

平成21年 6月 2日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19880020  
 研究課題名（和文） LH 依存的な SREBP の発現を促した哺乳動物卵子の新規体外成熟培養法の開発  
 研究課題名（英文） The exploitation of novel in vitro maturation system of mammalian cumulus-oocyte complex that enhances SREBP gene in cumulus cells  
 研究代表者  
 山下 泰尚（YAMASHITA YASUHISA）  
 鳥取大学・農学部・助教  
 研究者番号：50452545

研究成果の概要：豚 COC の体外成熟培養系を用いた SREBP の in vitro 発現解析により、SREBP のサブタイプである SREBP-1a、SREBP-1c、SREBP-2 の遺伝子発現が LH の下流シグナルである PKB を介して増加し、コレステロール生合成経路に働く遺伝子の発現上昇に関与することが明らかになった。さらに、LH 依存的な SREBP の働きにより活性化されるコレステロール生合成経路により分泌されるプロジェステロンは、卵子成熟に必須の因子である EGF-like factor の切断酵素である ADAM17 の発現の維持に働き、その結果卵子成熟が誘起されることを明らかにした。さらに、in vivo におけるプロジェステロン分泌、EGF-like factor、ADAM17 遺伝子発現変化をパラメーターとして、それを模倣した in vitro 培養系により卵子の発生率を 20%から 40%へと向上させることに成功した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,370,000	0	1,370,000
2008 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,720,000	405,000	3,125,000

研究分野：応用動物学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用動物学

キーワード：卵子成熟、排卵、プロジェステロン、コレステロール生合成経路

## 1. 研究開始当初の背景

以前の体外成熟培養法に関する研究は、培養期間中にホルモンや成長因子を機械的に培地に添加し、卵子成熟への効果を検討したものであった。このことから、点か因子の生理学的役割やその添加時期などの詳細な検討があまり行われておらず、体内での卵子成

熟過程を反映した培養法ではほとんど検討されていなかった。

## 2. 研究の目的

体内において、卵子は FSH、LH の刺激により卵胞内で成熟し発生能を獲得する。我々は、この高い発生能の獲得は、FSH あるいは

LH の刺激により分泌される因子が高次的に卵子を刺激することにより獲得されると考えている。卵子の発生能向上を目的に、卵子成熟に必須のファクターであるプロジェステロンの合成に注目した。我々は、豚卵丘細胞卵子複合体 (COC) を用いた以前の研究により、卵子成熟を誘起させるプロジェステロンは、卵丘細胞内のコレステロール生合成経路を介して合成されるコレステロールにより合成されることを示した。

体内におけるコレステロール同化の 50% を担う肝臓では、コレステロール新規合成は、転写因子である SREBP によりそれに働く酵素の遺伝子発現が調節される。すなわち、細胞内コレステロールの量が増加すると、コレステロールが SREBP の働きを負に調節し、コレステロール量が減少すると SREBP の働きを正に調節することによりコレステロールの恒常性が保たれる。申請者は、卵巣内のコレステロール新規合成経路の発現について調べる目的で、SREBP の遺伝子発現を調べた結果、LH の刺激により増加することを見出した。このことから、卵巣内のコレステロール新規合成経路は、肝臓のそれとは全く異なる調節機構により制御されていると考えられた。本実験では、コレステロール新規合成経路の転写調節に必須の SREBP の転写調節機構を詳細に解析し、それを促した哺乳動物卵子の新規体外成熟培養法を開発することを目的として研究を行った。

### 3. 研究の方法

本実験では、180 日齢のと殺場由来の豚卵巣から顆粒層細胞と COC を単離し、RT-PCR 法により SREBP(*Srebp-1a*、*Srebp-1c*、*Srebp-2*) の遺伝子発現を調べた。また、SREBP の発現調節機構を調べる目的で、LH

の下流に存在する PKA、p38MAPK、PKB、PKC の阻害剤を用いて、SREBP の遺伝子発現に及ぼす影響を調べた。さらに、これらの阻害剤がコレステロール生合成経路に働く遺伝子 (*Hmgcr*、*Cyp51*、*Tm7fc2*、*Dhcr7*) の発現、プロジェステロン分泌量、卵子成熟に及ぼす影響を調べた。また、近年の研究により、申請者は、プロジェステロンとならんで卵子成熟に EGF-like factor とその切断酵素 (ADAM17) が必須であることを報告したことから、コレステロール新規合成経路を介して分泌されるプロジェステロンが EGF-like factor と ADAM17 の遺伝子発現に及ぼす影響を調べた。さらに、eCG および hCG を投与した豚から COC を回収し、これらプロジェステロン分泌動態、EGF-like factor と ADAM17 の発現動態を調べ、それを模倣した新規体外成熟培養法の開発を目指した。

### 4. 研究成果

LH の刺激により卵丘細胞において SREBP(*Srebp-1a*、*Srebp-1c*、*Srebp-2*) の遺伝子発現が増加すること、その遺伝子発現には LH の下流に存在する PKB が重要であることが明らかになった。さらに、PKB 阻害時において、コレステロール新規合成に働く遺伝子の発現が低下し、プロジェステロン分泌量も低下した。このことから、PKB 系を介したシグナル系は、SREBP の遺伝子発現を介して卵丘細胞のコレステロール新規合成経路を活性化させ、プロジェステロン分泌を誘導することが示された。すなわち、肝臓とは全く異なるコレステロール新規合成経路の調節機構が示された。さらに、プロジェステロン、およびそれにより発現が調節される ADAM17、あるいは EGF-like factor の豚の *in vivo* における遺伝子発現パターンを調べ、

それを模倣した新規体外成熟培養法を開発し、その結果豚卵子の発生能が20～40%へと飛躍的に向上した。

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3件)

1. 下中麻奈美, 山下泰尚, JoAnne S. Richards, 島田昌之、論文名: 排卵期特異的なEGF like factorの発現機構とその作用、日本生殖内分泌学会誌, 14、印刷中、査読無し

2. Ikkou Kawashima, Tetsuji Okazaki, Noritaka Noma, Masahide Nishibori, Yasuhisa Yamashita, Masayuki Shimada、論文名: Sequential exposure of porcine cumulus cells to FSH and/or LH is critical for appropriate expression of steroidogenic and ovulation-related genes that impact oocyte maturation in vivo and in vitro、Reproduction, vol.136 p9-21、2008年、査読有り

3. Yasuhisa Yamashita, Ikkou Kawashima, Yoshinari Yanai, Masahide Nishibori, JoAnne S Richards, Masayuki Shimada 論文名: Hormone-induced expression of tumor necrosis factor alpha-converting enzyme/A disintegrin and metalloprotease-17 impacts porcine cumulus cell oocyte complex expansion and meiotic maturation via ligand activation of the epidermal growth factor receptor、Endocrinology, vol.148 p6164-6175、2007年、査読有り

[学会発表] (計9件)

1. 山下泰尚、島田昌之、PKC依存的なADAM17の活性化が卵子成熟に及ぼす影響、第110回日本畜産学会、日本大学、2009年、3月

2. 山下泰尚、島田昌之、PKC依存的なADAM17の活性化が卵丘細胞の機能性変化に及ぼす影響、第4回日本生殖再生医学会、東京、2008年、3月15日

3. 山下泰尚、島田昌之、PKC依存的なADAM17の活性化が卵丘細胞の機能性変化に及ぼす影響、第14回日本生殖内分泌学会、鳥取大学、2008年、11月29日

4. 山下泰尚、水上貴裕、永野昌志、菱沼貢、島田昌之、EGF-like factor-ADAM17系により誘導される卵子成熟機構の解析、第146回日本獣医学会、宮崎大学、2008年、9月24日～26日

5. Masayuki Shimada, Ikkou Kawashima, Tetsuji Okazaki, Yasuhisa Yamashita, Sequential exposure of porcine cumulus cells to FSH and LH is critical for appropriate expression of steroidogenic and ovulation related genes that impact oocyte maturation in vivo and in vitro、41th Annual meeting of the society for the study of reproduction, 405、Hawaii, USA、2008年、5月27日～30日

6. Yasuhisa Yamashita, Tetsuji Okazaki, Ikkou Kawashima, Masayuki Shimada, PGE2 and progesterone enhance EGFR activation in porcine cumulus cells via the induction of TACE/ADAM17 expression but not EGF-like factors expression during oocyte maturation in vivo and in vitro、41th Annual meeting of society for the study of reproduction, 407、Hawaii, USA、2008年、5月27日～30日

7. 山下泰尚、水上貴裕、川島一公、岡崎哲司、島田昌之、EGF-like factors-ADAM17 pathwayにより誘起される卵子成熟、排卵機構の解析、第3回日本生殖再生医学会、

東京、2008年、3月30日

8. 山下泰尚、JoAnne S. Richards、島田昌之、PGE2 およびProgesterone (P4) はADAM17 の発現を誘起させ卵丘細胞の膨潤を誘起する、第109回日本畜産学会、常磐大学、2008年、3月27日～29日
9. 山下泰尚、西堀正英、JoAnne S. Richards、島田昌之、卵丘細胞におけるADAM17 の発現変化とそのEGFRシグナル系を介して誘起される卵丘細胞の膨潤に果たす役割、第48回日本哺乳動物卵子学会、山梨大学、2007年、5月27日

〔図書〕(計1件)

山下泰尚、島田昌之、卵子・初期胚の代謝機構、卵子学、2009年、印刷中

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

第48回日本哺乳動物卵子学会学術奨励賞受賞

第13回日本生殖内分泌学会学術奨励賞受賞

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山下 泰尚 (YAMASHITA YASUHISA)

鳥取大学・農学部・助教

研究者番号：50452545

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし