

正常な卵胞構造を規定する新規タンパク質複合体の特定

安原 菜々子 (筑波大学 生物学類)

指導教員：杉山 文博 (筑波大学 医学医療系)

【背景と目的】

卵母細胞は出生前に卵巣に貯蔵され、出生後には増殖しない。貯蔵されている卵母細胞の細胞周期は減数分裂の途中で停止しており、この状態を休眠と呼ぶ。ヒトでは約 100 万個(マウスでは約 2 万個)の卵母細胞が出生時に貯蔵されるが、卵母細胞へ分化可能な自己複製する幹細胞は出生後の生体内には存在しないため、休眠卵母細胞の備蓄が尽きることは生殖可能期間の終了を意味する。休眠卵母細胞の周囲には一層の扁平状の顆粒膜細胞が存在し、この卵母細胞と顆粒膜からなる構造体は原始卵胞と呼ばれる。性成熟を迎えると、一部の原始卵胞内休眠卵母細胞が覚醒(細胞周期の進行を再開)する。この覚醒に同期し顆粒膜細胞が立方体状になる(一次卵胞)。その後、卵母細胞の size-up と顆粒膜細胞の増殖及び多層化が平行して生じ(二次卵胞)、原始卵胞の約 30 倍の直径をもつ成熟卵胞となり排卵に到る。卵母細胞の休眠・発育異常は原発性卵巣機能不全や早発閉経などの疾患に深く関連しており、本邦で現在問題となっている出産の高年齢化に伴う不妊の原因解明のために、その作用機序を理解することが重要である。

最近、原始卵胞において顆粒膜細胞と細胞外マトリクスによる圧力が卵母細胞の休眠維持に重要であることが報告された。この事実は、顆粒膜細胞が卵母細胞を取り囲む卵胞の“構造”が卵母細胞の休眠・覚醒を制御することを示唆する。少なくともマウス・ラット・サル・ヒトにおいて、未発達な卵胞ステージである原始卵胞及び一次卵胞中で卵母細胞はその中央に位置する。しかし、その構造の形成・維持メカニズムや機能的意義は不明である。

この度、あるタンパク質複合体の構成因子をコードする 2 つの遺伝子をそれぞれ卵母細胞特異的に欠損させた conditional Knock-Out (以下、cKO)マウスにおいて、卵母細胞が未発達な卵胞中の中央に位置しないことを新たに見出した。そこで、卵胞構造の形成・維持の分子メカニズムを解明することを目指し、これらの cKO マウスの詳細な表現型解析を実施した。

【材料と方法】

○使用したマウス：生後 3 日以降の原始卵胞内卵母細胞において Cre を発現する *Gdf9*Cre マウスと、遺伝子 *X* または遺伝子 *Y* の floxed マウスを交配し、遺伝子 *X*cKO マウスと遺伝子 *Y*cKO マウスを作製した。

○H&E 染色による卵巣形態の観察：*X*cKO マウス、*Y*cKO マウスおよびコントロールマウスから卵巣を採材し、10 NM マイルドホルム(富士フィルム和光純薬株式会社)で固定した後に 70% エタノールで脱水してパラフィンブロックに包埋した。このパラフィンブロックを 5 μ m に薄切した切片を H&E 染色し、卵胞構造の形態を観察した。

○蛍光免疫染色：上記と同様に作製した卵巣切片を、卵母細胞のマーカーである MVH および増殖細胞核マーカーである PCNA で免疫染色した。その際、抗 MVH 抗体(Cat#ab13840, abcam)と抗 PCNA 抗体(Cat#sc-25280, Santa Cruz Biotechnology)を使用した。核の染色には DAPI を使用し、膜構造の染色に Wheat Germ Agglutinin (WGA) CF[®]488A Conjugates(Biotium)を用いた。

○画像解析：上記の蛍光免疫染色を行った卵巣切片を蛍光顕微鏡で撮影し、ImageJ を用いて原始卵胞・一次卵胞の重心と卵母細胞の重心との距離を測定した。なお、WGA により卵胞領域を、MVH により卵母細胞領域を選択した。

【結果】

○卵胞構造の異常：*X*cKO および *Y*cKO マウスの卵胞構造を確認するため、H&E 染色を行ったところ、未発達な卵胞において卵母細胞が卵胞の中心から大きくずれていた(図 1)。

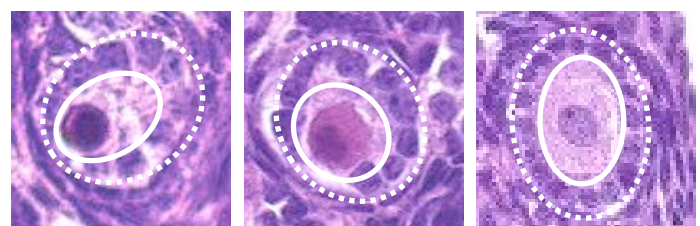
*X*cKO および *Y*cKO マウスにおいて、2 次卵胞以降の発達した卵胞が存在するのかを検討するために、増殖している顆粒膜細胞を含む発達卵胞が存在するのを PCNA の免疫染色で確認した。その結果、*X*cKO および *Y*cKO マウスでは、正常に発達した卵胞が観察されなかった。このことから、*X*cKO および *Y*cKO マウスでは二次卵胞以降まで発達した正常な卵胞が存在しないことが示された。

○原始卵胞・一次卵胞における卵母細胞のずれの評価：H&E 染色像で観察された卵母細胞のずれが原始卵胞から起きているのか一次卵胞から起きているのかを調べるため、PCNA の免疫染色で原始卵胞と一次卵胞とを区別し、卵胞の重心と卵母細胞の重心との距離を測定した。その結果、*X*cKO および *Y*cKO マウスでは、コントロールと比較して、原始卵胞および一次卵胞において重心距離が大きい、つまり卵母細胞が卵胞の中心からずれているということが分かった。

【考察・展望】

*X*cKO と *Y*cKO マウスでは卵母細胞が最も未発達な原始卵胞ステージよりその中心からずれていることから、タンパク質 X とタンパク質 Y を含むタンパク質複合体は、休眠状態の卵母細胞を原始卵胞の中心に位置させるために必要であることが示唆された。また、二次卵胞以降の発達した正常な卵胞が観察されないことから、卵母細胞が未発達な卵胞の中心に位置することが、それ以後の卵胞発育において重要であるかもしれない。

原始卵胞は、生後 0~4 日目の間に形成される。今回使用した Cre マウスは生後 3 日目より組換えを起こすため、今回の研究からは、タンパク質 X とタンパク質 Y が適切な卵胞構造の形成に重要なのか、もしくは、その維持に重要なのかを明らかにすることは出来なかった。そこで、任意のタイミングで Cre-LoxP 組換えを起こすことのできる別の Cre マウスを用いた実験を実施する予定である。



XcKO

YcKO

control

図 1 小さい卵胞の H&E 染色像
点線部分; 卵胞, 実線部分; 卵母細胞