

氏 名 ( 国 籍 )	吉 田 由美子 ( 東 京 都 )
学 位 の 種 類	博士 ( 農 学 )
学 位 記 番 号	農博甲第 1 0 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 1 0 年 3 月 1 3 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物生産科学専攻
研究指導を受けた大学	静岡大学
学 位 論 文 題 目	ウシ・ブタ卵の体外成熟・受精・発生過程における 成長因子およびそのレセプター遺伝子発現に関する 研究
審 査 委 員	主査 静 岡 大 学 教 授 番 場 公 雄 副査 信 州 大 学 教 授 辻 井 弘 忠 副査 岐 阜 大 学 教 授 吉 崎 範 夫 副査 静 岡 大 学 助 教 授 吉 田 光 敏

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

細胞成長因子(GF)は細胞の増殖と分化を制御する基本的な物質として様々な組織での細胞機能の調節に重要な役割を果たしていることが近年明らかとなった。従って、正常細胞の中では活発な増殖と分化を示す発生の各段階においても GF が大きな役割を担っていると思われる。しかし、哺乳動物卵の初期発生過程と GF との関連については未解明な点が多い。本研究は、卵の体外成熟・体外受精および逆転写-PCR 法を駆使し、ウシ・ブタ卵の成熟、受精および発生過程における GF 遺伝子およびチロシンキナーゼ型 GF レセプター(R) 遺伝子の発現とその機能を明らかにすることを目的とした。

ウシおよびブタ未成熟卵は食肉センター採取の卵巣卵胞より回収し、体外成熟、体外受精、体外発生させた。体内成熟卵および体内受精卵 (前核期～脱殻胚盤胞:HtBL)は過排卵処理した雌ブタより外科的に回収した。総 RNA は、ブタでは採取直後(卵核胞期:GV)、成熟培養開始後 12(GV)、24(第一成熟分裂中期:MI)、36 時間 (第二成熟分裂中期:MII)および 42 時間(MII)、媒精後 10(前核初期)、20(前核後期)、36(2~4-cell)、84(8~16-cell)、144(胚盤胞:BL)および 168 時間(HtBL)の卵より、ウシでは採取直後(GV)、成熟培養開始後 12(GV~MI)、18(MII)および 21 時間(MII)、媒精後 6(前核初期)、

24(前核後期, 2-cell)、48(8-cell)、72(16-cell)および 144 時間(BL)の卵より抽出した。成熟過程において、卵丘-卵母細胞複合体(COC)は卵母細胞と卵丘細胞に完全に分離し、それぞれを総 RNA 抽出に供した。抽出した総 RNA より、Oligo d(T)<sub>16</sub> および逆転写酵素を用いて、mRNA の分離および cDNA の作成を行った。得られた cDNA を各遺伝子を標的とする DNA プライマーと共に PCR に供し、標的遺伝子の増幅を行った。PCR 産物は電気泳動後、それぞれの遺伝子シグナルの検出状況を調べると共に、制限酵素で同定した。さらに、チロシンキナーゼ阻害剤(ゲニステイン・ハービマイシン A)がウシ・ブタ卵の体外成熟に及ぼす影響を調べた。

その結果、1)ブタ卵は成熟、受精および発生の各過程で GF および GF-R 遺伝子を発現しており、その発現パターンは次の 3 タイプに大別できた。すなわち、(P1)成熟から発生過程を通して発現する遺伝子：IGF-I-R、bFGF-R、PDGF-R $\alpha$ 、(P2)成熟過程で発現が見られるが、受精あるいは発生過程で一旦発現が消失後、再び発現する遺伝子：EGF、IGF-I、bFGF、PDGF-A、ErbB3、および(P3)受精後のみ発現する遺伝子：TGF- $\alpha$ 。

2)発生過程におけるブタ卵の GF 遺伝子発現パターンには体内と体外で異なるパターンを示す遺伝子が存在した。

3)ウシ卵は体外成熟、受精および発生の各過程で GF および GF-R 遺伝子を発現しており、その発現パターンはブタ卵と比べて多様であり、次の 5 タイプに分類できた。すなわち、(B1)成熟から発生過程を通して発現する遺伝子：IGF-I-R、PDGF-R $\alpha$ 、(B2)成熟過程で発現が見られるが、受精あるいは発生過程で一旦発現が消失後、再び発現する遺伝子：bFGF-R、ErbB3、(B3)成熟過程で一旦発現が消失後、再び発生過程で発現する遺伝子：IGF-I、(B4)成熟・受精過程で発現が見られるが、発生過程で発現が消失する遺伝子：bFGF、PDGF-A、および(B5)受精後にのみ発現する遺伝子：EGF。

4)ブタ COC の卵丘細胞層膨潤化および卵母細胞の成熟分裂の再開と進行にはレセプターチロシンキナーゼ活性が必須である。

5)ウシ COC の卵丘細胞層膨潤化および卵母細胞の成熟分裂の進行にはレセプターチロシンキナーゼ活性が必須であるが、成熟分裂の再開には同活性の影響は小さかった。

以上の結果より、ウシ・ブタ卵は成熟、受精および発生の各過程で GF および GF-R 遺伝子を自ら発現しているが、遺伝子発現パターンは遺伝子特異性が大きく、ステージ特異性が小さいこと、さらに、種特異的でブタおよびウシ卵で発現パターンが異なることが明らかとなった。また、遺伝子発現パターンは卵の置かれる環境によっても影響を受けることが示唆された。さらに、GF は卵の発生の諸段階、特に成熟分裂の再開と第二成熟分裂中期への進行過程において、チ

ロシキンナーゼ型 GF-R を介し重要な役割を担っていることが示唆された。

## 審 査 結 果 の 要 旨

家畜卵の成熟・受精・発生過程に係わる分子要因の解明は生命科学の分野に多くの情報をもたらすばかりでなく、体外での受精卵生産を効率的かつ安定的におしすすめる応用技術の開発にとっても極めて重要である。ウシやブタにおいては体外成熟卵の体外受精により産子が得られているが、食肉センター採取卵巣あたりの産子発育にまで至る体外受精卵の作出効率はいまだ低く、本技術のさらなる向上が望まれる。一方、細胞成長因子(growth factor: GF)は細胞の増殖と分化を制御する基本的な物質として様々な組織での細胞機能の調節に重要な役割を担っていることが明らかとなり、正常細胞の中では活発な増殖と分化を示す初期発生各段階においても GF が大きな役割を担っていると考えられてきた。しかし、家畜卵の成熟から受精・発生に至る過程において、GF の遺伝子レベルでの発現や細胞レベルでの機能に関しては未解明の点が多い。

そこで、本論文は、卵の体外成熟・体外受精技術などの発生工学的手法および逆転写(reverse transcription:RT)-polymerase chain reaction (PCR)法を駆使して、ウシおよびブタ卵の成熟、受精および発生過程における GF 遺伝子およびそのレセプター(R)遺伝子発現とその機能を明らかにすることを目的とし、以下の内容に関して検討したものである。1) ブタ卵の成熟、受精および発生過程における成長因子およびそのレセプター遺伝子の発現(第 I 章)、2) ウシ卵の成熟、受精および発生過程における成長因子およびそのレセプター遺伝子の発現(第 II 章)および 3) チロシキンナーゼ阻害剤がウシ・ブタ卵丘-卵母細胞複合体の卵丘細胞層膨潤化と核成熟に及ぼす影響(第 III 章)。

1) ではブタ卵の成熟、受精および発生過程における GF 遺伝子[上皮成長因子(epidermal growth factor; EGF)、塩基性線維芽細胞成長因子(basic fibroblast growth factor; bFGF)、I 型インシュリン様成長因子 (insulin-like growth factor I; IGF-I)、血小板由来成長因子 A 鎖(platelet-derived growth factor A chain; PDGF-A)、アルファ型形質転換成長因子(transforming growth factor-alpha; TGF- $\alpha$ )]およびそれらのレセプター(R) [ErbB3(EGF-R サブファミリー)、bFGF-R、IGF-I-R、PDGF-R $\alpha$ ]遺伝子発現とその発現パターンの経時的変化について調べた。さらに、GF 遺伝子に関しては体内と体外における卵の成熟、受精および発生過程における発現パターンを比較し検討した。その結果、(1) ブタ卵は成熟、受精および発生の各過程で GF および GF-R 遺伝子を発現していること、(2) 各過程における遺伝子発現パターンは遺伝子間で大きく異なること、(3) 発生過程におけるブタ卵の GF 遺伝子発現パターンには体内と体外で異なるパターンを示す遺伝子が存在すること、および(4)ブタ卵丘細胞においても GF および GF-R 遺伝子発現が卵成熟過程で見られることを初めて示した。

2) では、ウシ卵の体外成熟・受精・発生過程における GF [EGF、bFGF、IGF-I、PDGF-A]および GF-R[ErbB3、bFGF-R、IGF-I-R、PDGF-R $\alpha$ ]遺伝子発現が観察さ

れるか否かとその発現の経時的変化について検討した。その結果、(1)ウシ卵は体外成熟、受精および発生の各期間中に GF や GF-R 遺伝子を発現していること、および(2)それらの発現パターンは遺伝子間で異なり、遺伝子特異性が大きく、ステージ特異性が小さいことを初めて示した。

一方、GF の多くはそのレセプターに結合することによりレセプターに存在するチロシンキナーゼの活性化をもたらすが、3) では、チロシンキナーゼ阻害剤であるゲニステインおよびハービマイシン A がウシとブタ卵丘・卵母細胞複合体(COC)の体外成熟における卵丘細胞層膨潤化および核成熟に及ぼす影響について検討した。その結果、(1)ブタ COC の卵丘細胞層膨潤化および卵母細胞の成熟分裂の再開と進行にはチロシンキナーゼ活性が重要であること、(2)ウシ COC の卵丘細胞層膨潤化および卵母細胞の成熟分裂の進行にはチロシンキナーゼ活性が重要であること、(3)ブタ COC の成熟分裂の再開と進行には卵母細胞自体のチロシンキナーゼ活性が要求されること、および(4)ブタ卵母細胞の成熟分裂の再開と進行の抑制様式はゲニステインおよびハービマイシン A 間で異なることを初めて示した。

以上の業績は、これまで未解明なウシおよびブタ卵の成熟・受精・発生過程における細胞成長因子やそのレセプターの遺伝子レベルでの発現や細胞レベルでの機能に関する多くの新知見を包含する大変優れた論文であると認定され、今後、本研究で確立した RT-PCR による卵の遺伝子発現検出手法ならびに本論文で得られた細胞成長因子の挙動に関する基礎的実験データがウシやブタ卵の体外成熟・体外受精技術のさらなる高度化や効果的な核移植・外来遺伝子導入技術などの開発に大きく貢献すると評価された。

以上、本論文審査委員会は、提出論文および基礎となる学術論文等について慎重に審議し、審査委員全員の一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認め、合格と判定した。

#### [学位論文の基礎となる学術論文]

- 1) Yumiko YOSHIDA, Mitsutoshi YOSHIDA and Kimio BAMBA (1998) :  
Expression of mRNA for Growth Factor Receptors in Porcine Cumulus-Oocyte Complexes during In Vitro Maturation. The Journal of Reproduction and Development, 44 (1), in press.
- 2) Yumiko YOSHIDA and Mitsutoshi YOSHIDA (1998): Expression of mRNAs for Growth Factor Receptors during Development In Vitro of Porcine Ova Matured and Fertilized In Vitro. Journal of Mammalian Ova Research, 15 (1), in press.
- 3) Yumiko YOSHIDA, Motoharu MIYAMURA, Seizo HAMANO and Mitsutoshi YOSHIDA (1998): Expression of Growth Factor Ligand and Their Receptor mRNAs in Bovine Ova during In Vitro Maturation and after Fertilization In Vitro. The Journal of Veterinary Medical Science, 60 (5), in press.

- 4) Yumiko YOSHIDA, Mitsutoshi YOSHIDA and Kimio BAMBA (1998) :  
Detection of Growth Factor mRNAs in Porcine Cumulus-Oocyte Complexes  
during Maturation In Vivo and In Vitro. The Journal of Reproduction and  
Development, 44 (2), in press.