

マウス成長期卵における
母性mRNAの機能解析法の確立

東京大学 大学院新領域創成科学研究科

先端生命科学専攻 資源生物制御学分野

須永 和子

目次

要旨	1
緒言	4
材料と方法	8
結果	19
考察	26
謝辞	32
参考文献	33
図表	38

要旨

生殖細胞は体を形成している細胞のうちで唯一、受精を通じて再び次の世代を作り出すことのできる細胞である。マウスの卵形成過程では、胎児期の卵巣内において始原生殖細胞の活発な分裂が起こり、出生後、その細胞周期を第一減数分裂前期で停止して成長していく (Fig. 1)。そして成長後に再び減数分裂を開始し(卵成熟過程 ; oocyte maturation)、第二減数分裂中期で受精を待つ。この卵が成長する過程を卵成長過程 (oocyte growth) といい、この過程では、成長期卵 (growing oocyte) は顆粒膜細胞 (granulosa cell)、及び莢膜細胞 (theca cell) との複合体である卵胞 (follicle) を形成している。growing oocyte 中では、卵特異的な遺伝子の転写が活発に起こるが、その後転写活性は次第に低くなり、成長卵 (fully grown oocyte) では転写活性がまったくみられなくなる。しかし、fully grown oocyte 中にはそれまでに合成された mRNA (母性 mRNA) が非常に安定して蓄積されており、この蓄積された母性 mRNA が oocyte maturation や受精後の発生に機能することが知られている (Fig. 2)。しかしながら一方で、多くの母性 mRNA について、oocyte maturation、および初期発生過程での機能は未解明となっている。母性 mRNA の機能解析法として、conditional knockout mouse や 2 本鎖 RNA を発現する transgenic mouse を作成する方法があるが、これらは作成に多大な時間と労力を要し、さらに表現型が安定して得られない等の問題がある。そこで本研究では、従来の方法よりもより簡便に、そして効率的な母性 mRNA の機能解析法の確立を目的として、siRNA を follicle 中の growing oocyte に microinjection した後 *in vitro* で培養し、卵成長期、oocyte maturation を経て受精後の初期発生期における母性 mRNA の機能を解析する手法の確立を試みた (Fig. 3)。

まず、*in vitro* growth において、より高い割合で follicle が発達し、その後続く

oocyte maturation、受精、初期発生期まで至ることが必要であると考え、条件検討を行った。これまでの報告により、1個の卵巣から多数の growing oocyte が回収されてくるが、growing oocyte のサイズには大きな差異があり、また growing oocyte のサイズにより減数分裂への進行能力や発生能力に違いがあることがわかっている。そこで実際に、培養する follicle を回収するマウスの日齢、その培養期間、培養開始時における follicle や growing oocyte の直径について検討を行った。その結果、より高い割合で follicle を発達させ、かつ発達した follicle 中の fully grown oocyte を maturation させることのできた条件は、12日齢マウス由来の follicle でかつ、培養開始時に follicle の直径が 100-125 μm 、growing oocyte の直径が 50-65 μm のもの、また *in vitro* での培養期間は 12 日間であった。

また、*in vivo* で成長した後の fully grown oocyte が *in vitro* で成長したものと性質に違いがあるかを確認するために、核相を DNA 染色で、そして蓄積している *c-mos* の母性 mRNA 量を real-time PCR で調べたところ、両者に有意な差は見られなかった。また、受精率および受精後の 2 細胞期への発生率についてはこの両者に違いはみられなかったが、胚盤胞に至る割合は有意に差が見られた (*in vivo* growth ; *in vitro* growth=70.6:36.9%)。したがって、母性 mRNA の機能について oocyte maturation、そして受精後の 2 細胞期までの発生における解析が可能であることがわかった。また、2 細胞期から胚盤胞期までの発生については今後の検討が必要であると考えられる。

siRNA を導入するための方法として、transfection 試薬を用いた手法が一般的であるが、周りを granulosa cell で囲まれた growing oocyte では、母性 mRNA の機能解析には不適切であると考えられる。そこで growing oocyte の細胞質への microinjection が可能かどうか、またその後の follicle の発達に影響はないかを eGFP mRNA を用いて検討した。その結果、eGFP mRNA を microinjection したものでは、

growing oocyte の細胞質にのみ 90%以上の割合で EGFP の発現が観察され、growing oocyte に高い割合で microinjection できることがわかった。さらに、microinjection していないもの (uninjected) と microinjection したものとの間で follicle の発達率に差は無く、microinjection による培養への影響がないことが示された。

次に、12 日齢マウス由来の follicle 中の growing oocyte の細胞質に siRNA を microinjection し、卵成長過程に蓄積される母性 mRNA の機能解析が可能であるかどうかを検証した。検証には、母性 mRNA が卵成長過程において蓄積し、oocyte maturation 過程で翻訳され、またノックダウンした際に単為発生が起こるという表現型が知られている、*c-mos* に対する siRNA を用いた。microinjection 後、12 日間の培養期間における follicle の発達率やその後の排卵率は、uninjected のもの、eGFP siRNA を microinjection したもの、*c-mos* siRNA を microinjection したもの間に有意な差は見られなかった。続いて、*in vitro* で 12 日間培養後、fully grown oocyte 中の母性 *c-mos* mRNA の蓄積量について real-time PCR にて解析した。その結果、*c-mos* siRNA を microinjection した fully grown oocyte でのみ特異的に *c-mos* mRNA 蓄積量が大幅に減少していた。加えて、*in vitro* で排卵させた MII 期卵を 24 時間培養しその表現型を確認したところ、*c-mos* siRNA を microinjection した MII 期卵でのみ多く単為発生している卵がみられた。このことから、siRNA が特異的に母性 mRNA の機能を抑制し、12 日間の培養後においても、その効果がみられることがわかった。

以上により、本研究で確立した母性 mRNA の機能解析法により、卵成長期、oocyte maturation、受精後の初期発生期における母性 mRNA の機能を解析できる可能性が示された。

緒言

生殖細胞は体を形成している細胞のうちで唯一、受精を通じて再び次の世代を作り出すことのできる細胞である。マウスの卵形成の過程では、まず始原生殖細胞が作られ、その後始原生殖細胞が卵原細胞へと分化する (Fig. 1)。次に卵原細胞が増殖し、続いて減数分裂が開始し、DNA 複製を終えた後に第一減数分裂前期のディプロテン期で細胞周期を停止し、その後成長していく。この成長する過程を卵成長過程 (oocyte growth) という。この過程では、成長期卵 (growing oocyte) は顆粒膜細胞 (granulosa cell)、及び莢膜細胞 (theca cell) との複合体である卵胞 (follicle) を形成しており、growing oocyte の成長は follicle の発達に付随して起こる。また、すべての growing oocyte が同時期に同じように成長するわけではなく、発達段階初期の follicle のうち、いくつかは卵成長過程に入り、始めは直径が 20 μm であった growing oocyte が成長を完了した時点で 70 μm 以上に達する (fully grown oocyte)。卵成長後、ホルモン刺激により停止していた減数分裂が再開され、卵核胞の崩壊 (Germinal vesicle break down ; GVBD) を経て第一極体を放出し、第二減数分裂の中期で再び細胞周期を停止し未受精卵 (M II 期卵) となり排卵され、受精を待つ。この fully grown oocyte から M II 期卵になる過程を卵成熟過程 (oocyte maturation) という (Hurk and Zhao, 2005)。

growing oocyte 中では、卵特異的な遺伝子の転写が活発に起こっており、転写活性は生後 14 日目のマウスの卵巣内に多く含まれる直径約 55-65 μm の大きさ (Hiura *et al.*, 2006) の growing oocyte でピークを向かえる。そして fully grown oocyte に近づくにつれ転写活性が低くなり、fully grown oocyte では転写活性がまったくみられなくなる (Moore *et al.*, 1974 ; Worrad *et al.*, 1994)。しかし、fully grown oocyte 中には mRNA (母性 mRNA) が非常に安定して蓄積されている。そして oocyte maturation

中および受精後も、しばらく遺伝子発現は行われませんが、1細胞期後期より新たに胚由来の遺伝子発現が開始され、2細胞期に入り、その転写が強く活性化される (Schults, 1995 ; Aoki *et al.*, 1997) (Fig. 2)。

現在では母性 mRNA が oocyte maturation や受精後の発生に機能することが知られている。例えば、*Gpr3* は卵成長過程において発現、翻訳され、fully grown oocyte での減数分裂停止に必要であることが知られている (Mehlmann, 2005)。また、*c-mos* は卵成長過程において発現して母性 mRNA として蓄積し、oocyte maturation 時に翻訳され、第二減数分裂の中期で再び細胞周期を停止させる機能を有することが知られている (Araki *et al.*, 1996)。また、母性 mRNA は受精後にも機能し、4細胞期に至るまでの胚の初期発生に重要であることが報告されている (Kidder, 1992 ; Tong *et al.*, 2000 ; Wu *et al.*, 2003)。このことから、母性 mRNA が卵成長過程から初期発生にかけての幅広い時期に、重要な機能を持っていることが考えられる。しかしながら一方で、多くの母性 mRNA について、解析に適する実験手法が限られているために、その卵成長過程から初期発生にかけての機能が未解明なものとなっている。

一般的に、遺伝子の機能解析法として knockout mouse による解析手法が用いられている。しかしながら、卵成長過程において発現する遺伝子の解析法としては、この方法は不十分となることが多い。なぜならば、解析する遺伝子によっては knockout mouse では胎生致死となり (Yao *et al.*, 1998 ; Lagger *et al.*, 2002)、胎児の卵巣中にある growing oocyte への影響が調べられないからである。この問題を解決するために、近年では Cre/lox P システムを用いた遺伝子相同組換えにより作成した conditional knockout mouse により、組織特異的、部位特異的な遺伝子を解析する方法が用いられている (Orban *et al.*, 1992)。しかし、Cre/lox P システムを用いた解析手法では、相同組み換えを起こす酵素である Cre の発現調節領域による発現量の違いや、lox P 部位がゲノム上で複数、また逆向きに挿入されてしまう可能性がある

ために、得られる表現型が不安定である。また、近年では RNA interference (RNAi) の機構を用いた遺伝子解析法も注目を集めている。RNAi は、double-stranded RNA (dsRNA) によってその配列特異的に mRNA が分解され、その結果遺伝子の発現が抑制される現象である (Fire *et al.*, 1998)。RNAi を利用した knockdown 法は、比較的簡便であり、しかも遺伝子発現の抑制に大きな効果が期待できる。そして、組織や時期特異的に発現するプロモーターと標的となる遺伝子の dsRNA 配列を組み込んだベクターを用いて transgenic mouse を作成できるようになったことで遺伝子の機能解析が以前より容易になった (Wianny *et al.*, 2000 ; Stein *et al.*, 2003)。しかしながら、transgenic mouse においては、導入した遺伝子がホストのゲノムに組み込まれる場所やそのコピー数がランダムとなり、dsRNA の発現量を適当な量に調節できない。これらのことに加えて、上記の遺伝子機能解析手法は、遺伝子改変マウスの作製に多大な時間と労力を要し、卵成長過程において蓄積される母性 mRNA の機能解析を困難なものとしている。

以上のことから、本研究では、配列特異的に mRNA を分解する siRNA を growing oocyte の細胞質に microinjection し、その後 *in vitro* において卵成長期、卵成熟期を経て受精後の初期発生期まで培養することにより、この期間における特定の母性 mRNA の機能を解析するという、母性 mRNA の機能解析のための新たな実験手法の構築を目指した (fig. 3)。新たな実験系の確立にあたっての問題は二点考えられる。まず一つ目は、この時期の growing oocyte は卵巣中にあるため、*in vivo* では直接薬物投与することや特定の遺伝子発現を阻害する等の解析が困難なことである。そこで、現在いくつか報告されている *in vitro* で卵成長過程を構築する実験系を用いて、growing oocyte を *in vitro* で培養し解析につなげるという方法を考えた。二つ目は、機能解析に用いる si (short interference) RNA をどのようにして growing oocyte の細胞質中に導入するかという問題である。siRNA を用いた機能解析で一般に行わ

れているのは、transfection 試薬を用いて培養細胞に導入する手法である。しかしながら、母性 mRNA を合成している時期の growing oocyte は、その成長に関与していることが知られている granulosa cell、theca cell に囲まれているため、transfection 試薬による RNAi 法では、granulosa cell、theca cell に作用してしまう可能性があり、それによる growing oocyte への副次的な影響が考えられる。また、granulosa cell、theca cell を剥がし、直接 growing oocyte に transfection するという方法もあるが、growing oocyte は granulosa cell と協調して卵成長をする (Sugiura *et al.*, 2005) ために、granulosa cell がないと成長できず、oocyte maturation 以降の母性 mRNA の遺伝子機能を解析する手法としては不適切である。そこで siRNA を follicle 中にある growing oocyte に直接 microinjection する方法を考えた。

そのため、まず解析に用いる follicle と、それを *in vitro* で成長させる (*in vitro* growth) ための条件検討を行った。次に、実際に生後数日たったマウスから回収した follicle 中の growing oocyte の細胞質に microinjection が可能か、またその後の *in vitro* growth における影響を検証した。続いて、実際に母性 mRNA に対する siRNA を microinjection し、その効果を確認した。

材料と方法

follicle の採取

C57BL/6 雌マウスと DBA2 雄マウスを交配させて得た BDF1 雌マウスを使用した。生後 8 日齢、12 日齢マウスを頸椎脱臼にて屠殺し、卵巢の周りに結合している余分な組織を剥がし、卵巢のみを Whitten's medium (WM) (Whitten, *et al.*, 1971) に入れた。その後、顕微鏡下で卵巢を 30 G の針 (TERUMO CO, LTD. Tokyo, Japan) で崩して follicle を回収した。すべての操作は 37°C で行った。

follicle は、growing oocyte が丸いもの、丸い growing oocyte が見えて follicle の中央に位置しているもの、という条件のもと選択した。

follicle 培養用の培地とホルモン

follicle の培養は 3 種類の培地 (Lenie *et al.*, 2004) を用いて行った。Medium I (follicle 培養用) ; α -minimal essential medium (MEM) -glutamax without (deoxy) ribonucleosides (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) に非働化した 1% fetal bovine serum (FBS ; Sigma chemical co. MO, USA)、100 mIU/ml pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG ; Teikokuzouki CO, LTD. Tokyo, Japan)、5 μ g/ml insulin、5 μ g/ml transferrin、5 ng/ml sodium selenium (Sigma chemical co. MO, USA) を添加したものをを用いた。Medium II (follicle 培養用) ; α -minimal essential medium (MEM) -glutamax with (deoxy) ribonucleosides (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) に 5% FBS、100 mIU/ml PMSG、5 μ g/ml insulin、5 μ g/ml transferrin、5 ng/ml sodium selenium を添加したものをを用いた。Medium III (排卵誘導用) ; α - MEM-glutamax with (deoxy) ribonucleosides に 5% FBS、1.5 IU/ml human chorionic gonadotropin (hCG ; Teikokuzouki CO, LTD. Tokyo, Japan)、5 ng/ml epidermal growth factor (EGF ; Sigma

chemical co. MO, USA)、5 µg/ml insulin、5 µg/ml transferrin、5 ng/ml sodium selenium を添加したものをを用いた。

follicle の *in vitro* growth と *in vitro* における oocyte maturation と排卵誘導

8 日齢マウス由来の follicle の培養：培養皿 (90-mm CHIC シャーレ) (ASONE CO, LTD. Osaka, Japan) に Medium I を 10 µl ずつ 20 滴並べ、その上を 20 ml のミネラルオイル (Sigma chemical co. MO, USA) でカバーした。その後、38°C、5%CO₂、95% air の条件にて overnight であらかじめ incubate して平衡化させた。上記の条件にて選択した follicle を、100 µl の Medium I で 3 回洗浄した後、1 つずつ滴の中に入れ、38°C、5%CO₂、95% air の条件にて培養を行った。培養 4 日目に、10 µl ずつ新鮮な Medium I をそれぞれの滴に加えた。培養 6 日目に同様に用意した Medium II を含む培養皿に follicle を移した。培養 8 日目に各滴に新鮮な Medium II を 10 µl ずつ加えた。培養 10 日目から以降は、2 日おきに培養に使用していた 20 µl の培地のうち 10 µl を、新鮮な Medium II と交換した。

12 日齢マウス由来の follicle の培養：培養皿 (90-mm CHIC シャーレ) に Medium II を 10 µl ずつ 20 滴並べ、その上から 20 ml のミネラルオイルでカバーした。その後、38°C、5%CO₂、95% air の条件にて overnight であらかじめ incubate して平衡化させた。上記の条件にて選択した follicle を、100 µl の Medium II で 3 回 wash した後、1 つずつ滴の中に入れ、38°C、5%CO₂、95% air の条件にて培養を行った。培養 2 日目に、10 µl ずつ新鮮な Medium II をそれぞれの滴に加えた。培養 4 日目から以降は、2 日おきに培養に使用していた 20 µl の培地のうち 10 µl を、新鮮な Medium II と交換した。培養最終日に、発達した follicle から fully grown oocyte を採取するか、または、排卵誘導後に培養して oocyte maturation を起こさせた MII 期卵を採取した。fully grown oocyte を回収する際には、ピペッティングにて周りの卵丘細胞を除去後、

0.1% PVP/PBS で洗浄した。また oocyte maturation および排卵誘導により MII 期卵を回収する際には、まず培養最終日に培養していた 20 μ l の培地のうち 10 μ l を Medium III と交換した。その 18 時間後に *in vitro* で排卵した卵を回収し、hyaluronidase (Sigma chemical co. MO, USA) にて卵丘細胞を剥がして MII 期卵を得た。

fully grown oocyte と MII 期卵の採取

3 週齢 BDF 1 マウス雌に過排卵処理として 5 IU の PMSG を腹腔内投与した。PMSG 投与後 48 時間後に頸椎脱臼にて屠殺した後、卵巣を 20 mM HEPES を含む KSOM 培地 (Lawitts and Biggers, 1993) に移した。その後 30G の針を用いて卵巣を破壊し、ピペッティングにて周りの卵丘細胞を除去後、fully grown oocyte を 0.1% PVP/PBS で洗浄した。fully grown oocyte は直径 70~80 μ m のものを使用した。その後、5% FBS、5 ng/ml EGF を添加した α -MEM (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) で 3 回洗浄した後、38°C、5%CO₂、95% air の条件にて oocyte maturation を誘導し、15 時間培養後に MII 期卵を得た。

In vitro fertilization (IVF)

In vitro で排卵が確認された卵あるいは、PMSG を腹腔内投与したマウスから得た fully grown oocyte を *in vitro* で oocyte maturation させた MII 期卵を回収し、HTF 培地 (Quinn and Begley, 1984) に移した。体外受精は、ICR マウスリタイア雄 (SLC) の精巣上体尾部から採取した精子を、HTF 培地中で 2~3 時間前培養したのを用いて行った。媒精 3~4 時間後、受精卵を KSOM 培地と HTF 培地を混合した培地に移して 30 分間培養した。その後、受精卵を KSOM 培地に移して培養を継続した。培養は全て、38°C、5%CO₂、95% air の条件下で行った。

growing oocyte の採取

生後 12 日齢の BDF1 マウス雌から卵巣を回収し、Trypsin-EDTA (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) で 37°C、10 分間処理を行って growing oocyte を得た。growing oocyte は 0.1% PVP/PBS に移し、ピペティングにて周りの顆粒膜細胞を除去した。growing oocyte は直径 50~65 μm を使用した。

RNA 抽出

ISOGEN (Nippon Gene Co., Toyama, Japan) をエッペンチューブに 400 μl 入れ、その中に周りの細胞を除去後の oocyte を入れ、-80°Cにて一時保存した。室温に戻し、それぞれのサンプルに external control として 50 pg/ μl α -globin mRNA をそれぞれ 1 μl ずつ添加し、100 μl のクロロホルムを加え、ボルテックスミキサーにて激しく混合した。4°Cで 5 分間放置したのち、12,000 rpm、4°Cで 15 分間遠心し RNA の含まれる水層（上層）の 240 μl を新しいエッペンチューブに移した。共沈剤の 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Glycogen (Invitrogen Co., Faraday Avenue Carlsbad, CA, USA) をそれぞれのチューブに加えしっかりと攪拌した後、イソプロパノールをそれぞれのチューブに 400 μl ずつ加え、1 分間激しく攪拌した。その後 4°Cで 30 分間放置した後、15,000 rpm、4°Cで 15 分間遠心し、RNA の沈殿を得た。沈殿に 70%のエタノールを 500 μl 加え沈殿を洗い、再び 15,000 rpm、4°Cで 5 分間遠心した。エタノールを除去し、吸引式乾燥機で 7 分間乾燥した後、DEPC 水 28.5 μl を加えた。ピペティングと 55°Cで 12 分間放置することにより RNA を溶解した。

RT- polymerase chain reaction (PCR)

Total RNA 27 μl に 2 μl の 10 mM dNTP (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA)、2 μl の Oligo (dT)₁₂₋₁₈ primer (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) を加え、全量 31 μl と

した。この混合液を 70°C で 5 分間インキュベートして RNA の高次構造を破壊した。氷中に 1 分以上置き、10×Reaction Buffer (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) 4 µl、RNasin (Promega, Corp., Woods Hollow Road, Madison, USA) 0.5 µl、ReverseScriptIV (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) 0.5 µl、DEPC 水 4 µl を順に入れ、マイクロチップの先でよく混合した。42°C で 1 時間、51°C で 30 分間、95°C で 5 分間反応させたのち温度を 4°C に下げ、軽く遠心して反応液をチューブの底に集めた。RNaseH (TaKaRa, Shiga, Japan) を 0.5 µl (2 units) 加え、37°C で 40 分間インキュベートして DNA と 2 本鎖をなす未反応の RNA を除去した。

cDNA の精製

RT-PCR 産物に、1/10 量の 3M 酢酸ナトリウム、2.5 倍量の 100%エタノールを加え、ボルテックスミキサーにてしっかりと攪拌した。その後 30 分間、室温で放置した。12,000 rpm、4°C、15 分間遠心し、cDNA の沈殿を得た。100%エタノールを除去し、70%エタノール 500 µl を加えてチューブを洗い、再度 12,000 rpm、4°C、5 分間遠心した。遠心後 70%エタノールを除き、7 分間真空乾燥した。乾燥後、滅菌蒸留水に cDNA を溶かした。

Real-time polymerase chain reaction (PCR)

合成した cDNA を鋳型とし、Smart Cycler System (Cepheid, Sunnyvale, USA. and TaKaRa, Shiga, Japan) を用いた Real-time polymerase chain reaction (PCR) により定量を行った。DNA に二本鎖 DNA 染色剤である 3×SYBR[®] Green I を 2.5 µl (BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, USA)、2.5 µl の 10×buffer、0.3 µl の 250 mM MgCl₂、1.25 µl の 10 µM 各プライマー、0.75 µl の 10 mM, dNTPs 1.25 units の Ex Taq[™]R-PCR Version (TaKaRa, Shiga, Japan) を加えて全量が 25 µl になるよう

に滅菌蒸留水を加え PCR 反応液を作製した。Real-time PCR に用いた rabbit α -globin、*c-mos*、*cyclinA2* (Alizadeh *et al.*, 2005 ; Kageyama *et al.*, 2004) に対する各プライマー配列並びに PCR 条件は下に示す。

Rabbit α -globin

Sense: 5'-GTGGGACAGGAGCTTGAAAT-3'

Antisense: 5'-GCAGCCACGGTGGCGAGTAT-3'

95°C、30 秒 →(95°C、20 秒 →58°C、30 秒 →72°C、30 秒→91°C、6 秒 (optics on))×35

c-mos

Sense: 5'-CTCCGGAGATCCTGAAAGGA-3'

Antisense: 5'-CAGTGTCTTTCCAGTCAGGG-3'

95°C、20 秒 →(95°C、20 秒 →58°C、30 秒 →72°C、30 秒→86°C、6 秒 (optics on))×37

cyclin A2

Sense: 5'-GAGGTGGGAGAAGAATATAA -3'

Antisense: 5'-ACTAGGTGCTCCATTCTCAG -3'

95°C、20 秒 →(95°C、15 秒 →56.4°C、20 秒 →72°C、20 秒→84°C、6 秒 (optics on))×38

microinjection 用 eGFP mRNA の調整

① プラスミドの作成

pEGFP-N1 プラスミドにある eGFP の配列を鋳型として、eGFP を PCR により増

幅した。2.5 μ l の 10 \times buffer、0.3 μ l の 250 mM MgCl₂、1.25 μ l の 10 μ M 各プライマー、0.75 μ l の 10 mM dNTPs 、1.25 units の Ex TaqTMR-PCR Version を加えて全量が 25 μ l になるように滅菌蒸留水を加え PCR 反応液を作製した。PCR に用いた eGFP に対するプライマー配列並びに PCR 条件は下に示す。

eGFP

Sense: 5'-ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG-3'

Antisense: 5'-TTACTTGTACAGCTCGTCCATG-3'

95 $^{\circ}$ C、30 秒 \rightarrow (95 $^{\circ}$ C、30 秒 \rightarrow 58 $^{\circ}$ C、30 秒 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C、45 秒) \times 20 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C、7 分

増幅した PCR 産物を 2%の低融点アガロースゲルで電気泳動を行い、約 700 bp の位置のバンドの切り出しを行った。切り取ったバンドは Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Corp., Woods Hollow Road, Madison, USA) を用いて精製した。精製して得た PCR 産物を TOPO[®] TA Cloning (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) の手法に従ってベクターに組み込んだ。大腸菌 (One Shot[®], Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) にトランスフォーメーションし、50 μ g/ml Ampisiline (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) を含み、20% Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG ; Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)、40 mg/ml X-GAL (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) を 40 μ l ずつ塗布した LB 寒天培地で培養した。培養後、でてきた白色コロニーをサンプルとして eGFP を増幅させる際に用いたプライマーによりダイレクト PCR を行い、目的産物がクローニングされていることを確かめた。また、BigDyeTM Terminator v3.0 kit (Applied Biosystems) を用いたシークエンスを行い、配列と PCR 産物が挿入された方向を確認した。

② プラスミドの直鎖化と精製

トランスフォーメーションした大腸菌を 50 µg/ml Ampisililine-LB 培地で培養後、Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Corp., Woods Hollow Road, Madison, USA) の手法に従ってプラスミドを精製した。また、プラスミド DNA の濃度は Gene Quant *pro* (Amersham pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) を用い、吸光度から算出した。

得られたプラスミドを制限酵素 Not I (TaKaRa) で処理することにより、プラスミドを直鎖化した。このサンプルに、全量が 200 µl になるように、Diethylpyrocarbonate 処理水 (DEPC ; Ambion, Corp., USA) を加えた。その後、フェノールを 200 µl 加え、ボルテックスミキサーにてしっかりと攪拌した。15,000 rpm、4°C、5 分間遠心し、DNA の含まれる水層 (上層) を新しいエッペンチューブに移した。サンプルと等量の CIA (クロロホルム:イソアミルアルコール=24:1) を加え、ボルテックスミキサーにてしっかりと攪拌後、15,000 rpm、4°C、5 分間遠心した。再び上層を新しいエッペンチューブに回収し、1/10 量の 3M 酢酸ナトリウム、あらかじめ冷やしておいた 2.5 倍量の 100%エタノールを加え、ボルテックスミキサーにてしっかりと攪拌した。その後 30 分間以上、室温で放置した。15,000 rpm、4°C、20 分間遠心し、DNA の沈殿を得た。100%エタノールを除去し、あらかじめ冷やしておいた 80%エタノール 500 µl を加えてチューブを洗い、再度 15,000 rpm、4°C、5 分間遠心した。遠心後 80%エタノールを除き、7 分間真空乾燥した。乾燥後、10 µl の DEPC 処理水で DNA を溶かした。DNA の濃度は Gene Quant *pro* を用い、吸光度から算出した。

③ *in vitro* transcription による mRNA の合成と Poly(A)化反応

mMESSAGE mMACHINE® SP6 Kit (Ambion, Corp., USA) を用いて転写反応を行

った。2 μ l の SP6 10 \times Rxn buffer、10 μ l の SP6 2 \times NTP/CAP ribomix、2 μ l の 10 \times Enzyme buffer、一本鎖化し精製した DNA を 1.5 μ g となるように加え、全量を 20 μ l となるように nuclease free water (付属) を加えた。マイクロチップの先でよく混合した後、37 $^{\circ}$ C、2 時間インキュベートした。2 unit/ μ l の RNase-free DNase I を 1 μ l 加え、37 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートし、残存している DNA を除去した。

in vitro transcription 後のサンプルに、Poly(A) Tailing kit (Ambion, Corp., USA) を用いて Poly(A)付加を行った。20 μ l の mMESSAGE mMACHINE 反応液、36 μ l の nuclease-free water (付属)、20 μ l の 5 \times E-PAP Buffer、10 μ l の 25mM MnCl₂、10 μ l の ATM を加えマイクロチップの先でよく混合した後、E-PAP を 4 μ l 加え、37 $^{\circ}$ C、1 時間インキュベートした。反応後は、2% アガロースゲル電気泳動にて Poly(A)付加を確認した。

④ mRNA の精製

Poly(A)付加したサンプルに、100 μ l の DEPC 処理水、1/10 量の酢酸アンモニウム (付属)、サンプルと等量のサンプルと等量の CIA を加え、ボルテックスミキサーにてしっかりと攪拌した。15,000 rpm、4 $^{\circ}$ C、3 分間遠心し、RNA の含まれる水層 (上層) を新しいエッペンチューブに移した。再びサンプルと等量の CIA (クロロホルム:イソアミルアルコール=24:1) を加え、ボルテックスミキサーにてしっかりと攪拌後、15,000 rpm、4 $^{\circ}$ C、5 分間遠心した。上層を新しいエッペンチューブに回収し、等量の 100% イソプロパノールを加え、ボルテックスミキサーにてしっかりと攪拌後、15 分間以上、-80 $^{\circ}$ C で放置した。15,000 rpm、4 $^{\circ}$ C、30 分間遠心し mRNA の沈殿を得た。100% イソプロパノールを除去し、あらかじめ冷やしておいた 80% エタノール 500 μ l を加えてチューブを洗い、再度 15,000 rpm、4 $^{\circ}$ C、5 分間遠心した。遠心後 80%エタノールを除き、室温にて風乾した。乾燥後、10 μ l の DEPC 処

理水に mRNA を溶解させた。濃度は Gene Quant *pro* を用い、吸光度から算出した。測定後は、microinjection を行うために mRNA を 100 ng/ml の濃度になるよう調整した。

核相の観察 (DNA の染色)

In vivo、*in vitro* で成長した fully grown oocyte をそれぞれ回収し、直ちに新鮮な 3.7% PFA-PBS 中に移して overnight で固定した。固定した卵を 0.1% BSA-PBS で 10 分かけて洗浄し、0.5 % Triton X を含む PBS で室温 15 分間放置した。0.1% BSA-PBS で洗浄した後、RNase を 0.1% PBS-BSA で 10 倍希釈した液の中で卵を 45 分間処理した。再び 0.1%BSA-PBS で 10 分かけ 3 回洗浄し、VectaShield で 10 倍希釈した propidium iodide を用いてホールマウント標本とした。核相は、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM 510) を用いて観察した。

si (short interference) RNA の調整

siRNA は、Invitrogen program BLOCK-iT™ RNAi Designer (<https://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/>) を用いて作成した。また、siRNA すべてに invitrogen program Convert standard siRNA to Stealth™ RNAi (<https://rnaidesigner.invitrogen.com/sirna/extend.do?pid=2660227812202383890>) を用いて stealth 修飾を施した。siRNA は付属の RNase free water で溶解し、20 nM の濃度に調整した。microinjection に用いた eGFP (Kageyama *et al.*, 2006)、*c-mos* の siRNA の配列は下に示す。

eGFP : 5'- CCACUACCUGAGCACCCAGUCCGCC-3'

c-mos : 5'- AGUCACUGAUCUUACAAACGUCUUG-3'

growing oocyte の細胞質への siRNA microinjection

microinjection は Inverted microscope (ECLIPSE TE300, Nikon Corporation, Tokyo, Japan) と micromanipulator (Narishige Co., Ltd., Tokyo, Japan) を使い、borosilicate glass capillaries (GC100 Tf-10, Harvard Apparatus Ltd., Kent, UK) 中に入れた各ターゲット遺伝子の siRNA を microinjector (IM300, Narishige Co., Ltd.) により N_2 の圧力で押し出し、12 日齢マウス由来の follicle 中の growing oocyte の細胞質に約 5~10 pl 注入した。注入後の follicle は、100 μ l の *in vitro* growth 用の medium II で三回洗浄したのち培養した。注入は 20 mM HEPES を含む KSOM 培地中で行った。

結果

マウスの日齢と培養期間による follicle の *in vitro* growth への影響

in vitro における growing oocyte の培養条件を検討するために、その使用するマウスの日齢と培養期間の影響を調べた。生後 8 日齢マウスと 12 日齢マウスの卵巣から回収した follicle を用いて、それぞれ 14、16、18 日間 (8 日齢)、および 10、12、14 日間 (12 日齢) で培養を行った。本研究において培養最終日に、培養皿に付着し、かつ growing oocyte と growing oocyte の周りの granulosa cell、theca cell とが複合体を形成している follicle を正常に発達したと定義し、その割合とマウスの日齢および培養期間についての関係を調べた。また、同様に排卵率、卵成熟率についても調べた。その結果、follicle 発達率、排卵率、卵成熟率ともに、すべての培養期間で 12 日齢マウス由来の follicleの方が 8 日齢マウスよりも高かった (Fig. 4A-C)。また、12 日齢マウス由来の follicle については、follicle 発達率と排卵率は培養期間での違いは見られなかった。しかしながら卵成熟率においては 12 日間の培養を行ったときに比較的高いことがわかった。そこで、本研究において以降の実験は 12 日齢マウス由来の follicle を 12 日間培養することとした。

follicle の直径の違いによる *in vitro* growth への影響

培養開始時における follicle の直径と follicle 発達率、排卵率、卵成熟率との関連を調べた。12 日齢マウスの卵巣から回収されてきた follicle は、100-125 μm の直径をもつものが最も多いことがわかった。次に 80-100 μm 、125-160 μm の直径をもつものが多く含まれており、80 μm 以下や 160 μm 以上の直径をもつものは、卵巣からほとんど回収されなかった (Fig. 5A)。培養開始時の直径が 80 μm から 160 μm の follicle を直径別に 12 日間培養した結果、培養開始時の直径が 100-125 μm の

follicle が最も高い割合で follicle が発達することがわかった。さらに、排卵誘導後の排卵率、卵成熟率も同様な結果が得られた (Fig. 5B-D)。この結果から *in vitro* における follicle の培養は、直径 100-125 μm のものを使用することとした。

growing oocyte の直径の違いによる *in vitro* growth への影響

培養開始時における growing oocyte の直径と follicle 発達率、排卵率、卵成熟率との関係について調べた。12 日齢マウスの卵巣から回収された follicle 中の growing oocyte について大きさを調べたところ、50-65 μm の直径をもつ growing oocyte が多く回収されてくることがわかった (Fig. 6A)。また、培養開始時の直径別に培養後の follicle 発達率を調べると、培養開始時に 50-65 μm の直径をもつ growing oocyte が最も高い割合で発達することがわかった。(Fig. 6B)。さらに *in vitro* での排卵に至っては、培養開始時に 50-65 μm の直径である growing oocyte でのみ確認された (Fig. 6C)。また、これらの排卵された卵の成熟率は 39.6%であった。以上のことから、培養開始時において follicle 中に存在する growing oocyte の直径が 50-65 μm であることが *in vitro* の培養に必要であり、以降の実験にはこの直径の growing oocyte のみを使用することとした。

in vivo で成長した卵と *in vitro* で成長した卵との比較

In vitro で成長した卵が *in vivo* で成長した卵と構造や機能において違いがあるかどうかを調べるために、MII 期卵の直径、fully grown oocyte の核相、卵成長過程における 母性 mRNA の蓄積量について比較した。MII 期卵は、透明体を除く卵自体の直径について測定した。*In vivo* で成長した卵では、平均して 74.9 \pm 1.0 μm の直径であった。また、*in vitro* で成長した卵では、平均して 72.8 \pm 2.6 μm の直径であった (Fig. 7A)。平均値では両者に有意な差は認められなかったが (student's *t*-test、

$P > 0.05$)、*in vitro* のものは直径にばらつきがあった。

次に、正常なクロマチンのリモデリングが行われているかどうかを *fully grown oocyte* の核相について DNA を染色して調べた。卵成長過程においてクロマチン構造が変化し、NSN (Non-surrounded nucleus) 型から SN (Surrounded nucleus) 型になることが知られている。SN 型は核小体の回りを取り囲むようにヘテロクロマチンが凝集したものであり、その核相をもつ *fully grown oocyte* は *oocyte maturation* 後の胚盤胞を形成する割合が高い。一方、NSN 型はクロマチンが脱凝集した状態で核内に一様に広がっているものであり、MII 期卵および胚盤胞形成率が極めて低い (Fuente, 2006 ; Zuccotti *et al.*, 1998 ; Liu *et al.*, 2002)。以上のことから、卵成長過程における NSN 型から SN 型への核相の変化は *meiotic competence* と *developmental competence* を反映していると考えられている。そこで、*in vivo*、*in vitro* で成長した *fully grown oocyte* を比較して核相に違いがあるかどうかを調べた結果、SN 型の割合には差が見られなかった (Fig. 7B)。このことから、*in vitro* で成長した卵においてもクロマチンのリモデリングが正常に行われている事がわかった。

卵成長過程における母性 mRNA の蓄積量の変化を、*c-mos* について *real-time PCR* を用いて調べた。*In vivo*、*in vitro* それぞれで成長した *fully grown oocyte* 中の *c-mos* mRNA について、12 日齢マウスの *growing oocyte* の値を 1 としたときの相対値を示した (Fig. 7C)。その結果、*in vivo*、*in vitro* での成長に関係無く、卵成長過程における母性 mRNA の蓄積が起こることが確認できた。

***In vitro* growth が初期発生へ与える影響**

12 日齢マウスの卵巣より上記で定めた *follicle* の直径、*growing oocyte* の直径に従い *follicle* を回収した。12 日間 *in vitro* で培養した後、*follicle* 発達率を調べたところ 89.5% (469/524) となり、高い割合で *in vitro* における *follicle* の発達がみられ

た。続いて、培養 12 日目に hCG を含む培地を添加することにより *in vitro* での排卵を誘導し、排卵率について調べた (Table. 1)。排卵率では *in vivo* で成長した卵では 65.7% (266/405) であるのに対し、*in vitro* で成長した卵では 62.7% (294/469) であり、統計的に有意な差は見られなかった (χ^2 -test, $P>0.05$)。その後排卵された卵を回収して体外受精を行い、その後の初期発生が正常に行われるかどうかについて調べた (Table. 2)。受精後の 2 細胞期胚にいたる割合は、*in vivo* が 57.5% (153/266) であるのに対して *in vitro* では 55.7% (122/219) となり、受精率については有意な差はみられなかった (χ^2 -test, $P>0.05$)。一方で、2 細胞期胚から胚盤胞期まで発生した割合を調べたところ、*in vivo* では 70.6% (108/153) であるのに対して *in vitro* では 36.9% (45/122) となり、有意な差がみられた (χ^2 -test, $P<0.05$)。以上のことから、*in vitro* で成長した卵では *in vivo* で成長した卵と比較して、受精後から 2 細胞期までの発生は正常に起こり、2 細胞期胚から胚盤胞期までの発生率が大きく低下することがわかった。

granulosa cell に囲まれた growing oocyte に対する microinjection の検証

granulosa cell に囲まれた growing oocyte の細胞質に microinjection が可能かどうかを、eGFP mRNA を用いて検証した (Fig. 8A 写真左)。eGFP mRNA の microinjection から 3~4 時間後に観察したところ、EGFP の発現が growing oocyte の細胞質にのみ観察された (Fig. 8A 写真右)。microinjection した卵 68 個のうち 62 個 (91.2%) でこのような EGFP の発現が確認された。次に、microinjection による *in vitro* growth への影響を調べるために、eGFP mRNA を growing oocyte の細胞質へ microinjection した follicle を、*in vitro* で 12 日間培養させて正常に follicle が発達するかどうかを調べた。この結果、microinjection していないもの (uninjected) と eGFP mRNA を microinjection したものを比較しても、両者の間に差は見られなかった (uninjected :

eGFP mRNA =14/20 : 15/20 , Fig. 8B)。これらのことから、granulosa cellに囲まれた growing oocyteの細胞質へのmicroinjectionが可能であり、この操作がその後のfollicleの発達に影響を及ぼさないことが明らかになった。

siRNAによる卵成長過程における母性 mRNA の機能解析法確立の検証

siRNAを用いた卵成長過程における母性 mRNA の機能解析法の確立を検証するために、実際に12日齢マウス由来のfollicle中のgrowing oocyteの細胞質にsiRNAをmicroinjectionし、表現型を確認した。検証には、卵成長過程においてmRNAが蓄積し、またknockout mouseを用いた実験によりgrowing oocyteでは表現型が見られず、MII期卵以降で初めて表現型が見られることが明らかとなっている*c-mos*を用いた。すなわち、12日間の培養による卵成長過程を通してsiRNAが母性mRNAを分解し続けることができるかどうかを確認するためには、抑制することにより卵成長が途中で止まってしまうような、卵成長にかかわる遺伝子をターゲットにするのは不適切だからである。そこで欠損させた表現型として、MII期卵で正常に細胞周期が停止せず、単為発生する (Hashimoto *et al.*, 1994 ; College *et al.*, 1994 ; Araki *et al.*, 1996) ことが知られている*c-mos*を用いて行った。

12日齢マウスのgrowing oocyteの細胞質に*c-mos* siRNAをmicroinjectionし、*in vitro*で12日間培養後、fully grown oocyte中の母性*c-mos* mRNAの蓄積量についてreal-time PCRにて解析した (Fig. 9)。細胞質中の*cyclin A2*のmRNA蓄積量についてはmicroinjectionを行わなかったもの (uninjected) と比較して、変化が見られなかったのに対し、*c-mos* siRNAをmicroinjectionしたfully grown oocyteでのみ*c-mos* mRNA蓄積量が大幅に減少していた。一方、siRNA microinjectionのコントロールとしてeGFP siRNAを用いたものは、uninjectedのものと比較して、*c-mos* および*cyclin A2* mRNAともに減少は認められなかった。この結果から、12日間の培養期

間を通して *c-mos* の siRNA が配列特異的に mRNA の分解を引き起こし、成長過程における *c-mos* mRNA の蓄積を抑制していることがわかった。

siRNA microinjection による *in vitro* growth への影響

まず、growing oocyte の細胞質への *c-mos* siRNA の microinjection がその後の follicle の成長に影響を及ぼすかどうかを確かめるために、培養 2 日目から 2 日おきに follicle の形態的な変化を調べた。培養過程において *c-mos* siRNA を microinjection した follicle は正常な発育を示した (Fig. 10)。この結果、uninjected と比較して、follicle 発達率はわずかに低い値を示したが、統計的有意差は見られなかった (Fig. 11A, χ^2 -test ; $P>0.05$)。

次に、siRNA microinjection による排卵率への影響について調べた。*c-mos* siRNA を microinjection した follicle の排卵率は microinjection を行っていない follicle と比較してわずかに低い値を示したが、統計的有意差は見られなかった (Fig. 11B, χ^2 -test ; $P>0.05$)。以上のことから、siRNA を microinjection することによる 12 日間の培養期間中の follicle の発達や、排卵への影響はほとんどないことが示された。

siRNA microinjection による表現型

siRNA を用いた卵成長過程における遺伝子制御機構を解析する新たな実験系の確立をより確かなものにするために、*c-mos* siRNA を microinjection し培養した後の MII 期卵の表現型を検証した。培養 12 日目に hCG を含む培地にて排卵誘導し、18 時間後に *in vitro* で排卵した卵を回収し、その後 KSOM 培地に移して 24 時間培養した。排卵誘導後 18 時間の MII 期卵を観察したところ、*c-mos* siRNA を microinjection した卵でのみ異常な大きさの極体を放出しているものがみられた (Fig. 12A 写真上)。KSOM 培地にて 24 時間培養後、microinjection を行っていな

い卵や eGFP siRNA を microinjection した卵では MII 期で停止していたのに対し、*c-mos* siRNA を microinjection した卵では大きな極体が 2 個みられるものや 2 細胞期胚へ単為発生がみられた (Fig. 12A 写真下)。

KSOM 培地にて 24 時間培養後の卵の DNA を染色し、核相の状態を確認した。その結果、*c-mos* siRNA を microinjection した卵でのみ、*c-mos* knockout mouse の未受精卵にみられる class 別のすべて表現型 (Hirao *et al.*, 1997) と同様のものがみられた (Fig. 12B)。またこれらの表現型の出現率を調べたところ、*c-mos* siRNA を microinjection した卵は 84.2% (32/38) であったのに対し、microinjection していない卵では 2% (1/50)、eGFP siRNA を microinjection した卵は 2% (1/51) となった (Fig. 12C)。これは統計的に有意な差がみられた (student's *t*-test、 $P < 0.001$)。

以上の結果から、本研究にて確立を試みた実験法が、卵成長過程で蓄積する母性 mRNA の卵成熟および初期発生に及ぼす影響を解明する上で有効な手法となりうることを示された。

考察

本研究の目的は、マウスの *growing oocyte* の細胞質に siRNA を *microinjection* し、その後 *in vitro* で培養させることにより、卵成長過程から初期発生期における母性 mRNA の機能を解析する手法を確立することである。

現在までに、一般的な遺伝子解析手法として *knockout mouse* による方法が用いられてきたが、ターゲットとなる遺伝子によっては胎生致死となる場合があった (Yao *et al.*, 1998 ; Lager *et al.*, 2002)。そこで *Cre/lox P* システムを用いた *conditional knockout mouse* (Orban *et al.*, 1992) や RNAi を用いた *transgenic mouse* 作成による母性 mRNA による解析 (Wianny *et al.*, 2000 ; Stein *et al.*, 2003) が行われてきた。しかしながら、これらの方法では遺伝子改変マウスの作成に多大な時間と労量を要し、また表現型が安定して得られない可能性がある。そこで、従来の方法よりもより簡便に、そして直接的に卵成長過程で蓄積される母性 mRNA の機能解析を行う手法を確立することが必要不可欠である。

本研究では、マウスの卵巣中にある *follicle* を回収し、*follicle* 中の *growing oocyte* の細胞質に解析したい母性 mRNA に対して特異的な抑制効果をもつ siRNA の *microinjection* を行い、その後、*microinjection* した *follicle* を *in vitro* で培養するという手法を試みた (Fig. 3)。新規解析法の確立にあたっての問題として、1) どのような条件の *follicle*、*growing oocyte* が *in vitro* でより高い割合で発達、排卵、*oocyte maturation*、そして発生するか、2) siRNA を *microinjection* することで、この操作による副次的な作用がなくターゲットとした母性 mRNA を効果的に抑制できるか、という二点が挙げられる。そこでまず、これらの問題を検討すべく実験を行った。

まず、一つ目の問題である解析に用いるための *follicle* の条件と *in vitro* における培養条件について検討した。始めに、現在報告されている *in vitro growth* に関する

文献を参考にし(Hartshorne GM, 1997)、*in vitro* における follicle の培養条件の検討を試みた。効果的に母性 mRNA を抑制し、機能解析するためには、母性 mRNA の蓄積がより少ない時期に siRNA を microinjection することが望ましい。そのため、卵成長段階においてより早い段階にある follicle を用いた *in vitro* growth を行うことを目指した。follicle は、その大きさや形状に応じて分類されている (Torben and Hannah., 1968)。この分類により定義されている Type3b から Type5a と呼ばれる medium follicle の *in vitro* における培養方法として、酵素処理により卵巣から follicle を回収し、5% O₂、5%CO₂、90% N₂ の気相条件の下 *in vitro* で培養する方法 (O'Brien *et al.*, 1996) と、機械的に卵巣から follicle を回収し、5% CO₂、in air の気相条件の下 *in vitro* で培養する方法 (Cortvrindt *et al.*, 1996) が報告されている。これらの培養方法を用いて、*in vitro* における follicle の培養を試みた結果、後者の培養方法が簡便で結果の再現性も高かった (データ未掲載)。そこでこの方法を用いて、*in vitro* growth に用いる follicle の条件検討を行った。その結果、12 日齢マウス由来の follicle であつ、*in vitro* での 12 日間の培養が最も早い段階でより高い割合で follicle の発達、排卵、oocyte maturation までいたることがわかった (Fig. 4)。

次に、マウスの卵巣からは多くの follicle が回収されるが、follicle や follicle 中の growing oocyte の大きさは一様ではない。また今までに、growing oocyte の直径によって DNA のメチル化状態が変化することや、減数分裂を進行するための能力や発生するために必要な能力に差異があることが報告されている (Sorensen *et al.*, 1976 ; Hiura *et al.*, 2006)。培養開始時における growing oocyte の差異が、培養後の解析結果に影響を及ぼす可能性もあることから、用いる follicle や growing oocyte の大きさを比較し、よりばらつきの少ない結果が得られる条件を検討した。その結果、卵巣より回収された follicle の直径が 100-125 μm であつ、follicle 中の growing oocyte の直径が 50-65 μm のものがより高い割合で培養開始時から oocyte maturation までいた

ることがわかった (Fig. 5、6)。今まで報告されている *in vitro* growth に関する研究においては、培養に用いる follicle の直径と形状についてその基準が決められていたが (Smits and Cortvrindt., 2002)、growing oocyte の直径までは言及されていなかった。しかし、growing oocyte とその周囲を囲む granulosa cell との間で、代謝の協調作用により follicle の発達、および卵の成長が起こることが知られている (Sugiura *et al.*, 2005)。以上のことから、*in vitro* growth には growing oocyte の直径と follicle の直径とのバランスが重要であり、本研究において定めた follicle の条件や培養条件を用いることでサンプルによる解析時のばらつきを減らすことができると考えられる。

in vivo で成長した卵と *in vitro* で成長した卵とを比較した結果、まず MII 期卵における卵の直径については、両者の間に有意な差は見られなかった (Fig. 7A)。しかし、*in vivo* と異なり、*in vitro* で成長した卵では直径にばらつきが生じた。次に、fully grown oocyte 時のクロマチンリモデリングや母性 mRNA 蓄積量については、この両者に変化は見られなかった (Fig. 7B,7C)。一方、体外受精以降の両者の発生率を比較したところ、卵成熟率、受精から 2 細胞期への発生率については両者に統計的に有意な差はみられなかったが、胚盤胞期への発生においては有意に差が生じた (Table. 1、2)。現在までに、Type3b から Type5a の medium follicle から、*in vivo* で成長した fully grown oocyte と *in vitro* で成長した fully grown oocyte を用いて DNA マイクロアレイを行った研究があり、その expression profile は 4% の違いと低いものの (Pan *et al.*, 2005)、しかしその一方で、*in vivo*、*in vitro* それぞれで成長した fully grown oocyte 中の β -actin や insulin-growth factor II の発現量を RT-PCR にて解析した結果、*in vivo* と比較して *in vitro* で成長した卵は、その発現量が低いことが報告されている (Kim *et al.*, 2004)。これらのことから、*in vitro* growth は必ずしも卵巣の環境をすべて再現できているわけではないと考えられる。しかしながら、2

細胞期までの発生は *in vivo*、*in vitro* で変化がみられなかったことから、この時期までは *in vivo* を反映していると考えられ、本研究の目的とする解析手法には十分に用いることができると考えられる。*in vitro* growth において低下していた胚盤胞期への発生率については、今後培地の検討や培養条件の改善などの更なる条件検討により改善されることが期待される。

新規解析法の確率にあたっての二つ目の問題は、siRNA を microinjection することで、この操作による副次的な作用がなくターゲットとした母性 mRNA を効果的に抑制できるかという点である。現在までに、培養細胞に対する RNAi を用いた遺伝子解析手法としては、transfection による導入法が一般的であり、高い遺伝子機能抑制効果を示すことが知られており、卵では、fully grown oocyte に transfection 試薬を用いて siRNA を導入する方法も行われている (Wang *et al.*, 2006)。しかしながら、growing oocyte はその成長過程において、周囲を囲む granulosa cell と gap junction を介した物質の交換をおこなっており、それが oocyte の成長を助けている (Sugiura *et al.*, 2005)。したがって、母性 mRNA を合成している卵成長過程において transfection 試薬を用いた siRNA 導入法では、siRNA が granulosa cell へ影響を及ぼし、その副次的な影響を growing oocyte が受ける可能性が考えられる。そこで本研究では、granulosa cell にその周囲を囲まれた growing oocyte の細胞質に microinjection 法を用いて直接 siRNA を導入する手法を用いて解析することを考えた。現在までに、growing oocyte の細胞質に microinjection する手法はいくつかのグループにより行われている (Qi *et al.*, 2002 ; McLay *et al.*, 2002)。しかしながら、これらの実験手法はすべて granulosa cell を剥がしてから行うものであるため、周囲の granulosa cell を失った growing oocyte は成長できず (Bachvarova *et al.*, 1980)、卵成長過程において蓄積した母性 mRNA の oocyte maturation や受精、またその後の初期発生における機能は解析できない。そのため、microinjection 後に培養するため

には granulosa cell と growing oocyte が複合体を形成している状態が必要不可欠である。そこで本研究では、12 日齢マウス由来の follicle 中の growing oocyte の細胞質に microinjection ができるかどうかを調べた。上記の実験にて定めた直径をもつ 12 日齢マウス由来の follicle 中の growing oocyte の細胞質に、eGFP mRNA を microinjection し、その 3-4 時間後に EGFP の発現を蛍光にて確認した (Fig. 8A)。また、microinjection 後の follicle を *in vitro* で 12 日間培養させても、microinjection を行っていないもの (uninjected) と比較して follicle の発達には影響がないことがわかった (Fig. 8B)。次に、siRNA を microinjection して有効に母性 mRNA を抑制できたことを確認するために、その表現型が、knockout mouse と同様な表現型 (Hashimoto *et al.*, 1994 ; College *et al.*, 1994 ; Araki *et al.*, 1996) を示すかどうかを調べた。12 日齢マウス由来の growing oocyte の細胞質に *c-mos* siRNA を microinjection し、その後 *in vitro* で 12 日間培養を行った結果、uninjected のものや eGFP siRNA を microinjection したものと比較して *c-mos* mRNA 蓄積量の減少がみられた (Fig. 9)。また培養期間を通じて、uninjected のもの、*c-mos* siRNA を microinjection したものの、eGFP siRNA を microinjection を比較しても、follicle の発達時における形態異常、follicle の発達率、排卵率に違いはみられなかった (Fig. 10、11)。このことから、卵成長過程において mRNA が蓄積していく母性 mRNA では、growing oocyte 中に蓄積される母性 mRNA の siRNA を microinjection しても *in vitro* growth への副次的な影響を及ぼさず、siRNA によるノックダウン効果は培養 12 日間後も続くことがわかった。また *in vitro* で培養し、排卵させた後に表現型を確認したところ、*c-mos* siRNA を microinjection したものののみ *c-mos* knockout mouse と同様な表現型が確認できた (Fig. 12)。以上の結果から、siRNA が配列特異的に mRNA を分解し、培養後においてもその効果が持続していることがわかった。これは、卵成長過程において転写活性が約直径 55 μ m の growing oocyte をピークに低下し、転写が完全に停止

した後には母性 mRNA は合成されることなく保持されている、という要因で 12 日間という培養期間後においても siRNA の効果がみられたと考えられる。

近年において、follicle 中の growing oocyte の細胞質に siRNA を microinjection した例が一つ報告されているが、これは卵成長過程後期の follicle (follicle の直径が 140-180 μ m) を用いて、3 日間だけ培養を行ったものであり (Mehlmann, 2005)、oocyte maturation 及びその後の初期発生過程での母性 mRNA の機能を調べたものではない。しかし本研究で確立した実験系を用いれば、卵成長過程から oocyte maturation、受精、受精後の初期発生より幅広い期間における母性 mRNA の機能を解析することができ、より多くの母性 mRNA の機能を明らかにできると考えられる。

本研究における重要なポイントは二点あると考えられる。まず一つ目に、*in vivo* では卵巣中の growing oocyte に直接薬物を投与することや特定の遺伝子発現を阻害する等の解析が困難であることから、follicle を *in vitro* で成長させることにより、卵成長過程における growing oocyte を用いた解析を可能にした点である。さらに、用いる follicle の条件や培養条件を定めることにより、サンプルにおけるばらつきを減らすことができたと考える。二つ目に、granulosa cell に囲まれた growing oocyte へ siRNA を microinjection し、その後成長させ、oocyte maturation から初期発生における母性 mRNA の機能を解析することができた点である。今までに、卵成長過程の早い時期に microinjection し、その後成長させた報告例はない。

以上のことから、本研究で確立した実験手法を用いることで、より簡便にマウス卵成長過程から oocyte maturation、受精、初期発生における幅広い時期での母性 mRNA の機能が明らかとなることが期待される。

謝辞

本論文を終えるにあたり、研究及び論文の作製を終始親身に御助言、御指導いただきました東京大学大学院新領域創成科学研究科 青木不学 助教授に心から深く感謝致します。また、研究の様々な局面において御助言を頂きました東京大学大学院新領域創成科学研究科 永田昌男 教授に感謝致します。

実験の進行におきまして多大なる技術的指導・専門的知識および様々な御助力を頂きました同大学大学院同分野の諸先輩方に心より感謝致します。

また、日々の研究生活において、ともに苦しみ、励まし、喜びあった同期の大我政敏君、白倉義之君、堀恭徳君に心から感謝します。

共に楽しく充実した時間を歩んでくれた、同大学大学院同分野の後輩、先端生命科学専攻の同期、後輩に感謝します。

最後に、私の二年間の研究生活において、研究に没頭できるすばらしい環境を提供し、また研究が円滑に進むように暖かく見守ってくださった家族をはじめとする、本研究に関わるすべての方々に心から感謝致します。

参考文献

- Alizadeh Z, Kageyama S, and Aoki F. (2005) Degradation of maternal mRNA in mouse embryos: selective degradation of specific mRNAs after fertilization. *Mol Reprod.* 72. 281-290.
- Aoki F, Worrall DM, and Schultz RM. (1997) Regulation of transcriptional activity during the first and second cell cycles in the preimplantation mouse embryo. *Dev Biol.* 181. 296-307.
- Araki K, Naito K, Haraguchi S, Suzuki R, Yokoyama M, Inoue M, Aizawa S, Toyoda Y, and Sato E. (1996) Meiotic abnormalities of *c-mos* knockout mouse oocytes: Activation after first meiosis or entrance into third meiotic metaphase. *Biol Reprod.* 55, 1315-1324.
- Bachvarova R, Baran MM, and Tejblum A. (1980) Development of naked growing mouse oocytes in vitro. *J Exp Zool.* 211. 159-169.
- Colledge WH, Carlton MBL, Udy GB, and Evans MJ. (1994) Disruption of *c-mos* causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs. *nature.* 370, 68-71.
- Cortvrindt R, Smits J, and Steirteghem ACV. (1996) In-vitro maturation, fertilization and embryo development of immature oocytes from early preantral follicles from prepuberal mice in a simplified culture system. *Hum Reprod.* 11, 2656-2666.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, and Mello CC. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *nature.* 391. 806-811.
- Fuente RDL. (2006) Chromatin modifications in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes. *Dev Biol.* 292, 1-12.
- Hartshorne GM. (1997) In vitro culture of ovarian follicles. *Reviews of Reprod.* 2. 94-104.

- Hashimoto N, Watanabe N, Furuta Y, Tamemoto H, Sagata N, Yokoyama M, Okazaki K, Nagayoshi M, Takeda N, Ikawa Y, and Aizawa S. (1994) Parthenogenetic activation of oocytes in *c-mos*-deficient mice. *nature*. 370, 68-71.
- Hirao Y, and Eppig JJ. (1997) Parthenogenetic development of *mos*-deficient mouse oocytes. *Mol Reprod Dev*. 48, 391-396.
- Hiura H, Obata Y, komiyama J, Shirai M, and Kono T. (2006) Oocyte growth-dependent progression of maternal imprinting in mice. *Genes to Cell*. 11, 353-361.
- Hurk RVD, and Zhao J. (2005) Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*. 63. 1717-1751.
- Kageyama S, Liu H, Nagata M, and Aoki F. (2006) The role of ETS transcription factors in transcription and development of mouse preimplantation embryos. *Biochem Biophys Res Commun*. 344, 675-679.
- Kageyama S, Nagata M, and Aoki F. (2004) Isolation of nascent messenger RNA from mouse preimplantation embryos. *Biol Reprod*. 71, 1948-1955.
- Kidder GM. (1992) The genetic program for preimplantation development. *Dev Genet*. 13. 319-325.
- Kim DH, Ko DS, Lee HC, Lee HJ, Park WI, Kim SS, Park JK, Yang BC, Park SB, Chang WK, and Lee HT. (2004) Comparison of maturation, fertilization, development, and gene expression of mouse oocytes grown in vitro and in vivo. *J Assist Reprod Genet*. 21, 233-240.
- Lagger G, O'Carroll D, Rembold M, Khier H, Tischler J, Weitzer G, Schuettengruber B, Hauser C, Brunmeir R, Jenuwein T, Seiser C. (2002) Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression. *EMBO J*. 21. 2672-2681.
- Lawitts JA, and Biggers JD. (1993) Culture of preimplantation embryos. *Methods Enzymol*. 225, 153-164.

- Lenie S, Cortvrindt R, Adriaenssens, T, and Smitz, J. (2004) A reproducible two-step culture system for isolated primary mouse ovarian follicle as single function units. *Biol Reprod.* 71, 1730-1738.
- Liu H, and Aoki F. (2002) Transcriptional activity associated with meiotic competence in fully grown mouse GV oocytes. *Zygote.* 10. 327-332.
- McLay DW, Carroll J, and Clarke HJ. (2002) The ability to develop an activity that transfers histones onto sperm chromatin is acquired with meiotic competence during oocyte growth. *Dev Biol.* 241. 195–206.
- Mehlmann LM. (2005) Oocyte-specific expression of GPR3 is required for the maintenance of meiotic arrest in mouse oocytes. *Dev Biol.* 288. 397-404.
- Moore GPM, Moore SL, Peters H, and Faber M. (1974) RNA synthesis in the mouse oocyte. *J Cell Biol.* 60, 416-422.
- Orban PC, Chui D, and Marth JD. (1992) Tissue- and Site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89. 6861-6865.
- O'Brien MJ, and Eppig JJ. (1996) Development in vitro of mouse oocytes from primoedial follicles. *Biol Reprod.* 54, 197-207.
- Pan H, O'Brien MJ, Wigglesworth K, Eppig JJ, and Schultz RM. (2005) Transcript profiling during mouse oocyte development and the effect of gonadotropin priming and development in vitro. *Dev Biol.* 286. 493-506.
- Qi H, Williams Z, and Wassarman PM. (2002) Secretion and assembly of zona pellucida glycoproteins by growing mouse oocytes microinjected with epitope-tagged cDNAs for mZP2 and mZP3. *Mol Biol Cell.* 13. 530-541.
- Quinn P, and Begley AJ. (1984) Effect of human seminal plasma and mouse accessory gland extracts on mouse fertilization in vitro. *Aust J Biol Sci.* 37, 147-152
- Schultz RM. (1993) Regulation of zygotic gene activation in the mouse. *BioEssays.* 8. 245–254.

- Smitz JE, and Cortvrintd RG. (2002) The earliest stages of folliculogenesis in vitro. *Reprod.* 123. 185-202.
- Sorensen RA, and Wassarman PM. (1976) Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev Biol.* 50. 531-536.
- Stein P, Svoboda P, and Schultz. (2003) Transgenic RNAi in mouse oocytes: a simple and fast approach to study gene function. *Dev Biol.* 256. 187-193.
- Sugiura K, and Eppig JJ. (2005) Society for reproductive biology founder's lecture 2005 control of metabolic cooperativity between oocytes and their companion granulose cells by mouse oocytes. *Reprod Fertil Dev.* 17, 667-674.
- Tong ZB, Gold L, Pfeifer KE, Dorward H, Lee E, Bondy CA, Dean J, and Nelson LM. (2000) Mater, a maternal effect gene required for early embryonic development in mice. *Nat Genet.* 26. 267-268.
- Torben P, and Hannah P. (1968) Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *J Reprod Fertil.* 17, 555-557.
- Wang JY, Lei ZL, Nan CL, Yin S, Liu J, Hou Y, Li YL, Chen DY, and Sun QY. (2006) RNA Interference as a tool to study the function of MAD2 in mouse oocyte meiotic maturation. *Mol Reprod Dev.* 74. 116-124.
- Whitten WK. (1971) Nutrient requirement for the culture of preimplantation embryos. *Adv Biosci.* 6, 129-139.
- Wianny F, and Goetz MZ. (2000) Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat Cell Biol.* 2. 70-75.
- Worrada DM, Ram PT, and Schultz RM. (1994) Regulation of gene expression in the mouse oocyte and early preimplantation embryo: developmental changes in Sp1 and TATA box-binding protein, TBP. *Development.* 120. 2347-2357.

- Wu X, Wang P, Brown CA, Zilinski CA, and Matzuk MM. (2003) *Zygote arrest 1 (Zar1)* is an evolutionarily conserved gene expressed in vertebrate ovaries. *Biol Reprod.* 69. 861-867.
- Yao TP, Oh SP, Fuchs M, Zhou ND, Ch'ng LE, Newsome D, Bronson RT, Li E, Livingston DM, and Eckner R. (1998) Gene dosage-dependent embryonic development and proliferation defects in mice lacking the transcriptional integrator p300. *cell.* 93. 361-372.
- Zuccotti M, Rossi PG, Martinez A, Garagna S, Forabosco A, and Redi CA. (1998) Meiotic and developmental competence of mouse antral oocyte. *Biol Reprod.* 58. 700-704.

Table 1. *in vitro* growth に用いる follicle の改善による oocyte maturation への影響

Groups	follicle数	排卵数(%)
<i>in vivo</i>	405 ^a	266(65.7) ^c
<i>in vitro</i>	469 ^b	294(62.7) ^d

a ; 3週齢 BDF₁ マウスにPMSGを注射し48時間経過後、卵巣から回収し、oocyte maturationを誘導する実験に用いたfully grown oocyteの数を示した。

b ; *in vitro*にて12日間培養した後、排卵の実験に用いたfollicle数を示した。

c ; *in vitro*にてoocyte maturationを誘導後、M II 期卵になった数を示した。

d ; *in vitro*にてhCGを含む培地にてoocyte maturationを誘導し、18時間後に*in vitro*で排卵した数を示した。

実験は*in vivo*については6回、*in vitro*については10回行った。

またそれらの結果をすべて足し合わせたものを示した。

Table 2. *in vitro* growth が受精後の初期発生へ与える影響

Groups	排卵数(%)	2細胞期胚数 (%) ^c	胚盤胞期数(%) ^d
<i>in vivo</i>	266 ^a	153 (57.5)	108(70.6)*
<i>in vitro</i>	219 ^b	122 (55.7)	45(36.9)*

a ; *in vitro*にてoocyte maturationを誘導しM II 期卵になった数を示した。

b ; *in vitro*にてhCGを含む培地にてoocyte maturationを誘導し、18時間後に*in vitro*で排卵した数を示した。

c ; 割合は2細胞期胚数／排卵数で示した。

d ; 割合は胚盤胞期／2細胞期胚数で示した。

* ; $P < 0.05$ (χ^2 -test)

実験は6回行い、またそれらの結果をすべて足し合わせたものを示した。

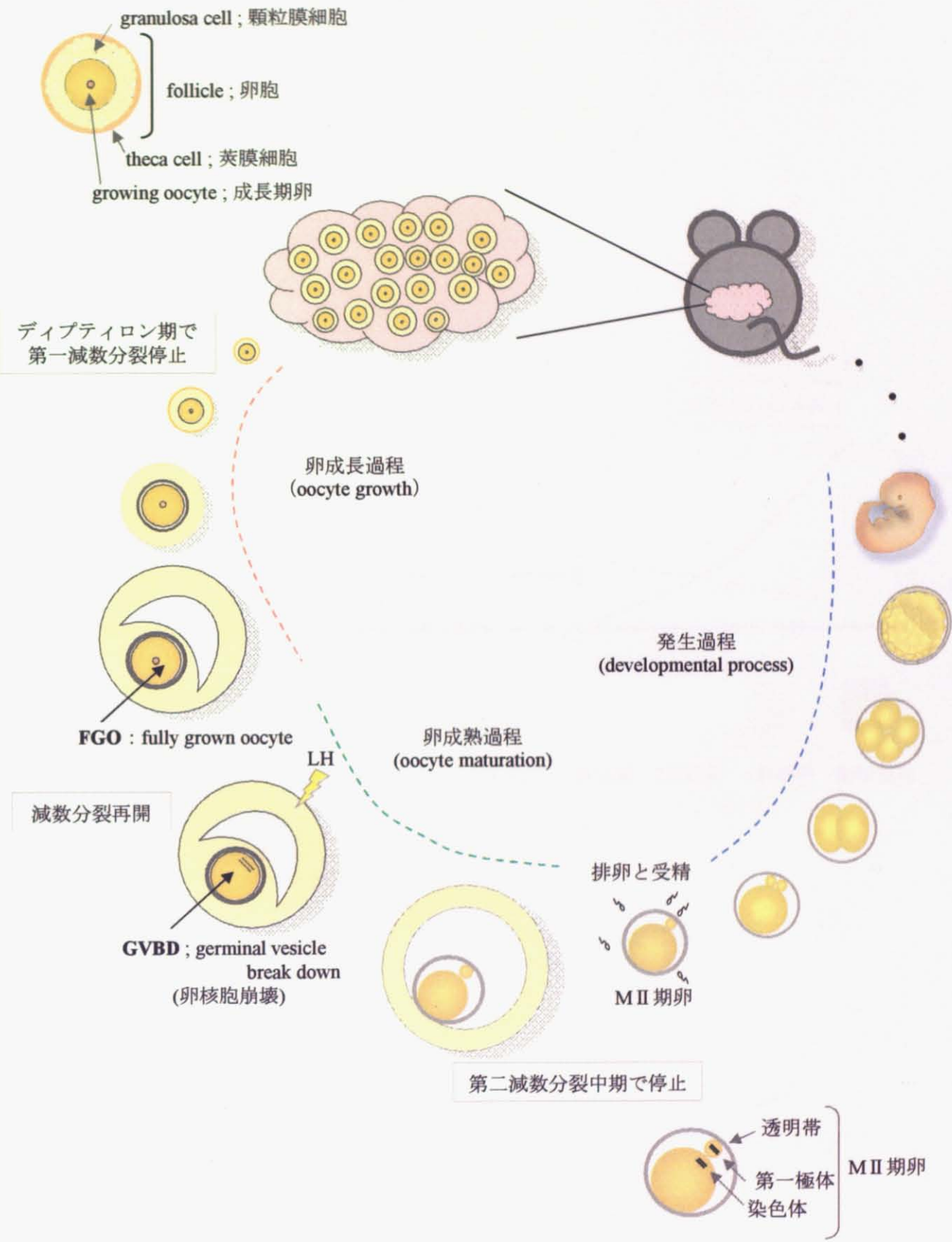


Fig.1 マウス雌の生殖細胞の成長、成熟、発生について

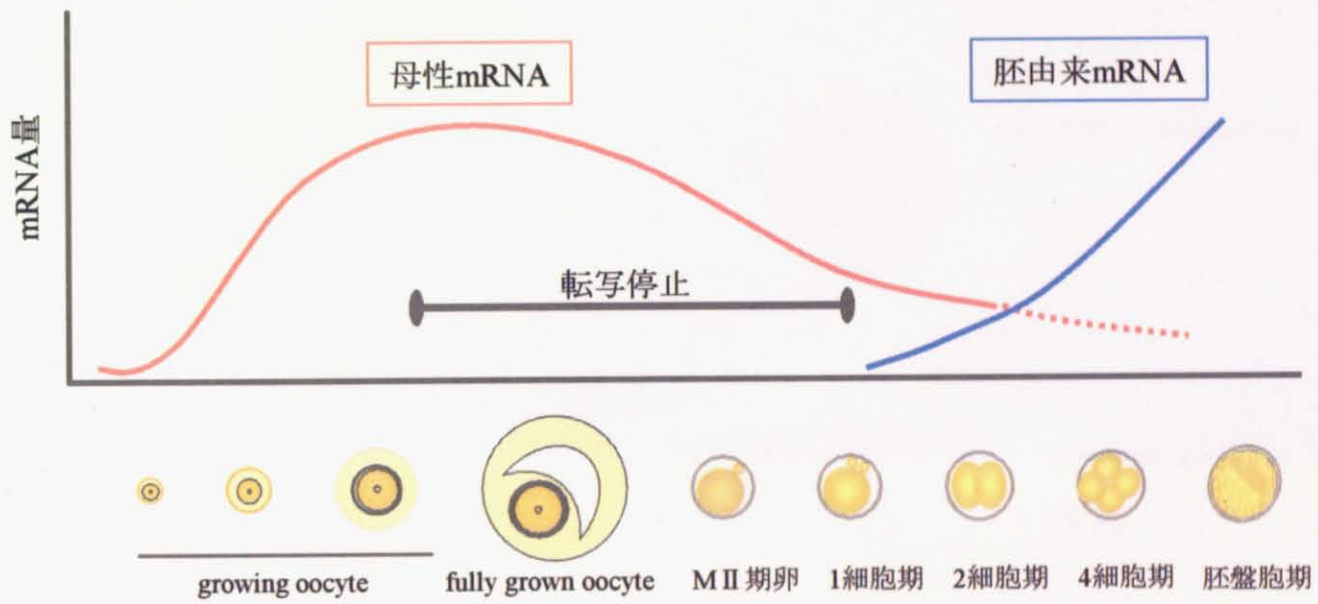
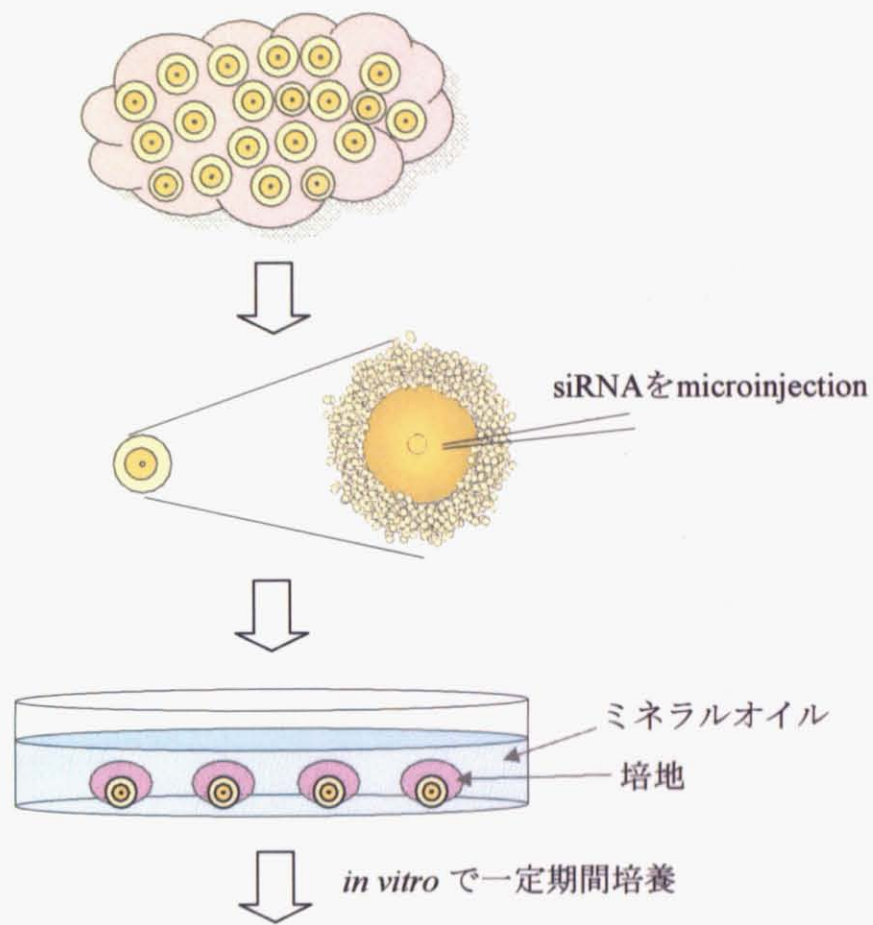


Fig.2 卵成長過程から、卵成熟、受精、初期発生にかけての
転写機構の遷移とmRNA量の変化



免疫染色法、Real-time PCR、RT-PCR、
 phenotypeの観察、排卵後の発生等で
 母性mRNAの機能について解析する

Fig.3 実験手順の概要

生後数日たった雌マウスの卵巣からfollicleを回収し、ターゲットとなる遺伝子のsiRNAをmicroinjectionする。その後、*in vitro*にて培養させた後、各種の解析手法により、機能解析を行う。

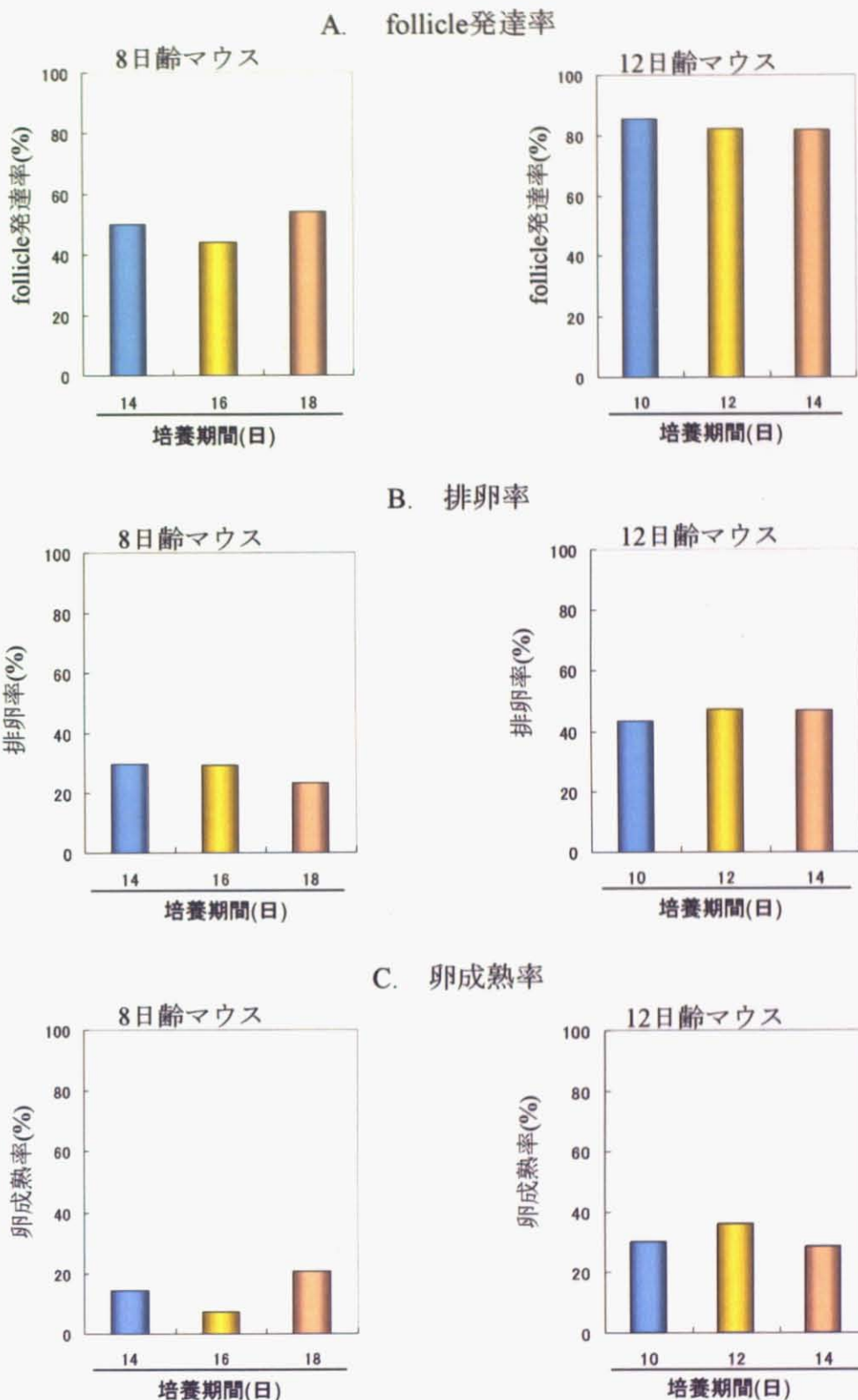
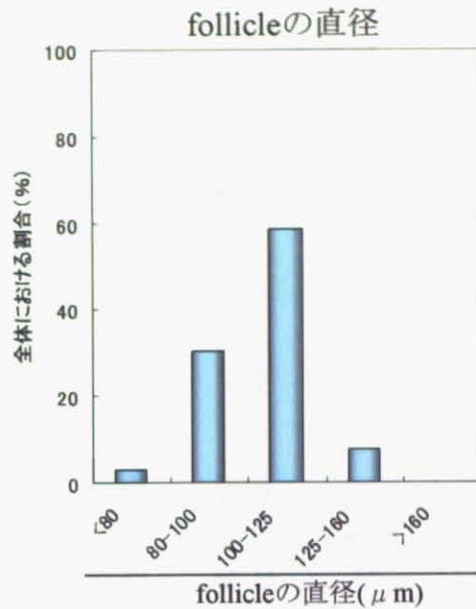


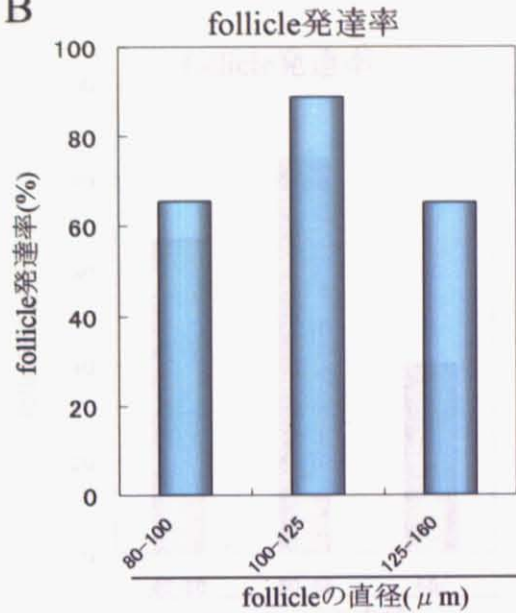
Fig.4 8日齢、12日齢マウス由来のgrowing oocyteを用いた場合の培養期間による *in vitro* growthへの影響

A; *in vitro* における培養後、培養開始時に対してfollicleが発達している割合をマウスの日齢別、培養期間別に調べた B; 培養期間終了日に培地にhCG添加後、*in vitro* で排卵させ、培養開始時に対する排卵率をマウスの日齢別、培養期間別に調べた。 C; 排卵された卵の卵丘細胞を除去後、第一極体を確認し、培養開始時に対する卵成熟率をマウスの日齢別、培養期間別に調べた。 A - Cの各実験は8日齢マウスについては3回行い、12日齢マウスについては4回行った。またそれらの結果をすべて足し合わせたものを示した。調べたfollicleの数は、8日齢が360個、12日齢が476個である。

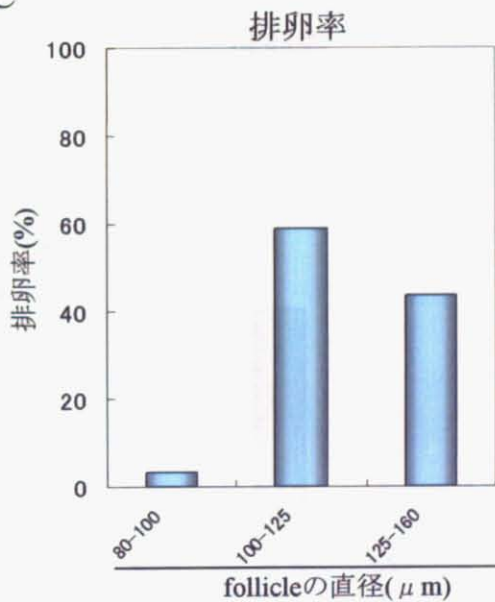
A



B



C



D

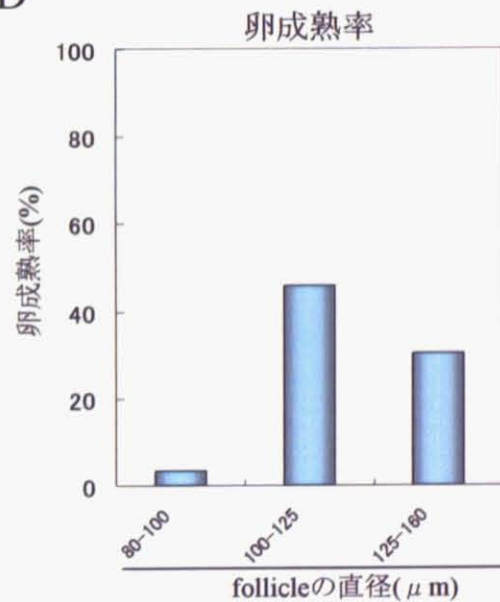


Fig.5 follicleの直径の違いによるfollicle発達率、排卵率、卵成熟率への影響
 A ; 1匹のマウスの卵巣からgrowing oocyteとgranulosa cellが複合体を形成しているfollicleを回収し、follicleの直径について調べた。 B ; *in vitro* における12日間の培養後、follicleが発達している割合を調べた。 C ; 培養12日目に培地にhCG添加後 *in vitro* で排卵させ、培養開始時に対する排卵率を調べた。 D ; 排卵された卵の卵丘細胞を除去後、第一極体を確認し、培養開始時に対する卵成熟率を調べた。
 実験は4回行い、それらの結果をすべて足し合わせたものを示した。A - Dの各実験で調べたfollicleの数は476個である。

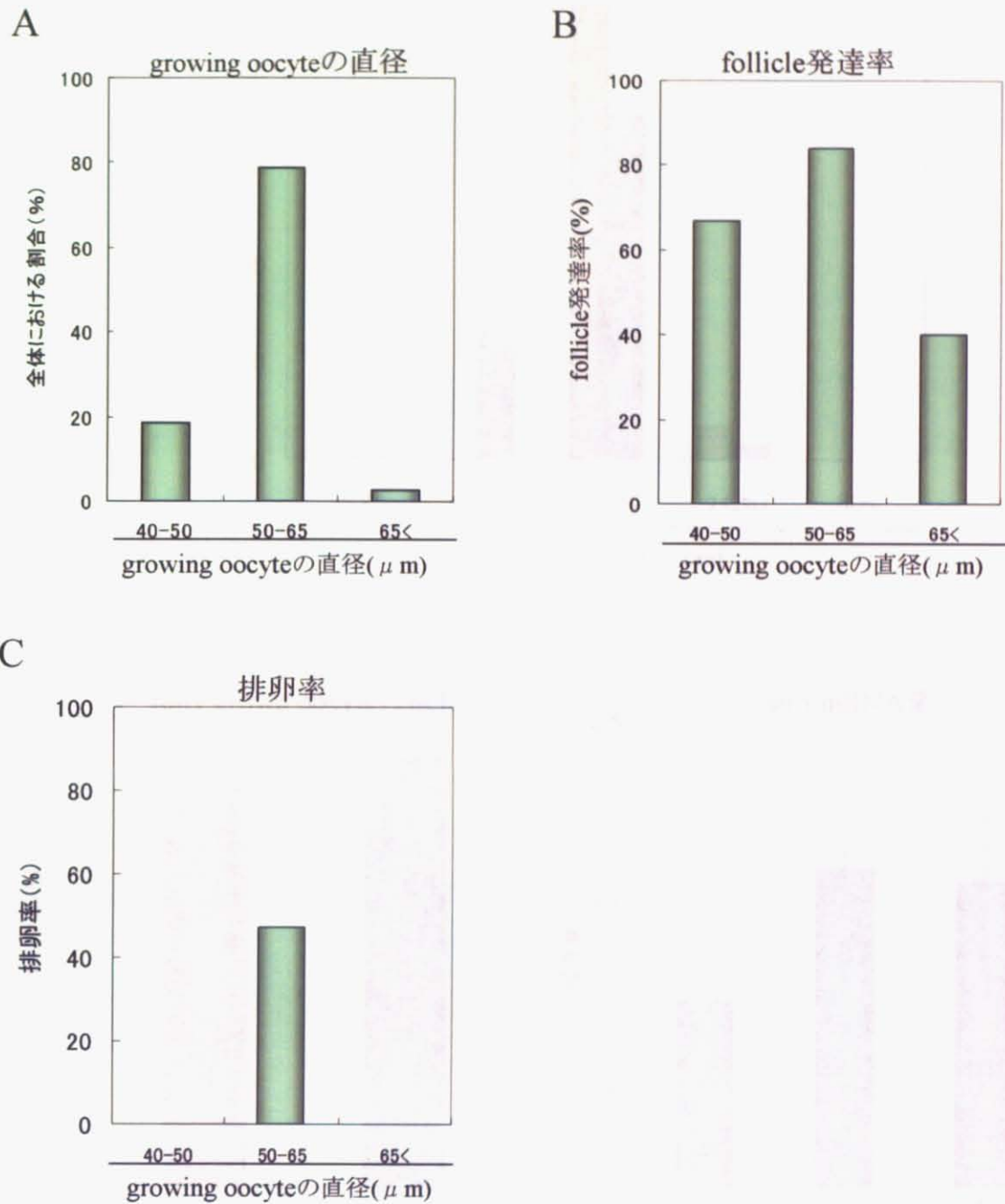


Fig.6 growing oocyteの直径の違いによるfollicle発達率、排卵率、卵成熟率への影響
 A ; 1匹のマウスの卵巣からgrowing oocyteとgranulosa cellが複合体を形成しているfollicleを回収し、growing oocyteの直径について調べた。 B ; *in vitro* における12日間の培養後、follicleが発達している割合を調べた。 C ; 培養12日目に培地にhCG添加後 *in vitro* で排卵させ、培養開始時に対する排卵率を調べた。
 実験は4回行い、それらの結果をすべて足し合わせたものを示した。 A - Cの各実験で調べたgrowing oocyteの数は、それぞれ476個である。

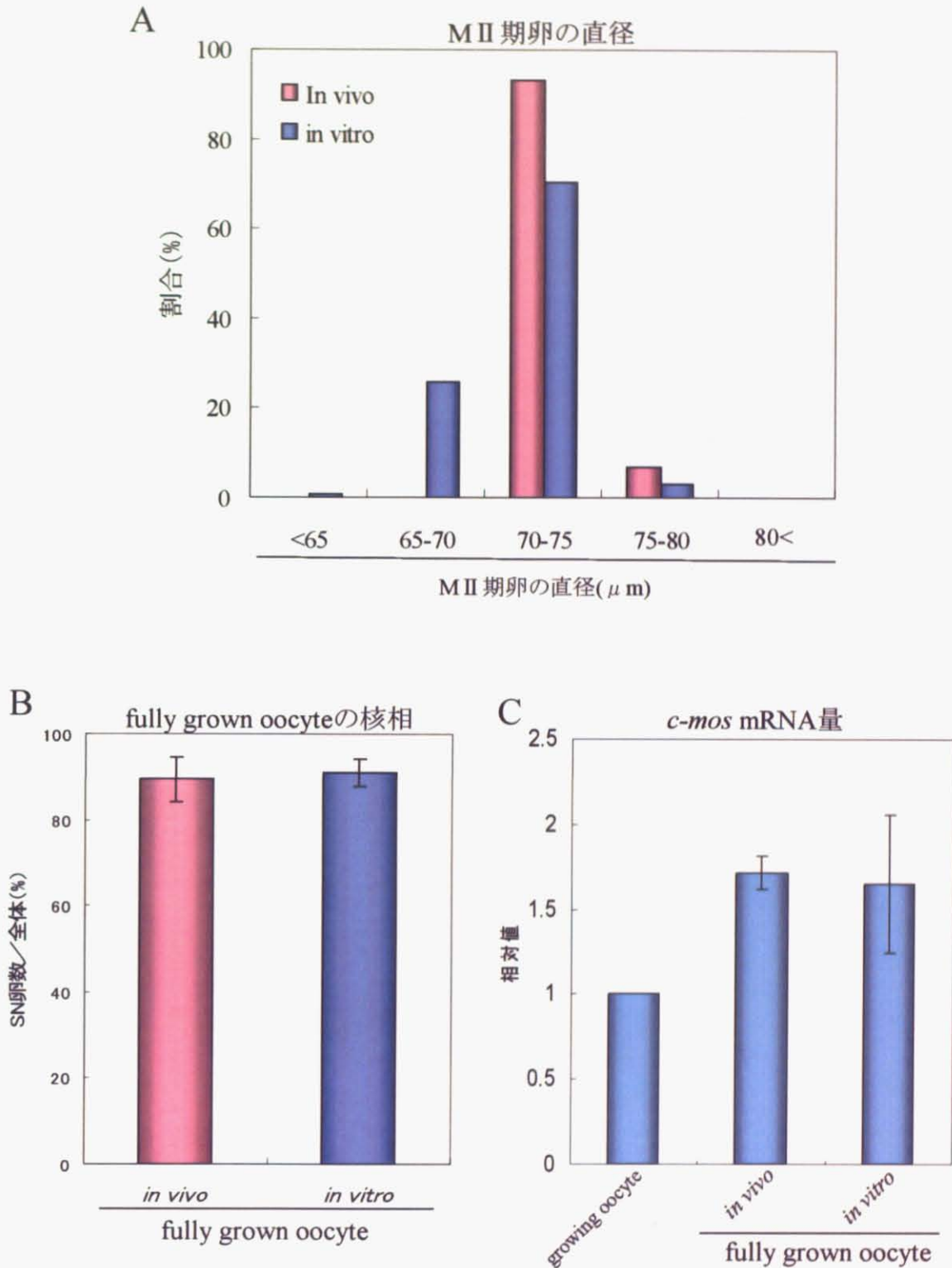
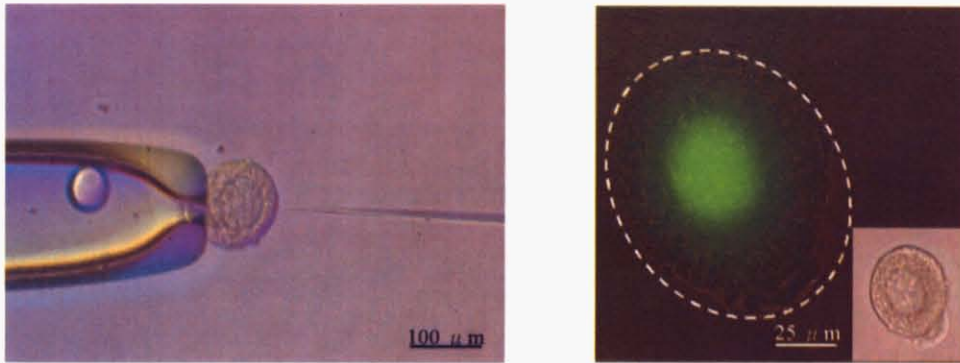


Fig.7 *in vivo*で成長した卵と*in vitro*で成長した卵との比較
 A; *in vitro*、*in vivo*で成長し、成熟したMII期卵の直径を計測した。 B; fully grown oocyte (FGO)における核相 (SN型、NSN型)をDNA染色で確認し、SN型のしめる割合を比較した。 C; *in vivo*、*in vitro*で成長したFGO中の *c-mos* mRNA 蓄積量を、12日齢マウス由来のgrowing oocyteの値を1とした相対値を示した。
 Aの実験で用いたMII期卵の数は、*in vivo*; 30個、*in vitro*; 166個である。 B、Cの実験はそれぞれ3回行い、測定値は平均値 \pm SDで示した。

A



B

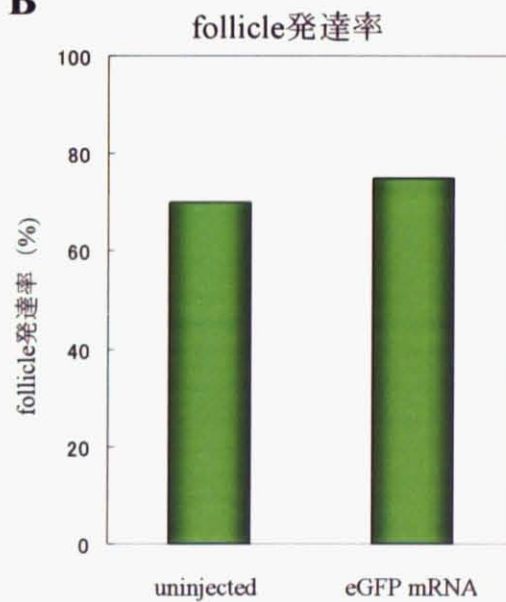


Fig.8 follicle中のgrowing oocyteの細胞質へのmicroinjection

A ; 12日齢マウスから回収したgrowing oocyteの細胞質にeGFP mRNAをmicroinjectionした(写真左)。microinjection後、3-4時間でeGFPの蛍光を観察した(写真右)。 B ; microinjectionし、*in vitro*における12日間の培養後、follicleが発達している割合を調べた。

Bの実験は1回行い、用いたサンプル数はuninjection : 20個、eGFP mRNA microinjection : 20個である。

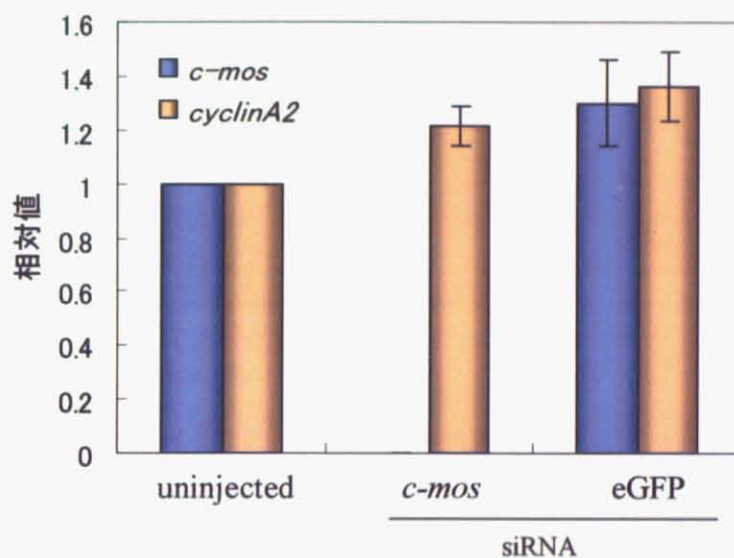


Fig.9 *in vitro* における12日間培養後の siRNA の抑制効果
 12日齢マウス由来のgrowing oocyteに *c-mos*、eGFP の siRNA を microinjection し、*in vitro* で12日間培養させた後、real-time PCRにて *c-mos*、*cyclin A2* の mRNA の蓄積量を調べた。
 実験は3回行い、測定値はmicroinjectionを行わなかったもの (uninjected) を1として相対値を求め、平均値±SDで示した。

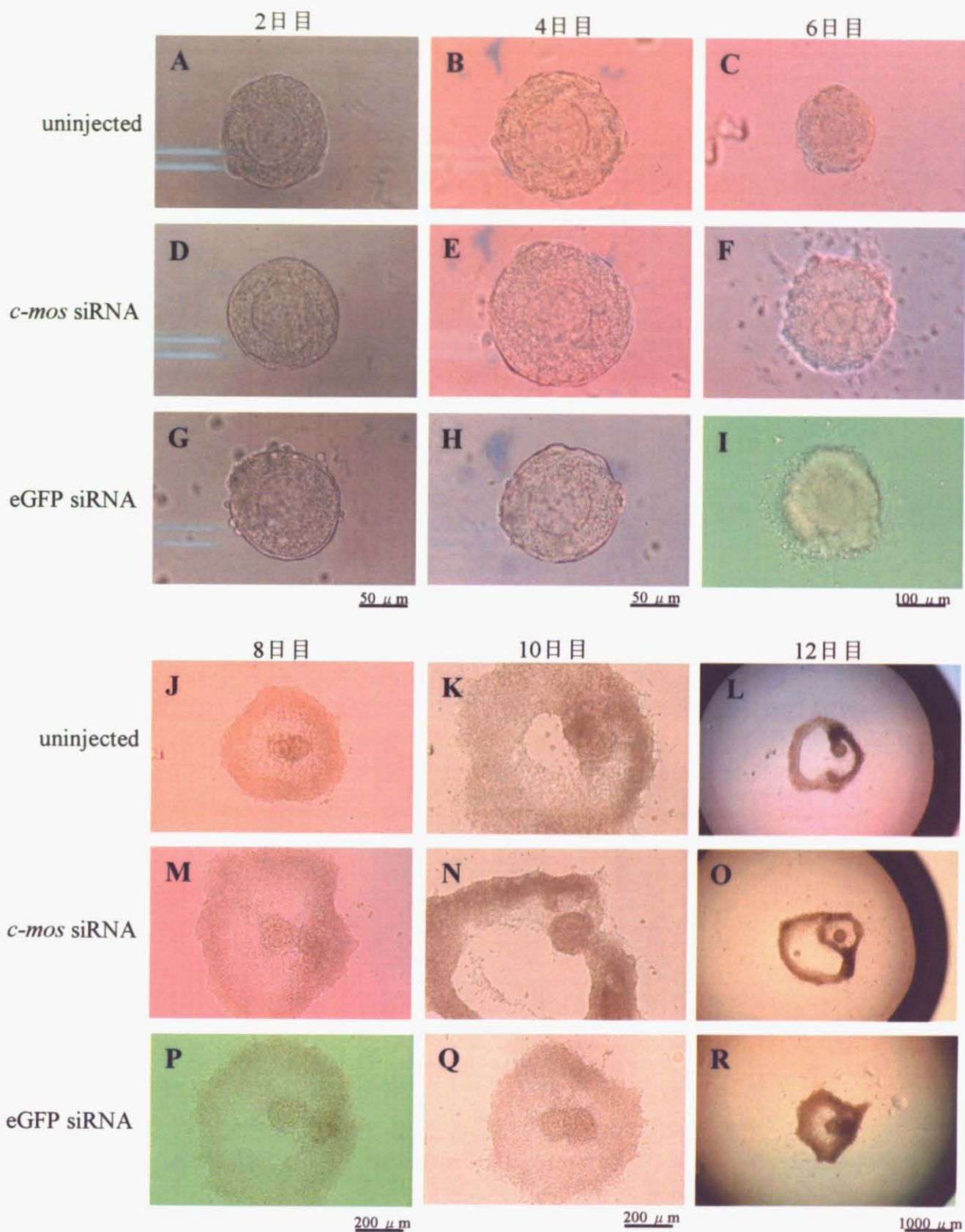


Fig.10 siRNA microinjection後のfollicleの成長

12日齢マウス由来のfollicle中のgrowing oocyteに *c-mos*、eGFP の siRNA をmicroinjection し、*in vitro* で12日間培養した。写真はそれぞれ A,D,G; 培養2日目 B,E,H; 培養4日目 C,F,I; 培養6日目 J,M,P; 培養8日目 K,N,Q; 培養10日目 L,O,R; 培養12日目 を表す。

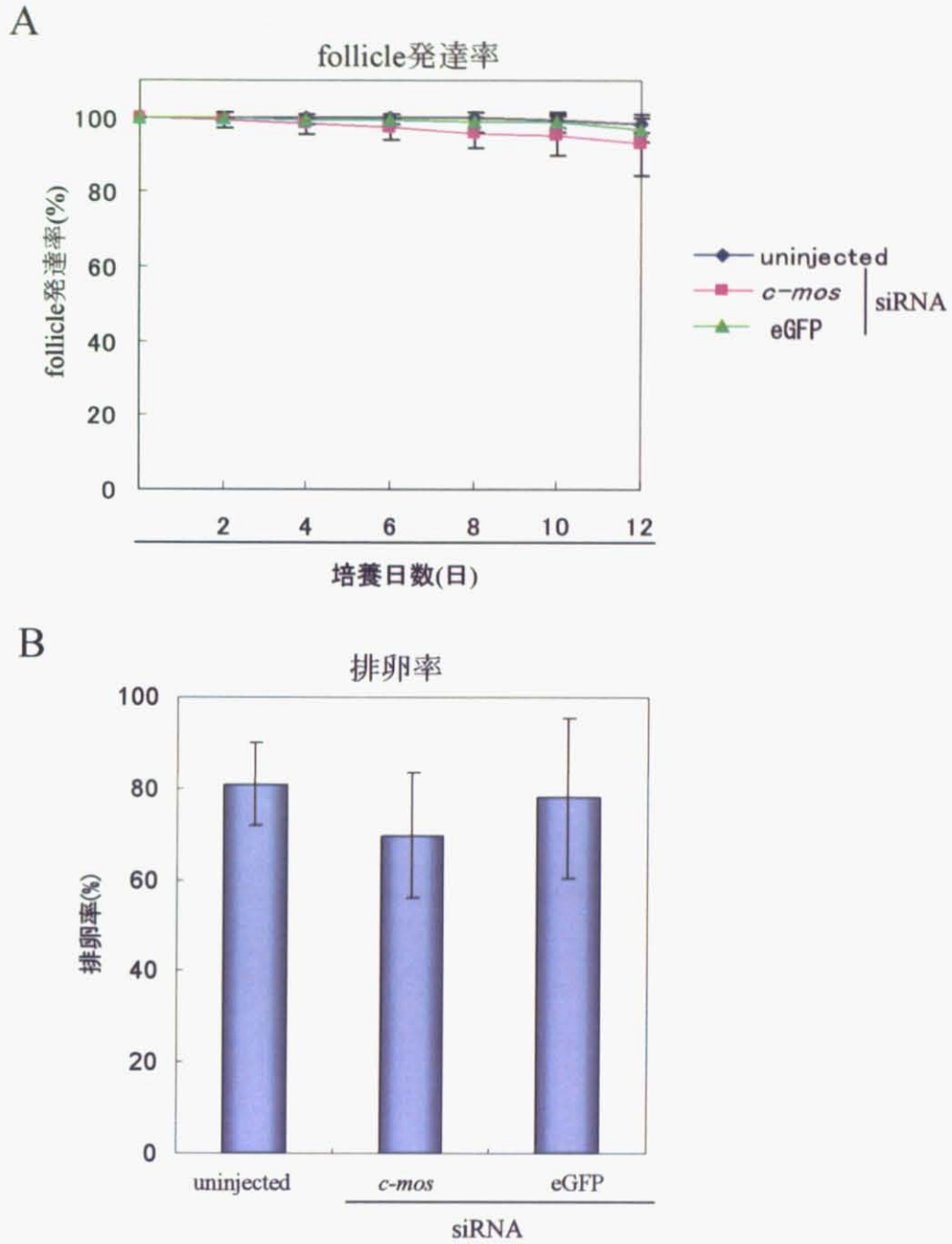
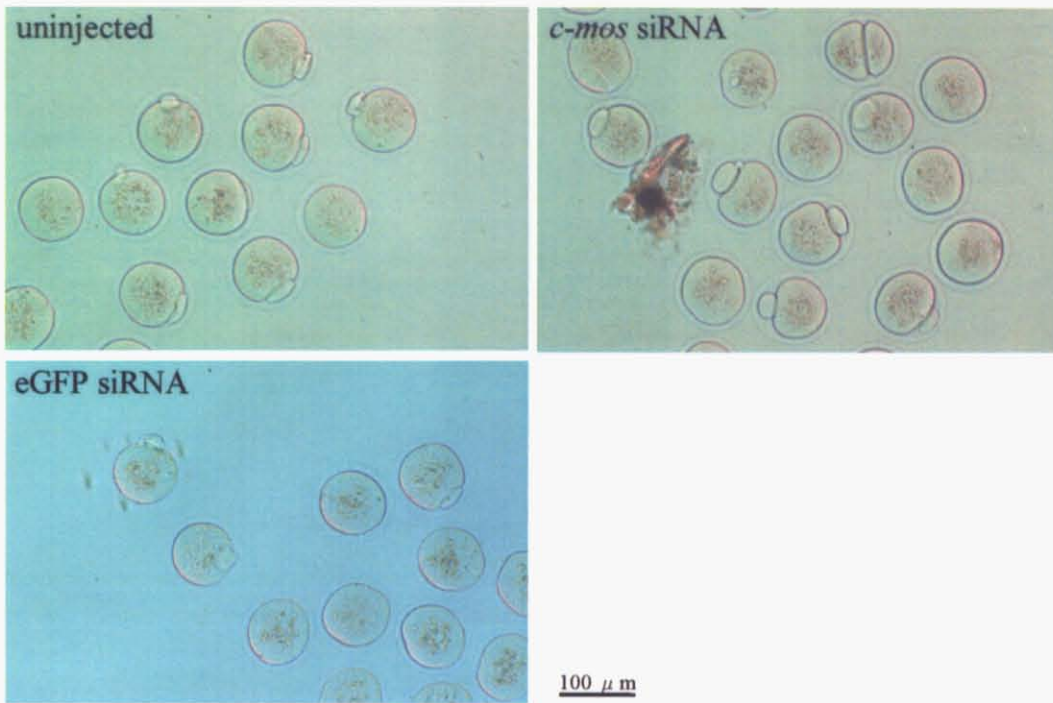


Fig.11 siRNA microinjection後のfollicleの成長

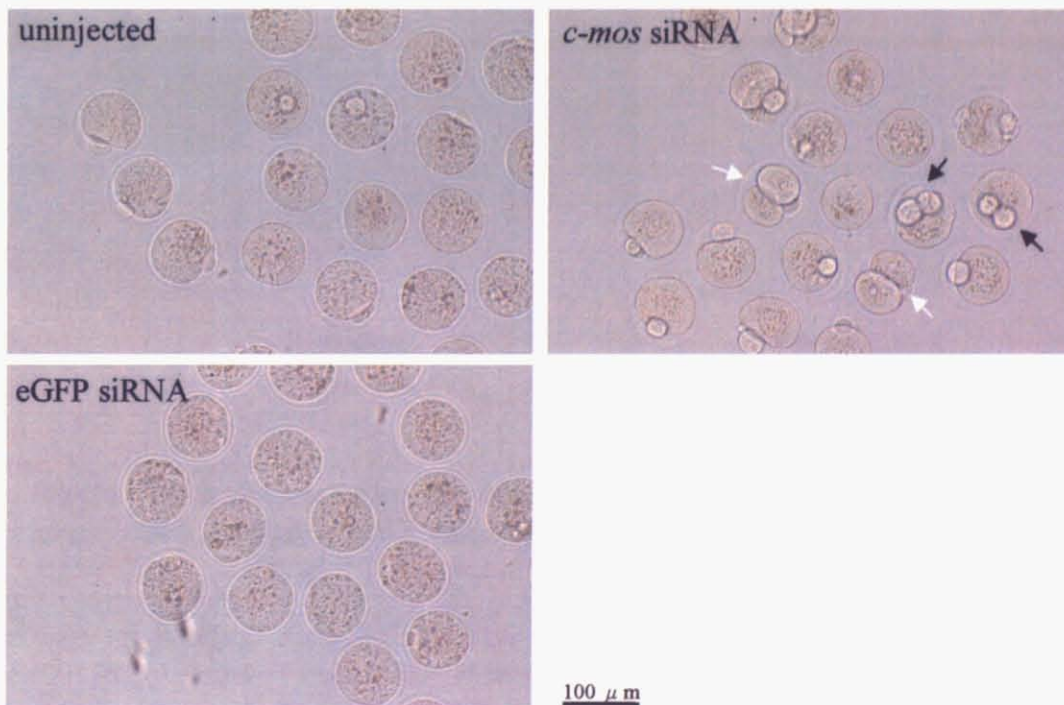
A ; 12日齢マウス由来のfollicleにmicroinjectionを行い、12日間培養させた時のfollicle発達率を調べた。 B ; 培養12日目に培地にhCG添加後 *in vitro* で排卵させ、培養開始時に対する排卵率を調べた。実験はそれぞれ7回行い、測定値はすべて平均値±SDで示した。

A

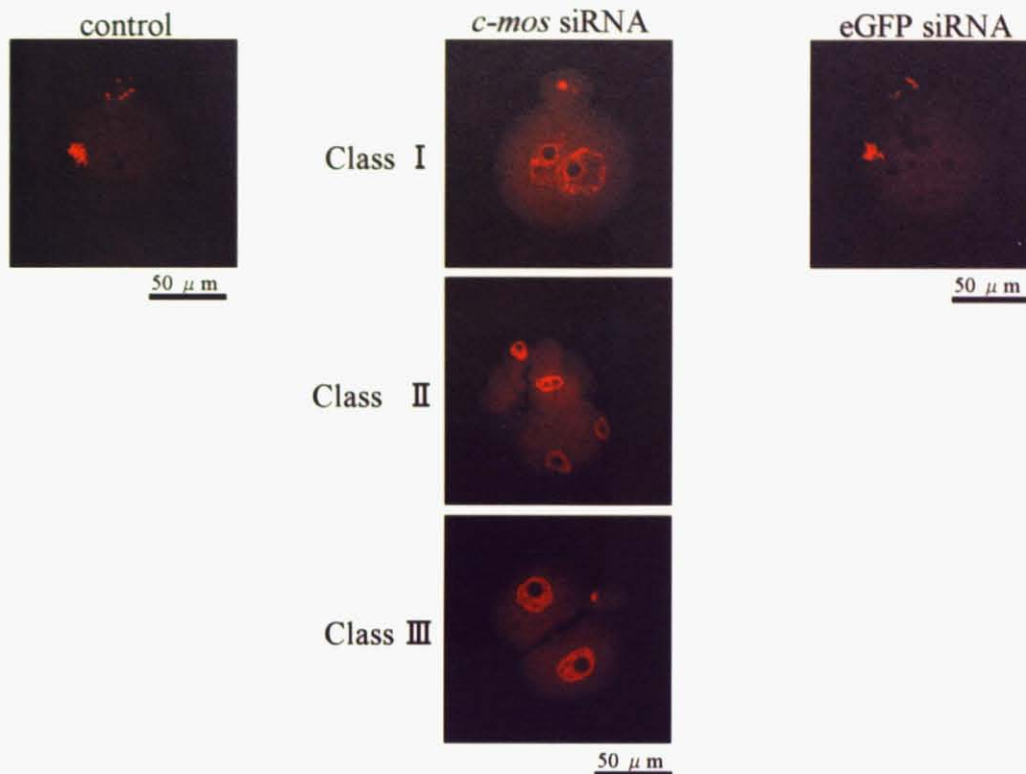
hCG添加18時間後



hCG添加43時間後



B



C

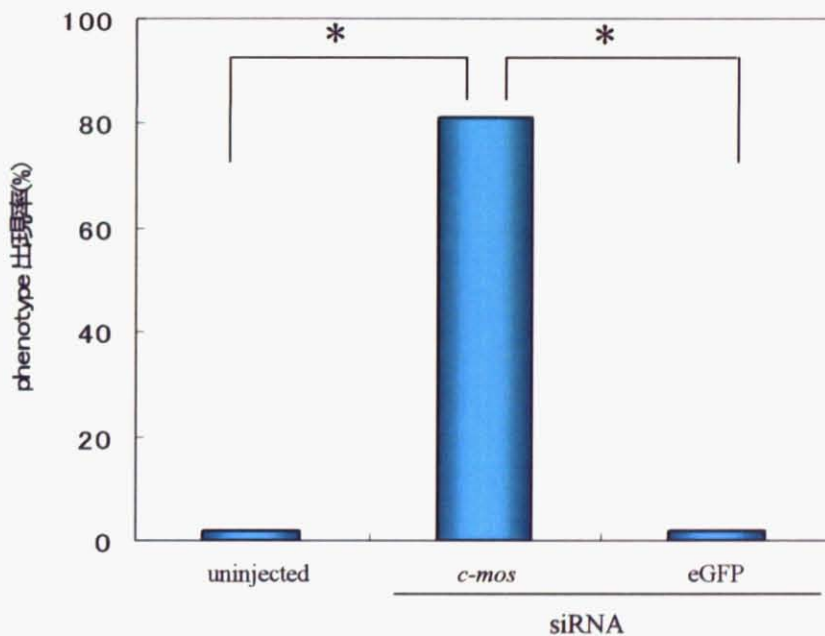


Fig.12 siRNA microinjection し、培養期間を経た後の効果についての検証

A ; *c-mos*、eGFP siRNAをそれぞれmicroinjectionし12日間培養後、*in vitro* で排卵させた(上側の写真)。その後、ヒアルロニダーゼにて卵丘細胞を除去し、KSOM培地に移して24時間培養した(下側の写真)。黒い矢印は大きな極体が2個みられたもの、白い矢印は2細胞期胚へ単為発生がみられたものを示す。 B ; KSOM培地に移して24時間培養後、固定してDNAの染色を行った。表現型のclassはHiraoら(1997)の文献を参考に分けた。 C ; 表現型の出現率について調べた。

Cの実験は4回行い、それらの結果をすべて足し合わせたものを示した

(* ; $P < 0.05$ student's *t*-test)