

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 5日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22580332

研究課題名（和文）

卵母細胞の減数分裂制御におけるCNPシグナルの役割とその機能利用に向けた研究

研究課題名（英文）Study on the role of CNP in the regulation of oocyte meiosis

研究代表者

辻 岳人 (Takehito Tsuji)

岡山大学・大学院環境生命科学研究科・准教授

研究者番号：90314682

研究成果の概要（和文）：

本研究では、C型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)が、卵母細胞の減数分裂制御に関与するか解析した。その結果、(1) CNPとその受容体(NPR2)は顆粒膜細胞に発現する(2) NPR2遺伝子変異は減数分裂制御に異常をもたらす(3) 減数分裂の再開をもたらすLHによりCNP遺伝子発現量は低下することを明らかにした。したがって、CNP/NPR2シグナルは卵母細胞の減数分裂を抑制し、その効果はLHに反応して減少することが示された。

研究成果の概要（英文）：

This study investigated the role of CNP/NPR2 signaling in the regulation of oocyte meiosis, and obtained novel findings as follows: (1) CNP and its receptor (NPR2) were expressed in ovarian granulosa cells (2) mice with a mutation in *Npr2* gene showed precocious resumption of oocyte meiosis in antral follicles (3) CNP was downregulated in response to LH signaling. These results suggest that the arrest of oocyte meiosis is maintained by CNP/NPR2 signaling from the granulosa cells that is relieved by LH signaling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：動物遺伝学

科研費の分科・細目：基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：卵母細胞、減数分裂、CNP

1. 研究開始当初の背景

卵母細胞は、卵巣内で発育してから排卵に至るまでの間に減数分裂を停止し、その後、LH サージによる再開と再停止をくりかえす。これらの過程は様々な因子により厳密に制御されることで正常な卵子が形成されるが、その制御機構は十分に解明されていない。

ナトリウム利尿ペプチドファミリーの1つとして知られるC型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)は、特異的レセプターであるNPR2に結合し、NPR2により合成されたcGMPを介して特定の細胞に作用する局所因子である。我々はこれまでにCNPおよびNPR2遺伝子における機能欠損型の突然変異をもつ雌マウスは、不妊をしめすことを確認した。また、cGMPは卵母細胞の減数分裂制御に関与することがすでに報告されている。これらのことから、CNP/NPR2/cGMPシグナルが卵母細胞の減数分裂制御に関わる重要な役割を担う可能性が予想された。

2. 研究の目的

本研究ではCNP/NPR2シグナルが、減数分裂の停止状態の維持と再開に関与するかどうか明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) NPR2遺伝子に突然変異をもつ成熟マウスの卵巣の切片を作成し、各ステージの卵胞内に存在する卵母細胞における減数分裂の異常の有無を観察した。

(2) 正常な成熟マウスの卵巣におけるCNPおよびNPR2の発現パターンを明らかにするため、RT-PCRおよびin situハイブリダイゼーションによる解析をおこなった。

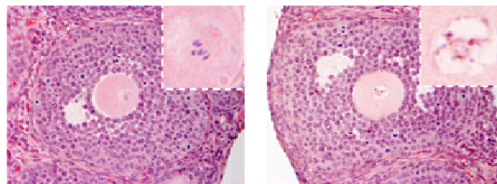
(3) PMSG投与48時間後にhCGを投与した

正常マウス卵巣におけるCNPまたはNPR2遺伝子の発現パターンの変化をリアルタイムPCRおよびin situハイブリダイゼーションにより解析した。

(4) 正常マウスの卵巣より単離した卵胞および顆粒膜細胞を培養し、LHの下流シグナル因子であるアンフィレギュリンおよびEGFレプター阻害剤の添加後におけるCNPまたはNPR2遺伝子の発現量変化を解析した。

4. 研究成果

(1) NPR2遺伝子に変異をもつ突然変異マウスの卵巣では、胞状卵胞以前のステージの多くの卵母細胞では卵核胞が観察され、正常に減数分裂を停止していることが観察された。しかし、胞状卵胞期以降では、卵母細胞でクロマチンの凝集が見られ、減数分裂を再開した異常な卵母細胞の割合が顕著に増加していた(下図参照)。

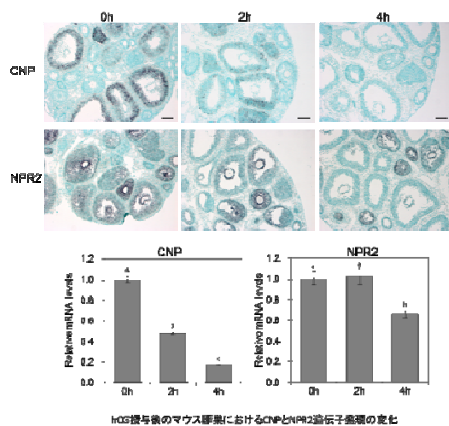


Npr2遺伝子に変異をもつマウス(左)と正常マウス(右)の卵胞
右上の破線内は卵母細胞の拡大写真

(2) マウス性周期の各ステージ卵巣におけるCNPとNPR2遺伝子の発現量を調べたところ、両遺伝子共にすべてのステージで発現が確認され、特に発情前期において最も強い発現が確認された。さらに、in situハイブリダイゼーション法により、CNPは卵胞外側の顆粒膜細胞、NPR2は卵母細胞周囲の卵丘細胞および顆粒層細胞に発現していることが確認された。

(3) LHサージにより再開される減数分裂とCNPとNPR2遺伝子の関連性について調べた。

PMSG 投与 48 時間後のマウス卵胞では、CNP と NPR2 遺伝子は、それぞれ胞状卵胞の顆粒層細胞と卵丘細胞において強い発現が確認された。さらに hCG を投与した場合、CNP 遺伝子は hCG 投与 2 時間後で明らかな発現量の減少が認められ、4 時間後にはほとんど発現が確認されなかった（下図、上段参照）。また、NPR2 遺伝子の発現は 4 時間後にわずかに減少した。さらに、卵巣での遺伝子発現量の定量解析をおこなったところ、CNP 遺伝子の発現量は、2 時間後で半分程度になり、4 時間後には 2 割以下まで低下していた（下図、下段参照）。



(4) PMSG 処理後の雌マウス卵巣より回収した卵胞を培養し、減数分裂再開にかかわる LH シグナルの下流因子であるアンフィレギュリンを添加したところ、卵胞における CNP 遺伝子の発現量は添加 30 分後以内に減少し、2 時間後にはさらに低下することが認められた。さらに、これらの LH シグナルによる遺伝子発現低下が顆粒膜細胞における反応であるか確認するため、顆粒膜細胞を培養し、アンフィレギュリンを添加後の CNP, NPR2 遺伝子発現を解析した。その結果、両遺伝子とも培養卵胞での結果と同様に、発現量は明らかに減少した。さらに、アンフィレギュリンとともに EGF レセプター阻害剤を前処理した時の CNP 発現量を解析したところ、発現量の

低下は認められなかった。

以上の結果より、CNP/NPR2 シグナルは卵胞の顆粒層細胞に存在し、胞状卵胞期における卵母細胞の減数分裂の停止維持に必須であることが明らかになった。これまでに、卵母細胞周囲の体細胞より卵母細胞へ cGMP が供給され、卵母細胞内の cGMP 濃度が一定以上に維持されることが減数分裂の停止維持に重要であることが報告されている。したがって、これまで不明であった cGMP による減数分裂の停止維持は、CNP/NPR2 が主要な経路であることが考えられた。また、LH サージにより減数分裂再開には、LH により活性化されるアンフィレギュリン/EGF レセプターにより CNP 遺伝子は発現量を急速に低下させ、その結果、卵母細胞へ供給される cGMP レベルは低下し、減数分裂の再開を導くことが示唆された。本研究は、卵母細胞の減数分裂制御にかかわる重要な機構の一面を明らかにした。これらの知見は未だ不明な卵胞の発育・成熟調節に関わる重要な知見であり、今後、畜産や人の生殖技術分野への貢献が期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

1. [Tsuji T](#), Kiyosu C, Akiyama K, [Kunieda T](#). CNP/NPR2 signaling maintains oocyte meiotic arrest in early antral follicles and is suppressed by EGFR-mediated signaling in preovulatory follicles. *Mol Reprod Dev.* 査読有、79 巻、2012、795-802、DOI: 10.1002/mrd.22114
2. Kiyosu C, [Tsuji T](#), Yamada K, Kajita S, [Kunieda T](#). NPPC/NPR2 signaling is essential for oocyte meiotic arrest and cumulus oophorus formation during

follicular development in the mouse ovary. *Reproduction*. 査読有、144 巻、2012、187-193

DOI: 10.1530/REP-12-0050

3. Sogawa C, Abe A, Tsuji T, Koizumi M, Saga T, Kunieda T. Gastrointestinal Tract Disorder in Natriuretic Peptide Receptor B Gene Mutant Mice. *Am. J. Pathol.* 査読有、177 巻、2010、822-828

DOI: 10.2353/ajpath.2010.091278

[学会発表] (計 2 件)

1. 山田郁・辻 岳人:骨成長をもたらす突然変異(dwg)の原因遺伝子の同定 第30回日本骨代謝学会 2012年7月21日 東京
2. 岩上 大毅・辻 岳人:矮小を呈するstbマウスの組織学的解析および原因遺伝子のマッピング 第30回日本骨代謝学会 2012年7月21日 東京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

辻 岳人 (TAKEHITO TSUJI)

岡山大学・大学院環境生命科学研究科・准

教授

研究者番号 : 90314682

(2)研究分担者

国枝 哲夫 (KUNIEDA TETSUO)

岡山大学・大学院環境生命科学研究科・教授

研究者番号 : 80178011