

ブタ卵子減数分裂再開時における卵丘細胞の
 $\Delta 14$ -reductase 遺伝子発現とその
 progesterone 合成に果たす役割

Expression of $\Delta 14$ -reductase gene in cumulus
 cells and its physiological role in progesterone
 production during meiotic resumption of
 porcine oocytes

山下泰尚・西堀正英・島田昌之

Yasuhisa YAMASHITA, Masahide NISHIBORI
 and Masayuki SHIMADA

広島大学院生物圏科学研究科

Graduate School of Biosphere Sciences, Hiroshima University

【目的】

哺乳動物において、第一減数分裂前期で減数分裂を停止した卵子は、性腺刺激ホルモンの刺激を受け減数分裂を再開する。このとき卵胞内では、卵子の減数分裂再開を促進するMAS (Meiosis Activating Sterol) が多量に蓄積されることが報告されている¹⁾。このMASはcholesterol合成系の中間体であり、lanosterolから $\alpha 14$ -dimethylaseの作用により形成される。しかし、MASは裸化卵子においてのみ減数分裂再開を促進すること、MASの受容体が未だ単離されていないことなどその生理的活性意義については不明な点が多い。我々は、卵丘細胞におけるcholesterolからprogesterone (P_4) への変換を抑制することが減数分裂再開 (GVBD) を誘起する卵子の割合を有意に低下させること²⁾、卵丘細胞卵子複合体 (COCs) をFSH + LHにさらに P_4 を添加した培地で培養すると減数分裂再開が早期に誘起されることを報告した³⁾。更に $\alpha 14$ -dimethylaseの阻害剤を用いてlanosterolからMASの合成を阻害した結果、卵丘細胞により分泌される P_4 量の低下と卵子のGVBD率の有意な低下が共に生じること、このGVBD率の低下は培地への P_4 添加により回復することを報告した³⁾。これらのことから、合成されたMASは直ちにcholesterolを経て P_4 へと変換され、その P_4 が減数分裂再開を促進すると推察している。そこで本研究では、MASからcholesterolへの変換に関与する $\Delta 14$ -reductaseの卵丘細胞における遺伝子発現とその P_4 合成に果たす役割について検討した。

【方法】

(実験1) 既報²⁾に従って回収したCOCsを4 mM hypoxanthine (HX) あるいはHX + 20 ng/ml pFSH (NIDDK) を添加したアミノ酸含有mNCSU37で12あるいは24時間培養した。COCsから卵丘細胞を解離し、既報⁴⁾の方法に従ってTotal RNAを回収した。センスプ

ライマーにはヒト $\Delta 14$ -reductase cDNA (AY039681) の5'より679から703塩基を、アンチセンスプライマーには1134から1155塩基を用いてRT-PCRを行い $\Delta 14$ -reductase遺伝子の発現を調べた。RT-PCR産物は、サイクルシーケン法により塩基配列を決定した。

(実験2) COCsをHX, HX + FSH + 500 ng/ml pLH (NIDDK), およびHX + FSH + LH + 20 μ M BM15.766 (Dr. S. Hauptman, Roche Diagnostics GmbHより供与) を添加したアミノ酸含有mNCSU37を300 μ l入れたNunc 48-well dishで24時間培養し、既報²⁾に従って培地中 P_4 濃度を測定した。

【結果】

(実験1) ヒト $\Delta 14$ -reductase cDNAから設計したプライマーを用いたRT-PCRにより476bpの産物が得られた。これは、ヒト $\Delta 14$ -reductaseと93.04%、ウシ $\Delta 14$ -reductaseと88.63%の相同性を示した。次に、卵丘細胞における $\Delta 14$ -reductase 遺伝子発現の経時的变化を検討した。卵胞から回収した直後の卵丘細胞において $\Delta 14$ -reductase 遺伝子の発現が認められ、HX添加培地で12, 24時間培養したCOCsの卵丘細胞においても同様に検出された。この $\Delta 14$ -reductase 遺伝子の発現量はFSH添加により有意に上昇し、24時間までこの高い値は維持された。

(実験2) 実験1において、性腺刺激ホルモンの刺激を受けた卵丘細胞において $\Delta 14$ -reductase 遺伝子の発現量が増加していたことから、合成されたMASは直ちにcholesterolへと変換され、 P_4 が合成されることが示唆された。そこで $\Delta 14$ -reductaseの抑制剤であるBM15.766を用いて実験を行った。その結果、FSH + LH添加により上昇した P_4 分泌量がBM15.766添加により有意に減少し、HXのみを添加した時とほぼ同様の低い値を示した。

【考察】

実験1から、肝臓以外の臓器においても $\Delta 14$ -reductase 遺伝子が盛んに発現する組織が存在すること、この発現が性腺刺激ホルモンにより促進されることが初めて明らかとなった。この結果から、性腺刺激ホルモンの作用を受けた卵丘細胞において形成されたMASは直ちにcholesterolへと変換されること、実験2からこの系が P_4 合成に重要な役割を担っていることが示された。以上から、卵子減数分裂再開を促進する卵丘細胞における P_4 合成には、 $\Delta 14$ -reductaseなどのcholesterol合成に関与する遺伝子の発現が密接に関与することが明らかとなった。

【参考文献】

- 1) Byskov. AG. et al. (1995) Nature, 374, 559-565.
- 2) Shimada M. and Terada T. (2002) Mol. Hum. Reprod., 8, 621-628.
- 3) Yamashita Y. et al. (2003) Biol. Reprod., 69, "in press".
- 4) Shimada M. et al. (2003) Biol. Reprod., 69, "in press".