

# 論文内容の要旨

申請者氏名 新田麻衣

In mammals, cell to cell interactions work critically for the formation and maturation of germ cells. For example, germ cells are first formed as primordial germ cell (PGC) precursor cells from epiblast when they receive the BMP4/8b signals from adjacent extraembryonic ectoderm. Subsequently, intercellular communication between oocytes and the surrounding follicle cells through gap junction channels is crucial for oocyte development and maturation. Furthermore, inside the follicles, oocytes go through germ cell specific events such as the erasure and resetting of the genomic imprinting, meiosis.

These germ cell specific events have been mainly clarified by generating knockout or transgenic mice. However, although this kind analysis enables us to reveal the role of an individual gene, it is difficult to perform any cellular or molecular analysis which should provide information not only for understanding the development of mammalian germ cells but also for clinical purposes by this *in vivo* method. To achieve this, therefore, the establishment of an appropriate *in vitro* experimental system that can follow the entire gametogenesis process would be preferable. In this study, I tried out two *in vitro* experimental approaches to understand the mechanism of germ cell development.

## **1. Elucidation of the role of gap junctions in folliculogenesis.**

Our group previously reported the spatiotemporal expression of multiple connexin genes in porcine follicle cells. Here, I searched for connexin genes specifically expressed in porcine oocytes to elucidate gap junctions formed between oocytes and follicle cells. To achieve this, I constructed an oocyte-specific cDNA library to identify connexin genes expressed and found that CX60 and CX45 are the major connexins expressed in porcine oocytes. Immunostaining and *in situ* hybridization of sectioned porcine ovaries confirmed oocyte expression of these genes at three different stages of folliculogenesis. Furthermore, their gap junction channel activity was assessed using a heterologous cell system. However, CX37, which is known to be expressed in oocytes of several other mammals, was undetectable. I demonstrate that there is diversity in the connexin genes expressed in mammalian oocytes, and hence in the gap junctions connecting oocytes and cumulus cells.

## **2. Establishment of an *in vitro* model system for deriving follicles from mouse embryonic stem cells**

Pluripotent mouse embryonic stem (ES) cells can produce germ cells (GC) capable of giving rise to normal offspring *in vivo*. However, functional oocytes are not generated from ES cells. In this study, I generated a clone of male mouse ES cells that efficiently formed follicle-like structures (FLSs) *in vitro*, and this allowed me to analyze folliculogenesis at a molecular level. Induced FLSs were morphologically similar to primary/secondary follicles, and several GC-specific genes were expressed in FLSs. However, the *FSH receptor* was not expressed, and FLSs were arrested at the preantral stage of folliculogenesis. Finally, putative oocytes in FLSs exhibited an androgenic genomic imprinting pattern. The data suggest that the developmental dysfunction of the FLSs may be attributable to aberrant gene expression and the epigenetic state induced by the *in vitro* system.

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 新田麻衣

哺乳類の卵形成、成熟は卵巣内の卵胞という構造体の中で、卵子を取り巻く周辺細胞（顆粒膜細胞）との物質透過を介した相互応答により進行する。その応答機構を担う実体はコネクシン蛋白質から構成されるギャップ結合である。物質透過性は各コネクシンにより異なることから、卵胞内で発現するコネクシンの実体を把握するとともに、それらのコネクシンの透過活性がどのように制御されているかを明らかにすることが卵形成機構を理解するうえで非常に重要である。本研究において、申請者は、まず、顆粒膜細胞で発現するコネクシン研究の蓄積のあるブタを材料とし、卵母細胞特異的に発現しているコネクシンを探索した。その結果、CX45とCX60というこれまで哺乳類では報告されていない新規なコネクシンの発現を見出した。これまでの解析により、ブタ卵胞細胞で発現していることが確認されているコネクシンとの間で機能的なギャップ結合を形成し得ることも確認した。この結果は、これまで哺乳類の卵子で発現されているコネクシンとは全く異なる発現パターンを示すことから、哺乳類種間で見られる卵発育、成熟機構の違いを反映していることが示唆された。

さらに、申請者は、卵子形成機構を理解するうえで、これらのアプローチの限界を認識し、卵胞形成機構を分子、細胞レベルでしかも時空間的な観点からの解析も可能な実験系の確立の試みを行った。その目的で、マウス ES 細胞からの卵胞形成誘導システムの開発を試みた。その達成のために、種々の条件検討を行った結果、効率的に卵胞様構造体を形成する細胞株を単離し、初期卵胞の誘導には成功したが、後期卵胞および成熟卵子の形成をみる事が出来なかった。そこで、詳細な遺伝子発現、形態分析などを行うことによりその原因を探ったところ、*in vitro* 系で誘導した卵胞様構造体においては、マウス卵胞発育に必須であることが知られている FSH 受容体および *Nobox* 遺伝子が発現していないことを見出した。さらに、精製した卵子様細胞についてゲノミックインプリンティングの解析をおこなったところ、それらの細胞中では、雄性特異的なインプリンティングが生じていることを見出した。これまで、マウス ES 細胞を用い、成熟卵子の形成を試みた報告は世界的にいくつかあるが、いずれも初期段階で止まっている。今回、申請者が見出した現象は、*in vitro* 卵子誘導系の問題点を明らかにした点でも、高く評価できる。

以上のように、本論文は哺乳類の卵形成機構に関わる分子メカニズムの一端を明らかにするとともに、その理解に向けた新しい実験系の樹立の可能性を示したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。