

卵丘細胞の progesterone receptor (PR) mRNA 発現パターンの変化がブタ卵子の 減数分裂再開を促進する

The shift in progesterone receptor (PR) gene
expression from PR-B to PR-A in cumulus cells
induces meiotic resumption of porcine oocytes

島田昌之・岡崎哲司・山下泰尚・西堀正英
Masayuki SHIMADA, Tetsuji OKAZAKI,
Yasuhisa YAMASHITA and Masahide NISHIBORI

広島大学大学院生物圏科学研究科
Graduate School of Biosphere Sciences, Hiroshima University

【目的】

卵丘細胞はcAMPなどの卵子の減数分裂再開抑制因子を合成し、これらの因子はギャップジャンクション(GJ)を介して卵子内に輸送される。性腺刺激ホルモンの作用を受けた卵丘細胞卵子複合体(COCs)において、GJが閉鎖し、卵子へのcAMP移行量が減少すると、減数分裂が再開する¹⁾。我々は、このGJの閉鎖は、卵丘細胞におけるconnexin-43の消失により誘起されること、これにprogesterone (P_4)が関与することを明らかにしてきた^{2,3)}。 P_4 が細胞を刺激するには核内に存在する受容体(PR)が必要である。このPRをコードする遺伝子は単一であるが、2つのプロモーター領域を有するために2種類のPR(PR-A, PR-B)が合成される⁴⁾。卵胞内の細胞において、PR遺伝子(PR)発現が性腺刺激ホルモンにより促進されることは明らかとされているが、PR-AとPR-Bの発現パターンやそれぞれの生理学的役割に関しては全く報告されていない。そこで本研究では、PR-A, B共通プライマーとPR-B特異的プライマーを設計し、RT-PCR法により卵丘細胞におけるPR発現パターンの解析を行った。さらに、卵丘細胞の機能的変化へのPRの役割についても検討した。

【方法】

(実験1) 既報⁵⁾に従って回収したブタCOCsをpFSH(NIDDK)とpLH(NIDDK)添加培地で24時間まで培養し、既報⁵⁾に従って4時間ごとにTotal RNAを回収した。回収したTotal-RNAはPR-A, B共通領域、PR-B特異領域、 β -actinに対するプライマーを用いたRT-PCRに供試した。RT-PCR産物は、サイクルシーケンス法により塩基配列を決定した。

(実験2) COCsをFSH, FSH+20 ng/ml P_4 添加培地で10時間培養した。これらのCOCsにおけるBrdU取り込み量をELISA法により測定した。

(実験3) FSH添加培地で10時間培養したCOCsを

FSH+LH, FSH+LH+RU486 (25 μ M) 添加培地でさらに10時間培養し、10~20時間におけるBrdU取り込み量、 P_4 分泌量を測定した。

【結果】

(実験1) PR-A, B共通領域とPR-B特異領域に対するプライマーを用いたRT-PCRにより、254 bpと198 bpの産物が得られた。これらの塩基配列は、PR-A, B共通領域はヒトに対して98.1%、PR-B特異領域は83.3%の相同性を示した。PR-A, B mRNAとPR-B mRNAは卵胞から回収した直後の卵丘細胞においてはほとんど検出されないが、FSH+LH添加培地での培養により発現量が有意に増加した。PR-A, B mRNAの発現量は培養24時間まで維持されたが、PR-B mRNAは培養12時間以降においては著しく低下した。これらの結果から、卵丘細胞において培養初期にはPR-Bが発現するが、培養12時間以降においてはPR-Aが主に発現していることが明らかとなった。

(実験2) 培養10時間までに卵丘細胞に主に発現するPR-Bを P_4 により刺激した結果、増殖活性は有意に高い値を示した。この有意な増加はPR antagonistであるRU486により有意に抑制された。

(実験3) 培養10時間以降においては卵丘細胞が P_4 を分泌することから、この分泌された P_4 のPR-Aへの結合をRU486により拮抗阻害させ、卵丘細胞の機能への影響を検討した。その結果、RU486添加により卵丘細胞の増殖活性が増加し、 P_4 分泌量は有意に低下した。また、PR-B mRNAの発現量が有意に増加していた。これらの結果から、培養10時間以降に主に存在するPR-Aは卵丘細胞のLHによる機能性の変化に密接に関与することが明らかとなった。

【結論】

ブタ卵子減数分裂再開時において、性腺刺激ホルモンの作用により卵丘細胞でPR-Bがまず主に発現すること、その後卵丘細胞が分泌する P_4 の作用によりPR-Aへと発現パターンが変化し、これが卵丘細胞の機能性の変化を誘起することが明らかとなった。従って、PR-Aへの発現パターンの変化が、卵子の減数分裂再開に密接に関与すると考えられた。

【引用文献】

- 1) Shimada M. and Terada T. (2002) *Mol. Reprod. Dev.*, 62, 124-131.
- 2) Shimada M. et al. (2001) *Biol. Reprod.*, 64, 1255-1263.
- 3) Shimada M. and Terada T. (2002) *Mol. Hum. Reprod.*, 8, 621-628.
- 4) Kraus WL. et al. (1993) *Mol. Endocrinol.*, 7, 1603-1616.
- 5) Shimada M. et al. (2003) *Biol. Reprod.*, 69, "in press".