

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏 名	KHIN MAR LAY
審査委員	主査 琉球 大学 教授 建本 秀樹
	副査 琉球 大学 教授 川本 康博
	副査 鹿児島 大学 准教授 三好 和睦
	副査 琉球 大学 教授 及川 卓郎
	副査 佐賀 大学 准教授 山中 賢一
審査協力者	
題 目	Studies on involvement of the zona pellucida modifications during meiotic maturation of porcine oocytes in the sperm-egg interactions (ブタ卵母細胞の減数分裂時における透明帯変化の精子-卵子間相互作用への関与に関する研究)
<p>哺乳類卵の成熟分裂時には、核の成熟と細胞質の成熟が正常な受精や受精後の胚発生にとって重要である。さらには、未成熟卵に比較して成熟卵の精子侵入率が著しく増加すると云った結果から、卵周囲を覆う透明帯にも卵成熟時に何らかの変化が起きていると推測されている。しかしながら、卵成熟に伴った核や細胞質の成熟に関する研究に比べて透明帯の変化に関する研究がブタ卵では全く見当たらない。</p> <p>したがって、本研究では、ブタ卵成熟時の透明帯構成糖タンパク質における N-グリコシル化、シアル化ならびに硫酸化が、精子-透明帯間相互作用に関与するか否かについて検討した。</p> <p>まず始めに、WGA や S-WGA を用いたレクチンブロッキング解析により、ブタ卵透明帯の ZP3 糖タンパク質の N-acetylglucosamine (GlcNAc) 残基が卵成熟に連れて増加する結果が得られた。一方、N-グリコシル化の特異的阻害剤である tunicamycin で処理された卵では透明帯 GlcNAc 残基の増加が抑制され、同時に精子侵入率、多精子侵入率、透明帯に結合した精子の先体反応率および透明帯への</p>	

結合精子数は著しく低下した。そこで、成熟培養開始後、経時的に tunicamycin 処理を行ったところ、卵丘細胞卵子複合体では成熟培養開始後 24 時間、裸化卵では 36 時間までの新たな *N*-グリコシル化がブタ卵の精子-透明帯間の相互作用に重要であった。すなわち、裸化卵の方が卵丘細胞卵子複合体に比べて *N*-グリコシル化に長時間を要した結果から、卵成熟時に卵丘細胞は透明帯構成糖タンパク質の *N*-グリコシル化の促進に関与していると推察された。

次に、二次元電気泳動と SSA レクチンブロッキングによりブタ卵透明帯構成糖タンパク質を解析したところ、卵成熟時のシアル化と硫酸化に伴って成熟卵の透明帯構成糖タンパク質は未成熟卵のそれに比べて酸性化されることが証明された。しかし、neuraminidase 処理で脱シアル化、もしくは NaClO_3 処理で硫酸化阻害を行った卵では、透明帯構成糖タンパク質の酸性化が強力に抑制され、その結果、透明帯への結合精子数と透明帯に結合した精子の先体反応誘起率の有意な減少が観察された。そして、透明帯構成糖タンパク質のシアル化と硫酸化は卵成熟分裂の卵核胞崩壊時期に起こっており、これら透明帯の酸性化機序に卵丘細胞の存在は無関係であった。一方、脱シアル化処理卵では精子侵入率と多精子侵入率の両値が有意に低下したが、硫酸化阻害卵では精子侵入率は影響されることなく多精子侵入率のみが著しく低下すると云った非常に興味ある結果が得られた。また、*N*-グリコシル化、シアル化および硫酸化の有無により、受精前の透明帯におけるプロテアーゼ抵抗性が変化することはなかった。

本研究の結果から、ブタ卵の成熟時には *N*-グリコシル化、シアル化ならびに硫酸化と云った透明帯構成糖タンパク質の糖鎖末端への修飾が起こっており、これら透明帯の変化は精子-透明帯間の相互作用に密接に関係することが初めて明らかとなった。

以上の成果は、哺乳類卵の透明帯構成糖タンパク質の糖鎖末端は成熟分裂に伴って顕著な変化を起こしており、これら各種糖鎖修飾の変化が受精時における精子-透明帯間の相互作用、すなわち、正常な受精の作用機序誘導に深く関与していることを世界で初めて明らかにした。これら重要な知見は、今後、家畜だけでなくヒトや野生動物における繁殖工学技術の活用に対して大きく貢献するものと期待される。したがって、審査員一同、本論文は博士（農学）の学位論文として十分価値があるものと判定した。