



Expression of link protein during mouse follicle development

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 孫, 廣煒 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1188

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	医博第 335号	学位授与年月日	平成13年 3月27日
氏 名	孫 廣 煒		
論文題目	Expression of link protein during mouse follicle development (マウス卵胞発育における Link Protein の発現)		

博士(医学) 孫 廣 偉

論文題目

Expression of link protein during mouse follicle development

(マウス卵胞発育におけるLink Proteinの発現)

論文の内容の要旨

〔目的〕

Cumulus cell-oocyte complex (COC) は卵細胞と周囲のcumulus cellsから構成される。gonadotropin刺激により、cumulus cellsの細胞間隙にヒアルロン酸(HA)の豊富な細胞外マトリックスが形成される。この過程はexpansionあるいはmucificationと呼ばれ、COC expansionは排卵には必須の現象である。一方、血清に由来するInter-alpha-inhibitor ($I\alpha I$) は細胞外マトリックスのHAに特異的に結合して、細胞外マトリックスを安定化するために必要な血清因子であることが判明している。リンク蛋白質(LP)がHAの結合蛋白として、HAと $I\alpha I$ の両者に結合できることを我々は以前に報告した。リンク蛋白は主にその細胞外マトリックス中に存在するため、COC expansionの細胞外マトリックス中においてもHAと $I\alpha I$ の両者に結合することによりHAと $I\alpha I$ の結合を安定化させる可能性が考えられる。我々はマウス卵巣におけるリンク蛋白の発現とその局在について検討した。

〔方法〕

1. HA結合蛋白からリンク蛋白を精製した。このリンク蛋白を用いて、四週間毎に、rabbitに3回皮下注射した。Rabbitからの血清を精製し、抗リンク蛋白抗体を得た。
2. 未熟なマウス(21日齢)にpregnant mare serum gonadotropin (PMSG) 5単位を腹腔内投与(ip)し、その44時間後に、一部のマウスにhuman chorionic gonadotropin (hCG) 5単位を注射し(ip)、もう一方はコントロールとしてphosphate-buffered saline (PBS)のみ注射した。卵巣はhCG注射後0、1、2、4、8、12および24時間後に摘出した。
3. マウスの卵巣を4%パラホルムアルデヒドにより固定し、パラフィン包埋の後、免疫染色を行った。染色方法はavidin-biotin peroxidase complex method法を用いた。一部の切片は組織固定の前にhyaluronidaseで1時間処理した。一次抗体として抗リンク蛋白抗体($5\mu\text{g/ml}$)を用いた。一方コントロールとして、rabbit nonimmune IgGを一次抗体として用いた。

〔結果〕

1. HA結合蛋白から精製したリンク蛋白はHAと生理的に結合する。
2. リンク蛋白は49KDaと40KDaの二つの分子量から構成されていた。このリンク蛋白はhyaluronidaseやchondroitinase ABCによりさらに分解されることはなかった。40KDaのリンク蛋白は、49KDaのリンク蛋白のtrypsinによる分解産物と考えられる。western blottingの結果、gonadotropinを使用した成熟卵巣にのみ42KDaのリンク蛋白が確認された。
3. リンク蛋白免疫染色の結果：卵細胞とtheca cellにおけるリンク蛋白の染色は卵胞発育の時期にかかわらず常に発現した。リンク蛋白はhCG投与後、顆粒膜細胞に強く発現するようになり排卵直前のCOCが最も強陽性を示した。また、黄体と卵管上皮細胞にもリンク蛋白陽性所見を認めた。nonimmune IgG

を一次抗体として使用した場合は、リンク蛋白の染色は確認できなかった。また組織固定の前にhyaluronidaseで1時間処理することによりリンク蛋白の染色性は消失した。リンク蛋白自身はhyaluronidaseとchondroitinase ABCにより分解されないため、hyaluronidaseによるリンク蛋白の染色が消失した原因はHA自身が分解されたためと思われた。

〔考察〕

今回の実験結果をまとめるとgonadotropin刺激により、cumulus cells自身はその細胞外マトリックスにHAのみならずリンク蛋白も分泌する。cumulus cells自身から産生されたリンク蛋白は、細胞外マトリックスのHAと $I\alpha I$ の結合を安定化するために必要であり、その結果、細胞外マトリックスの急激な成長がおこり、COC expansionが進行し排卵現象が引き起こされるものと考えられた。今回初めて卵巣におけるリンク蛋白の発現を明らかにした。

〔結論〕

リンク蛋白の産生と局在に関して以下の点を明らかにした。

卵巣にgonadotropinが作用し、排卵直前になると顆粒膜細胞にリンク蛋白が出現し、HAと血清由来の $I\alpha I$ の結合を安定化することによりCOC expansionが促進される。

論文審査の結果の要旨

Cumulus cell-oocyte complex (COC) は卵細胞と周囲のcumulus cellsから構成されており、gonadotropinが作用すると、cumulus cellsの細胞間隙にヒアルロン酸(HA)の豊富な細胞外マトリックスが形成される。この過程はexpansionと呼ばれ、このCOC expansionは排卵には必須の現象である。一方、血清に由来するInter-alpha-inhibitor($I\alpha I$)は細胞外マトリックスのHAに特異的に結合して、細胞外マトリックスを安定化するために必要な血清因子である。HAと $I\alpha I$ の両者に結合できる蛋白として、リンク蛋白質(LP)が存在することを申請者らは先に報告している。LPは主にその細胞外マトリックス中に存在するため、expansion時に、細胞外マトリックス中においてもHAと $I\alpha I$ の両者に結合することにより、それらの結合を安定化させる可能性を考えた。本研究ではマウス卵巣におけるLPの発現とその局在性について検討し、COC expansionとの関連性について考察した。

LP抗体は、HA結合蛋白から精製したLPをrabbitに注射して、その血清から得たものを用いた。実験群マウスとして、21日齢の雌マウスにpregnant serum gonadotropin(PMSG)を腹腔内投与し、44時間後に、human chorionic gonadotropin(hCG)を注射し、対照群としてphosphate-buffered saline(PBS)のみ注射したものを用いた。

一定時間後、各群マウスの卵巣を摘出し、固定、パラフィン包埋の後、avidin-biotin peroxidase complex法で免疫染色を行なった。一次抗体として、LP抗体を用いて、コントロール抗体としてrabbit nonimmune IgG抗体を用いた。

実験の結果、HA結合蛋白から精製したLPはHAと生理的に結合した。このLPは49KDaと40KDaの二つの分子量から構成されており、hyaluronidaseやchondroitinase ABCによりさらに分解されなかった。また、40KDaのLPは49KDaのLPのtrypsinによる分解産物と考えられる。

Western blottingの結果、gonadotropinを使用した成熟卵巣にのみ42KDaのLPが確認された。LP免疫染色

