

Changes in oligosaccharide expression on plasma membrane of the mouse oocyte during fertilisation and early cleavage

著者	北村 公也
雑誌名	浜松医科大学学報. 学位授与記録
巻	21
ページ	120-122
発行年	2004-03-09
URL	http://hdl.handle.net/10271/1666

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 389号	学位授与年月日	平成16年 3月 9日
氏名	北村公也		
論文題目	Changes in oligosaccharide expression on plasma membrane of the mouse oocyte during fertilisation and early cleavage (受精、初期卵割時におけるマウス卵細胞膜上のオリゴ糖発現の変化)		

論文題目

Changes in oligosaccharide expression on plasma membrane Of the mouse oocyte during fertilisation and early cleavage

(受精、初期卵割時におけるマウス卵細胞膜上のオリゴ糖発現の変化)

論文の内容の要旨

[はじめに]

着床とは、胚と子宮内膜組織の接着現象である。接着には受け入れ側の子宮内膜組織の状態とともに、胚の成熟状態も重要な因子と考えられる。受精によって、卵及び胚の細胞膜の変化が始まり、受精卵の分割が進み胚盤胞に至る時には卵の細胞膜表面は着床に最適な状態に変化する。この卵細胞膜の変化の一つに、細胞膜表面の糖鎖の発現、および糖鎖構造の変化が指摘されている。しかし具体的な糖鎖構造の変化を明らかにした研究は少ない。今回、金コロイドで標識したレクチンを用い免疫電子顕微鏡法により、受精前、受精直後、卵割進行中の卵、胚盤胞の細胞膜表面に発現する糖鎖の変化を検討した。

[材料ならびに方法]

1 マウス卵の回収

8週令BDF1雌マウス(日本SLC)を過排卵処理し、灌流法にて未受精卵を回収した。同様に過排卵処理した雌マウスを雄マウスと交配させた後に受精卵を回収した。Hoppeらの方法により37℃、5% CO₂の条件下で胚培養液を用い実験を行った。

2 蛍光抗体法による解析

顆粒膜、透明帯を除去した未受精卵及び胚盤胞をBiotin標識した7種類のレクチン, ConA (*Conavalia ensiformis*), WGA (*Triticum vulgare*), UEA-I (*Ulex europaeus*), MPA (*Maclura pomifera*), LCA (*Lens culinaris*), DBA (*Dolichis biflorus*), PNA (*Arachis hypogaea*) と反応させた後、Avidin-FITCで標識し蛍光顕微鏡にて蛍光強度の差を観察した。

3 免疫電子顕微鏡による解析

顆粒膜、透明帯を除去した未受精卵、受精卵、4細胞期卵、胚盤胞を20nm金コロイド粒子で標識したConA及びWGAと反応させ、凍結真空乾燥を行った後、走査型電子顕微(SEM)の反射電子ビームモードにて観察を行った。5万倍の倍率で、1個の卵につき無作為に3箇所を観察を行い、エリア内(5 μm²内)の細胞膜表面に付着した金コロイド粒子数を測定した。測定は各レクチンにつき3個の卵を用いて行い、計6箇所の金コロイド粒子の付着数を計測し、平均値を算出した。

[結果]

1 蛍光抗体法による比較

未受精卵と胚盤胞の間で、ConAおよびWGAに反応する部位の蛍光強度の差がもっとも大きく認められた。他のレクチン(UEA-I, MPA, LCA, DBA, PNA)では蛍光強度の差は認められなかった。

2 ConAならびにWGA結合糖鎖の定量化

マウスの卵細胞膜表面上一定エリア内に反応したConA-金コロイド粒子の数は未受精

卵389±46(個)、受精直後341±43、4細胞期卵274±61、胚盤胞927±77であった。4分割時には一時減少するが、胚盤胞では有意に増加した(P<0.05)。WGA-金コロイド粒子の数は、未受精卵766±238(個)、受精直後486±244、4細胞期卵1532±205、胚盤胞1876±336であった。受精直後には減少したが、4細胞期から胚盤胞に至るまで増加が継続した(P<0.05)。

[考察]

胚の細胞膜表面の各種抗原性が受精、卵割によって変化する事は免疫組織学的手法を用いた研究により以前より報告されている。変化する物質のうちで細胞接着因子の一つである糖蛋白が、受精、卵割によって胚の細胞膜表面に出現してくる事も確認されている。すなわち膜表面の糖蛋白の質的、量的変化により胚が子宮内膜に着床する至適条件が誘導されることが考えられる。今回の実験で、ConA, WGAに特異的に結合する部位が受精直後の胚と比べて胚盤胞では、有意に増加していることが確認された。このことはこの2種類のレクチンに特異的に結合する糖鎖を有する糖蛋白が細胞膜表面に胚盤胞では有意に増加していることを意味する。ConAは α -Man(α -マンノース)型および α -Glc(α -グルコース)型糖鎖に結合するが、 α -Man型糖鎖に特異的に結合するLCAの変化は蛍光抗体法による解析では見られなかった。このことから胚盤胞で増加するのは α -Glc型糖鎖を持つ糖蛋白であると考えられる。同様にWGAはGlcNAc(N-アセチルグルコサミン), NeuNAc(N-アセチルノイラミン酸)型糖鎖に特異的に結合するが、GlcNAc型糖鎖に特異的に反応するUEA-Iの変化を認めなかった。したがって胚盤胞で卵細胞膜表面に増加するのはNeuNAc型糖鎖を有する糖蛋白である可能性が考えられる。

[結論]

マウス卵は受精後、卵割が進むにつれて、 α -Glc型, NeuNAc型糖鎖を有する糖蛋白が卵細胞膜表面に出現し、胚の表面が変化していくことが観察された。このことは着床と関連していると考えられる。

論文審査の結果の要旨

着床は、胚と子宮粘膜との接着現象であり、受け入れ側の子宮内膜組織の状態と卵の成熟状態が重要な因子となる。受精卵は卵割とともに細胞膜の変化が始まり、胚盤胞に至る時には着床に最適な状態になる。この細胞膜の変化のひとつに、細胞膜表面の糖鎖の発現、糖鎖構造の変化があげられている。しかしながら、具体的な糖鎖構造の変化を明らかにした研究は少ない。申請者は、金コロイド標識したレクチンを用いた免疫電子顕微鏡法により、未受精卵、受精直後の卵、卵割進行中の胚、および胚盤胞の細胞膜表面に発現する糖鎖の変化を観察した。

実験は、以下の方法で行った。

8週令BDF1雌マウスを過排卵処理して灌流法により未受精卵を回収し、また、過排卵した雌マウスと雄マウスを交配させ、受精卵・卵割胚・胚盤胞をそれぞれ回収した。胚培養はHoppeらの方法により37℃、5%CO₂の条件下で行った。Biotin標識した7種類のレクチン、ConA(*Canavalia ensiformis*由来)、WGA(*Triticum vulgare*由来)、UEA-I(*Ulex europaeus*由来)、MPA(*Maclura pomifera*由来)、LCA(*Lens culinaris*由来)、DBA(*Dolichis biflorus*由来)、PNA(*Arachis hypogaea*由来)をそれぞれの発生段階の卵(胚)と反応させた。免疫電子顕微鏡

による観察は、未受精卵・受精卵・4細胞期胚・胚盤胞を金コロイド標識したConAおよびWGAと反応させ、凍結真空乾燥を行った後、走査電子顕微鏡(SEM)にて単位面積($5\mu\text{m}^2$)あたりの金コロイド粒子数を測定した。

この実験から、明らかになった結果は以下の通りである。

- 1) 蛍光抗体法による比較では、ConAおよびWGAは、受精卵と胚盤胞で反応する部位の蛍光強度の差がもっとも大きく認められた。他のレクチン(UEA-I、MPA、LCA、DBA、PNA)では、蛍光強度の差は認められなかった。
- 2) マウスの卵細胞膜表面上の一定エリア内あたりの反応したConA-金コロイド粒子数(平均値±標準偏差)は、未受精卵 389 ± 46 、受精直後の卵 341 ± 43 、4細胞期胚 274 ± 61 、胚盤胞 927 ± 77 で、4細胞期胚では一時減少するが、胚盤胞で有意に増加した。また、WGA-金コロイド粒子数は、未受精卵 766 ± 238 、受精直後の卵 486 ± 244 、4細胞期胚 1532 ± 205 、胚盤胞 1876 ± 336 であった。受精直後の卵では減少したが、4細胞期胚から胚盤胞に至るまで増加する傾向を示した。

ConAは α -マンノース(α -Man)型および α -グルコース(α -Glc)型糖鎖に結合し、WGAはN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)、N-アセチルノイラミン酸(NeuNAc)型糖鎖に特異的に結合するという事、また α -Manと結合するLCAおよびGlcNAcと結合するUEA-Iが蛍光抗体法とともに検出できなかったという実験結果もふまえて、申請者は次のように結論した。

マウス卵は、受精後、卵割が進むにつれて、胚の細胞膜表面が変化して、 α -グルコース、N-アセチルノイラミン酸型糖鎖を有する糖タンパクが出現してくることが考えられ、これらが胚の着床のひとつの因子となっている。

本委員会では、マウス卵表面に着目して、レクチンを用いてその糖鎖の変化を走査型電子顕微鏡で免疫組織学的に追跡したことを高く評価した。

審査の過程において、申請者の研究内容について審査委員会では以下のような質問や議論を行った。

- 1) 材料としてBDF1マウスを使った理由はなにか、また動物の種差、系統差、ヒトとの間に違いはあるか
- 2) 固定液の種類による影響の違いはあるか
- 3) 卵表面の微絨毛(マイクロビリ)とそれ以外の部分に差異がみられたか
- 4) レクチンのinhibitorで前処理した卵での実験は行ったのか
- 5) 受精直後に結合性がやや落ちるのは、どういう理由が考えられるか
- 6) 着床した卵としなかった卵で、糖鎖に差異があるという実験は計画できないか
- 7) ヒト卵表面の糖鎖についての解析はどこまでされているか
- 8) ヒト不妊症において、その発現状態と卵表面の糖鎖との関連性について検討がなされているか、また今後どういう検討を加えていくか
- 9) このデータをもとにして、着床障害に対する不妊患者の妊娠率をあげることに応用できるか

これらの質問に対し、申請者の解答は適切であり、問題点も十分に理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 右藤文彦

副査 大園誠一郎 副査 小杉伊三夫