

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780267

研究課題名(和文)シグナル相互作用によって制御される新規卵母細胞発達メカニズムの解明

研究課題名(英文)The study of novel mechanism for oocyte development regulated by signal interaction.

研究代表者

杉浦 幸二 (SUGIURA, KOJI)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：20595623

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、卵母細胞の新たな発達制御メカニズムの解明を目指した。具体的には、卵母細胞の発達には卵丘細胞が重要な役割を果たすことから、マイクロアレイ法による卵丘細胞遺伝子発現の網羅的解析を行い、卵母細胞が分泌する増殖因子(卵由来シグナル)とエストロゲンとの相互作用が、卵丘細胞の分化・機能に与える影響を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted to understand the mechanism of oocyte development. Using a microarray method, the effects of oocyte-derived paracrine factors and/or estrogen on the transcriptome of cumulus cells were examined.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用動物科学

キーワード：繁殖

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の卵母細胞の発達には、多くの増殖因子やホルモンなどが関与しているが、これらの多くは卵母細胞ではなく、それを支持する卵丘細胞をターゲットとして卵母細胞の発達を制御している。したがって卵母細胞の発達メカニズムを理解するには、卵丘細胞の発達や機能制御のメカニズムを解明する必要がある。

卵丘細胞の発達に重要なシグナルのひとつとして、卵母細胞自身が分泌する増殖因子(卵由来シグナル)が挙げられる。実際、卵母細胞の分泌する増殖因子をコードする遺伝子を欠損したマウスでは、卵丘細胞の分化・機能異常によりメスの妊孕性が低下してしまう。

申請者のこれまでの研究により、卵由来因子のひとつである骨形成タンパク質 15 (BMP15) の卵丘細胞機能制御における重要性や、卵丘細胞の発達に重要な役割を持つエストロゲンと卵由来シグナルが共に働くことが卵丘細胞の発達に必須であることなどが明らかとなっている。

しかし、これらのシグナルがどのように相互作用するのか、また、その相互作用の結果として卵丘細胞の発達や機能制御にどのような影響を与えるのかについては理解されていない。

## 2. 研究の目的

卵由来シグナルとエストロゲンとの相互作用のメカニズム、およびその相互作用が卵丘細胞の分化・機能に与える影響の解明を試みた。

## 3. 研究の方法

### (1) Nrip1、Noggin の発現解析

予備実験により、卵由来シグナルとエストロゲンの相互作用に關与する可能性の考えられたエストロゲン受容体結合因子 NR1P1 および BMP 阻害因子 Noggin について、卵母細胞発達過程での詳細な発現動態および発現制御を、リアルタイム PCR およびウェスタンブロット法で解析した。

サンプルは、未発達な前胞状卵胞の顆粒膜細胞 (PG) および発達した胞状卵胞の壁顆粒膜細胞 (MG) と卵丘細胞とした。また、これらの遺伝子発現に対する卵母細胞との共培養の影響についてもリアルタイム PCR で解析した。さらに、Noggin についてはエストロゲン添加の影響を解析した。

### (2) Noggin の機能解析

培養実験を行い、卵由来シグナルのうち特に BMP シグナルに対する Noggin 合成タンパク質の影響を解析した。

具体的には、胞状卵胞より採取した MG を

卵母細胞と共培養し、Noggin 合成タンパク質の添加が、卵丘細胞内での BMP シグナルに与える影響を解析した。BMP シグナルの指標としては、その仲介因子 SMAD1/5/8 のリン酸化状態をウェスタンブロットにより調べた。

### (3) 網羅的遺伝子発現解析

卵丘細胞遺伝子発現に対する卵由来シグナルおよびエストロゲンの影響について、マイクロアレイ法を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。

卵丘細胞には、卵丘細胞卵母細胞複合体 (COC) からマイクロマニピュレーターを用いて、高次構造を維持したまま卵母細胞を除去した OOX 複合体を用いた。OOX 複合体を、卵母細胞との共培養、およびエストロゲン添加の有無で培養し遺伝子発現をマイクロアレイ法で解析した。解析結果は、リアルタイム PCR により結果の確認を行ったうえで、遺伝子オンロジー解析、パスウェイ解析を行い、卵丘細胞内で起こる生物学的変化について考察した。

## 4. 研究成果

### (1) Nrip1、Noggin の発現解析

Nrip1 の発現は、卵母細胞発達に伴って MG で上昇し、卵丘細胞においては低く維持されていた。一方、Noggin については卵母細胞発達に伴って卵丘細胞で高い発現を示し、MG での発現は低く維持されていた。

卵丘細胞におけるこれらの遺伝子発現に対する卵由来シグナルの影響を調べたところ、Nrip1 の発現は卵母細胞によって抑制、一方 Noggin は促進されることが明らかとなった。したがって、生体内で MG と卵丘細胞にみられるこれら遺伝子の発現差は、卵母細胞による抑制・促進制御によると考えられる。

さらに、卵丘細胞における Noggin の発現は、生体内で低く抑えられており、生体外に取り出すことにより上昇した。この時、培地にエストロゲンを添加することによって Noggin の発現上昇は抑制された。すなわち、生体内では何らかの因子によって Noggin の発現は抑制されており、その因子の一つとしてエストロゲンが示唆される。

これらの結果は、卵由来シグナルおよびエストロゲンは互いのシグナルを阻害し得る因子の発現を抑制することで互いのシグナルを増強し合っている可能性を示唆している。

### (2) Noggin の機能解析

次に、実際に Noggin が卵由来シグナルのうち、特に卵由来の BMP15 のシグナルを抑制できるのかについて解析を行った。

BMP タンパク質の細胞内シグナルは仲介タンパク質である SMAD1/5/8 のリン酸化によって伝えられる。そこで、SMAD1/5/8 のリン酸化状態を BMP シグナルの活性化指標としてウ

エスタンプロット法で解析した。その結果、MGを単独培養した際にはSMAD1/5/8のリン酸化は検出されなかったが、卵母細胞と共培養するとMGでSMAD1/5/8のリン酸化を促進された。しかし、卵母細胞とMGの共培養系にNogginを添加することで、このリン酸化の割合に低下が見られた。一方、卵母細胞と共培養しないMGにNogginを添加培養しても、SMAD1/5/8のリン酸化に影響は見られなかった。

さらに、このNogginによる卵由来BMPシグナルの抑制がBMP15特異的であるかどうかを検討するために、人工合成したヒトBMP15タンパク質を、MG培養系に添加し、Nogginの影響を解析したヒトタンパク質を用いた理由は、一般的にマウスBMP15は合成が難しくさらに活性を失いやすいため、入手が困難であるためである。その結果、ヒトBMP15合成タンパク質はMGにおけるSMAD1/5/8のリン酸化を促進し、一方Nogginの添加により、このリン酸化は顕著ではないが抑制される傾向が見られた。

これらの結果は、Nogginが卵母細胞由来のBMPシグナルを抑制し得る可能性を示唆しているが、それがBMP15シグナル特異的であるかどうかについては、マウスBMP15合成タンパク質の作成などにより今後更なる検討の必要がある。また、生体内ではエストロゲンによりNogginの発現は抑制されていることから、この抑制の生理的意義を解明する目的で、現在、顆粒膜細胞特異的にNogginを過剰発現するマウスを作成している。

### (3) 網羅的遺伝子発現解析

卵由来シグナルとエストロゲンが卵丘細胞での遺伝子発現に与える影響について、マイクロアレイによる網羅的解析を行った。

解析には、卵母細胞と共培養またはエストロゲン添加培地で培養したOOX複合体、卵母細胞とエストロゲン共に培養したOOX複合体、単体で培養したOOX複合体を用いた。また、マイクロアレイ結果の内、一部の遺伝子については、リアルタイムPCR法で結果の確認を行った。

マイクロアレイ解析の結果、エストロゲンが存在しない時、卵由来シグナル単体では、卵丘細胞内で細胞増殖関連の遺伝子オントロジーに関係した遺伝子発現が有意に促進され、一方アポトーシスに関連したものは有意な抑制を受けた。興味深いことに、エストロゲンの存在下においても、卵母細胞は同様に、細胞増殖の促進とアポトーシスの抑制をした。

卵母細胞が存在しない時には、エストロゲンは細胞増殖の促進に関連した遺伝子の発現を有意に促進した。一方、卵母細胞が存在する際には、エストロゲンは卵丘細胞内で多くの細胞内外のシグナル伝達に参与するタンパク質をコードする遺伝子の発現を促進した。

これらの結果は、エストロゲンは卵由来シグナルに対して顕著な影響を示さないものの、卵由来シグナルはエストロゲンシグナルに大きな影響を持ち、卵由来シグナルの影響の結果、エストロゲンは卵胞発達に重要とされるシグナル伝達に参与する遺伝子発現を促進するようになることを示唆している。

現在は、この卵由来シグナルによるエストロゲンシグナル制御メカニズムの解明を目指し、卵由来シグナルによって発現制御を受けるエストロゲンシグナル制御タンパク質の探索を行っている。

### 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)

[雑誌論文](計4件)

1. Emori C, Sugiura K. Role of oocyte-derived paracrine factors in follicular development. Anim. Sci. J. [in press] (総説、査読なし)
2. 江森千紘\*、川崎紅\*、杉浦幸二(\* Equally contributed)「卵胞発達における卵母細胞由来の増殖因子の役割」日本IVF学会雑誌2014; 17巻 1号(総説、査読なし)
3. Lee KB, Zhang M, Sugiura K, Wigglesworth K, Uliasz T, Jaffe LA, Eppig JJ. Hormonal Coordination of Natriuretic Peptide Type C and Natriuretic Peptide Receptor 3 Expression in Mouse Granulosa Cells. Biol. Reprod. 2013; 88: 42 (査読有)
4. Emori C, Wigglesworth K, Fujii W, Naito K, Eppig JJ, Sugiura K. Cooperative effects of 17 $\beta$ -estradiol and oocyte-derived paracrine factors on the transcriptome of mouse cumulus cells. Endocrinology. 2013; 154:4859-4872. (査読有)

[学会発表](計5件)

1. 松野雄太、藤井涉、内藤邦彦、杉浦幸二、ブタ卵胞液におけるエキソソームの存在確認、第118回日本畜産学会(つくば国際会議場) 2014年3月28日。
2. 川崎紅、藤井涉、内藤邦彦、杉浦幸二、マウス個体の老化が卵母細胞と卵丘細胞間のコミュニケーションに及ぼす影響、第106回日本繁殖生物学会(東京農工大学) 2013年9月13日。
3. 住友準一、藤井涉、内藤邦彦、杉浦幸二、マウス卵母細胞が顆粒膜細胞での

miR-322発現を抑制する，第106回日本繁殖生物学会(東京農工大学) 2013年9月13日

4. 古川 最一，西村 鷹則，藤井 渉，内藤 邦彦，杉浦 幸二，マウス卵巣におけるFGF リガンドおよびレセプターの発現解析，第105回日本繁殖生物学会(筑波大学)2012年9月6日.
5. 江森千紘，内藤邦彦，杉浦幸二，マウス卵胞発達におけるNogginの発現制御および機能解析(IYS-02)，第116回日本畜産学会(安田女子大学、広島)2012年3月28日.

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

杉浦 幸二 (SUGIURA KOJI)  
東京大学 大学院農学生命科学研究科  
准教授  
研究者番号：20595623

##### (2)研究分担者

なし

##### (3)連携研究者

なし