超純水で溶解した。マウス卵母細胞 1 個当たりの total RNA 含量 0.35 ng を参考に計算すると、得られた total RNA の濃度は 210 ng/600 個であり、RNA 抽出の際のロス等を考慮し、この 7  $\mu$ l の RNA 溶液には 100~150 ng の total RNA があるものとした。

## 2) first strand cDNA の合成

以下のように反応液(全量で 5  $\mu$ l)をそれぞれ調整した。反応に必要な試薬は全て SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit に含まれているものを使用した。

<u>5'-RACE cDNA</u>			<u>3'-RACE cDNA</u>		
total RNA	3 $\mu$ l		total RNA	3 $\mu$ l	
5'-CDS primer	1 $\mu$ l		3'-CDS primer	1 $\mu$ l	
SMART oligo	1 $\mu$ l		超純水	1 $\mu$ l	

これらを 70°Cで 2 分間反応させ、氷上で急冷し、さらにそれぞれの反応液に、2  $\mu$ l の 5×first-strand buffer、1  $\mu$ l の 20 mM DTT、1  $\mu$ l の 10 mM dNTP、1  $\mu$ l の MMLV reverse transcriptaseを加えて全量で 10  $\mu$ l とした。これを 42°C

で 1.5 時間反応させた。その後 20  $\mu$ l の Tricine-EDTA buffer を加え、72°C で 7 分間保持した後、-20°C でストックした。

### 3) 5'-RACE および 3'-RACE PCR

5  $\mu$ l の Advantage2 PCR buffer(10 $\times$ )、1  $\mu$ l の 10 mM dNTP Mix、1  $\mu$ l の Advantage2 Polymerase Mix(50 $\times$ )、2.5  $\mu$ l の 5'-または 3'-RACE cDNA、5  $\mu$ l の UPM(10 $\times$ )、1  $\mu$ l の 遺伝子特異的プライマー(10  $\mu$ M)、超純水 34.5  $\mu$ l を反応液として調整し、PCR に供した。この過程で 5'-RACE を何度も試みたが、特異的 PCR 断片が得られなかった。従って 5'-RACE に関しては 5'-側(翻訳開始領域 ATG コドンから 20 bp)および 3'-側の両方にプライマーを設定して 5'-RACE 断片を得た(Fig. 12)。プライマーはマウス(Gen<sup>TM</sup>bank accession number: MMU86408) と ヒト (Gen<sup>TM</sup>bank accession number: AF232722)の cDNA のホモロジーの高い領域から設計した。PCR のプログラムは、(94 °C、5 秒間→72 °C、4 分間)を 1 サイクルとし 5 回繰り返した後、(94 °C、5 秒間→70 °C、20 秒間→72 °C、4 分間)を 1 サイクルとし 40 回繰り返した。

### 4) 5'-RACE および 3'-RACE 断片のクローニングおよびシーケンシング

得られた 5'-RACE(約 1.7 kbp)および 3'-RACE(約 2.5 kbp)断片を 1% GTG アガロースゲル(Seakem GTG agarose, Cat. No. 50070, BMA product com, USA)で電気泳動した後、NucleoTrap(Cat. No. 740584, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co., Germany)キットによって、ゲルから抽出した。これを pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System (Cat. No. A1380, プロメガ(株), 東京)を用いて、TA クローニング法によりベクターに組み込んだ。ブルーホワイトセクションによって得たいくつかのポジティブクローンをピック

アップし、Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System(Cat No. A1330, プロメガ (株), 東京)キットによりプラスミドを精製し、EcoR で制限酵素処理後、それらを電気泳動し、インサートの確認をした。インサートが確認されたものについて、シーケンスを行った。このようにしてインサートが確認され、かつ *has3* 遺伝子断片を含むクローンを大量調整し、最終的なシーケンシングを行った。

### 体外成熟・受精・培養による着床前胚の作出

着床前胚は三好ら(1999)の方法に準じて作出した。以下に示す試薬でメーカー名を記していないものは、第 1 章と同様のものであり、それ以外は和光純薬工業 (株) のものを使用した。第 1 章に準じて準備した BSA を含まない NCSU-23(108.73 mM NaCl, 4.78 mM KCl, 1.7 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.19 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.19 mM MgSO<sub>4</sub>, 25.07 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5.55 mM glucose, 1.0 mM glutamine(Cat. No. G-3126, SIGMA, USA), 7.0 mM taurine(Cat. No. T-7146, SIGMA, USA), 5.0 mM hypotaurine(Cat. No. H-1384, SIGMA, USA))を基礎培地に 10 IU/ml eCG、10 IU/ml hCG(プベローゲン 1000 単位, 三共 (株), 東京)、0.57 mM L-cysteine(Cat. No. C-7755, SIGMA, USA)、10%(v/v) pFF を添加した培地で、採取したブタ COCs を 38.5°C、5%CO<sub>2</sub>-95%空気気層下で 22 時間培養後、eCG および hCG を除いた同じ培地でさらに 22 時間培養した。ここまでは成熟培地 400 µl ドロップ当たり、約 40 個程度の卵母細胞とした。成熟培養後、COCs は 0.3 mg/ml ヒアルロニダーゼで裸化し、受精用培地(113.1 mM NaCl, 3.0 mM KCl, 10.0 mM CaCl<sub>2</sub>, 25.07 mM NaHCO<sub>3</sub>, 11.0 mM glucose, 5.0 mM sodium pyruvate, 2.0 mM caffeine-sodium benzoate(Cat. No. C-4144, SIGMA, USA), 1.0 mg/ml fatty acid-free BSA(Cat. No. A-6003, SIGMA, USA))に移した。この時点で受精用培地 100 µl ドロップ当たり、約 40 個程度の卵母細胞とした。一方、

凍結精液は 38.5°C に加温した 10 ml の 1 mg/ml fatty acid-free BSA および抗生物質を含む Dulbecco's PBS-(第 1 章参照)で融解し、穏やかに混合した後、5 分間、遠心(1,500×g)した。その後上清を捨て、再度この 10 ml の PBS で希釈し、同様に遠心した。このように融解時も含めて 3 回精子を洗浄した後、受精用培地に、最終濃度  $7.5 \times 10^6$  cells/ml になるように加えた。成熟時と同様の条件で 6 時間共培養した後、卵母細胞を 4 mg/ml ml fatty acid-free BSA を含む NCSU-23 培地に移し、3 回洗浄後、同培地で 7 日間培養を行った。これらの過程で得た未成熟卵母細胞(培養 0 時間)、成熟卵母細胞(培養 48 時間)、2 細胞期、4~8 細胞期、桑実期および胚盤胞期胚をサンプリングした。

#### 未成熟卵母細胞の acridine orange および Hoechst 33258 による二重蛍光染色

卵母細胞の生存性と has3 の発現との関係を調べる目的で、卵母細胞の acridine orange および Hoechst 33258 による二重蛍光染色を行った。acridine orange は DNA あるいは RNA に結合し、励起波長 502 nm 下でダブルストランド DNA に結合したものを緑色に、励起波長 460 nm 下でシングルストランド DNA あるいは RNA に結合したものを赤色に発色する。一方、Hoechst 33258 は死んでいる細胞のみを染色し、励起波長 350 nm 前後で青色に発色する。Narendra と Ralph(1986)は、これら二重染色の観察が 1 種類の励起フィルター(Hoechst の観察用)で可能であるとし、蛍光顕微鏡下で死んだ細胞は Hoechst 33258 に染色されブルーに(生存している細胞は染色されない)、生存している細胞は acridine orange に染色されグリーンに発色するため、これを利用し、ヒトのリンパ球の生死判定を行っている。卵母細胞でこのような生死判定あるいは RNA の合成量を指標とする分染が可能であるかについて検証を行った。



第 1 章に準じて採取したブタ COCs を、直ちに eCG+pFF 区の TCM-199(第 1 章参照)中でピペティングにより、卵丘細胞を除去した。得られた卵母細胞を二重染色した後 total RNA の抽出に供することから、卵母細胞の生存性を損なわないように、一連の作業を 37~38°C に保温しながら速やかに行った。PBS-BSA(第 1 章参照)に acridine orange(Cat. No. 349-07441, 同仁化学研究所(株), 熊本)を最終濃度 2.5 µg/ml、Hoechst 33258(Cat. No. B-2883, SIGMA, USA)を最終濃度 1.0 µg/ml になるように加えた溶液中で、裸化した卵母細胞を 10 分間、37°C で染色した。その後、蛍光顕微鏡で、励起波長 365 nm、蛍光波長 465 nm の条件下で観察した。その結果、卵母細胞の細胞質全体が赤色に発色するもの、細胞質は染まらず核のみが緑色に発色するものの二つに分別可能であった。従って、卵母細胞を赤色蛍光区および非赤色蛍光区に分けてサンプリングした。

#### 卵母細胞および着床前胚からの total RNA の抽出および RT-PCR

卵母細胞および着床前胚からの total RNA の抽出は、第 2 章に準じて行った。着床前胚における has3 mRNA の発現をみるための RT-PCR は未成熟卵母細胞、成熟卵母細胞、着床前胚それぞれ 3 個分の total RNA を用いて、42°C、20 分間の RT 反応の後、95°C、5 分間の reverse transcriptase の失活を行い、(95°C、1 分間→50°C、1 分間→72°C、1.5 分間)を 1 サイクルとし、45 回繰り返した。一方、acridine orange と Hoechst 33258 による二重染色を行った卵母細胞の RT-PCR は未成熟卵母細胞 30 個分の total RNA を用いて、42°C、20 分間の RT 反応の後、95°C、5 分間の reverse transcriptase の失活を行い、(95°C、1 分間→50°C、1 分間→72°C、4 分間)を 1 サイクルとし、40 回繰り返した。

## 結 果

### ブタ *has3* cDNA のクローニング

ブタ卵母細胞で発現している *has3* cDNA の ORF 領域から poly A<sup>+</sup> までの塩基配列を決定した。その結果、全長で 3995 bp、ORF 領域は 1~1659 bp で推定アミノ酸残基数は 553 残基であった (Fig. 13)。このブタ *has3* の推定アミノ酸配列と、現在までに哺乳類で単離されている HAS3 のアミノ酸配列における相同性は、ヒトと 98.2%、ウサギと 98.4%、マウスと 96.9% で、種を越えて保存性が高いことが明らかとなった。これに対して cDNA 全長の配列は現在のところ、哺乳類ではヒトおよびマウスでしか単離されていないが、それらとブタ *has3* cDNA 配列の相同性は 65% 前後であった (Fig. 14)。このアミノ酸残基内には、HA 結合モチーフといわれている配列 B(X<sub>7</sub>)B が 4 カ所存在しているほか、PKC あるいは cAMP 依存性プロテインキナーゼのコンセンサス配列 (PKC: RHLT, KYT, RWLS; cAMP-dependent protein kinase: RWS) も確認された (Fig. 14)。さらに HA の構成成分である N-アセチルグルコサミンの糖転移活性に必須のアミノ酸部位 215 番目と 317 番目のアスパラギン酸、353 番目のグルタミン、357 番目のトリプトファンの存在が明らかとなった (Fig. 15)。この糖転移に必須の部位は、酵母のキチン合成酵素 CHS2 の研究で明らかにされたもので、他種の HAS、根粒菌のキチンオリゴ糖合成酵素、植物のセルロース合成酵素においても保存されていることがわかっている。また HA のもう一方の構成成分であるグルクロン酸の糖転移活性を持つ UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ (以下、UDP-GT) のアミノ酸配列の中で、種を越えて保存されている UDP-グルクロン酸の結合活性をもつ領域が、他種の HAS と同様にブタ *has3* においても保存されていることが明らかとなった。

## 着床前胚における **has3 mRNA** の発現

成熟過程の卵母細胞でみられた **has3** の発現は、受精後発生が進むにつれて弱くなり、桑実期胚以降では確認されなかった(Fig. 16)。

## 未成熟卵母細胞の **acridine orange** および **Hoechst 33258** による二重蛍光染色

予備実験で、第 1 章および第 2 章で用いた無添加区の成熟培地でブタ COCs を 120 時間まで培養し、24 時間毎にサンプリングを行い、**acridine orange** および **Hoechst 33258** による二重蛍光染色を試みた。その結果、卵細胞質全体が赤色に発色しているものと、核のみが緑色に発色しているものの二つに分別できた。この染色結果と明視野下の卵母細胞の形態を比較した場合、卵細胞質が不均一で色が薄く退行している卵母細胞の核が、緑色に発色していることがわかった(Fig. 17)。**acridine orange** はシングルストランド DNA および RNA を染色することから、卵細胞質が赤色に発色している卵母細胞は RNA 合成が盛んであるものと判断した。この二重染色において **Hoechst 33258** による青色の発色はみられなかったため、**Hoechst** 単独染色を行ったところ、青色に発色している卵母細胞はみられなかった。このことから卵母細胞では **Hoechst 33258** による生死判定は難しいことがわかった。この赤色に発色する卵母細胞の割合は、採卵直後の卵母細胞では 75.6%であった。

## **acridine orange** および **Hoechst 33258** の二重蛍光染色による RNA 合成量を指標にした卵母細胞の **has3 mRNA** の発現量の比較

赤色蛍光区の卵母細胞における  $\beta$ -actin の発現量は、非赤色蛍光区と比較して明らかに高かった(Fig. 18)。このことから非赤色蛍光区の卵母細胞における RNA 合成量は、低下しているものと考えられた。また **has3** の発現は

非赤色蛍光区より赤色蛍光区で高い傾向にあった。

## 考 察

卵母細胞で発現しているブタ *has3* cDNA のクローニングを行った。この結果、予測されたアミノ酸配列はヒト (Gen<sup>TM</sup>bank accession number: AF232722)、ウサギ(Ohno ら, 2001)、マウス(Spicer ら, 1997)と非常に高いホモロジー(96%以上)を示し、種を越えてよく保存されていることが明らかとなった。現在、同研究室で修士課程の今野祥顕氏が卵丘細胞で発現しているブタ *has2* cDNA のクローニングを行っている。その結果からブタ *has2* の予想アミノ酸配列も、ウシ (Gen<sup>TM</sup>bank accession number: AB017804)、ヒト (Watanabe と Yamaguchi, 1996)、ラット (Gen<sup>TM</sup>bank accession number: AF008201)、マウス(Spicer ら, 1996)、ニワトリ (Gen<sup>TM</sup>bank accession number: AF106940)と 93%以上のホモロジーを示した。また HA の構成成分である N-アセチルグルコサミンの糖転移活性に必須のアミノ酸部位、HA のもう一方の構成要素であるグルクロン酸の糖転移活性を持つ UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼのアミノ酸配列の中で UDP-グルクロン酸の結合活性をもつ領域が、種を越えて HAS ファミリーに広く存在することが明らかとなっている。このようにアミノ酸配列で比較した場合、HAS は HAS ファミリー共通の配列およびモチーフを持ち、それぞれの HAS は種を越えてよく保存されていることがわかった。しかし HAS ファミリー間のアミノ酸配列の比較では HAS1 と HAS2 とでは約 55%、HAS1 と HAS2 とでは約 57%、HAS2 と HAS3 と約 70%の相同性が認められるにすぎず、それぞれの発現動態の違いからも 3 者は明らかに独立したものと認識される(Spicer ら, 1997 と 1998)。ブタ *has2* と *has3* のアミノ酸配列における相同性も 71.1%であった。*HAS3* cDNA はヒトでは 4049 bp、マウスでは 5919 bp、そして本章で明らかにしたブタでは 3995 bp が現在まで明らかにされているデータであるが、その特徴としていずれ

も 5'側に ORF 領域が偏っており、ORF 領域における種間の相同性は高いものの(約 90%)、ORF 領域以降 3'末端にかけての相同性は低かった。そのため cDNA 全体の相同性は 65%前後にとどまっていた。本章では RACE 法によってブタ *has3* cDNA の同定を行ったが、その過程で ORF 領域より 5'末端側が同定できなかった。その理由は明らかでないが、ヒトおよびマウスの配列から推定すると、5'末端側にさらに 100~200 bp 程度の配列が存在すると予想される。Spicer ら(1998)は HAS ファミリーのゲノムの構造解析を行い、それによるとマウス *Has2* および *Has3* がいずれも 4 個のエクソンから成り立ち、それぞれのエクソンとイントロンの境界付近の配列が非常によく似ており、また翻訳開始領域(ATG コドン)がともに第 2 エクソンの最初に存在していることなどを報告している。

本章では卵母細胞で発現している *has3* の生理的役割を推測するため、着床前胚における *has3* mRNA の発現について調べた。その結果、未成熟および卵母細胞で発現していた *has3* は受精後徐々に発現がみられなくなった。予備実験で成熟培養時間を 120 時間まで延長した卵母細胞でも *has3* の発現は一定してみられることを確認している。このことから判断すると *has3* は受精前の卵母細胞で特異的に発現していることが示唆された。しかし、本研究では特に 2~5 mm の胞状卵胞由来の未成熟および成熟卵母細胞でしか発現を確認していない。従って卵巣内の原始卵胞から発育過程にある全ての卵胞について調べることで、その発現の意義が解明できるのではないかと考えられる。

体外成熟培地に HA を添加することで卵母細胞のフラグメンテーションが抑制され、体外成熟、受精、その後の発生率が向上することが報告されている(Kano ら, 1998; Sato ら, 1987)。また Sato ら(1990)は卵胞液から精製される HA に類似した分画のグリコサミノグリカンの添加が、卵母細胞の生存性

を向上させることを報告している。これらは HA が卵母細胞および胚の生存性、発生率の向上に関わっていることを示している。従って卵母細胞で発現している has3 由来の HA は卵母細胞がそれ自身の生存のためにオートクリンに分泌しているのではないかと考えられた。これらを検証するため、acridine orange および Hoechst 33258 の二重蛍光染色による RNA 合成量を指標にした卵母細胞の has3 mRNA の発現を調べた。その結果、RNA 合成の盛んな赤色蛍光区では非赤色蛍光区と比較して、has3 の発現が高いことが明らかとなった。このことから、RNA の合成量と has3 の発現量は相関があり、優良な卵母細胞では has3 の発現量も高いことが示された。

第 2 章でも述べたように *Has3* ノックアウトマウスは、形態的に異常は見られなく、不妊とも報告されていない(Spicer と Nguyen, 1999)。このことから卵母細胞の発生に HAS3 は必須ではないか、あるいは他の HAS によって代償されるものと考えられる。特に卵母細胞と接している卵丘細胞で has2 が発現していたことから、後者の可能性が高いと考えられる。

## 要 約

第 2 章で、卵母細胞成熟過程において卵丘細胞で発現している *has2* が、卵丘膨化時の HA 合成に関わる HA 合成酵素であることが明らかとなった。一方で、卵母細胞において *has3* mRNA が検出された。このことは卵母細胞が HA を合成していることを示唆していた。そこで本章ではまだブタでは同定されていない *has3* cDNA をクローニングし、全塩基配列を決定するとともに、卵母細胞で合成される HA の生理的役割を明らかにするためにさらに詳細な *has3* の発現動態を調べた。ブタ卵母細胞由来の cDNA を鋳型に、マウスおよびヒトの *HAS3* cDNA の配列を参考に RACE 法 PCR を行い、5'領域の断片(1700 bp)および 3'領域の断片(2500 bp)を得た(Fig. 12)。これらを TA クローニングした後、シーケンスを決定した。一方で卵母細胞の発生と *has3* の発現との関わりを明らかにする目的で、体外培養により受精卵を作出し、着床前胚における *has3* mRNA の発現について調べた。さらに卵母細胞を acridine orange および Hoechst 33258 による二重蛍光染色を行った。蛍光顕微鏡下で、acridine orange は一本鎖 DNA および RNA を赤色に、二本鎖 DNA を緑色に染色し、Hoechst 33258 は生きた細胞には入らず、二本鎖 DNA を青色に染色する。このことより RNA 合成が盛んな卵母細胞は赤色に、そうでない卵母細胞の核は緑色または青色に染まると予想した。これらを指標に RNA 合成が盛んな卵母細胞、そうでない卵母細胞に分別し、それぞれの *has3* mRNA の発現を調べた。

ブタ *has3* cDNA は全長で 3995 bp、ORF 領域は 1~1659 bp で推定アミノ酸残基数は 553 残基であった(Fig. 13)。このブタ *has3* の推定アミノ酸配列と、現在までに哺乳類で単離されている *HAS3* のアミノ酸配列における相同性は、ヒトと 98.2%、ウサギと 98.4%、マウスと 96.9%と種を越えて保存



性が高いことが明らかとなった。これに対して cDNA 全長の配列における相同性は現在までに明らかにされているヒトおよびマウスと 65%前後であった。この推定アミノ酸残基内には HA 結合モチーフといわれている配列 B(X<sub>7</sub>)B が 4 カ所存在しているほか、PKC あるいは cAMP 依存性プロテインキナーゼと関係したモチーフ (PKC: RHLT, KYT, RWLS; cAMP-dependent protein kinase: RWS) も存在していた (Fig. 13)。さらに HA の構成成分である N-アセチルグルコサミンの糖転移活性に必須のアミノ酸部位 215 番目と 317 番目のアスパラギン酸、353 番目のグルタミン、357 番目のトリプトファンの存在が明らかとなった (Fig. 15)。この糖転移に必須の部位は、他種の HAS においても保存されていることがわかっている。また HA のもう一方の構成成分であるグルクロン酸の糖転移活性を持つ UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ (以下、UDP-GT) のアミノ酸配列の中で種を越えて保存されている UDP-グルクロン酸の結合活性をもつ領域が、他種の HAS と同様にブタ *has3* においても保存されていることが明らかとなった。成熟過程の卵母細胞で発現していた *has3* の発現は受精後発生が進むにつれて弱くなり、桑実期胚以降では認められなかった (Fig. 16)。採卵直後の卵母細胞を二重蛍光染色した結果、非赤色蛍光区では赤色蛍光区よりも  $\beta$ -actin の発現量が少なく、このことから非赤色蛍光区における RNA 合成量は低下していることがわかった (Fig. 18)。また赤色蛍光区では非赤色蛍光区より *has3* の発現が高かった。

以上、本章では卵母細胞で発現しているブタ *has3* cDNA の塩基配列および推定アミノ酸残基を明らかにした。*has3* は RNA 合成の盛んな卵母細胞においてより強く発現しており、受精後低下することが明らかとなった。

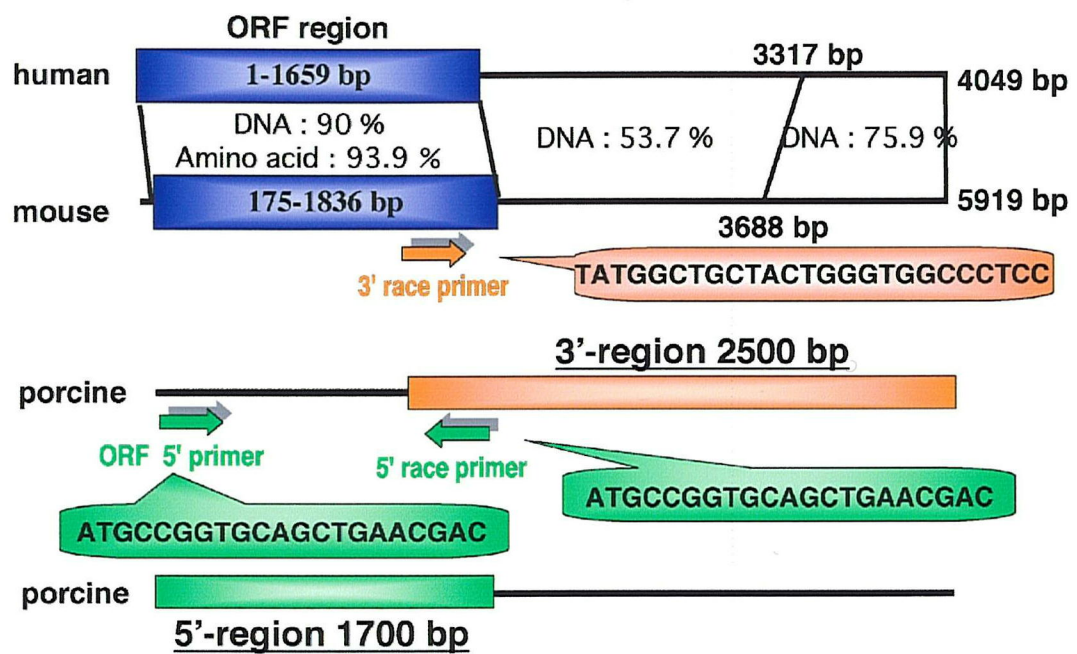


Fig. 12. Approach for cloning of porcine *has3* cDNA.



	<b>cDNA(%)</b>	<b>amino acid(%)</b>
human	66.6	98.2
rabbit	–	98.4
mouse	64.5	96.9

**Fig. 14. Comparison of porcine has3 with human, rabbit and mouse HAS3 on sequence of cDNA and predicted amino acid.**

## A

porcine has3	210	YIQVCDSDTV	219	312	CSFGDDRHLTN	322
human HAS3	210	YIQVCDSDTV	219	312	CSFGDDRHLTN	322
mouse Has3	211	YIQVCDSDTV	220	313	CSFGDDRHLTN	323
porcine has2	207	YVQVCDSDTM	216	309	CSFGDDRHLTN	319
human HAS2	207	YVQVCDSDTM	216	309	CSFGDDRHLTN	319
mouse Has2	207	YVQVCDSDTM	216	309	CSFGDDRHLTN	319
human HAS1	197	YVQVCDSDTR	206	299	CTFGDDRHLTN	309
mouse Has1	237	YVQVCDSDTR	246	339	CTFGDDRHLTN	349
DG42	235	YVQVCDSDTK	244	337	CTLGDDRHLTN	347
sphasA	130	FLTV-DSDTY	138	230	VSIGDDRCLTN	240
A98R	196	AVVLIDSDTV	205	297	CTYGDDRRLTN	307
NodC	136	VLNV-DSDST	144	237	SDFGEDRHLTI	247
CELA1	454	FILNLDCDHY	463	667	GSVTED-ILTG	676
CHS2	435	VVTLVDVGTR	444	556	MYLAEDRILCW	566

porcine has3	344	PTKYLRWLNQQTRWSKSYFRE	364
Human HAS3	344	PTKYLRWLNQQTRWSKSYFRE	364
mouse Has3	345	PTKYLRWLNQQTRWSKSYFRE	365
Porcine has2	341	PIEYLRWLNQQTRWSKSYFRE	361
Human HAS2	341	PIEYLRWLNQQTRWSKSYFRE	361
mouse Has2	341	PIEYLRWLNQQTRWSKSYFRE	361
Human HAS1	331	PSSFLRWLSQQTRWSKSYFRE	351
mouse Has1	371	PSSFLRWLSQQTRWSKSYFRE	391
DG42	369	PSLYLRWLNQQTRWTKSYFRE	389
sphasA	362	PFQLKSYLKQQNRWNKSFRE	282
A98R	329	PTNVFRYIVQQTRWSKSWCRE	349
NodC	269	PDTLKPYLRRQLRWARSTFRD	287
CELA1	701	PINLSDRLHQVLRWALGSVEI	719
CHS2	592	PEHVSEFISQRRRWLNCAMFA	612

## B

porcine has2	278	GCVQCISGPLGMYRNS	293
human HAS3	278	GCVQCISGPLGMYRNS	293
mouse Has3	279	GCVQCISGPLGMYRNS	294
porcine has2	275	GCVQCISGPLGMYRNS	290
human HAS2	275	GCVQCISGPLGMYRNS	290
mouse Has2	275	GCVQCISGPLGMYRNS	290
human HAS1	265	HCVSCISGPLGLYRNN	280
mouse Has1	305	HCVSCISGPLGLYRNN	320
DG42	303	DCVSCISGPLGMYRNN	318
sphasA	197	NILVC-SGPLSIYRRE	212
Rat UDP-GT	304	GVVVFSLGSMVSNMTE	319
Mouse UDP-GT	304	GVVVFSLGSMVSNMTE	319
RabbitUDP-GT	304	GVVVFSLGSMVSNMTE	319
Human UDP-GT	303	GVVVFSLGSMVSNMTE	318

Fig. 15. Conservation of amino acid residues crucial for GlcNAc transeferase activity. The predicted amino acid sequence alimnt that has been demonstrated to be essential for enzyme activity of chitin synthase2 protein is conserved in all HAS and some  $\beta$ -glycosyltransferase. Conserved residues are highlighted in bold type and marked by asterisk. The residues highlighted in bold may be critical for  $\beta$  1-4(A) and  $\beta$  1-3(B) glycosyltransferase activity.

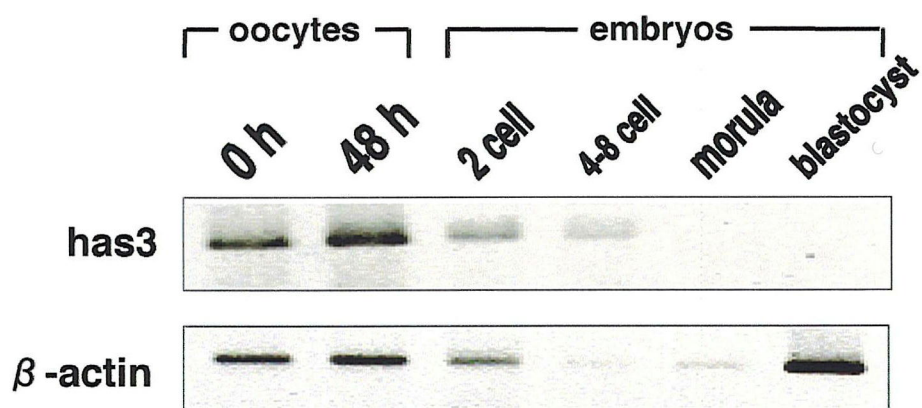


Fig. 16. Expression of has3 and  $\beta$ -actin mRNAs in porcine oocytes and embryos. The equivalent total RNA of 3 oocytes or 3 embryos per sample was subjected to RT-PCR analysis.



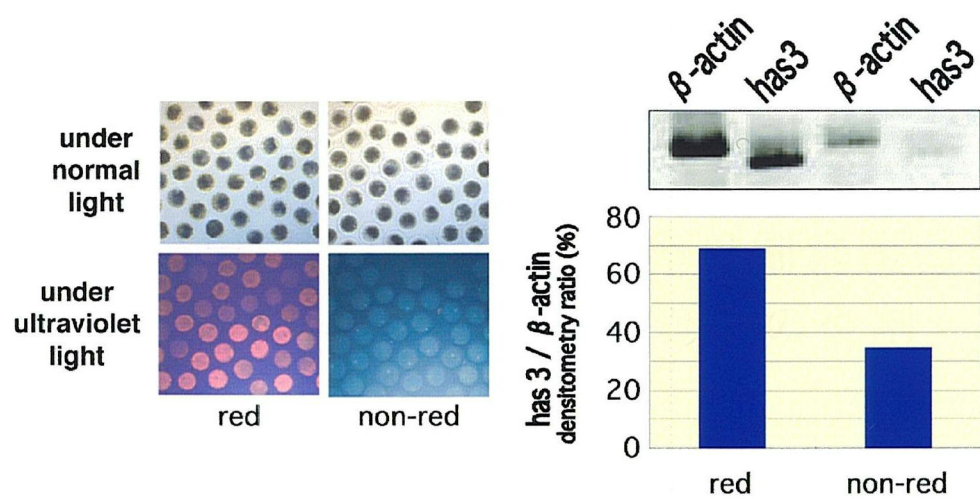


Fig. 18. Expression of has3 and  $\beta$ -actin mRNA in porcine oocytes of red and non-red groups sorted by acridine orange and Hoechst 33258 staining. The equivalent total RNA of 30 oocytes per sample was subjected to RT-PCR analysis.



## 第 4 章

体外成熟過程にある卵丘細胞-卵母細胞複合体  
における **CD44** の局在およびその役割

## 緒 言

細胞膜に存在し、HA に結合能を持つ細胞外マトリックスレセプターである CD44 は、第 2 章において卵丘細胞で mRNA の発現が確認された。その発現は卵丘膨化を誘起する eCG および pFF により誘導あるいは促進され、has2 の発現動態と類似していたことから、CD44 の合成は卵丘細胞で合成される HA と同調していることが示唆された。Ohta ら(1999)はヒトの卵丘細胞では顆粒膜細胞より強く CD44 が発現していることを確認しており、CD44 の卵母細胞成熟への関与を推察している。以上から、COCs における HA と CD44 の相互作用が、卵母細胞の成熟に何らかの役割を果たしているのではないかと考えられた。本章ではこれらについて明らかにすることを目的に、まず蛍光免疫染色法により COCs における CD44 の局在を調べた。さらに CD44 抗体存在下で体外成熟培養を行い、CD44 が卵母細胞の成熟に及ぼす影響について調べた。

卵母細胞の成熟が、卵丘膨化による卵丘細胞間および卵丘細胞-卵母細胞間のギャップ結合の消失に関与しているという報告がみられる(Larsen ら, 1986; Isobe ら, 1998)。細胞間ギャップ結合を構成するチャネルタンパク質であるコネキシン(Cx)ファミリーは、哺乳動物の卵巣では Cx26、30.3、32、37、43、45、57、60 の発現が確認されている(Itahana ら, 1996; Simon ら, 1997; Okuma ら, 1996; Manthey ら, 1999; Itahana ら, 1998)。この中で最近、Cx43 が卵母細胞の成熟に関与しているという報告がみられた(Vozzi ら, 2001; Shimada ら, 2001)。そこで、卵母細胞成熟過程における Cx43 の発現動態と CD44 がそれらに及ぼす影響について調べた。

## 材料および方法

### COCs および OXCs の抗ブタ CD44 抗体による免疫蛍光染色

第 1 章と同様の方法で準備した成熟培地、1)無添加区、2)eCG 区、3)pFF 区、4)eCG+pFF 区で COCs および OXCs を第 1 章と同様の条件で 24 時間培養した。その後 3 mg/ml polyvinyl-pyrrolidone(Cat. No. PVP-40, SIGMA, USA)を加えた Dulbecco's PBS-(第 1 章参照)に最終濃度 2%になるようにホルムアルデヒドを加えたものの中で、4℃で 30 分間保持し、固定を行った。その後 PBS-BSA(第 1 章参照)で 3 回洗浄した後、0.02%アジ化ナトリウムを含む PBS-BSA 中で、4℃で染色に供するまで保存した(最長で 1 週間程度まで保存した)。固定したサンプルを 20 µg/ml(50 倍希釈) 抗ブタ CD44 モノクローナル抗体(cell line , PORC24A, VMRD Inc, USA)―PBS-BSA で、37℃で 2 時間反応させた。続いて PBS-BSA で 3 回洗浄した後、200 倍希釈した二次抗体である FITC 結合ヤギ抗マウス IgG 血清(ICN Pharmaceuticals Inc, USA) ―PBS-BSA で、37℃で 1 時間反応させた。その後 PBS-BSA で 3 回洗浄した後、10 µg/ml Propidium Iodide ―PBS-BSA で 37℃で 1 時間反応させた。PBS-BSA で 3 回洗浄した後、スライドグラスにマウントし封入後、直ちに観察を行った。観察は Axioplan Zeiss microscope(Carl Zeiss, Germany)と Biorad MRC-1024 レーザー顕微鏡(Bio-Rad Laboratories, USA)によって行った。

### 抗ブタ CD44 抗体添加による成熟培養

第 1 章と同様の方法で準備した eCG+pFF 区の培地に抗ブタ CD44 モノクローナル抗体を 0.1、0.5、1.0、5.0 µg/ml になるように添加した。対照区として、eCG+pFF 区および eCG+pFF 区の培地に 5.0 µg/ml マウス IgG(Cat. No.284-010, Ancell Immunology Research Product, USA)を添加した区を設けた。

それぞれの区でブタ COCs を第 1 章と同様の条件で 48 時間培養した後、ヒアルロニダーゼ(第 2 章参照)により裸化処理し、組織観察に供した。

#### アセトオルセイン染色による核相の判定

裸化した卵母細胞を、4 点のワックススポットを添付したスライドグラスにマウントし、カバーグラスで卵母細胞を覆い挟み込んだ後、酢酸-エタノール(1:3)で 4℃、3 日間固定した。その後 0.75% アセトオルセインを含む 45% 酢酸で染色した。観察は位相差顕微鏡で行い、核膜を消失し、染色体の凝縮がみられたものが GVBD が誘起されたものと判断した。その他の成熟過程の核相判定は永井ら(1993 年)の出典を参考に行った。

#### 抗ブタ CD44 抗体添加培地で成熟培養した COCs における Cx43 mRNA の発現

eCG+pFF 区の培地を対照区とし、95%以上の GVBD が抑制された濃度である 5.0 µg/ml 抗ブタ CD44 モノクローナル抗体添加区で COCs を成熟培養し、0、3、6、12、24、36、48 時間後にサンプリング後、RNeasy Mini-Kit(Cat. No. 74104, QIAGEN K. K., 東京)および RNase-Free DNase Set(Cat. No. 79254, QIAGEN K. K., 東京)を用いて、RNA を抽出した。RT-PCR には Ready-To-Go RT-PCR beads(Cat. No. 27-9259-01, Amersham Pharmacia Biotech Inc, USA)を用いた。RT-PCR に用いた Cx43 のプライマーはマウスとヒトの cDNA のホモロジーの高い領域から設計した(sense: CTTCTATGTCTTCTTCAAGGG, anti-sense: TGGCTCTGCTGGAAGGTCGCT)。反応条件は 42 °C、20 分間→95°C、5 分間→(95°C、1 分間→55°C、1 分間→72°C、1 分間)×20 cycle で行った。このサイクル数は、半定量的 PCR を行うために、指数関数的増加上にあるサイクル数になるように最適化している。RT-PCR 後、得られた RT-PCR 産

物を 2%アガロースゲル(NuSieve 3:1 agarose, Cat. No. 50090, BMA product com., USA)で電気泳動を行い、0.5  $\mu\text{g/ml}$  エチジウムブロマイド(Cat. No.15585-011, Gibco BRL Life Technologies Inc, USA)染色によって検出した。さらに検出されたそれぞれのバンドの濃さを NIH イメージソフトによって定量し、同じサンプルの  $\beta$ -actin の値で除し、標準化することで発現量の定量を行った。

### COCsの抗ヒト・ラット Cx43 抗体による免疫蛍光染色

eCG+pFF 区の培地を対照区とし、5.0  $\mu\text{g/ml}$  抗ブタ CD44 モノクローナル抗体添加区で COCs を成熟培養し、0、6、12、24 時間後にサンプリングし、固定した。その後、ウサギの抗ヒト・ラットコネキシン 43 抗体(Cat. No. C6219, SIGMA, USA)による免疫蛍光染色を行った。固定および染色法は、前項の COCs の抗ブタ CD44 抗体による免疫蛍光染色に準じた。ただし、二次抗体は 200 倍希釈した Alexa Fluor 488 で標識されたヤギの抗ウサギ IgG 血清(Cat. No. A-11034, FMP, USA)を用いた。

### 抗ブタ CD44 抗体添加培地で成熟培養した COCs における免疫蛍光染色による脱リン酸化 Cx43 の検出

卵母細胞の成熟初期の段階でみられる、Cx 43 のリン酸化と GVBD との関わりを示す報告(Shimada ら, 2001)がみられたことから、CD44 抗体添加が Cx43 のリン酸化に影響を及ぼすかについて、脱リン酸化 Cx 43 のみを認識する抗マウス Cx 43 抗体(Cat. No.13-8300, Zymed Laboratories Inc., USA)を用いて免疫染色を行った。eCG+pFF 区の培地を対照区とし、5.0  $\mu\text{g/ml}$  抗ブタ CD44 モノクローナル抗体添加区で COCs を成熟培養し、0、3、6、12 時間後にサンプリングした。固定および染色法は、先に述べたの COCs の抗ヒト・

ラット Cx43 抗体による免疫蛍光染色法に準じた。一次抗体は 25 倍希釈した抗マウス Cx 43 抗体、二次抗体は 200 倍希釈した FITC 結合ヤギ抗マウス IgG 血清(ICN Pharmaceuticals Inc, USA)を用いた。

## 結 果

### COCs および OXCsにおける CD44 の局在

培養 0 時間と比較して、培養後 24 時間のそれぞれの実験区の COCs および OXCs では明らかに CD44 の強い発現を示し、特に eCG 区、pFF 区および eCG+pFF 区の卵丘細胞で強い発現がみられた(Fig. 19)。その局在は卵丘細胞の膜周囲、卵母細胞の膜周囲、透明帯の内側および卵母細胞と卵丘細胞の接触部でみられた(Fig. 20 および 21)。また一部の卵母細胞では細胞質内に不均一に局在していた。この細胞質における不均一な局在は、培養 0 時間の COCs あるいは健常でない卵母細胞にみられる傾向であった。

### 抗ブタ CD44 抗体添加による成熟培養

抗ブタ CD44 モノクローナル抗体添加培地で COCs を成熟培養した結果、対照区と比較し CD44 の濃度依存的に卵母細胞の成熟を示す MII 期像の割合が減少した(Fig. 22)。これと相対して GV 期の卵母細胞の割合が増加した。5.0  $\mu\text{g/ml}$  抗ブタ CD44 モノクローナル抗体添加区では 95%以上の卵母細胞が GV を保持し、MII への移行は完全に阻害された。一方、マウスの IgG を添加した対照区は GV および MII の割合に eCG+pFF 区と有意差がなかった。

### 抗ブタ CD44 抗体添加培地で成熟培養した COCs における Cx43 mRNA の発現

対照区およびCD44抗体添加区において Cx 43 mRNAの発現は培養後6時間までに増加し、その後減少する傾向がみられた(Fig. 23)。また培養後6時間で有意に高い発現量を示した無添加区に比較して、CD44抗体添加区では低い発現量を示した。

### **COCs における Cx43 の局在**

対照区および CD44 抗体添加区の両区において、Cx43 は培養 0 時間で弱い発現であり、培養後 6 時間で強くなり、その後徐々に減少する傾向がみられた(Fig. 24)。培養後 24 時間では eCG+pFF 区に比べ、CD44 モノクローナル抗体を添加した区で Cx43 の発現が強い傾向がみられた。この Cx43 の局在は卵丘細胞膜周囲、特に卵丘細胞間接触部にみられ、両区における局在の違いはみられなかった。

### **COCs における Cx43 の脱リン酸化**

対照区の多くで培養 6 時間以降で染色象を示すものが減少したのに対し、CD44 抗体添加区ではその後も染色象を示す COCs がみられた(Fig. 25)。この結果は、成熟過程にある COCs は培養 6 時間後にはリン酸化されていることを示していた。また成熟培地への抗 CD44 抗体の添加は 6 時間以降の Cx43 のリン酸化を抑制していることを示していた。



## 考 察

Campbell ら(1995)は免疫蛍光染色によりヒトの卵母細胞、卵丘細胞および着床前胚の細胞表面に CD44 が存在することを報告している。本章の結果でも CD44 は、ブタ COCs の卵丘細胞膜周囲、卵母細胞膜周囲および卵丘細胞と卵母細胞の接触部にみられ、Campbell らの報告と一致した。しかしながら第 2 章の RT-PCR の結果は、卵母細胞には CD44 mRNA が確認されなかった。この矛盾は次のように考えられる。CD44 の遺伝子解析の結果から、CD44 は多くのアイソフォームを持ち、選択的にスプライシングされる 20 カ所のエクソンがあることがわかっている。エクソン 1 から 7 までは細胞外ドメイン、エクソン 8 は膜貫通部位、エクソン 9 および 10 は細胞内ドメインでこの部位は選択的スプライシングを受け、細胞内の結合に影響を及ぼす。細胞外ドメインのエクソン 5 と 6 の間には多くの変異型エクソンが存在し、選択的にスプライシングされる(Ruiz ら, 1995)。本研究で設定した RT-PCR のプライマーはエクソン 3 から 10 にかけてのもので、この間には変異型エクソンが存在する。従って本研究で行った RT-PCR により卵丘細胞で検出された CD44 は、標準型 CD44 であると言える。この結果はヒトの卵丘細胞で標準型 CD44 の発現を免疫染色により確認している Ohta ら(1999)の結果にも一致する。卵母細胞で CD44 mRNA が検出されなかったのは、この変異型エクソンの存在による可能性が考えられる。

Ohta ら(1999)はヒトの顆粒膜細胞および卵丘細胞における CD44 の発現を標準型といくつかの変異型 CD44 を認識できる抗体で調べている。彼らは顆粒膜細胞より卵丘細胞で CD44 の強い発現を確認しており、CD44 が卵母細胞の成熟に関与していることを推察している。本章の結果でも抗 CD44 抗体添加により、卵母細胞の減数分裂再開における GVBD が阻害された。卵母細胞

の成熟が卵母細胞と卵丘細胞のギャップ結合を介して運ばれる成熟抑制因子に依存しているという従来の説を考慮すると、抗CD44抗体の添加がギャップ結合の切断を阻害するということが考えられる。そこで本章では卵母細胞と卵丘細胞間のギャップ結合タンパク質として考えられているCx43の発現に注目した。ごく最近、Ackertら(2001)はCx43ノックアウトマウスの卵母細胞は減数分裂能が欠失していることを報告している。またVozziら(2001)はCx43のアンチセンスcDNAを卵丘細胞に導入し、Cx43の発現を抑制すると卵母細胞の成熟率が抑制されることを報告している。これらは卵丘細胞と卵母細胞間のギャップ結合にCx43が重要な役割を果たしていることを示している。従って、卵丘細胞と卵母細胞間のギャップ結合の消失がCx43の発現量に依存し、CD44がこのCx43の発現を制御しているのではないかと考えた。つまり、抗CD44抗体添加により、消失するはずのCx43の発現がそのまま発現し続けているために卵母細胞の減数分裂の再開が誘導されないと考えた。本章の結果から、Cx43 mRNAの発現量は培養後3時間から6時間で急激に増加し、それ以降減少していた(Fig. 23)。このことからGVBDの誘起に一定量のCx43が必要であることが考えられた。しかし一方で抗CD44抗体の添加培養後の抗Cx43抗体による免疫蛍光染色の結果では、抗CD44抗体添加区と無添加区に顕著なCx43の発現量および局在の違いはみられなかった(Fig. 24)。Shimadaら(2001)は、卵丘細胞と卵母細胞間のギャップ結合がPKCおよびPI3キナーゼによるCx43のリン酸化に依存することを報告している。CD44はRASカスケードを介したMPFやセリンスレオニンキナーゼの活性化、これらによる細胞骨格の変化、PI3キナーゼの活性化、細胞内Ca<sup>2+</sup>の上昇を誘起することが報告されている。従って、CD44がCx43のリン酸化に関与している可能性も考えられる。本章での脱リン酸化Cx43を認識する抗体を用いた免疫染色による結果(Fig. 25)から、抗CD44抗体の添加培養によりCx43のリン酸化

が抑制されることが示された。このことからCD44は成熟に関与するCx43のリン酸化を制御していることが考えられた。

卵丘膨化時のDONによるHA合成阻害が卵母細胞の生存性を低下させたり(Chen ら, 1993)、培地へのHAおよびグリコサミノグリカンの添加が卵母細胞の退行を減少させ、発生率を上げることが報告されている(Kano ら, 1998)。Campbell ら(1995)の報告および本章での抗CD44抗体による免疫染色の結果から、卵母細胞および受精胚でCD44が発現していることが示された。このことからHAの卵母細胞あるいは受精胚の生存性および発生に及ぼす影響は、HA-CD44の結合によるものであることが考えられる。本章の結果から、実験に用いた抗ブタモノクローナル抗体は確実にブタCD44に反応していることが確認された。従って、卵母細胞あるいは受精胚の生存性および発生におけるCD44の役割についても、この抗体を用いて発現の確認をして、抗体添加の影響を調べることで、明らかにできる可能性がある。

以上、本章では卵母細胞成熟過程においてCOCsで発現しているCD44が減数分裂の再開に関与することが示された。またこの時CD44が卵丘細胞で発現しているCx43の発現動態を制御している可能性が考えられた。従って、卵母細胞成熟過程でCD44が卵丘膨化時の卵丘細胞間および卵丘細胞-卵母細胞間のギャップ結合の制御に関与しているのかについては、さらに調べる必要がある。

## 要 約

細胞膜に存在し、HA に結合能を持つ細胞外マトリックスレセプターである CD44 は、第 2 章において卵丘細胞で mRNA の発現が確認された。その発現は卵丘膨化を誘起する eCG および pFF により誘導あるいは促進され、has2 の発現動態と類似していたことから、CD44 の合成は卵丘細胞で合成される HA と同調していることが示唆された。このことから卵母細胞成熟過程において HA と CD44 の結合により何らかの生理的作用が発現すると考えられた。本章ではこれらについて明らかにすることを目的に、まず蛍光免疫染色法により COCs における CD44 の局在を調べた。さらに CD44 抗体存在下 (0.1, 0.5, 1, 5  $\mu\text{g/ml}$  の濃度) で体外成熟培養を行い、48 時間後にアセトオルセイン染色により核相判定を行い、成熟率を調べた。同時にこの条件下で、減数分裂に関与する細胞間ギャップ結合を構成するチャネルタンパク質である Cx43 の発現動態を経時的に調べた。

免疫染色の結果、CD44 は eCG および pFF 添加区で強く発現し (Fig. 19)、卵丘細胞の膜周囲、卵母細胞膜周囲あるいは透明帯の内側および卵母細胞と卵丘細胞の接触面でみられた (Fig. 20 および 21)。また一部の卵母細胞で CD44 は細胞質に不均一に局在していた。CD44 抗体添加区では対照区と比較し、GVBD を示した卵母細胞および MII へ移行した卵母細胞の割合が濃度依存的に減少した (Fig. 22)。特に 5  $\mu\text{g/ml}$  CD44 抗体添加区では 95% 以上で GVBD が抑制された。COCs における Cx43 の発現は卵丘細胞膜周囲で見られ、特に卵丘細胞間結合部で強く発現した (Fig. 24)。Cx43 mRNA の発現は成熟培養 0 時間では低かったが、培養後 6 時間までに上昇し、その後徐々に減少する傾向を示した (Fig. 23)。また Cx43 は 6 時間以降リン酸化された。

以上の結果から、CD44 は卵丘細胞膜周囲、卵母細胞膜周囲あるいは透

明帯の内側および卵母細胞と卵丘細胞の接触部に局在することが明らかとなった。CD44 抗体存在下で成熟培養を行った場合、卵母細胞の減数分裂再開における GV 期から GVBD への移行が阻害された。また卵母細胞成熟過程でギャップ結合タンパク質である Cx43 の発現動態(発現量やリン酸化の状態)が変化しており、CD44 がこの Cx43 の発現量に関与している可能性が示された。



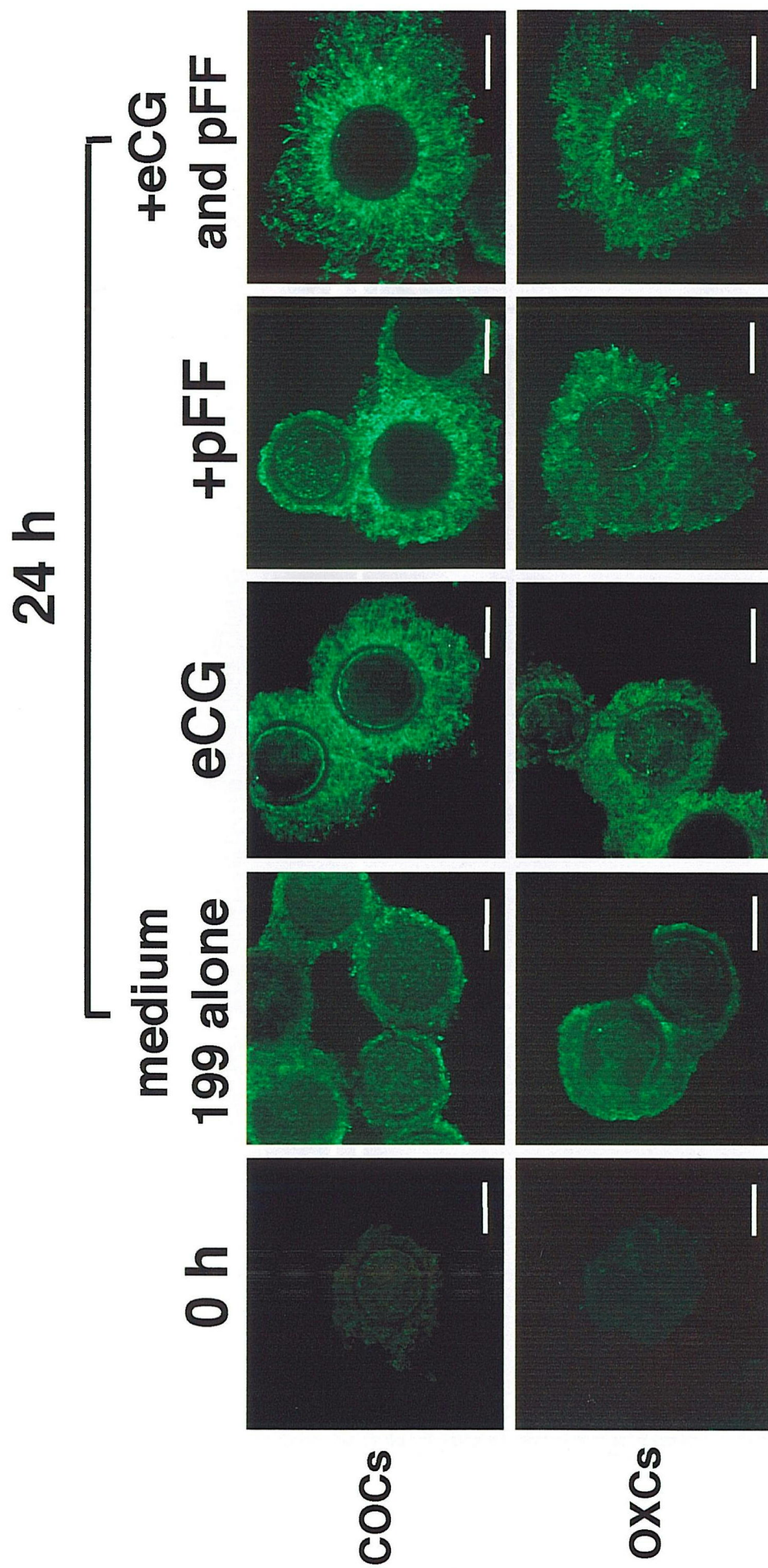


Fig. 19. Detection of CD44 by indirect immunofluorescence staining in porcine COCs and OXCs cultured in medium supplemented with or without eCG and pFF for 24 h. Selected sections were obtained by laser scanning confocal microscopy. Bar = 100  $\mu$ m.



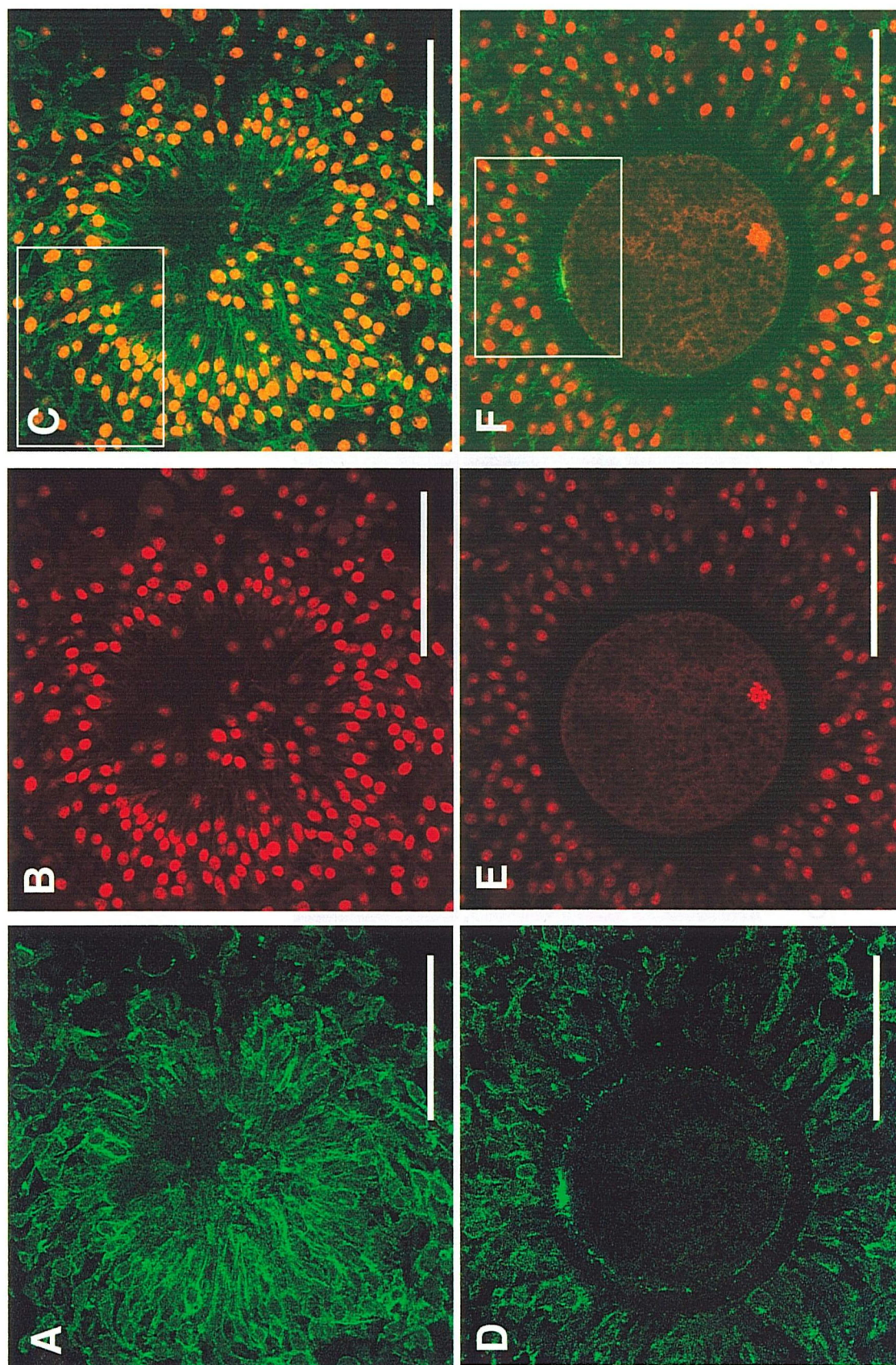


Fig. 20. Localization of CD44 by double staining with immunofluorescence (FITC: A and D) and propidium iodide (B and E) in cumulus expanded COCs at 24 h after culture in medium supplemented with eCG and pFF. Selected sections were obtained by laser scanning confocal microscopy. A, B and C (the same section): the surface of COCs; D, E and F (the same section): the cross section of COCs. C is overlay of A and B. F is overlay of D and E. The area surrounded by the line was shown in Fig. 20. Bar = 100  $\mu$ m.



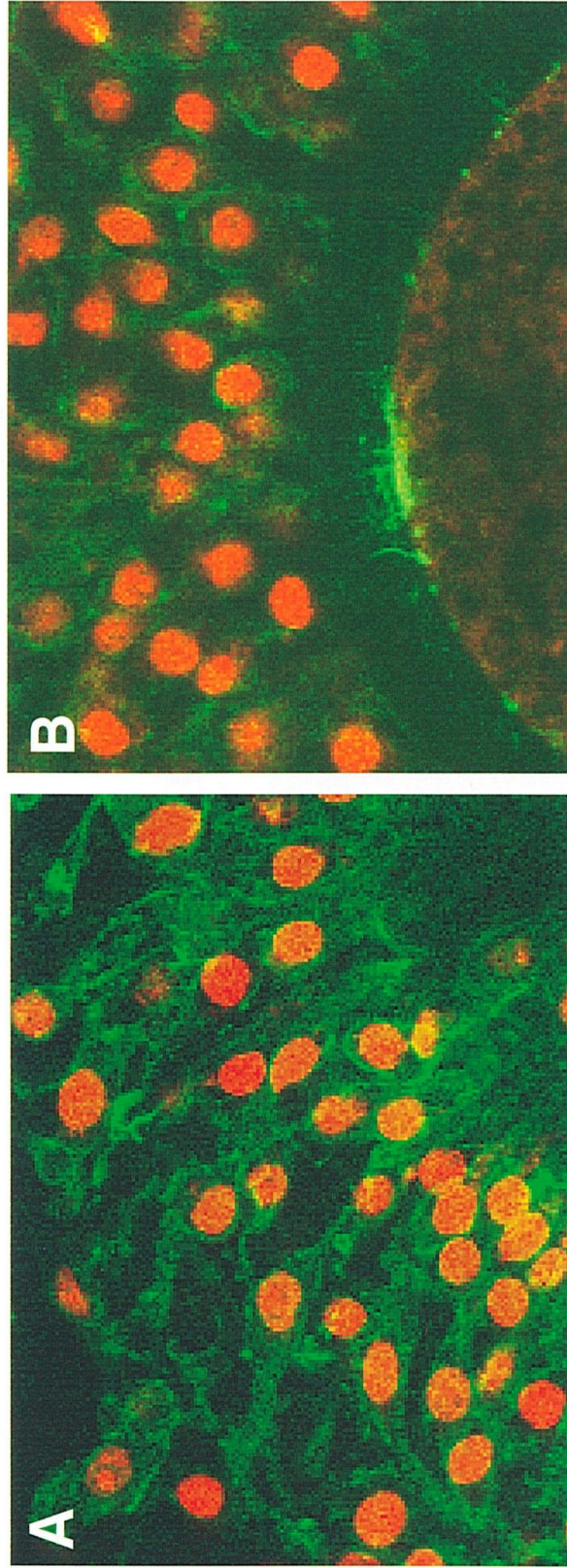


Fig. 21. High magnification of Fig. 20 C and F. A: Fig. 20 C.; B: Fig. 20 F.



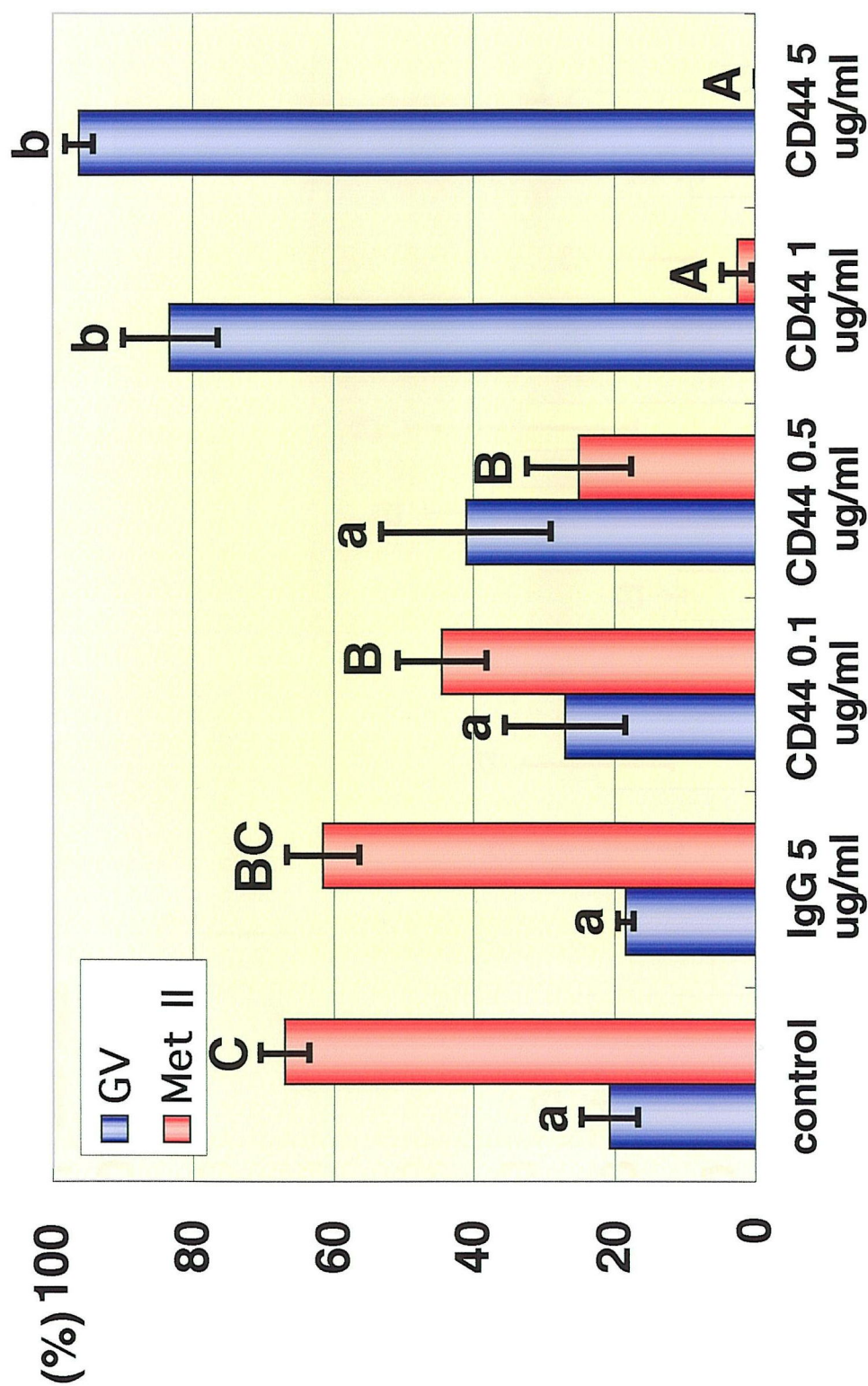


Fig. 22. Effect of anti-porcine CD44 antibody on *in vitro* maturation of porcine COCs. COCs were cultured with CD44 antibody (0.1, 0.5, 1, 5  $\mu$ g/ml) for 48 hours. Bars with no common letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) among each treatment.

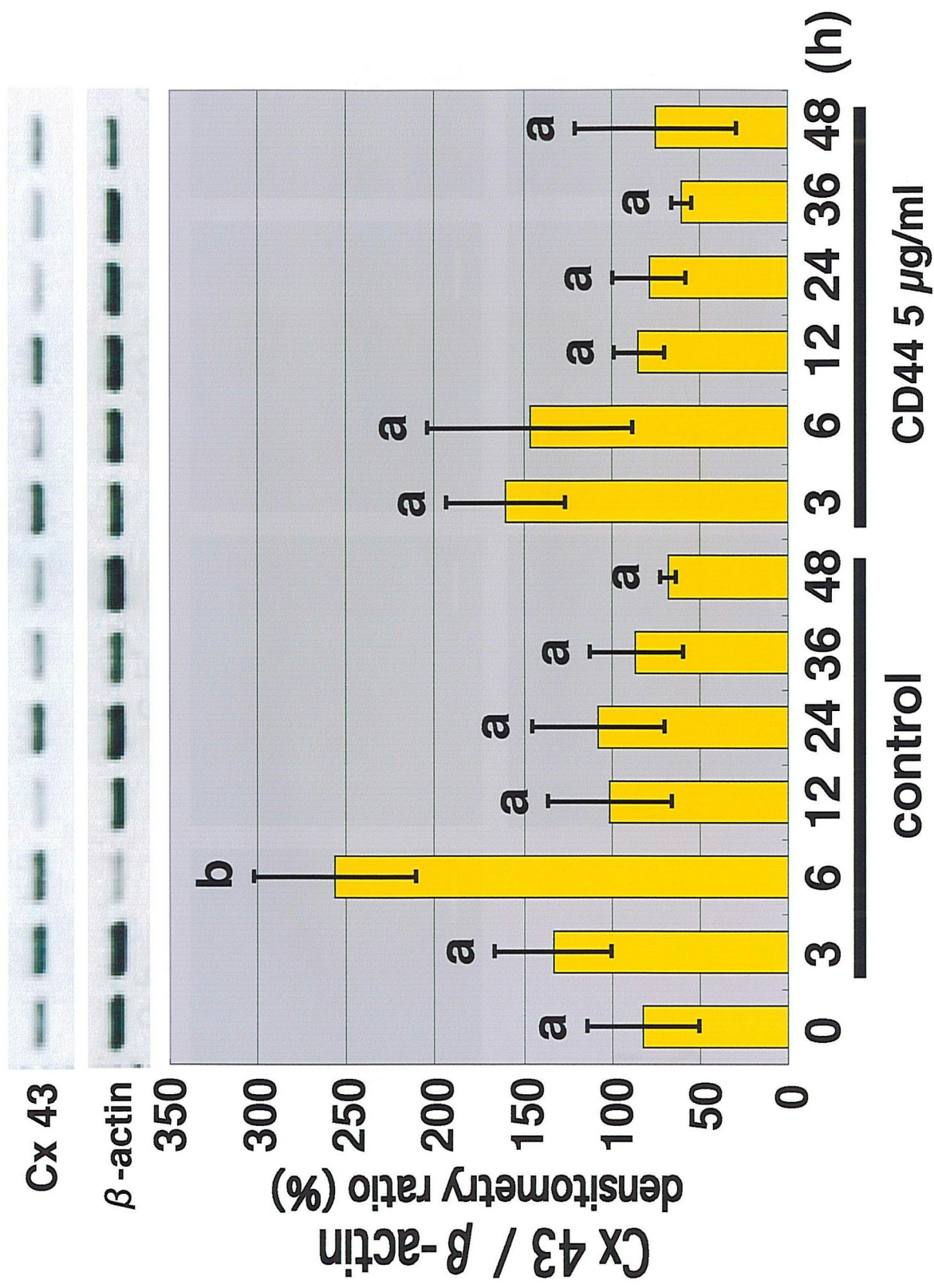


Fig. 23. Effect of anti-porcine CD44 antibody on expression of connexin 43 mRNAs in porcine COCs during in vitro maturation.



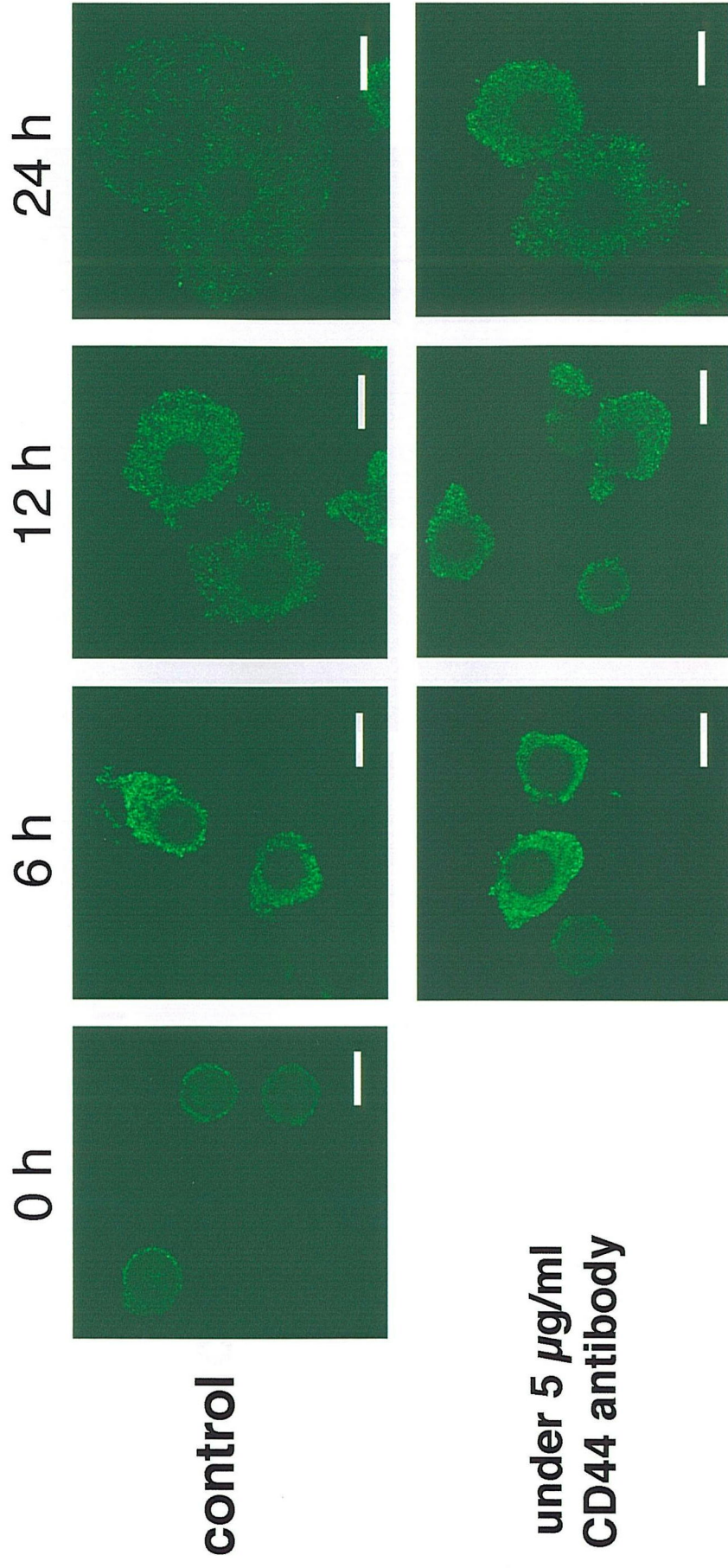


Fig. 24. Detection of connexin43 by indirect immunofluorescence staining in porcine COCs cultured in medium supplemented with or without 5 $\mu\text{g/ml}$  CD44 antibody. Selected sections were obtained by laser scanning confocal microscopy. Bar = 100  $\mu\text{m}$ .

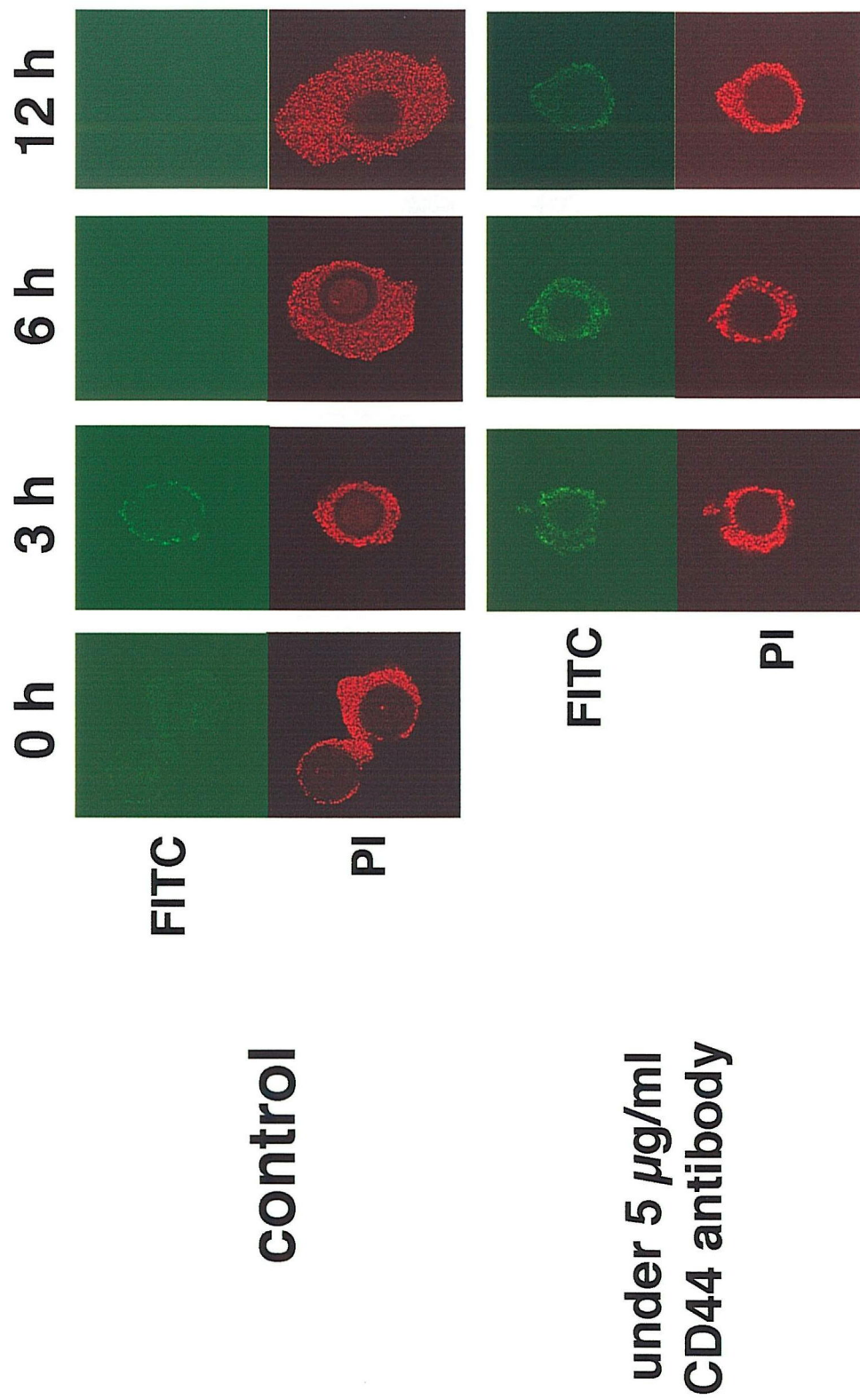


Fig. 25. Detection of connexin 43 by double staining with immunofluorescence and propidium iodide in porcine COCs cultured in medium supplemented with or without 5  $\mu\text{g/ml}$  CD44 antibody. Selected sections were obtained by laser scanning confocal microscopy.

## 総 括

## COCs における卵丘膨化の制御機構

第 1 章の結果から、eCG および pFF はブタ COCs における卵丘膨化を誘起し、特に eCG および pFF の同時添加によって著しい膨化が誘起された。この eCG の作用は FSH の作用であることがわかった。膨化に及ぼす卵母細胞の影響は特に eCG 添加区でみられたことから FSH 作用を介したものであることが示された。

卵丘膨化は、HA を主としたグリコサミノグリカンやプロテオグリカンを含む卵丘細胞外マトリックス構成成分の合成と、それらの卵丘細胞間への保持により成り立つ。*in vitro* における卵丘膨化の誘起には、FSH、血清、卵母細胞(由来の因子)が必須の因子であることが、主にマウスを用いた実験で報告されている(Eppig, 1979; Salustri ら, 1989; Eppig, 1980; Buccione ら, 1990; Salustri ら, 1990)。これらの因子の役割として、FSH は卵丘細胞における HA 合成を誘導すること(Eppig, 1979; Salustri ら, 1989)、血清は卵丘細胞外マトリックスの維持に関与すること(Eppig, 1980; Chen ら, 1992)、卵母細胞は卵丘細胞における HA 合成に関与すること(Buccione ら, 1990; Salustri ら, 1990; Tirone ら, 1997; Elvin ら, 1999)が報告されている。本研究の結果では、ブタ COCs の卵丘膨化には、血清および卵母細胞は必須の因子ではないことが示された。しかし eCG や FSH のみの添加区では pFF 区および pFF+eCG 区と比較し、膨化の程度が著しく減少した。また OXCs では COCs に比較し卵丘膨化の程度が 80%程度に減少した。このことから、pFF と卵母細胞は卵丘膨化を促進し、*in vivo* に見られるような十分な卵丘膨化の誘起に必須であることが考えられた。pFF は卵胞内細胞、特に顆粒膜細胞の分泌液と卵巣内血管から滲出した血漿成分から成り立ち(Edwards, 1974)、ブタの体外培養系に血清の代わりに用いられている(Naito ら, 1988; Yoshida ら, 1992; Funahashi ら, 1994; Miyoshi ら 1999)。この pFF には卵丘膨化促進作用があることが報告さ



れている(Yoshida ら, 1992; Daen ら, 1994)。この他、排卵直前卵胞液中には卵丘細胞外マトリックスの安定化に関わる因子 inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor が含まれていることが報告されている(Chen ら, 1992)。また顆粒膜細胞あるいは卵丘細胞では、HA と inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor ファミリーとの結合による卵丘細胞外マトリックスの安定化に参与する link protein(Camaioni ら, 1996; Kobayashi ら, 1999)、TSG-6(Fulop ら, 1997)、顆粒膜細胞由来の因子(Chen ら, 1996)が合成されていることが報告されている。これらのことから、pFF には卵丘細胞外マトリックス構成成分の合成と、卵丘細胞外マトリックスの維持の両作用があるものと考えられる。以上、本研究で検討した卵丘膨化促進因子と卵丘膨化との関係について Fig. 26 にまとめた。

#### COCs における HA 合成酵素

第 2 章の結果から、卵丘細胞では *has2* mRNA が発現し、その発現は卵丘膨化を誘起する eCG および pFF により誘導あるいは促進された。この *has2* の発現は FSH 依存性であり、卵母細胞の影響を受けていた。これらの結果から、卵丘膨化時の HA 合成はこの卵丘細胞で発現している *has2* によるものであることが明らかとなった。一方、卵母細胞で発現している *has3* mRNA の発現動態は *has2* と異なっていた。第 3 章では、卵母細胞で発現しているブタ *has3* cDNA の塩基配列および推定アミノ酸残基を明らかにした。この *has3* は RNA 合成の盛んな卵母細胞においてより強く発現し、受精後低下することが明らかとなった。

本研究から、卵細胞成熟過程において *has2* は卵丘膨化の HA 合成を担うものであることが明らかとなったが、*has3* の役割については明らかでなかった。最近の *HAS* 遺伝子ノックアウトマウスに関する報告では、*Has2* ホモ変異体は胎生期 9.5 日から 10.5 日で致死であるのに対し、*Has1* および *Has3*

についてはホモ変異体でも外見上正常に発生することが報告されている (Spicer と Nguyen, 1999; 板野ら, 1998)。この他の報告からも、HAS2 が HAS ファミリーの中では最も重要な生理的役割を果たしているように考えられる。しかしながら、ヒト卵巣における HAS のノーザンブロット解析の結果では HAS2 に比較して HAS1 および HAS3 の強い発現が確認され (Spicer と McDonald, 1998)、HAS2 の発現量は非常に微量であることが考えられた。従って、ブタ卵母細胞で発現している *has3* は、何らかの卵巣内機能を果たしているものと考えられ、今後さらなる解析が必要である。以上、本研究で検討した卵丘膨化促進因子と *has* の発現との関係について Fig. 27 にまとめた。

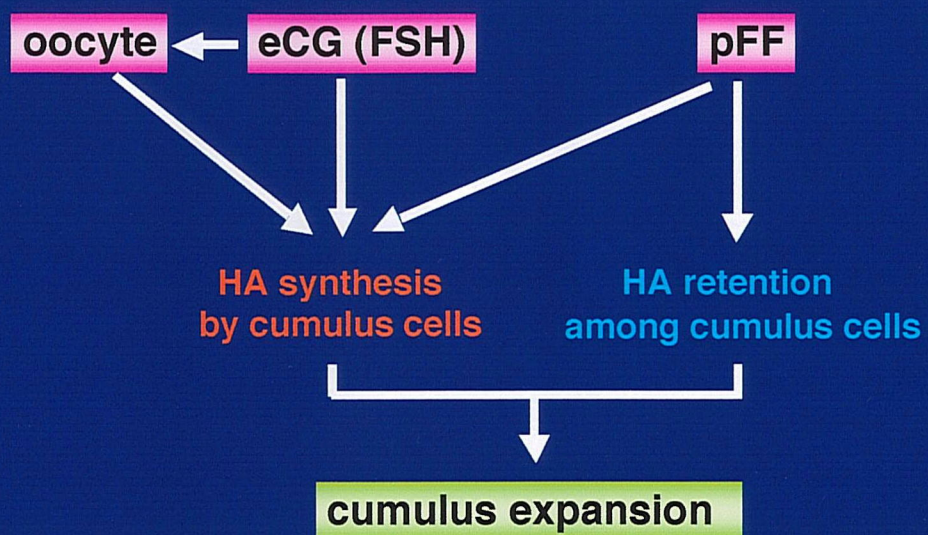
#### 卵母細胞成熟過程における CD44 の役割

第 2 章および第 4 章の結果から、卵丘膨化時に卵丘細胞膜周囲、卵母細胞膜周囲あるいは透明帯の内側および卵母細胞と卵丘細胞の接触部で発現している CD44 は、卵母細胞の減数分裂における GV 期から GVBD への移行に関与していることが明らかとなった。

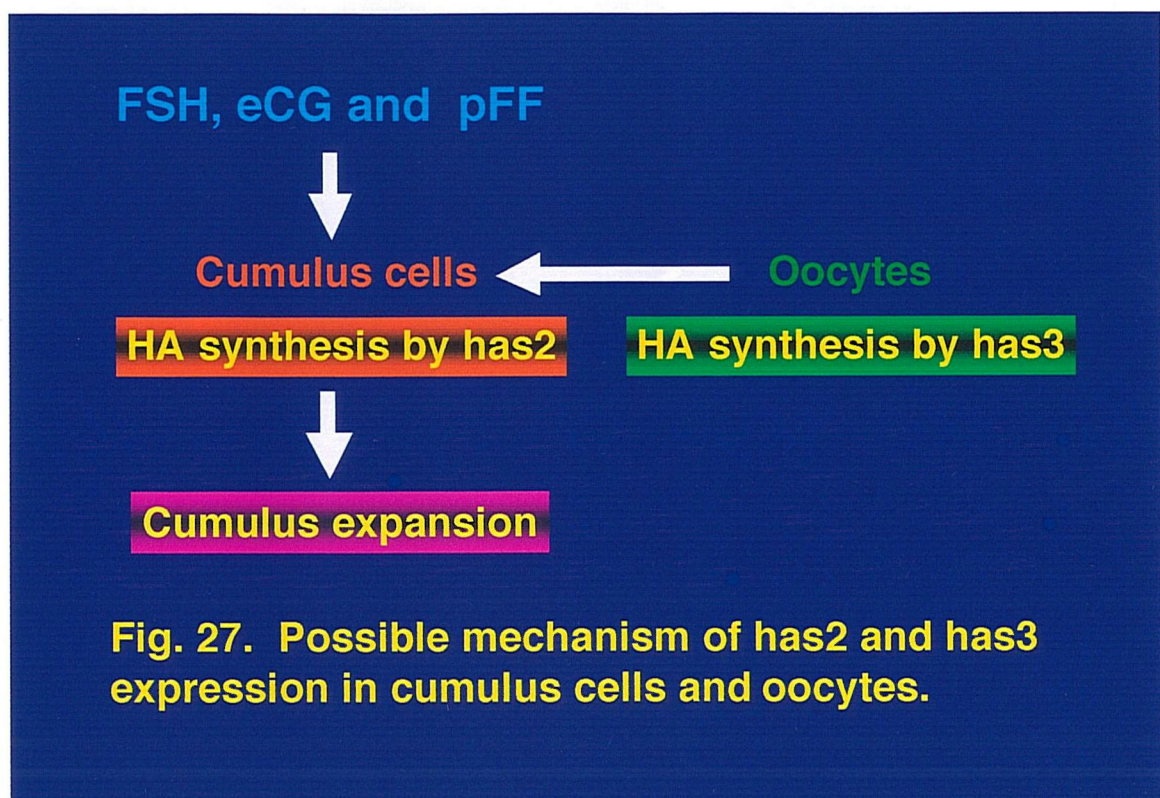
そこで第 4 章では、この CD44 が卵母細胞成熟過程における卵母細胞と卵丘細胞間のギャップ結合の変化に関与しているのではないかと考えた。そして卵母細胞と卵丘細胞間の重要なギャップ結合タンパク質である Cx43 の発現動態に注目した。成熟培地への抗 CD44 抗体添加実験から CD44 が Cx43 の発現量やリン酸化状態へ関与していることを示す結果が得られた。従って今後この CD44 が HA との結合を介し、卵丘膨化時の卵丘細胞間および卵丘細胞-卵母細胞間のギャップ結合の制御にどのように関与しているのか、あるいは CD44 がどのように卵母細胞の減数分裂に関与しているのかについて、さらなる解析が必要であろう (Fig. 28)。



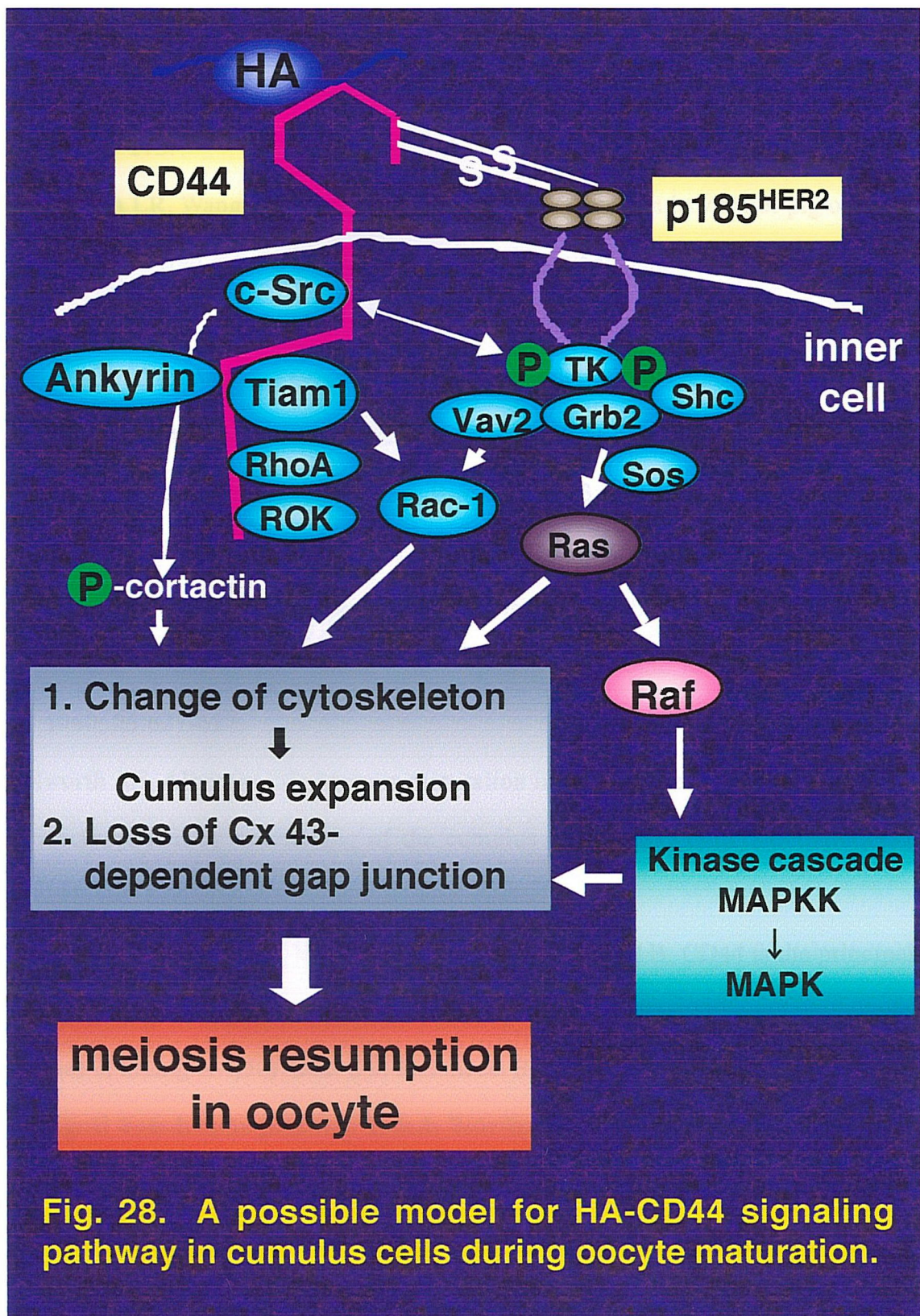
以上から、本研究では卵母細胞成熟過程でみられる卵丘膨化を引き起こす HA と HA レセプターである CD44 の産生調節機構およびその生理的役割を明らかにした。その結果、卵丘膨化時の HA 合成は卵丘細胞で発現している HA 合成酵素 *has2* によるものであり、この時卵丘細胞で発現している CD44 は卵母細胞の減数分裂再開に重要な役割をなすものと考えられた。一方、卵母細胞で発現しているブタ *has3* cDNA の塩基配列および推定アミノ酸残基を明らかにし、卵母細胞でも HA を合成している可能性が初めて示された。



**Fig. 26. Overall feature of inducible factors in porcine cumulus expansion.**







**Fig. 28. A possible model for HA-CD44 signaling pathway in cumulus cells during oocyte maturation.**

## 参考文献

- Abeydeera LR. In vitro production of embryos in swine. *Theriogenology* 2002; 57:256-273.
- Abeydeera LR, Wang WH, Prather RS, Day BN. Maturation in vitro of pig oocytes in protein-free culture media: fertilization and subsequent embryo development in vitro. *Biol Reprod* 1998; 58:1316-1320.
- Ackert CL, Gittens JE, O'Brien MJ, Eppig JJ, Kidder GM. Intercellular communication via connexin43 gap junctions is required for ovarian folliculogenesis in the mouse. *Dev Biol* 2001; 233:258-270.
- Ainsworth L, Tsang BK, Downey BR, Marcus GJ, Armstrong DT. Interrelationships between follicular fluid steroid levels, gonadotropic stimuli, and oocyte maturation during preovulatory development of porcine follicles. *Biol Reprod* 1980; 23:621-627.
- Allworth AE, Albertini DF. Meiotic maturation in cultured bovine oocytes is accompanied by remodeling of the cumulus cell cytoskeleton. *Dev Biol* 1993; 158:101-112.
- Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 1990; 61:1303-1313.
- Avruch J, Zhang X-f, Kyriakis JM. Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway. *Trends Biochem Sci* 1994 ; 19:279-283.
- Ball GD, Leibfried ML, Lenz RW, Ax RL, Bavister BD, First NL. Factors affecting successful in vitro fertilization of bovine follicular oocytes. *Biol Reprod* 1983; 28:717-725.
- Buccione R, Vanderhyden BC, Caron PJ, Eppig JJ. FSH-induced expansion of the

- mouse cumulus oophorus in vitro is dependent upon a specific factor(s) secreted by the oocyte. *Dev Biol* 1990; 138:16-25.
- Camaioni A, Hascall VC, Yanagishita M, Salustri A. Effects of exogenous hyaluronic acid and serum on matrix organization and stability in the mouse cumulus cell-oocyte complex. *J Biol Chem* 1993; 268:20473-20481.
- Camaioni A, Salustri A, Yanagishita M, Hascall VC. Proteoglycans and proteins in the extracellular matrix of mouse cumulus cell-oocyte complexes. *Arch Biochem Biophys* 1996; 325, No. 2:190-198.
- Campbell S, Swann HR, Aplin JD, Seif MW, Kimber SJ, Elstein M. CD44 is expressed throughout pre-implantation human embryo development. *Hum Reprod* 1995; 10:425-430.
- Chen HL, Marcinkiewicz JL, Sancho-Tello M, Hunt JS, Terranova PF. Tumour necrosis factor- $\alpha$  gene expression in mouse oocytes and follicular cells. *Biol Reprod* 1993; 48:707-714.
- Chen L, Mao SJT, Larsen WJ. Identification of a factor in fetal bovine serum that stabilizes the cumulus extracellular matrix: a role for a member of the inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor family. *J Biol Chem* 1992; 267:12380-12386.
- Chen L, Mao SJ, McLean LR, Powers RW, Larsen WJ. Proteins of the inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor family stabilize the cumulus extracellular matrix through their direct binding with hyaluronic acid. *J Biol Chem* 1994; 269:28282-28287.
- Chen L, Russell PT, Larsen WJ. Functional significance of cumulus expansion in the mouse: Roles for the preovulatory synthesis of hyaluronic acid within the cumulus mass. *Mol Reprod Dev* 1993; 34:87-93.
- Chen L, Zhang H, Powers RW, Russell PT, Larsen WJ. Covalent linkage between proteins of the inter- $\alpha$ -inhibitor family and hyaluronic acid is mediated by a



- factor produced by granulosa cells. *J Biol Chem* 1996; 271:19409-19414.
- Cherr GN, Yudin AI, Li MW, Vines CA, Overstreet JW. Hyaluronic acid and the cumulus extracellular matrix induce increases in intracellular calcium in macaque sperm via the plasma membrane protein PH-20. *Zygote* 1999; 7:211-222.
- Daen FP, Sato E, Naito K, Toyoda Y. The effect of pig follicular fluid fractions on cumulus expansion and male pronucleus formation in porcine oocytes matured and fertilized in vitro. *J. Reprod Fertil* 1994; 101:667-673.
- Daum G, Eisenmann-Tappe I, Fries HW, Troppmair J, Rapp UR. The ins and outs of Raf kinases. *Trends Biochem Sci* 1994; 19:474-480.
- Dekel N, Kraicer PF. Induction in vitro of mucification of rat cumulus oophorus by gonadotrophins and adenosine 3', 5'-monophosphate. *Endocrinology* 1978; 102:1797-1802.
- Dekel N, Phillips DM. Maturation of the rat cumulus oophorus; A scanning electron microscopic study. *Biol Reprod* 1979; 21:9-18.
- Ding J, Foxcroft GR. Epidermal growth factor enhances oocyte maturation in pigs. *Mol Reprod Dev* 1994; 39:30-40.
- Downs SM. Specificity of epidermal growth factor action on maturation of the murine oocyte and cumulus oophorus in vitro. *Biol Reprod* 1989; 41:371-379.
- Downs SM, Coleman DL, Ward-Bailey PF, Eppig JJ. Hypoxanthine is the principal inhibitor of murine oocyte maturation in a low molecular weight fraction of porcine follicular fluid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82:454-458.
- Downs SM, Eppig JJ. Cyclic adenosine monophosphate and ovarian follicular fluid act synergistically to inhibit mouse oocyte maturation. *Endocrinology*. 1984; 114:418-427.

- Downs SM, Hunzicker-Dunn M. Differential regulation of oocyte maturation and cumulus expansion in the mouse oocyte-cumulus cell complex by site-selective analogs of cyclic adenosine monophosphate. *Dev Biol* 1995; 172:72-85.
- Edwards RG. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature* 1965; 208:349-351.
- Edward RG. Follicular fluid. *J Reprod Fertil* 1974; 37:189-219.
- Elvin JA, Clark AT, Wang P, Wolfman NM, Matzuk MM. Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Mol Endocrinol* 1999; 13:1035-1048.
- Eppig JJ. Role of serum in FSH stimulated cumulus expansion by mouse oocyte-cumulus cell complexes in vitro. *Biol Reprod* 1980; 22:629-633.
- Eppig JJ. FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte-cumulus cell complexes from mouse preovulatory follicles. *Nature* 1979; 281:483-485.
- Esford LE, Maiti A, Bader SA, Tufaro F, Johnson P. Analysis of CD44 interactions with hyaluronan in murine L cell fibroblasts deficient in glycosaminoglycan synthesis: a role for chondroitin sulfate. *J Cell Sci* 1998; 111:1021-1029.
- Fulop C, Kamath RV, Li Y, Otto JM, Salustri A, Olsen BR, Glant TT, Hascall VC. Coding sequence, exon-intron structure and chromosomal localization of murine TNF-stimulated gene 6 that is specifically expressed by expanding cumulus cell-oocyte complexes. *Gene* 1997; 202:95-102.
- Fulop C, Salustri A, Hascall VC. Coding sequence of a hyaluronan synthase homologue expressed during expansion of the mouse cumulus-oocyte complex. *Arch Biochem Biophys* 1997; 337:261-266.
- Funahashi H, Cantley T, Day BN. Different hormonal requirements of pig oocyte-cumulus complexes during maturation in vitro. *J Reprod Fertil* 1994; 101:159-



- Furnus CC, de Matos DG, Moses DF. Cumulus expansion during in vitro maturation of bovine oocytes: relationship with intracellular glutathione level and its role on subsequent embryo development. *Mol Reprod Dev* 1998; 51:76-83.
- Hess KA, Chen L, Larsen WJ. Inter- $\alpha$ -inhibitor binding to hyaluronan in the cumulus extracellular matrix is required for optimal ovulation and development of mouse oocytes. *Biol Reprod* 1999; 61:436-443.
- Hizaki H, Segi E, Sugimoto Y, Hirose M, Saji T, Ushikubi F, Matsuoka T, Noda Y, Tanaka T, Yoshida N, Narumiya S, Ichikawa A. Abortive expansion of the cumulus and impaired fertility in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP<sub>2</sub>. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:10501-10506.
- Hsu CJ, Hammond JM Concomitant effects of growth hormone on secretion of insulin-like growth factor I and progesterone by cultured porcine granulosa cells. *Endocrinology* 1987; 121:1343-1348.
- Ijuin C, Ohno S, Tanimoto K, Honda K, Tanne K. Regulation of hyaluronan synthase gene expression in human periodontal ligament cells by tumour necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$  and interferon- $\gamma$ . *Arch Oral Biol* 2001; 46:767-772.
- Inoue M, Naito K, Aoki F, Toyoda Y, Sato E. Activation of mitogen-activated protein kinase during meiotic maturation in porcine oocytes. *Zygote* 1995; 3:265-271.
- Inoue M, Naito K, Nakayama T, Sato E. Mitogen-activated protein kinase translocates into the germinal vesicle and induces germinal vesicle breakdown in porcine oocytes. *Biol Reprod* 1998; 58:130-136.

- Isobe N, Maeda T, Terada T. Involvement of meiotic resumption in the disruption of gap junctions between cumulus cells attached to pig oocytes J Reprod Fertil. 1998; 113:167-172.
- Itahana K, Morikazu Y, Takeya T. Differential expression of four connexin genes, Cx-26, Cx-30.3, Cx-32, and Cx-43, in the porcine ovarian follicle. Endocrinology 1996; 137:5036-5644.
- Itahana K, Tanaka T, Morikazu Y, Komatu S, Ishida N, Takeya T. Isolation and characterization of a novel connexin gene, Cx-60, in porcine ovarian follicles. Endocrinology 1998; 139:320-329.
- Itano N, Kimata K. Expression cloning and molecular characterization of HAS protein, a eukaryotic hyaluronan synthase. J Biol Chem 1996; 271:9875-9878.
- Itano N, Sawai T, Yoshida M, Lenas P, Yamada Y, Imagawa M, Shinomura T, Hamaguchi M, Yoshida Y, Ohnuki Y, Miyauchi S, Spicer AP, McDonald JA, Kimata K. Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. J Biol Chem 1999; 274:25085-25092.
- 板野直樹, 吉田衛, 木全弘治. ヒアルロン酸合成酵素: 遺伝子改変によるヒアルロン酸機能解析. 蛋白質 核酸 酵素 1998; 43, No. 16:2387-2393.
- Kano K, Miyano T, Kato S. Effects of glycosaminoglycans on the development of in vitro-matured and -fertilized porcine oocytes to the blastocyst stage in vitro. Biol Reprod 1998; 58:1226-1232.
- Kobayashi H, Sun GW, Hirashima Y, Terao T. Identification of link protein during follicle development and cumulus cell cultures in rats. Endocrinology 1999; 140:3835-3842.
- Kobayashi K, Yamashita S, Hoshi H. Influence of epidermal growth factor and transforming growth factor- $\alpha$  on in vitro maturation of cumulus cell-enclosed

- bovine oocytes in a defined medium. *J Reprod Fertil* 1994; 100:439-446.
- Kosako H, Gotoh Y, Nishida E. Requirement for the MAP kinase kinase/MAP kinase cascade in *Xenopus* oocyte maturation. *EMBO J* 1994; 13:2131-2138.
- Kunundson W, Kunundson CB. ヒアルロン酸レセプター、CD44. GlycoForum/GlycoScience/Science of Hyaluronan 1999 年; <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA10/HA10J.html>
- Kuroda K, Utani A, Hamasaki Y, Shinkai H. Up-regulation of putative hyaluronan synthase mRNA by basic fibroblast growth factor and insulin-like growth factor-1 in human skin fibroblasts. *J Dermatol Sci* 2001; 2:156-160.
- Larsen WJ, Chen L, Powers R, Zhang H, Russell PT, Chambers C, Hess K, Flick R. Cumulus expansion initiates physical and developmental autonomy of the oocyte. *Zygote* 1996; 4:335-341.
- Larsen WJ, Wert SE, Brunner GD. A dramatic loss of cumulus cell gap junctions is correlated with germinal vesicle breakdown in rat oocytes. *Dev Biol* 1986; 113:517-521.
- Lesley J, Hyman R, Kincade PW. CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv Immunol* 1993;54:271-335.
- Liu N, Gao F, Han Z, Xu X, Underhill CB, Zhang L. Hyaluronan synthase 3 overexpression promotes the growth of TSU prostate cancer cells. *Cancer Res* 2001; 61:5207-5214.
- Mahi-Brown CA, and Yanagimachi R. Parameters influencing ovum pickup by oviductal fimbria in the golden hamster. *Gamate Res* 1983; 8:1-10.
- Manthey D, Bukauskas F, Lee CG, Kozak CA, Willecke K. Molecular cloning and functional expression of the mouse gap junction gene connexin-57 in human HeLa cells. *J Biol Chem* 1999; 274:14716-14723.

- Meyer K, Palmer JW. The polysaccharide of the vitreous humor. *J. Biol. Chem* 1934; 107:629-634.
- Miyoshi K, Umezu M, Sato E. Effect of hyaluronic acid on the development of porcine 1-cell embryos produced by a conventional or new in vitro maturation/fertilization system. *Theriogenology* 1999; 51:777-784.
- 永井 卓. II 卵子の培養法：ブタ. 生殖機能細胞の培養法(菅原七郎・尾川昭三編, (株) 学会出版センター). 1993 年:99-110.
- Naito K, Fukuda Y, Toyoda Y. Effects of porcine follicular fluid on male pronucleus formation in porcine oocytes matured in vitro. *Gamete Res* 1988; 21:289-295.
- Nakayama T, Inoue M, Sato E. Effect of oocyectomy on glycosaminoglycan composition during cumulus expansion of porcine cumulus-oocyte complexes cultured in vitro. *Biol Reprod* 1996; 55:1299-1304.
- Narendra PS and Ralph ES. A novel technique for viable cell determinations. *Stain Technology* 1986; 61:315-319.
- Naz RK, Zhu X, Menge AC. Expression of tumour necrosis factor-alpha and its receptors type I and type II in human oocytes. *Mol Reprod Dev* 1997; 47:127-133.
- Niwa K. Effectiveness of in vitro maturation and in vitro fertilization techniques in pigs. *J Reprod Fertil Suppl.* 1993; 48:49-59.
- Nuttinck F, Peynot N, Humblot P, Massip A, Dessy F, Flechon JE. Comparative immunohistochemical distribution of connexin 37 and connexin 43 throughout folliculogenesis in the bovine ovary. *Mol Reprod Dev.* 2000; 57:60-66.
- Ohta N, Saito H, Kuzumaki T, Takahashi T, Ito MM, Saito T, Nakahara K, Hiroi M. Expression of CD44 in human cumulus and mural granulosa cells of individual

- patients in in-vitro fertilization programmes. *Mol Hum Reprod* 1999; 5:22-28.
- Petters RM, Wells KD. Culture of pig embryos. *J Reprod Fertil Suppl* 1993; 48:61-73.
- Pienimäki JP, Rilla K, Fulop C, Sironen RK, Karvinen S, Pasonen S, Lammi MJ, Tammi R, Hascall VC, Tammi MI. Epidermal growth factor activates hyaluronan synthase 2 in epidermal keratinocytes and increases pericellular and intracellular hyaluronan. *J Biol Chem* 2001; 276:20428-20135.
- Pincus E and Enzmann EV. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and vitro. I The activation of ovarian eggs. *J. Exp. Med* 1935; 62:665-675.
- Prochazka R, Nagyova E, Brem G, Schellander K, Motlik J. Secretion of cumulus expansion-enabling factor (CEEf) in porcine follicles. *Mol Reprod Dev* 1998; 49:141-149.
- Prochazka R, Nagyova E, Rimkeviciova Z, Nagai T, Kikuchi K, Motlik J. Lack of effect of oocyectomy on expansion of the porcine cumulus. *J. Reprod Fertil* 1991; 93:569-576.
- Racowsky C, Baldwin KV. In vitro and in vivo studies reveal that hamster oocyte meiotic arrest is maintained only transiently by follicular fluid, but persistently by membrana/cumulus granulosa cell contact. *Dev Biol* 1989; 134:297-306.
- Ralph JH, Telfer EE, Wilmot I. Bovine cumulus cell expansion does not depend on the presence of an oocyte secreted factor. *Mol Reprod Dev* 1995; 42:248-253.
- Reed ML, Illera Mj, Petters RM. In vitro culture of pig embryos. *Theriogenology* 1992; 37:95-109.
- Ruiz P, Schwarzler C, Gunthert U. CD44 isoforms during differentiation and development. *BioEssays* 1995; 17:17-24.
- Salustri A, Camaioni A, Di Giacomo M, Fulop C, Hascall VC. Hyaluronan and

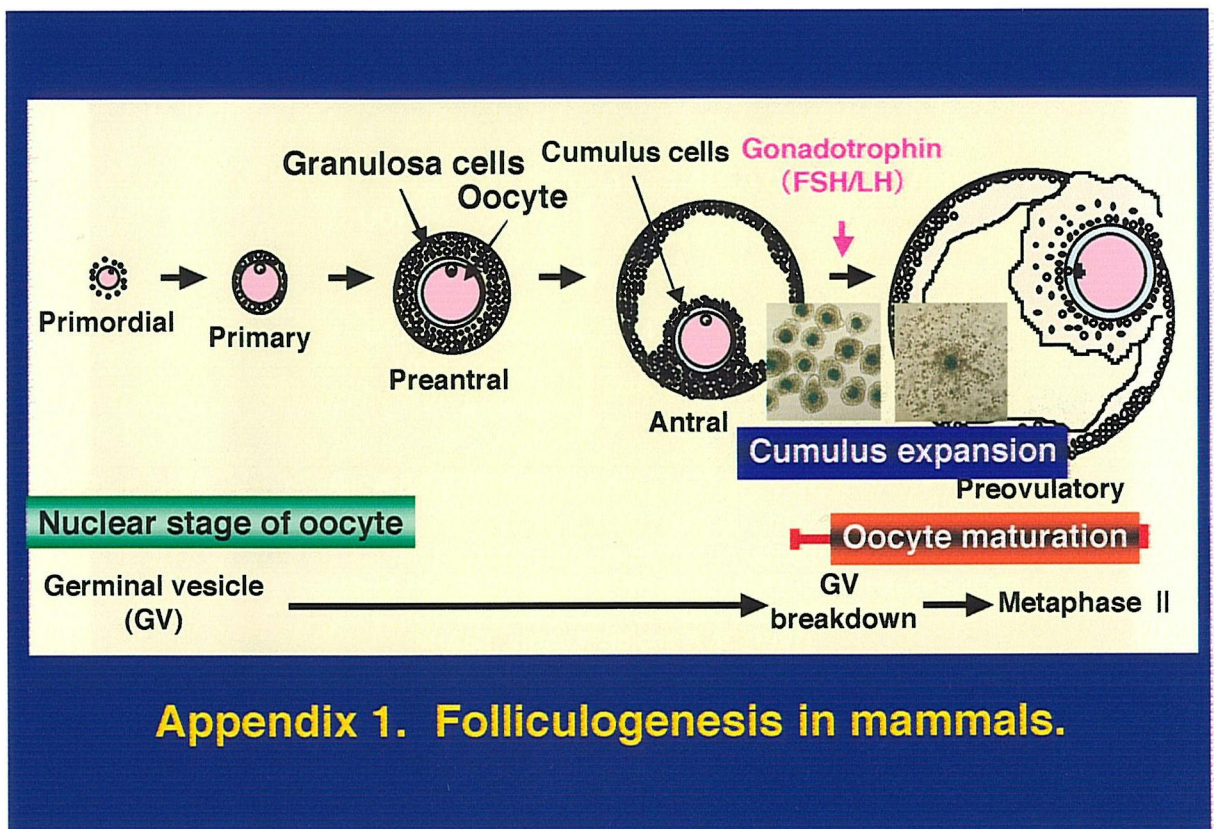
- proteoglycans in ovarian follicles. Hum Reprod Update 1999; 5:293-301.
- Salustri A, Petrungaro S, De Felici M, Conti M, Siracusa G. Effect of follicle-stimulating hormone on cyclic adenosine monophosphate level and on meiotic maturation in mouse cumulus cell-enclosed oocytes cultured in vitro. Biol Reprod 1985; 33:797-802.
- Salustri A, Ulisse S, Yanagishita M, Hascall VC. Hyaluronic acid synthesis by mural granulosa cells and cumulus cells in vitro is selectively stimulated by a factor produced by oocytes and by transforming growth factor- $\beta$ . J Biol Chem 1990; 265:19517-19523.
- Salustri A, Yanagishita M, Hascall VC. Synthesis and accumulation of hyaluronic acid and proteoglycans in the mouse cumulus cell-oocyte complex during follicle-stimulating hormone-induced mucification. J Biol Chem 1989; 264:13840-13847.
- Salustri A, Yanagishita M, Hascall VC. Mouse oocytes regulate hyaluronic acid synthesis and mucification by FSH-stimulated cumulus cells. Dev Biol 1990; 138:26-32.
- Salustri A, Yanagishita M, Underhill CB, Laurent TC, Hascall VC. Localization and synthesis of hyaluronic acid in the cumulus cells and mural granulosa cells of the preovulatory follicle. Dev Biol 1992; 151:541-551.
- Sato E, Ishibashi T, Koide SS. Prevention of spontaneous degeneration of mouse oocytes in culture by ovarian glycosaminoglycans. Biol Reprod 1987; 37:371-376.
- Sato E, Miyamoto H, Koide SS. Glycosaminoglycans in porcine follicular fluid promoting viability of oocytes in culture. Mol Reprod Dev 1990; 26:391-397.
- Screaton GR, Bell MV, Jackson DG, Cornelis FB, Gerth U, Bell JI. Genomic

- structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:12160-12164.
- Shimada M, Maeda T, Terada T. Dynamic changes of connexin-43, gap junctional protein, in outer layers of cumulus cells are regulated by PKC and PI 3-kinase during meiotic resumption in porcine oocytes. *Biol Reprod* 2001; 64:1255-1263.
- Shyjan AM, Heldin P, Butcher EC, Yoshino T, Briskin MJ. Functional cloning of the cDNA for a human hyaluronan synthase. *J Biol Chem* 1996; 271:23395-23399.
- Simon AM, Goodenough DA, Li E, Paul DL. Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature* 1997; 385:525-529.
- Singh B, Armstrong DT. Insulin-like growth factor-1, a component of serum that enables porcine cumulus cells to expand in response to follicle-stimulating hormone in vitro. *Biol Reprod* 1997; 56:1370-1375.
- Singh B, Barbe GJ, Armstrong DT. Factors influencing resumption of meiotic maturation and cumulus expansion of porcine oocyte-cumulus cell complexes in vitro. *Mol Reprod Dev* 1993;36:113-119.
- Sirard MA, Lambert RD. In vitro fertilization of bovine follicular oocytes obtained by laparoscopy. *Biol Reprod* 1985; 33:487-494.
- Slevin M, Krupinski J, Kumar S, Gaffney J. Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan induce protein tyrosine kinase activity in endothelial cells and activate a cytoplasmic signal transduction pathway resulting in proliferation. *Lab Invest* 1998; 78:987-1003.
- Spicer AP, Augustine ML, McDonald JA. Molecular cloning and characterization of a putative mouse hyaluronan synthase. *J Biol Chem* 1996; 271:23400-23406.

- Spicer AP, Nguyen TK. Mammalian hyaluronan synthases: investigation of functional relationships in vivo. *Biochem Soc Trans* 1999; 27: 109-121.
- Spicer AP, McDonald JA. Characterization and molecular evolution of a vertebrate hyaluronan synthase gene family. *J Biol Chem* 1998; 273:1923-1932.
- Spicer AP, Olson JS and McDonald JA. Molecular cloning and characterization of cDNA encoding the third putative mammalian hyaluronan synthase. *J Biol Chem* 1997; 272:8957-8961.
- Sugiyama Y, Shimada A, Sayo T, Sakai S, Inoue S. Putative hyaluronan synthase mRNA are expressed in mouse skin and TGF-beta upregulates their expression in cultured human skin cells. *J Invest Dermatol* 1998; 110:116-121.
- Sutovsky P, Flechon JE, Flechon B, Motlik J, Peynot N, Chesne P, Heyman Y. Dynamic changes of gap junctions and cytoskeleton during in vitro culture of cattle oocyte cumulus complexes. *Biol Reprod* 1993; 49:1277-1287.
- Talbot P, Geiske C, Knoll M. Oocyte pickup by the mammalian oviduct. *Mol Biol Cell* 1999; 10:5-8.
- Talbot P, DiCarlantonio G. Ultrastructure of opossum oocyte investing coats and their sensitivity to trypsin and hyaluronidase. *Dev Biol* 1984; 103:159-167.
- Tatemoto H, Kubo T, Horiuchi T. Granulosa cells affect the chromatin condensation of bovine at germinal vesicle stage. *J. Mamm Ova Res* 1994; 11:118-119.
- Tirone E, D'Alessandris C, Hascall VC, Siracusa G, Salustri A. Hyaluronan synthesis by mouse cumulus cells is regulated by interactions between follicle-stimulating hormone (or epidermal growth factor) and a soluble oocyte factor (or transforming growth factor beta1). *J Biol Chem* 1997; 272:4787-4794.
- Tolg C, Hofmann M, Herrlich P, Ponta H. Splicing choice from ten variant exons establishes CD44 variability. *Nucleic Acids Res* 1993; 21:1225-1229.

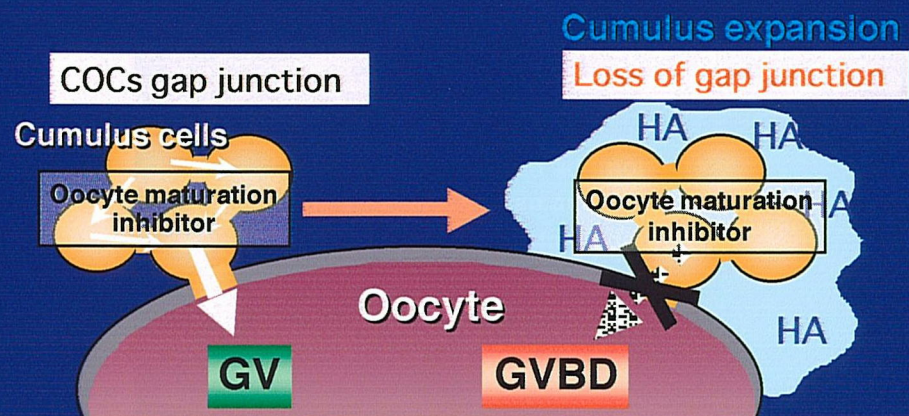


- Vanderhyden BC. Species differences in the regulation of cumulus expansion by an oocyte-secreted factor(s). *J Reprod Fertil* 1993; 98:219-227.
- Vanderhyden BC, Armstrong DT. Role of cumulus cells and serum on the in vitro maturation, fertilization, and subsequent development of rat oocytes. *Biol Reprod* 1989; 40:720-728.
- Vozzi C, Formenton A, Chanson A, Senn A, Sahli R, Shaw P, Nicod P, Germond M, Haefliger JA. Involvement of connexin 43 in meiotic maturation of bovine oocytes. *Reproduction* 2001; 122:619-628.
- Watanabe K, Yamaguchi Y. Molecular identification of a putative human hyaluronan synthase. *J Biol Chem* 1996; 271:22945-22948.
- Weigel PH, Hascall VC, Tammi M. Hyaluronan synthases. *J Biol Chem* 1997; 272:13997-4000.
- Yanagimachi R. Mammalian fertilization. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press; Knobel E and Neil J(eds), 135-185.
- Yoshida M, Ishizaki Y, Kawagishi H, Bamba K, Kojima Y. Effects of pig follicular fluid on maturation of pig oocytes in vitro and on their subsequent fertilizing and developmental capacity in vitro. *J Reprod Fertil* 1992; 95:481-488.
- Zhuo L, Yoneda M, Zhao M, Yingsung W, Yoshida N, Kitagawa Y, Kawamura K, Suzuki T, Kimata K. Defect in SHAP-hyaluronan complex causes severe female infertility. A study by inactivation of the bikunin gene in mice. *J Biol Chem* 2001; 276:7693-7696.



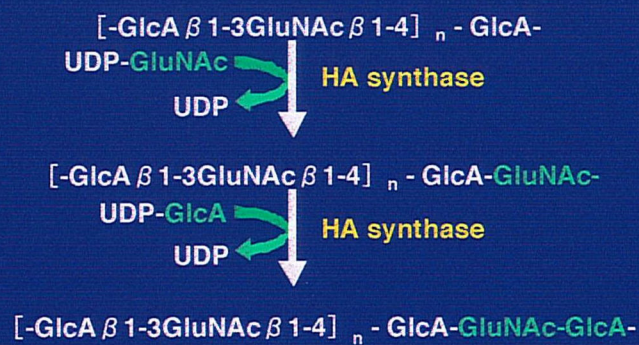
## Appendix 1. Folliculogenesis in mammals.

- Oocyte maturation
- Dissociation of COCs from the follicle wall, and ovulation
- The pick-up of COCs by oviduct fimbria
- The signaling in spermatozoa through the binding of hyaluronan to sperm membrane protein PH-20, and fertilization
- The subsequent development of zygotes



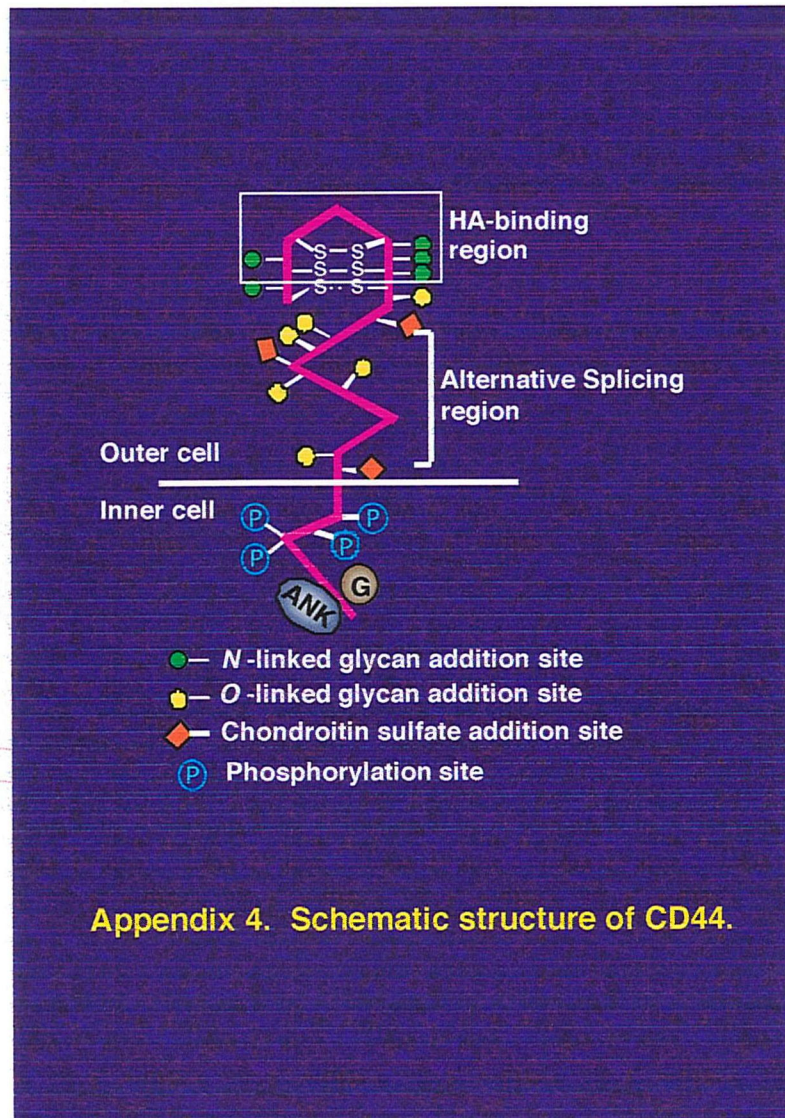
**Appendix 2. Physiological roles of cumulus expansion.**





Cloning of HA synthase cDNAs in vertebrates  
 mHas1: Itano et al. (1996), hHAS1: Shyjan et al. (1996) mHas2: Spicer  
 et al. (1996), hHAS2: Watanabe et al. (1996)  
 hHAS3, mHas3: Spicer et al. (1997)

### Appendix 3. Hyaluronan(HA) synthesis.



**Appendix 4. Schematic structure of CD44.**

## 謝 辞

まず初めに、本研究を無事終了するまで終始懇切な御指導を賜り、研究への姿勢を教えてくださいました、東北大学大学院農学研究科資源生物科学専攻動物生殖科学分野教授 佐藤英明博士に深甚の感謝を申し上げます。また本研究を遂行するにあたり、御指導と御助言を頂いた東北大学大学院農学研究科資源生物科学専攻動物生殖科学分野助教授 佐々田比呂志博士、同研究室助手 松本浩道博士、同研究室研究員 三好和睦博士に深謝いたします。共同研究を行い、実験に協力いただいた東北大学大学院農学研究科資源生物科学専攻の横尾正樹さん、今野祥顕さんに感謝いたします。研究生活において御助力と御配慮戴いた同研究室秘書 長谷川まどかさん、他同研究室メンバー各位に心から感謝いたします。