

平成30年6月9日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18815

研究課題名(和文)哺乳類卵母細胞における休眠維持機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of maintenance mechanism of mammalian oocyte dormancy

研究代表者

中島 友紀(Nakajima, Yuki)

九州大学・稲盛フロンティア研究センター・特任助教

研究者番号：50743126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類卵母細胞は、体細胞に囲まれた卵胞として発育を開始し、成熟後に排卵するが、その過程で発育を始めたうち99%以上が選択的に消失する。しかし、その選抜機構はほとんど明らかにされていない。そこで本研究では、卵母細胞の休眠維持と活性化機構の解明を目的とした。まず、酵素処理を必要としない卵胞の分離法を開発することで、効率的に卵胞を回収することが可能となった。次に、分離した卵胞における卵母細胞核の形態を観察し、休眠/活性化状態との関連を解析した。その結果、休眠している原始卵胞における卵母細胞核はユークロマチン形態を示すことから、卵母細胞の休眠にはクロマチン形態が関連することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mammalian oocyte develops as a follicle that is enclosed with somatic cells and is ovulated after maturation. However, more than 99% of follicles are arrested during folliculogenesis and its mechanism is unclear. In the present study, therefore, we investigated the mechanism of oocyte dormancy maintenance and that of oocyte activation. We first developed a method to isolate follicles which does not require enzymatic treatment of ovaries. Then, with the use of the developed method, we revealed that nuclei of oocytes in dormant primordial follicles are dominated by euchromatin structure, suggesting an association between dormancy of oocytes and their chromatin structure.

研究分野：生命科学

キーワード：卵母細胞 休眠 クロマチン

1. 研究開始当初の背景

哺乳類卵母細胞は、卵胞細胞層に囲まれた卵胞として発育し、性周期に伴い一定数が成熟し排卵するが、その過程で発育を始めたうち99%以上が選択的に消失する。この卵胞の選抜機構は、種の存続においてより良い個体を残すための戦略であると考えられ、国内外でその機構解明が精力的に行われている。

胎生期で第一減数分裂を開始した卵母細胞は、減数分裂前期で核小体を含む卵核胞期まで進行後、休止する。この時、卵母細胞は卵胞上皮細胞に囲まれ原始卵胞を形成し、マウスでは数ヶ月の長い休眠に入る。性成熟後は、性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) による刺激を受け、卵巣に含まれる一部の原始卵胞が休眠状態から卵胞発育を開始し、数個～数十個の卵母細胞が排卵される。原始卵胞が一次卵胞、二次卵胞、三次卵胞と発育する過程で99%以上の卵胞が消失するが、二次卵胞から三次卵胞における発育制御 (Manabe et al., 2004. *J Reprod Dev*; Zhang et al., 2010. *Science*; Wigglesworth et al., 2013. *PNAS*) に関する報告がある一方で、原始卵胞から一次卵胞における休眠状態の維持/活性化機構についてはほとんど明らかになっていない。そこで、本研究では哺乳類の原始卵胞における卵母細胞の休眠維持機構に着目した。

2. 研究の目的

原始卵胞は性周期に伴い GnRH からの刺激を受けて発育を開始し、卵母細胞は顆粒層細胞からの栄養を受けて体積を増加させ卵成熟する。卵成長に伴い卵のクロマチン構造は NSN (Non Surrounded Nucleolus) 型から SN (Surrounded Nucleolus) 型に変化することが明らかにされている (Zuccotti et al., 1995. *Mol Reprod Dev*)。SN 型はクロマチンが核小体を取り囲むように凝集したヘテロクロマチン

構造であるのに対し、NSN 型はクロマチンが核内に広がったユークロマチン構造である。一般にクロマチンの構造は形態的に転写状態を示す指標の一つと考えられており、卵母細胞におけるクロマチン構造の移行が卵母細胞の休眠/活性化の移行に関連する可能性が高い。そこで、本研究では卵母細胞のクロマチン構造の解析から休眠期間の原始卵胞における卵母細胞の特徴を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 未成熟卵胞回収法の確立

休眠する原始卵胞における卵母細胞を回収するためには、卵巣から卵母細胞を卵胞上皮細胞に囲まれた卵胞の状態 で分離する必要がある。複数の細胞種で構成される組織から細胞を選択的に回収するためには、組織をトリプシン等のタンパク質分解酵素を使用する、もしくは物理的に細胞を分離する必要がある。しかし、本研究で対象とする卵胞は、トリプシンおよびコラゲナーゼに感受性が高く、卵胞回収の際に酵素処理によりほとんどの卵胞が死滅する。そのため、二次卵胞においては卵胞を生きたまま回収するためには外科用メスで細切する等の機械的な回収が有効であることが明らかにされている (Itoh and Hoshi, 2000. *In Vitro Cell Dev Biol*)。一方、研究代表者は、これまで胚の生殖巣から酵素処理を行わずに生殖細胞を選択的に分離する方法を開発している (Nakajima et al., 2011. *J Poult Sci*)。そこで、本研究では上記の細胞分離法を組み合わせることで成熟前の原始卵胞、一次卵胞および二次卵胞の効率的分離法の確立を試みた。

性成熟雌マウスから卵巣を取り出し、PBS で洗浄した後、27G の医療用針で細切し 200 μ l の① α MEM、②PBS、③1mM EDTA を添加した PBS (1mM EDTA-PBS) もしくは④5mM

EDTA-PBS に入れ、37°Cでインキュベートした。3 時間後、それぞれの培養液内に分離した卵胞を計測した。さらに、卵巣を細切し、37°Cで1 時間インキュベートし、それぞれの培養液内に分離した卵胞を計測した。

(2) 卵母細胞のクロマチン構造の解析

原始卵胞の休眠維持機構におけるクロマチン構造の関与を明らかにするために、卵巣内に原始卵胞が存在すると予想される新生児期、春機発動期、および性成熟後のマウス卵巣から回収した卵母細胞を分類し、クロマチン構造を解析した。クロマチン構造はクロマチンが核小体を取り囲むように凝集したヘテロクロマチン構造を示すものを SN 型、クロマチンが核内に広がったユークロマチン構造を示すものを NSN 型とした。

まず、回収した卵胞を 4%PFA を添加した PBS で固定した後、Sytox を添加したマウント剤で包埋することで核染色を行った。核染色を行った卵胞は、卵胞上皮細胞の数、卵胞上皮細胞の形態および卵母細胞の直径で原始卵胞、一次卵胞、二次卵胞、三次卵胞に分類した。次に、分類したそれぞれの卵胞における卵母細胞の核のクロマチン形態を解析した。

4. 研究成果

(1) 未成熟卵胞回収法の確立

マウスから卵巣を採取し、①αMEM、②PBS、③1mM EDTA-PBS もしくは ④5mM EDTA-PBS 内で、37°C、3 時間培養した結果、②の場合において最も多くの卵母細胞を回収することが可能であった (表 1)。しかし、②で分離された卵母細胞の発育ステージは、原始卵胞および一次卵胞 0%、二次卵胞 86%、三次卵胞 14%であった。そのため、原始卵胞および一次卵胞の回収には②の場合には非効率的であることが示唆された。一方、卵巣を

細切し、さらに1 時間培養した結果、原始卵胞および一次卵胞が分離される割合は①26.7%、②9.7%、③20.6%、④53.1%であり、④で最も効率的に発育前期の卵胞を分離することが可能であった (図 1)。

さらに、生後 3 日齢および生後 7 日齢のマウス卵巣を用いた場合においても④の条件で最も高い効率で原始卵胞および一次卵胞の分離が可能であった。

以上より、本研究においてマウス卵巣からの未成熟卵胞回収法を確立した。

表 1. マウス卵巣から分離された卵胞数

	3 時間 (細切なし)	1 時間 (細切あり)	合計
①	0	45	45
②	28	62	90
③	8	68	76
④	0	50	50

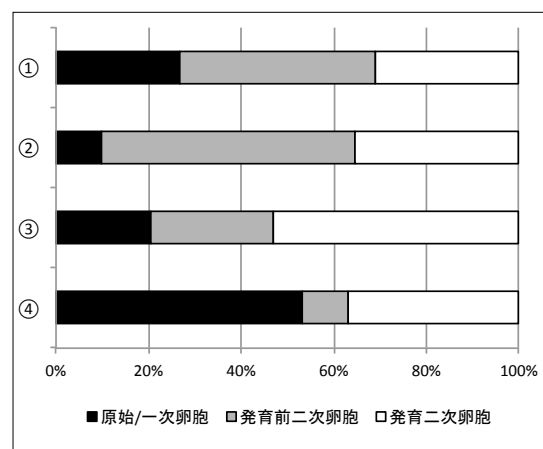


図 1. 分離した卵胞の発育段階

(2) 卵母細胞のクロマチン構造の解析

新生児期、春機発動期、および性成熟後のマウス卵巣から回収され核染色が可能であった卵胞のうち、原始卵胞～二次卵胞の直径が 40μm 以下の未成熟卵胞を解析した。卵胞は卵母細胞を取り囲む上皮細胞が 1 層の扁平ものを原始卵胞、1 層の立方体状のものを一次卵胞、2 層のものを二次卵胞と同定した。原始卵胞の卵母細胞のクロマチン構造は、新

生児期および性成熟後いずれにおいても NSN 型が 100%、転写不活性型の SN 型が 0% であった。一方、一次卵胞においてクロマチン構造が SN 型の卵母細胞は、新生児期では 4.3%、性成熟後では 33.3%であった (図 2)。

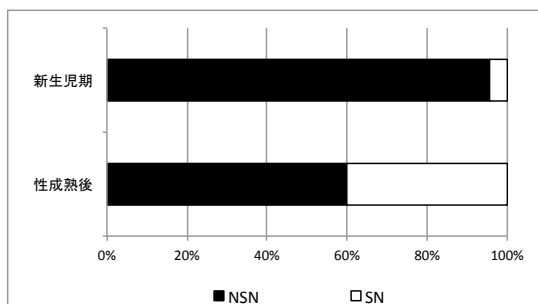


図 2. 一次卵胞におけるクロマチン構造

この結果から、原始卵胞には SN 型のクロマチン構造をもつ卵母細胞が存在しない、もしくは NSN 型以外の卵母細胞は休眠が維持できず一次卵胞へと発育してしまう可能性が考えられる。

近年、原始卵胞が発育を開始する発育選抜である原始卵胞の活性化には PI3K-PTEN-AKT-FOXO3 シグナル (Castrillon et al. 2003. Science; Kim et al. 2015. Endocrinology) や、mTORC I シグナル (Laplante and Sabatini. 2012. Cell) が抑制的に働くことで、原始卵胞の休眠が制御されていることが明らかになっている。しかし、これらのシグナルの上流因子や活性化される原始卵胞の選抜について詳細なメカニズムは明らかにされていない。本研究は、原始卵胞における卵母細胞の休眠維持と活性化について、卵母細胞のクロマチン構造に着目して研究を行った。その結果、本研究において原始卵胞の卵母細胞の休眠における NSN 型のクロマチン形態の関与が示唆された。このことから、今後の展望として、休眠する原始卵胞の卵母細胞におけるクロマチン形態を制御する因子に着目することで卵母細胞の休眠/活性化メカニズムを解明することが考え

られる。卵母細胞の休眠/活性化メカニズムを解明し、制御することで正常な卵胞成熟能や個体発生能を有する卵胞の選別、および体外培養系における卵母細胞救済への応用が期待でき、家畜繁殖工学や生殖医療への寄与が期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 2 件)

(1) Yuki Nakajima, Maiko Gotoh, Yu-ichi Tsukada. Developmental potential of single mouse blastomere. Fourth World Congress of Reproductive Biology (WCRB 2017). 2017

(2) 中島友紀、東田裕一、マウス着床前初期胚が有する全能性の評価、日本分子生物学会第 39 回年会、2016 年

6. 研究組織

(1)研究代表者

中島 友紀 (NAKAJIMA, Yuki)
九州大学・稲盛フロンティア研究センター・特任助教
研究者番号：50743126