

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830061

研究課題名(和文)女性の生殖可能期間を支える原始卵胞活性化とその分子機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of the molecular mechanism for primordial follicle activation

## 研究代表者

鈴木 仁美 (Suzuki, Hitomi)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：60644094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類卵巣においては卵母細胞は複数種の体細胞に支持され、これらの細胞が作る球状の細胞の集合体を「卵胞」とよぶ。最も未成熟な原始卵胞は前顆粒細胞と小さな卵母細胞からなり、休眠状態で長期間卵巣内に蓄えられているが、刺激にตอบสนองして活性化すると成熟過程に入って排卵される。女性が40年という長い生殖器官を維持できるのは、原始卵胞の維持と活性化のバランスをとる機構が働いているためだが、その分子機構の詳細については未だ不明である。本研究では、卵母細胞特異的に発現する転写因子Sohlh1, Sohlh2の機能の一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Folliculogenesis in mammals is a complex process involving bi-directional communication between the oocyte and surrounding soma. In the mouse ovary, primordial follicles (PrdFs) that contain 15um oocyte surrounded by flatten soma are formed shortly after birth, and provide a source of future growing follicles during the entire reproductive lifespan. PrdFs remain dormant for prolonged intervals. For retaining a long female reproductivity, it is essential to manage both 'dormancy' and 'activation' of PrdF and to prevent the consumption of all PrdF in a short period. In this study, we revealed the part of function of Sohlh1 and Sohlh2, which are the oocyte-specific transcription factors.

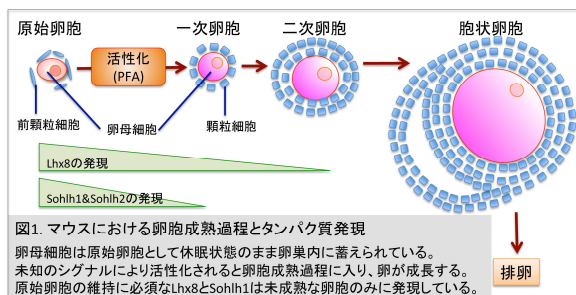
研究分野：発生生物学

キーワード：原始卵胞 卵巣機能

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類卵巣においては卵母細胞は複数種の体細胞に支持され、これらの細胞が作る球状の細胞の集合体を「卵胞」とよぶ。最も未成熟な原始卵胞は前顆粒細胞と小さな卵母細胞からなり、休眠状態で長期間卵巣内に蓄えられている。原始卵胞が刺激を受けて活性化すると、卵胞成熟過程に入り、性周期に従って一次卵胞、二次卵胞、胞状卵胞と成長し、排卵に至る(図1)。原始卵胞活性化時には体細胞も刺激され、扁平な前顆粒細胞が方形の顆粒細胞へと分化し、卵母細胞の成熟を支える。健康なヒト女性の卵巣では、思春期以降約40年の間に月に1個ずつ、合計400個ほどの成熟した卵子(卵母細胞)が排卵される。女性が40年という長い生殖可能期間を維持できるのは、原始卵胞の維持と活性化のバランスを保つ機構が働いているからだが、その詳細は未だ不明である。女性の1-4%は若年のうちに閉経を迎えてしまう早期卵胞閉鎖症を患っているといわれ、原始卵胞を維持できずに卵胞が枯渇する症例も報告されている。従って今後の不妊治療の改善、開発のためには原始卵胞活性化機構の解明が急務である。

生殖細胞特異的な bHLH 型転写因子 *Sohlh1* と *Sohlh2* は、卵巣では原始卵胞と一部の初期一次卵胞に強く発現している(図1)。*Sohlh1* または *Sohlh2* のノックアウトマウス(*Sohlh1* KO, *Sohlh2* KO)



では生後まもなくすべての卵胞がアポトーシスにより死滅する。申請者は *Sohlh1* KO と *Sohlh2* KO の表現型を詳細に解析し直

し、原始卵胞が顆粒細胞の分化を伴わない異常な PFA をおこなっていることに注目した。

## 2. 研究の目的

「転写因子 *Sohlh1*, *Sohlh2* は、他の因子と共同して PFA およびアポトーシスの抑制に機能している」と仮定し、その分子的作用機序の解明を目的として研究を行う。

## 3. 研究の方法

*Sohlh1* と *Sohlh2* が転写調節を行っている転写因子の1つに *Lhx8* があることが知られている。申請者は、*Sohlh1* と *Lhx8* が直接結合することを発見した。本研究では以下の方法でその相互関係を探索した。

- (1) *Sohlh1*, *Sohlh2*, *Lhx8* の結合部位同定
- (2) *Sohlh1* 結合因子の網羅的解析と、同定された因子と *Lhx8* の関係解析

## 4. 研究成果

- (1) *Sohlh1*, *Sohlh2*, *Lhx8* の結合部位同定  
*Sohlh1* と *Lhx8*, *Sohlh2* と *Lhx8*, *Sohlh1* と *Sohlh2* それぞれの結合部位を同定し、機能にあたる影響を類推することが可能となった。
- (2) *Sohlh1* と結合する因子 A を同定した。A は *Lhx8* とは直接結合しないこと、*Sohlh1* との結合において *Lhx8* と競合するであろうが明らかになった。*Sohlh1* は結合パートナーによって標的や機能を変えている可能性が示唆された。

以上の結果から、原始卵胞維持機構において、転写因子同士の相互作用が必要であることが初めて示唆された(Ren et al. 2015 BMC in press)。さらに、卵巣での機能が未知の因子 A を同定し、*Sohlh1* と共同して原始卵胞維持に寄与していることを示唆する結果を得たことは、当該分野に新たな局面を創出するきっかけになると考えている。今後、これらの

因子の相互関係や機能を因子 A のノックアウトマウスの解析等を通して明らかにしていきたい。

#### 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 7 件)

Yu Ren\*, Hitomi Suzuki\*, Krishna Jagarlamudi\*, Kayla Golnoski, Megan McGuire, Rita Lopes, Vassilis Pachnis, and Aleksandar Rajkovic. (3 authors with\* are equally contributed)

*Lhx8* regulates primordial follicle activation and postnatal folliculogenesis  
Bio Medical Central Central Biology (in press)  
(査読あり)

Aiyama Y, Tsunekawa N, Kishi K, Kawasumi M, Suzuki H, Kanai-Azuma M, Kurohmaru M, Kanai Y,

A Niche for GFR $\alpha$ 1-positive spermatogonia in the Terminal Segments of the Seminiferous Tubules in Hamster Testes.

Stem Cells. 2015 May 26. (Epub ahead of print) (査読あり)  
doi: 10.1002/stem.2065.

Shinomura M, Kishi K, Tomita A, Kawasumi M, Kanezashi H, Kuroda Y, Tsunekawa N, Ozawa A, Aiyama Y, Yoneda A, Suzuki H, Saito M, Picard JY, Kohno K, Kurohmaru M, Kanai-Azuma M, Kanai Y.

A novel Amh-Treck transgenic mouse line allows toxin-dependent loss of supporting cells in gonads.

Reproduction. 2014 Dec;148(6):H1-9.  
doi: 10.1530/REP-14-0171. (査読あり)

Ramaswamy S, Razack BS, Roslund RM, Suzuki H, Marshall GR, Rajkovic A, \*Plant TM, Spermatogonial SOHLH1

nucleocytoplasmic shuttling associates with initiation of spermatogenesis in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*), Mol Hum Reprod. 2014 Apr;20(4):350-7.

doi: 10.1093/molehr/gat093 (査読有り)

Puri P., Phillips B.T., Suzuki H., Orwig K.E., Rajkovic A., Lapinski P.E., King P.D., Feng G.S.,

\*Walker W.

The Transition From Stem Cell to Progenitor Spermatogonia and Male Fertility Requires the SHP2 Tyrosine Phosphatase.

Stem Cells (2013). Oct 7.

DOI: 10.1002/stem.1572. (査読有り)

Yamamoto Y, Watanabe T, Hoki Y, Shirane K, Li Y, Ichiiyanagi K, Kuramochi-Miyagawa S, Toyoda A, Fujiyama A, Oginuma M, Suzuki H, Sado T, Nakano T, \*Sasaki H., , Targeted gene silencing in mouse germ cells by insertion of a homologous DNA into a piRNA generating locus.

Genome Res. 2013 Feb;23(2):292-9.

doi: 10.1101/gr.137224.112. (査読あり)

Suzuki H., Dann CT., Rajkovic A., Generation of a germ cell-specific mouse transgenic CHERRY reporter, Sohlh1-mCherryFlag.

Genesis. 2013 Jan;51(1):50-8.

doi: 10.1002/dvg.22347. (査読あり)

〔学会発表〕(計 7 件)

鈴木仁美, Aleksandar Rajkovic, 金井正美. 「卵胞成熟過程におけるエピジェネティックな転写調節機構の解析」第 6 2 回実験動物学会総会 (2015/5/28-30, 京都府京都市), 口頭発表; O-39 (2015/05/28),

平手良和, 鈴木仁美, 川澄みゆり, 金井克晃, 金井正美, 「Sox17 ヘテロ雌マウスの着床におけるハプロ不全」第 6 2 回実験動物学会総会 (2015/5/28-30, 京都府京都市), ポスター; P-104 (2015/02/29)

平手良和, 川澄みゆり, 鈴木仁美, 狩野桜子, 金井克晃, 金井正美. 「Sox17 ヘテロマウスにおける着床不全」第 37 回日本分子生物学会 (2014/11/25, 神奈川県、横浜市)

鈴木仁美, Aleksandar Rajkovic, 金井正美, 「転写因子 Sohlh1 を起点とする卵胞成熟分子機構の解析」

第 6 1 回実験動物学会 (2014/5/15-17, 北海道札幌市); ポスター, 1 P 0 7 4 (2014/05/15)

川澄みゆり, 鈴木仁美, 金井克晃, 金井正美, 胚の子宮着床における転写因子 Sox17 の機能解析,

第 6 1 回実験動物学会総会 (2014/5/15-17, 北海道札幌市), ポスター: 1P075-S (2014/05/15)

鈴木仁美、金井正美, 「マウス卵巣における原始卵胞の休眠維持と活性化の制御機構」 第 60 回実験動物学会総会 (茨城県つくば市、2013/5/15-17), ポスター P-34 (2013/05/14),

川澄みゆり、平松龍人、鈴木仁美、金井克晃、金井正美. 「Sox17-GFP トランスジェニックマウスを用いた着床メカニズムの解析」 第 60 回日本実験動物学会総会 (茨城県つくば市、2013/5/15-17), ポスター P-79

Kento Miura, Kyoko Harikae, Mai Shinomura, Mayu Nakaguti, Ayako Tomita, Naoki Tsunekawa, Hitomi Suzuki, Masami Kanai, Masamichi Kuroumaru, Yoshiakira Kanai. , 「Hsp-Sry Tg マウスを用いた精巣決定遺伝子 SRY の標的遺伝子の同定」 第 106 回日本繁殖生物学会大会 (2013/9/12-14、東京), 口頭発表: OR1-35 (2013/09/14)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等  
成果発表を研究室ホームページにて行っている。  
<http://www.tmd-cea.jp/eam/publications>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木仁美 (Suzuki, Hitomi)  
東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号 : 60644094

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号 :