

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月22日現在

機関番号：11301
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23658236
 研究課題名（和文） 卵成熟抑制因子群の最上流因子同定による減数分裂休止機構の全体像解明とIVM法改善
 研究課題名（英文） Improvement of IVM based on the elucidation of meiosis pause mechanism by uppermost stream factor identification of oocyte maturation inhibitory factor group
 研究代表者
 佐藤 英明（SATO EIMEI）
 東北大学・大学院農学研究科・教授
 研究者番号：80093243

研究成果の概要（和文）： 卵子形成過程でみられる減数分裂休止機構の全体像をこれまでの研究蓄積を基盤にして解明を試みた。DNA マイクロアレイのデータを基に上流因子を検索し、C型ナトリウムペプチドやアドレノメジュリンが上流因子の同定に繋がることを明らかにした。また、IVMの改良にも取り組み、cAMP や cAMP 増強因子で卵母細胞を一定時間培養することで受精能及び受精後の発生能が上昇することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）： We tried the elucidation for the global image of the meiosis pause mechanism seen in oocyte maturation process based on the previous results of research. The upstream factor was searched based on the data of a DNA microarray, and it was shown clearly that C-Type natriuretic peptide and adrenomedullin lead to identification of an upstream factor. Furthermore, we also tackled improvement of IVM and it was shown clearly that fertilizing capacity and the developmental competence after fertilization go up by in vitro oocyte maturation for a definite period of time by cAMP or a cAMP potentiation factor.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	1,600,000	480,000	2,080,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、応用動物科学

キーワード：卵成熟、卵成熟抑制因子、減数分裂休止、IVM

1. 研究開始当初の背景

佐藤（研究代表者）らは、約35年前に未成熟卵子の体外成熟、体外受精、体外培養（IVMFC）法の基礎を築いた。これを基に研究が進められ、ウシでは屠場卵巣由来未成熟卵子を用いるIVMFCは既に実用的な技術に成

長し、これによって年間2,000頭を超える講師が誕生している。哺乳類の卵巣内には多数の未成熟卵母細胞が存在することから、この技術を用いてさらなる技術の改良・普及が期待されている。一方で、卵巣内の多数の卵子が、どのようなメカニズムで減数分裂を休止させているのかという点については未だ詳

細が明らかにされておらず、分子メカニズムを明らかにすることで、体外成熟培養 (IVM) の改良に貢献できると考えられる。

佐藤らは、これまでに卵成熟抑制因子の作用は卵丘細胞で産生されるヒアルロン酸がその受容体 (CD44) に結合し、そのシグナルがギャップ結合タンパク質 (コネクシン 43) のリン酸化を誘導し、ギャップ結合を閉鎖することにより無効となることを明らかにしている。これまでの報告から、生体内に卵成熟開始 (減数分裂再開、Germinal vesicle breakdown; GVBD) 抑制因子が存在することが多くの研究者によって指摘され、実際に幾つかの抑制作用を有する因子が報告されているが、その実態は明らかにされていない。そのため、新たにこの問題に取り組み、検証する必要がある。

2. 研究の目的

卵巣において卵丘細胞-卵母細胞複合体を取り巻く、顆粒層細胞に減数分裂再開抑制因子が存在することが幾つかの論文によって示唆されている。しかしながら、その因子の実体は明らかにされてこなかった。本研究では分子レベルで新規の GVBD 抑制因子を同定し、その作用機序を明らかにすることで、卵巣内での卵子がどのように休眠状態を維持しているのか、その機構を明らかにし、体外培養系への応用に役立てることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 培養系の確立：顆粒層細胞から分泌されている因子の影響を調べるために、顆粒層細胞と卵丘細胞-卵母細胞複合体の接触培養系を確立した。適度な顆粒層細胞の面積が必要であることから、ブタの卵胞を切開し、顆粒層細胞が露出するようにシート状に卵胞を広げ、その上にマウスの卵母細胞をのせることで実験系を確立した。

(2) マイクロアレイによる解析：ブタ顆粒層細胞とマウス卵丘細胞-卵母細胞複合体を接触培養し、卵丘細胞から total RNA を抽出して DNA マイクロアレイ解析を行った。候補因子の絞り込みは、cGMP 産生の抑制効果があるものに注目して選抜した。

(3) 選抜した候補因子の減数分裂再開抑制作用の検証：市販のペプチドをそれぞれ体外成熟培地に濃度段階的に加え、培養後一定時間で卵母細胞の固定、染色を行い、再開抑制率を算出した。

4. 研究成果

哺乳類の卵母細胞は第一減数分裂前期において減数分裂を休止させ、休眠状態、すなわち卵核胞 (Germinal Vesicle) を保持した状態にあり、卵核胞の崩壊 (Germinal Vesicle Breakdown) によって卵成熟が進行する。これまで、本研究では卵核胞の崩壊 (以下、GVBD) を指標として *in vitro* で候補因子の同定を進め、以下の結果を得た。

(1) ブタ顆粒層細胞とマウス卵丘細胞-卵母細胞複合体の接触培養系を構築し (図 1)、この系を用いてマイクロアレイ解析を行うことにより、遺伝子の網羅的発現解析と候補因子の選抜を行った。その結果、GVBD抑制因子であるcGMPの産生作用を有するC型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) とアドレノメジュリン (ADM) を候補因子として選抜した。

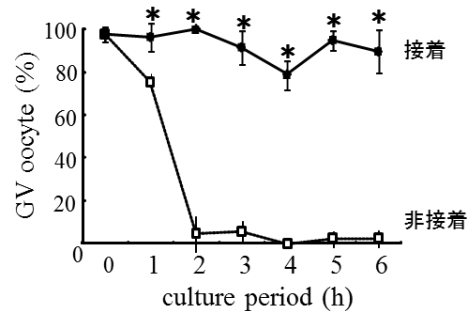
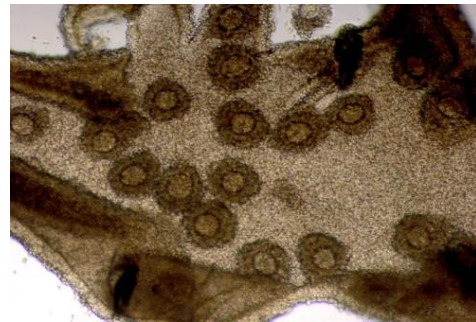


図 1. ブタ顆粒層細胞とマウス卵丘細胞-卵母細胞複合体の接触培養 (上図) による減数分裂再開抑制効果 (下図)

(2) CNPの受容体であるnpr2 mRNAは卵母細胞を覆う卵丘細胞のみで発現が確認され、CNPの標的が卵丘細胞であることを明らかにした。実際にCNPの添加によりブタ、マウス両種の卵母細胞でGVBDの抑制が観察されたことから、CNPがGVBD抑制因子であり、卵丘細胞を介して卵母細胞に間接的に抑制シグナル(cGMP)が伝えられることを示唆した。またCNPはマウスおよびブタ

兩種に作用する、種保存性のある因子であることが示唆された (図2)。

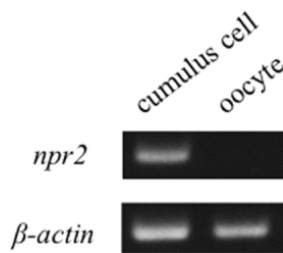


図2. CNP受容体 (npr2) のmRNA解析

(3) ADMはマウスにおいてその受容体および活性修飾因子のmRNAが卵丘細胞に発現しており (図3)、さらに免疫組織染色により発達した卵胞内で強く発現していることを示した。これ等の結果から、ADMが卵丘細胞を標的に作用する可能性が示された。卵胞内では高濃度の一酸化窒素 (NO) が存在していることから、ADMをNOのドナーと共に添加すると、有意なGVBD抑制作用を示した。

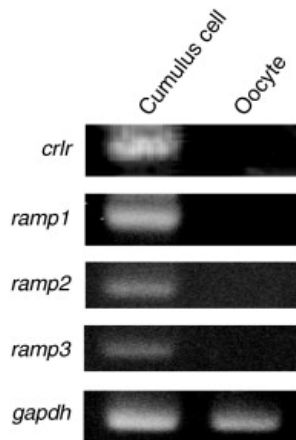


図3. アドレノメジュリン受容体のmRNA発現解析

(4) 卵丘細胞においてADMの下流で機能する因子を特定するためにAkt、FAK、MAPKの阻害剤を用いたところ、Aktを阻害した場合のみにGVBD抑制作用の解除が観察され、ADMの下流でAkt経路を介した経路がGVBD抑制に機能していることを明らかにした (図4)。

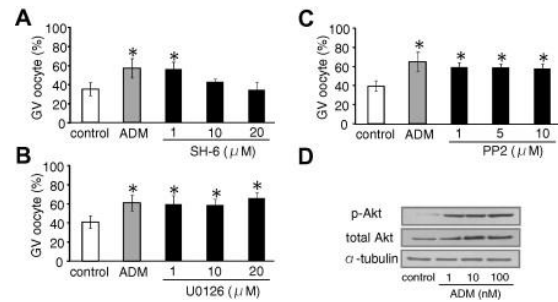


図3. Akt、FAK、MAPKの阻害剤処理によるアドレノメジュリン下流因子の解析。Akt阻害 (A)、MAPK阻害 (B)、FAK阻害 (B)、アドレノメジュリン処理によるAktおよびそのリン酸化の発現量 (D)。

以上の結果より、CNPおよびADMをGVBD抑制因子として同定し、その作用機序の一端を解明することが出来た。

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 Hiradate Y, Hoshino Y, Tanemura K, Sato E, C-type natriuretic peptide inhibits porcine oocyte meiotic maturation, Zygote, 査読有, 2013, 1-6.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/S0967199412000615>
- ② Hiradate Y, Ohtake J, Hoshino Y, Tanemura K, Sato E, Adrenomedullin: a possible regulator of germinal vesicle breakdown. Biochem Biophys Res Commun. 査読有, Vol.415, No.4, 2011, 691-695.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.10.139.
- ③ Sakurai M, Sato Y, Mukai K, Suematsu M, Fukui E, Yoshizawa M, Tanemura K, Hoshino Y, Matsumoto H, Sato E, Distribution of tubulointerstitial nephritis antigen-like 1 and structural matrix proteins in mouse embryos during preimplantation development in vivo and in vitro, Zygote, 査読有, 2012, 1-7.
<http://dx.doi.org/10.1017/S0967199412000469>

[学会発表] (計3件)

- ① Sato E, Factors affecting meiotic arrest in mammalian oocytes, 9th Annual Conference of the Asian Reproductive Biotechnology Society, 2012年10月23日, マニラ(フィリピン)
- ② 平舘裕希、大竹順、星野由美、種村健太郎、佐藤英明、マウス卵母細胞減数分裂再開抑制におけるアドレノメジュリンの作用、第154回日本獣医学会、2012年9月15日、岩手
- ③ Sato E, Cumulus-oocyte complex interactions during the initiation of oocyte maturation, 4th Congress of the Asia-Pacific Initiative on Reproduction, 2012年9月1日、大阪

[その他]

ホームページ等

<http://db.tohoku.ac.jp/whois/detail/34b0b77a410b78164106dee5e216fef4.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 英明 (SATO EIMEI)
東北大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：80093243

(2) 研究分担者

星野 由美 (HOSHINO YUMI)
東北大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号：10451551

(3) 連携研究者

()

研究者番号：