

平成 21 年 4 月 20 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19780210
 研究課題名 (和文) マウス卵巣及び子宮において概日リズム的に発現し、妊孕性に関わる遺伝子の特定
 研究課題名 (英文) Identification of the genes expressed in mouse ovaries and uteri by circadian manner
 研究代表者
 天野 朋子 (AMANO TOMOKO)
 近畿大学・生物理工学部・助教
 研究者番号：60388585

研究成果の概要：本研究から、マウスの卵巣において、全発現遺伝子の 1/10 以上の転写を制御する時計遺伝子群が発現量に日周性が観察されることが示された。また時計遺伝子群は胞状卵胞と黄体に強く局在しており、排卵やホルモン分泌などの機能が概日リズム的に制御される可能性が示された。一方卵子と初期胚にも時計遺伝子群は発現していたが、その発現量は一定であり、概日リズムの形成とは異なる働きをすると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	500,000	0	500,000
2008 年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
年度			
総計	900,000	120,000	1,020,000

研究分野：応用動物学

科研費の分科・細目：6602

キーワード：卵巣、時計遺伝子群、概日リズム

1. 研究開始当初の背景

生物には環境の明暗に従う生物時計(概日時計)が存在し、規則的に起きる生理現象を制御している。哺乳類の雌の生殖生理には、概日時計の強い関与が示唆され、例えば排卵や分娩には起こりやすい時刻が存在することが知られている。さらに概日時計が乱された雌マウスには、着床胚数の減少が起こることが報告されており、卵巣や子宮、及び初期胚といった臓器や細胞の生理機能と概日時計との関わりが示唆される。しかし、これらの臓器・細胞において、具体的どのような遺伝子が概日時計の制御を受けるのかについて、知見は得られておらず、概日周期の乱れが雌側の生殖生理に及ぼす影響なども、正確な把握

には至っていなかった。

2. 研究の目的

本研究はマウスの卵巣及び初期胚において、mRNA やタンパク質の発現量の経時的な変化に 24 時間周期のリズム(概日リズム)が認められる遺伝子を特定することによって、それらの生理機能における概日時計の関与をより明確にすることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 卵巣における遺伝子発現解析：ICR系成熟雌マウス(8-12 週齢)左側卵巣 3 個体分を、性周期の期間(4 日間)、4hおきに採取

しRT real-time PCRにより、全発現遺伝子の 1/10 の発現に関与する転写制御因子である時計遺伝子群 (*clock*, *bmal1*, *cry1*, *cry2*, *per1*, *per2*)の発現を、経時的に観察した。また卵胞発育や黄体形成に必須の顆粒層細胞の増殖/退行に関わりが深い *wee1*, *cyclinD*, 及び *c-myc* の発現量については、発情前期から発情後期の 2 日間について解析した。

(2) 卵子及び初期胚の回収と遺伝子発現解析：成熟マウス卵巣の細切により、未成熟卵子(GV卵)を回収した。またホルモン(PMSGとhCG)の処理を行なったマウスより、成熟卵子(MII卵)を回収した。また MII卵に体外受精を行なって初期胚を作成して培養し、3-6h毎に 96hにわたって採取した。これらのサンプルについてRT real-time PCRを行い、時計遺伝子群の発現量を経時的に観察した。また交配後、膣栓が確認された雌マウスから、6-12h 毎に初期胚を回収し、体外受精によって得られた初期胚と同様にRT real-time PCRにより、時計遺伝子群の発現量を経時的に観察した。

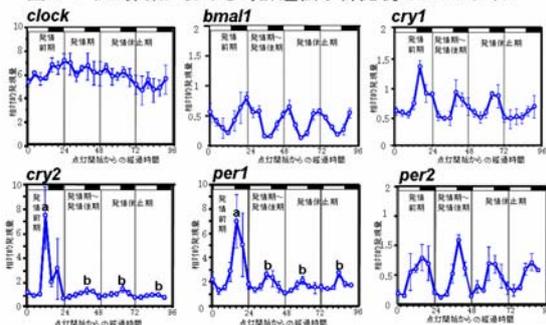
(3) 卵巣、初期胚における時計遺伝子群 (*bmal1* 及び *per2*)の mRNA局在およびタンパク質局在解析： mRNAの局在はin situ hybridization法により検討した。タンパク質発現量及び局在は、免疫染色法によって検討した。

4. 研究成果

(1) 成熟マウス卵巣における解析

成熟マウス卵巣において、全発現遺伝子の 1/10 の発現を制御する時計遺伝子群の発現量に、概日リズムが観察された(図 1)。このリズムは性周期のすべての期間にわたって観察され、さらにその mRNA は、卵巣全体に発現する傾向が観察されたが、特に胞状卵胞の顆粒層細胞と黄体に強く局在していた(図 2)。また卵子についても微弱ながら発現が観察された(図 2)。

図1: マウス卵巣における時計遺伝子群発現のプロファイル



これらの結果は、卵巣機能全般に概日時計

が関与しており、特に卵胞と黄体の機能に概日時計が強く関わっている可能性を示唆した。また他の時期に比べ、発情前期の *per1* と *cry2* の発現量のピークが有意に高かった ($P < 0.05$)。この生理的な意義は不明であるが、発情前期に特徴的な黄体形成ホルモン(LH)のサージとの関わりが考えられた。一方、顆粒層細胞や黄体の増殖や退行に関連の深い *wee1*, *cyclinD* 及び *c-myc* の発現量に周期性が認められなかった(図 3)。このことは、卵巣において概日時計は、顆粒層細胞や黄体の増殖や退行に関わる可能性は低いものの、時計遺伝子群の発現量の制御を通じ、卵胞では排卵のタイミングの制御やエストロゲン分泌、黄体ではプロゲステロンの分泌などの機能に関与する可能性を示唆した。我々は次に、時計遺伝子群が変異したマウスにおける卵巣機能を検討することにより、概日時計と卵巣機能の関わりをより具体的に検討する予定である。

図2: マウス卵巣における時計遺伝子群(*per2*, *bmal1*)の局在

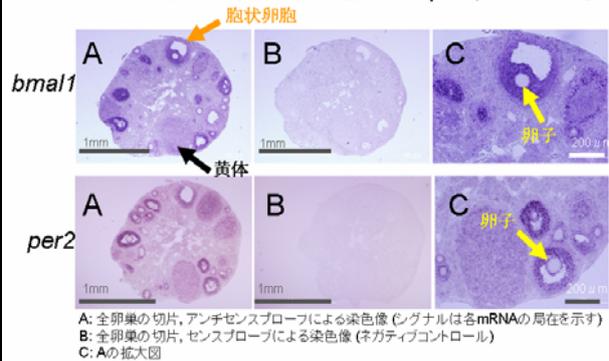
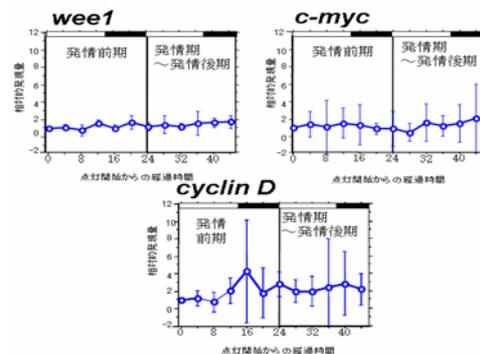


図3: 発情前期と発情後期における *wee1*, *cyclin D* 及び *c-myc* の発現量の推移

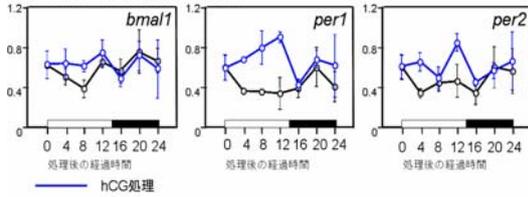


(2) 未成熟マウスの卵巣における解析

性成熟以前の未成熟マウス卵巣では、胞状卵胞以降への発育は起きず、黄体も存在しない。本検討では、胞状卵胞や黄体に発現していた時計遺伝子群が、卵巣で観察された周期的な時計遺伝子発現の主要因であることを確認するために、3 個体の 2 週齢の幼若マウスの左側卵巣を 4h おきに 24h 採取し、(1)の検討と同様に時計遺伝子群(*bmal1*, *per1*, *per2*)

の発現を観察した。また 2 週齢マウスを PMSG で処理し、胞状卵胞を人為的に形成させた後、時計遺伝子群の発現量に周期性が現れるかどうかを観察し、さらに hCG で処理を行なうことにより、LH サージが卵巣の時計遺伝子群発現に与える影響も検討した。その結果、2 週齢マウスの卵巣に時計遺伝子群の周期的な発現は観察されず、卵胞への時計遺伝子群の局在も弱いことが示された(図 4 A、B)。一方、PMSG の処理により生じた胞状卵胞には時計遺伝子群の強い局在が観察されたが、発現量の周期的な変動は観察されなかった(図 5 A、B)。しかし、PMSG で処理した 2 週齢マウスを hCG で処理すると、時計遺伝子群の発現量に変動が観察された(図 4 A 及び図 5 A)。以上の結果から、卵巣における時計遺伝子群の周期的な発現は胞状卵胞において、黄体形成ホルモン感作の下で形成されている可能性が示された。

図4 A: hCG処理後及び無処理の2週齢マウス卵巣における時計遺伝子群発現解析



B: 2週齢マウス卵巣における時計遺伝子群発現解析

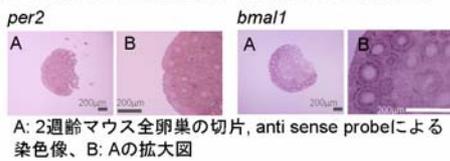
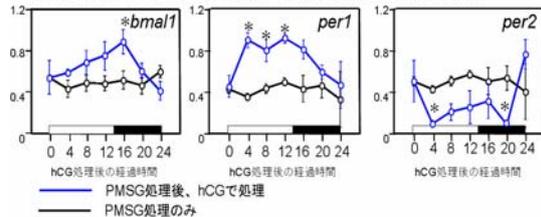
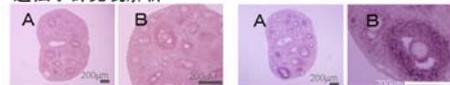


図5 A: PMSG48時間後、hCG処理を行なった2週齢マウス及びPMSG処理を行なった2週齢マウス卵巣における時計遺伝子群発現解析



B: PMSG処理48時間後の 2週齢マウスにおける時計遺伝子群発現解析



A: PMSG+hCG投与区(hCG投与後16時間)のantisense probeによる染色像、B: Aの拡大図

(3) 卵子および初期胚における解析

(1)の検討より、卵子に微弱ながら時計遺伝子群の発現を観察した。そこで本検討では、卵子と初期胚における時計遺伝子群の発現量解析を行なった。その結果、卵子と初期胚において、時計遺伝子群の発現量に顕著な周期性は認められないことが示された(図 6)。

一方、時計遺伝子群は、タンパク質量に周期

的な変動が観察される場合があるため、タンパク質発現についても検討を行なった。しかし、タンパク質量についても顕著な発現量の変動は観察されず、CLOCKとCRY1が8細胞期まで、BMAL1が4細胞期まで核に一定量存在することが示された(図 7 A-C)。これらの結果は、概日時計が卵子や初期胚の時計遺伝子群の発現制御に関わっていないことを示すと考えられた。一方、clock, bmal1およびcry1のmRNAおよびタンパク質が卵子と4細胞期までの初期胚で強く発現していたことは、これらの遺伝子が、概日時計とは無関係に、母性因子として卵子や初期胚の機能に関わる可能性を示すと考えられた。

図 6: マウス卵子と初期胚における時計遺伝子群の発現プロファイル

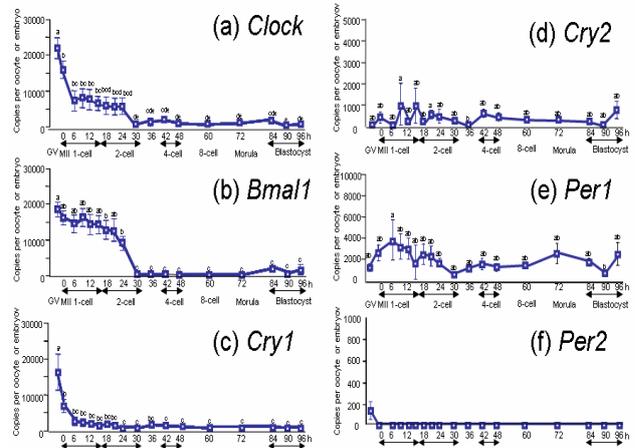
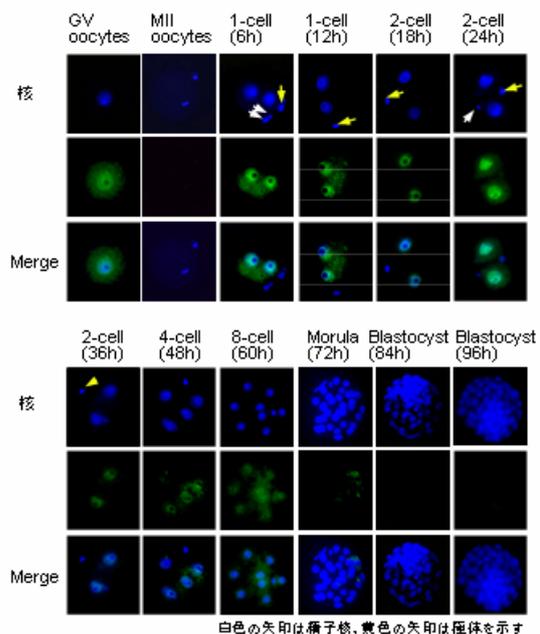
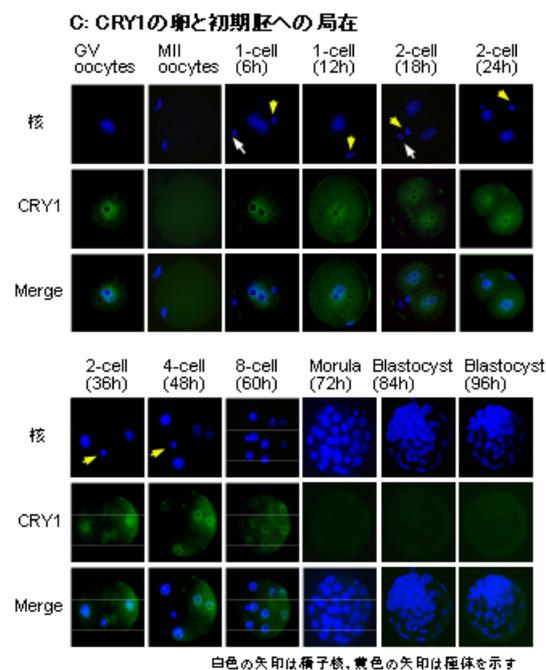
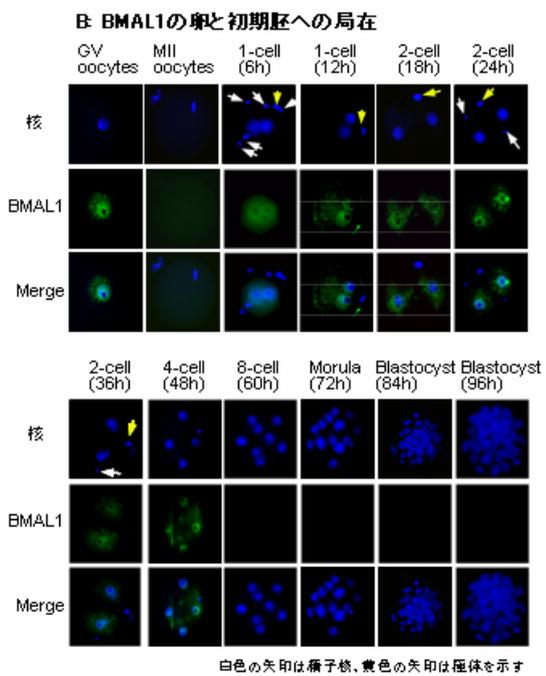


図7 A: CLOCKの卵と初期胚への局在



白色の矢印は精子核、黄色の矢印は極体を示す



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 2 件)

1. Amano T, Matsushita A, Hatanaka Y, Watanabe T, Oishi K, Ishida N, Anzai M, Mitani T, Kato H, Kishigami S, Saeki K, Hosoi Y, Iritani A and Matsumoto K., Expression and functional analyses of circadian genes in mouse oocytes and preimplantation embryos: *Cry1* is involved in the meiosis process independent of circadian clock regulation. *Biology of Reproduction*, In

press, 2008, 査読有

2. 畑中 勇輝、天野 朋子、松本 和也. 哺乳類の卵巣と子宮において時計遺伝子群が果たす機能：時計遺伝子群による細胞周期制御に着目して. 近畿大学先端技術総合研究所紀要 第13号 1-9頁, 2008, 査読有

[学会発表] (計 6 件)

1. 天野 朋子、渡辺 達也、畑中 勇輝、小寺 学、伊都 奈央佳、松下 聡紀、岸上 哲士、佐伯 和弘、細井 美彦、松本 和也、入谷 明 成熟マウス及び幼若マウスの卵巣における時計遺伝子群の発現解析 平成 20 年(2008 年) 12 月 12 日 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会抄録集 4P-0876 神戸
2. 天野 朋子、渡辺 達也、畑中 勇輝、小寺 学、伊都 奈央佳、松下 聡紀、松本 和也、入谷 明 成熟マウス及び幼若マウス卵巣における時計遺伝子群の発現解析 平成 20 年(2008 年) 11 月 8 日 第 15 回日本時間生物学会学術大会講演要旨集p (p045) 岡山大学
3. 天野 朋子、渡辺 達也、畑中 勇輝、小寺 学、佐伯 和弘、細井 美彦、松本 和也、入谷 明 マウス卵巣における時計遺伝子群の発現解析 平成 20 年(2008 年) 9 月 19 日 第 101 回日本繁殖生物学会大会 講演要旨集p113(p-42) 福岡 九州大学
4. Tomoko Amano, Yuki Hatanaka, Kazuhiro Saeki, Yoshihiko Hosoi, Akira Iritani, Kazuya Matsumoto, Expression and functional analysis of circadian genes in mouse ovaries, 日本学術振興会及びドイツフンボルト財団主催第 5 回日独先端科学シンポジウム, 2008 年 11 月 1 日, アトリウムホテルマインツ(ドイツ)
5. 天野 朋子、畑中 勇輝、松本 和也、佐伯 和弘、細井 美彦、入谷 明 マウス卵及び初期胚における時計遺伝子群の発現及び機能解析 平成 19 年(2007 年) 12 月 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会抄録集 1P-1015 横浜 パシフィコ横浜
6. 天野 朋子、畑中 勇輝、佐伯 和弘、細井 美彦、入谷 明、松本 和也 マウス卵子と初期胚における時計遺伝子群の発現及び機能解析 平成 19 年(2007 年) 9 月 第 100 回日本繁殖生物学会大会 東京 東京大学

6. 研究組織

- (1) 研究代表者

天野 朋子 (AMANO TOMOKO)
近畿大学・生物理工学部・助教
研究者番号:60388585

- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
なし