

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 18 日現在

機関番号：81602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660247

研究課題名(和文) 卵胞の選択的発育分子メカニズムの解明を可能にするFSH結合抑制因子の分離同定

研究課題名(英文) Clarification of molecular mechanism of selective follicular growth in mammals by identification of FSH binding inhibitor with different function

研究代表者

佐藤 英明 (Sato, Eimei)

独立行政法人家畜改良センター・その他部局等・理事長

研究者番号：80093243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)： FSH結合抑制因子候補の絞り込みを行ったが、得られた研究成果は次の通りである。(1)ハンキングドロップ法による卵母細胞-卵丘細胞複合体の単培養系を確立し、さらにFSH結合抑制因子を含む化合物のスクリーニングに効果的であることを明らかにした。(2) focal adhesion kinase(FAK)に焦点を当てて解析した。マウスでの先行研究を行い、卵子・卵丘複合体(COC)におけるFAKの発現と卵成熟におけるFAKのTyr397部位におけるリン酸化の役割を解析するとともにFAKのTyr397部位におけるリン酸化抑制は受精・初期発生を促進させることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)： The results obtained in this study are as follows. (1) Candidates of genes/proteins as the FSH binding inhibitor has been identified and some of them had the activity for GVBD Inhibition. (2) Hanging drop method for culturing individual oocyte-cumulus complex was established for screening the chemical including the inhibitor for follicular development and oocyte maturation. Then, it was shown that the method is useful for our purpose. (3) The physiological role of FAK was analyzed, and it was shown that phosphorylation of FAK is important for oocytes to obtain the fertilizability and developmental ability through the expression the Has2. (4) It was shown that Pin1 has a crucial role for oocyte maturation and early embryogenesis in mice.

研究分野：家畜繁殖学、畜産学

キーワード：卵胞発育 血管増殖 FAK リン酸化 IVMFC 和牛

1. 研究開始当初の背景

- (1) 卵胞発育の後半は FSH によって調節されているが、どのようにして一部の卵胞のみが FSH に反応して発育を継続し、排卵に至るか、すなわち FSH の選択的作用 (一部の卵胞のみに作用し、大多数への影響は弱い) について明解な答えはなかった。
- (2) 選抜されて発育を進める卵胞・卵母細胞で発現するどのような因子が卵胞の選択的発育に関与するかについては不明であった。

2. 研究の目的

- (1) FSH の卵胞への選択的作用に係わる FSH 結合抑制因子を分離同定し、機能の異なる FSH 結合抑制因子を同定する。
- (2) 選抜され発育を進める卵子・卵丘複合体で発現する遺伝子の網羅的解析を行い、卵胞発育に違いをもたらす可能性のある遺伝子・因子を同定する。その中から FAK を取り上げ、その発現調節カスケードを明らかにする。
- (3) 卵胞の微小な遺伝子発現の違いを反映する培養系を開発する。

3. 研究の方法

- (1) ウシとブタの卵胞液を出発にして FSH 結合抑制因子を分離する。
- (2) 卵子・卵丘複合体で発現する遺伝子の網羅的解析の先行研究をマウスで行う。その中から卵胞発育に違いをもたらす可能性の高い遺伝子を文献検索により同定し、解析する因子を絞る。
- (3) 発育を進める卵子・卵丘複合体で発現する遺伝子の中から FAK を選抜し、卵丘細胞における、その発現カスケードを明らかにする。
- (4) また卵子において発現する Pin 1 に焦点を当て、卵成熟における役割を明らかにする。
- (5) 卵子・卵丘複合体での遺伝子発現の微小な違いの解析が可能な培養系を開発する。そして、卵子・卵丘複合体の微小な遺伝子発現の同定を可能とする。

4. 研究成果

- (1) 卵胞内顆粒膜細胞で発現するものの中から卵胞退行開始に伴って発現するものを選抜した。その中の少数の因子が卵胞発育・卵成熟制御因子として機能することを明らかにした。
- (2) polylectosamine によって修飾された糖鎖 CD44 を発現するマクロファージが卵胞

退行に係わることを明らかにした。FSH により退行卵胞の消失促進を認めているが、FSH 結合抑制因子の発現と polylectosamine によって修飾された糖鎖 CD44 の機能の相関を明らかにする必要がある。

- (3) ウシとブタの FSH 結合抑制因子のそれぞれの標的細胞への結合活性について既報のデータを再度解析した。その結果、ウシよりもブタ由来の因子の FSH 結合抑制活性が高かった。1 個排卵する動物 (ウシ) と多数個排卵する動物 (ブタ) の違いによっても推察された。相違の由来を明らかにしようとしたが、研究期間内に明確にはできなかった。

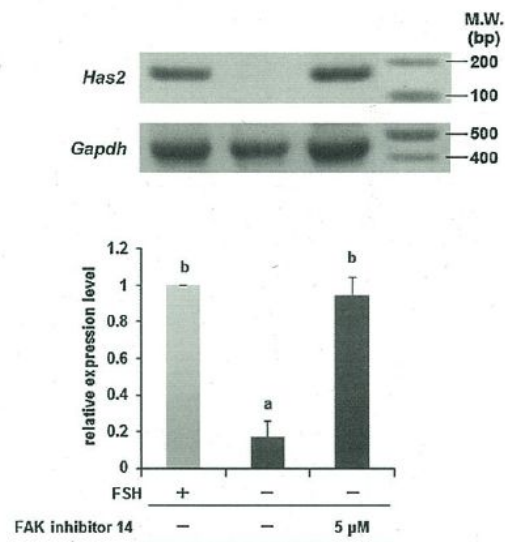


図. 卵子・卵丘複合体の卵丘膨化及び Has2 遺伝子発現に及ぼす FAK インヒビターの影響

- (4) 卵胞液からの FSH 結合抑制因子の分離同定に加え、生き残り、発育を続ける卵胞内の卵子・卵丘複合体で発現する遺伝子の網羅的解析を行い、その中の一つである focal adhesion kinase (FAK) に焦点を当てて解析した。マウスでの先行研究を行い、卵子・卵丘複合体 (COC) における FAK の発現と卵成熟における FAK の Tyr397 部位におけるリン酸化の役割を解析した。卵成熟において FAK の Tyr397 部位におけるリン酸化を抑制し、その後の受精・初期発生を観察した。Tyr397 部位のリン酸化 FAK は卵子と卵丘で発現することをウエスタンブロッティングで明らかにした。免疫組織化学では卵子と卵丘の細胞質に観察された。Tyr397 部位のリン酸化 FAK は相互の接着部位に蓄積した。Tyr397 部位のリン酸化 FAK の発現の程度は in vivo では卵丘膨化前に比べ低下した。FAK インヒビター (Tyr397 のリン酸化を特異的に阻害) の添加は FSH 無添加培

地における卵成熟及び卵丘膨化を促進した(図)。ヒアルロン酸合成酵素2(Has2)のmRNAの発現(卵丘膨化の指標)が誘導されるがRTPCRにより明らかになった。FAKインヒビターの処理は胚盤胞への発生率を上昇させた。これらの事実はFAKが卵成熟においてTyr397のリン酸化を通じたヒアルロン酸合成酵素Has2の発現がCOCの成熟、特に発生能力の獲得に関与していることを示している。

- (5) 退行せず、生き残り、発育を進めた卵胞内の卵子は減数分裂を再開し、成熟する。成熟はFSHが順調に作用した結果として誘起される重要な卵巣内現象である。これまでに明らかにした卵成熟メカニズムに基づき、その上流因子の解析を進め、プロリン異性化酵素Pin1が卵子の成熟(減数分裂再開)と初期胚の発生に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

引用文献

Sato, E., Ishibashi, T., Iritani, A. (1982) Purification and action sites of a follicle-stimulating hormone inhibitor from bovine follicular fluid. *J. Anim. Sci.*, 55:873-877.

Tsafiriri, A. (1995) Ovulation as tissue remodeling process., *Adv. Esp. Med. Biol.*, 377, 121-140.

Sato, E., Koide, S. S. (1987) Biochemical transmitters regulating the arrest and resumption of meiosis in oocytes. *Inter. Rev. Cytol.*, 100:1-31.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Nakano, K., Nishio, M., Kobayashi, N., Hiradate, Y., Hoshino, Y., Sato, E., Tanemura, K., Comparison of the effects of BPA and BPAF on oocyte spindle assembly and polar body release in mice., *Zygote*, 査読有、24(2):172-180、2015、DOI:10.1017/S0967199415000027

Ohtake, J., Sakurai, M., Hoshino, Y., Tanemura, K., Sato, E., Expression of focal adhesion kinase in mouse cumulus-oocyte complexes and effect of phosphorylation at Tyr397 on cumulus expansion., *Mol. Reprod. Dev.*, 査読有、82(3):218-231、2015、DOI:10.1002/mrd.22464

Sato, E., Intraovarian control of selective follicular growth and induction of oocyte maturation in mammals., *Proc. Jpn. Acad. Ser. B*, 査読有、91:76-91、2015、DOI:10.2183/pjab.91.76

[学会発表](計5件)

橋谷田 豊・相川芳雄・松田秀雄・大竹正樹・後藤由希・小林修司・山之内忠幸、ウシ卵性双子生産のための胚の割球分離溶液の検討、第22回日本胚移植研究会大会、2015年8月28日、高知大学農学部(高知県南国市)

松田秀雄・山之内忠幸・大竹正樹・相川芳雄・後藤由希・小林修司・橋谷田 豊、OPU前のGnRH投与が黒毛和種の胚発生に及ぼす影響、第22回日本胚移植研究会大会、2015年8月28日、高知大学農学部(高知県南国市)

松田秀雄、山之内忠幸、後藤由希、相川芳雄、大竹正樹、小林修司、橋谷田 豊、ウシ卵子のガラス化液に添加するポリエチレングリコール至適濃度の検討、第108回日本繁殖生物学会大会、2015年9月18日、宮崎大学農学部(宮崎県宮崎市)

橋谷田 豊、肉用牛の胚・子牛生産効率を上げるには、第108回日本繁殖生物学会大会(シンポジウム)、2015年9月19日、宮崎大学農学部(宮崎県宮崎市)

山之内忠幸・松田秀雄・大竹正樹・後藤由希・小林修司・橋谷田豊、ウシ卵子の成熟培地へのプロジェステロン添加が体外受精後の胚発生に及ぼす影響、第31回東日本受精卵移植技術研究会大会、2016年2月5日、石川県立音楽堂(石川県金沢市)

[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]なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤英明(SATO Eimei)

(独)家畜改良センター・理事長

研究者番号: 80093243

(2) 研究分担者

橋谷田 豊(HASHIYADA Yutaka)

(独)家畜改良センター・企画調整部・技術専門役

研究者番号50462536

(3) 研究分担者

松田秀雄(MATSUDA Hideo)

(独)家畜改良センター・企画調整部・係長

研究者番号30442685

(4)研究分担者

真崎匡(MASAKI Kyo)

(独)家畜改良センター・企画調整部・係長

研究者番号：60731164