

平成 21 年 4 月 5 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006 年度～2009 年度

課題番号：18380164

研究課題名（和文） 哺乳類卵子の品質の判定法の開発：卵胞選抜の分子制御機構に基づいて

研究課題名（英文） Development of estimation method for mammalian oocyte quality based
Based on molecular mechanism of follicular selection

研究代表者 眞鍋 昇

東京大学農学生命科学研究科・教授

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学

キーワード：家畜繁殖・卵胞選抜・卵母細胞・アポトーシス・細胞死阻害因子

1. 研究計画の概要

近年核移植技術を用いた体細胞や ES 細胞由来のクローン動物の作出、体外成熟・受精法の広領域での実用化、卵細胞質内顕微授精法の開発など様々な動物発生工学・生殖医療技術が編み出されて発展・活用されてきているが、ここで用いられる卵子の品質の科学的評価は未熟である。加齢にともなう卵子品質の低下は、胎児期に体細胞分裂を終えてしまっただけでその後減数分裂を停止して長く休眠する哺乳類にとって避けられない宿命である。様々な領域で卵子が使用されているので、卵子の品質を科学的に見極める技術を開発することが急務である。哺乳類は休眠後に減数分裂を再開して発育・成熟する過程で 99.9% 以上の卵子・卵胞を選択的に死滅させてしまうことで不都合な卵子を取り除く機構を備えているが、本研究は申請者が解明してきた卵子・卵胞を選択して死滅させる分子制御機構の成果を活用し、これを一段と発展させて死滅すべき卵子・卵胞を見極めて、残る高品質の卵子のみを動物発生工学や生殖医療に供することができる新規技術システムを開発しようとするもので、世界的にも極めて独創性が高くかつ社会に貢献する意義深いものである。

2. 研究の進捗状況

二次卵胞以降の顆粒層細胞には細胞死リガンドと受容体が発現していることを明らかにしたが、これらは閉鎖卵胞のみならず発育中の健常卵胞の顆粒層細胞にも発現していたので、細胞死を阻害する因子が存在すると考え、その探索と細胞内シグナル伝達系の解析を行った。顆粒層細胞はミトコンドリア

を介してシグナルが伝わる II 型アポトーシス細胞であることを示した。すなわちリガンドと結合した活性型受容体に細胞内でアダプタータンパク FADD が結合し、これにカスパーゼ 8 前駆体が結合すると一部が切断されて活性型カスパーゼ 8 となる。これが Bid を分解して活性化し、ミトコンドリアからのチトクローム C 放出を誘導すると、これと Apaf-1 とがカスパーゼ 9 前駆体と結合し、ここでカスパーゼ 9 が活性化されてカスパーゼ 3 前駆体をし、これが caspase activated DNase (CAD) を分解して活性化させる。活性型 CAD は核内に移行して遺伝子 DNA を分断してアポトーシスが実行される。健常卵胞の顆粒層細胞では、FADD とカスパーゼ 8 前駆体との結合を阻害する cellular FLICE-like inhibitory protein (cFLIP) およびカスパーゼ 9 によるカスパーゼ 3 前駆体分解を阻害する X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) が常に発現してアポトーシスを阻止しているおり、これらは閉鎖に伴って減少した。これらは、卵子の品質評価マーカーとして優れていることが分かった。

3. 現在までの達成度

当初の計画以上に進展している。

当初は、cFLIP が重要な品質評価マーカーと推測していたが、XIAP も重要であることを新たに見いだせた。加えて、品質評価後の卵胞から採取した卵母細胞の受精・成熟機能を評価し、これらの阻害因子が品質評価マーカーとして優れていることを実証できた。また排卵後の卵胞上皮細胞由来の黄体細胞においてもこれらの阻害因子が存在して、黄体形成、妊娠維持などにも重要な機能をもつこと

が分かった。

4. 今後の研究の推進方策

顆粒層細胞由来細胞に cFLIP や XIAP 遺伝子を導入した場合にアポトーシスが阻害されるか否か、逆に RNA silencing 法でこれらの発現を停止させると細胞は速やかに死滅するか否かを調べて品質評価マーカーとしての有効性を見極める。加えた、これらを品質評価マーカーとして品質を評価した後の卵胞から採取した卵母細胞の受精・成熟機能の評価の例数を増やすとともに、様々な家畜においても有効なマーカーか否かを調べて、これらの阻害因子が品質評価マーカーとして優れていることを実証する。併行して、研究成果を国内外に学会や学術論文を介して公表し、実用化を推進して、社会に貢献する。

5. 代表的な研究成果

〔雑誌論文〕(計 34 件)

Manabe N, Matsuda F, Goto Y, Maeda A, Cheng Y, Nakagawa S, Inoue N, Wongpanit K, Jin HZ, Gonda H, Li JY. Role of cell death ligand and receptor system on regulation of follicular atresia in pig ovaries. *Reprod Dom Anim*, 43: 268-272 (2008)

Ogushi S, Palmieri C, Fulka H, Saitou M, Miyano T, Fulka JJr. The maternal nucleolus is essential for early embryonic development in mammals. *Science*, 319: 613-616 (2008)

Bowolaksono A, Nishimura R, Hojo T, Sakumoto R, Acosta TJ, Okuda K. Anti-apoptotic roles of prostaglandin E2 and F2 in bovine luteal steroidogenic cells. *Biol Reprod*, 79, 310-317 (2008)

Matsuda F, Goto Y, Inoue N, Sakamaki K, Chedrese PJ, Manabe N. Anti-apoptotic activity of porcine cFLIP in ovarian granulosa cell lines. *Mol Reprod Dev*, 74: 1165-1170 (2007)

〔学会発表〕(計 46 件)

Manabe N, Role of cell death ligand and receptor system on regulation of follicular atresia in pig ovaries. *In: the 16th International Congress on Animal Reproduction*, 13-17 July (2008), Budapest, Hungary.

〔図書〕(計 11 件)

Miyano T, Manabe N. Oocyte growth and acquisition of meiotic competence. *In: Gamete Biology: Emerging frontiers on fertility and contraceptive development*. Gupta SK, Koyama K, Murray JF eds, Nottingham University Press, Nottingham,

UK, (ISBN:13-978-1-904761-43-3)
pp531-538 /545, (2007)

〔その他〕

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/bokujo/>