

[ 研究区分： 学際的・先端的研究 (A) ]

研究テーマ： 鉄イオン輸送タンパク質・トランスフェリンの雌性生殖細胞への新たな機能-卵の減数分裂再開抑制メカニズムの解明とその体外培養系への応用-	
研究代表者： 生命環境学部 生命科学科 准教授・山下泰尚	連絡先： yamayasu@pu-hiroshima.ac.jp
共同研究者：	
【研究概要】 Transferrin(TF)はFe <sup>3+</sup> と複合体を形成後、血中を介して末梢組織にFe <sup>3+</sup> を供給する担体タンパク質である。当研究室ではTF量が卵胞発育に伴い高値を示すことを見出したことから、卵胞発育期におけるTF-Fe <sup>3+</sup> の役割とその応用を試みた。その結果、卵巣では卵胞発育時に肝臓から供給されるTF-Fe <sup>3+</sup> が卵巣のTF受容体(TFR1)を刺激し、卵胞を裏打ちする顆粒膜細胞におけるエネルギー代謝、細胞増殖、メチル化を上方制御することで、正常な卵胞発育と卵の減数分裂再開停止を誘導することを見出した。さらにブタにおいてTFを添加した新規体外培養法を構築し、胚の発生率を既存法に比べ2倍以上の50%にまで高めることに成功した。	

【研究内容・成果】

①マウス卵巣に蓄積するTFの産生場所と蓄積要因に関する解析

卵胞発育期の卵胞内の顆粒膜細胞を採取し、Tf mRNA 発現を調べた結果、Tf mRNA 発現は全く変化が見られなかったが、TFタンパク質は卵胞発育刺激により増加した(図1)。さらにTFの受容体であるTFR1は卵胞発育期、排卵期に関わらず顆粒膜細胞に局在することを見出した。このことから、卵巣以外の組織からTFが排卵期特異的に他組織から運搬されると推察された。体内では、TF-Fe<sup>3+</sup>は肝臓で合成されることが知られている。そこで、卵胞発育と排卵をそれぞれPMSGとhCGで誘導したマウスの肝臓におけるTf mRNA、TFのタンパク量と局在を解析した結果、卵胞発育期に発現量が上昇していた。また、肝臓での鉄イオンの排出に関わるFPNとそれを阻害するHPDも同様に解析した結果、FPNは卵胞発育期に発現上昇し、HPDは逆に低下していた(図2)。さらに卵胞発育期に卵胞ないで合成されるエストロゲンを腹腔投与したところ、HPDの発現には影響しなかったが、肝臓におけるTFおよびFPNの発現が著しく亢進していた。この結果から、卵巣と肝臓には新しい異組織間のコミュニケーションが存在し、これを媒介するのがエストロゲンであること、および肝臓から卵巣を標的にTF-Fe<sup>3+</sup>を供給するシステムが存在することを初めて明らかにした。

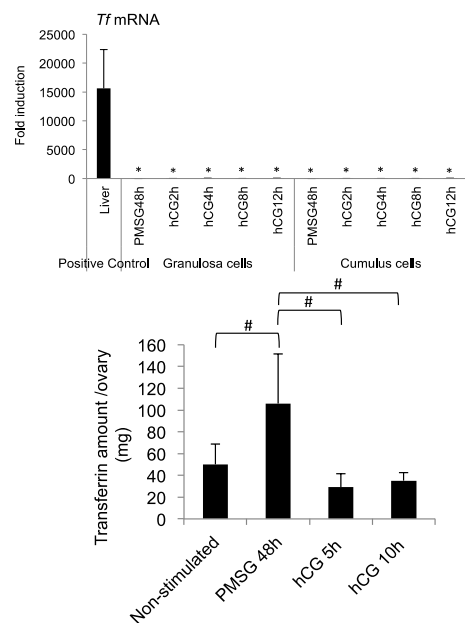


図1. 卵胞発育、排卵時期における肝臓のTF mRNA発現と卵巣のTF量

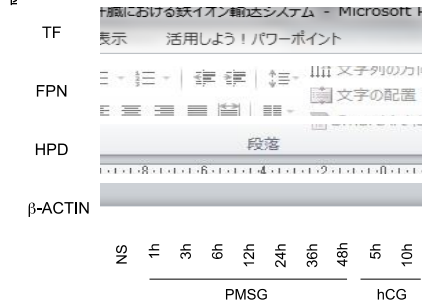


図2. 卵胞発育、排卵時期における肝臓のTF、FPN、HPD発現

②マウス卵巣に蓄積するTF-Fe<sup>3+</sup>の役割

TF-鉄イオンの卵巣における役割を明確化するため、生後3週目の離乳直後のマウスを低鉄飼料でその後3週間飼育し、鉄欠乏 (Low Fe; LF) モデルマウスを作製し、卵巣機能に及ぼす影響を調べた。この結果、LFマウスでは、PMSGにより誘起される卵胞発育およびhCGにより誘起される排卵が全く行いこと、LFマウスは性周期変動が極めて微弱かつ短く、交配しても全く産子を得ることができなかつた(図3)。この結果から、卵胞発育期にTFを介して運搬される鉄イオンは、初期胞状卵胞から後期胞状卵胞までの卵胞発育に極めて重要な因子であること、これにより鉄欠乏モデルマウスでは卵胞発育不全を呈し、産子を得ることができないことが明らかになった。

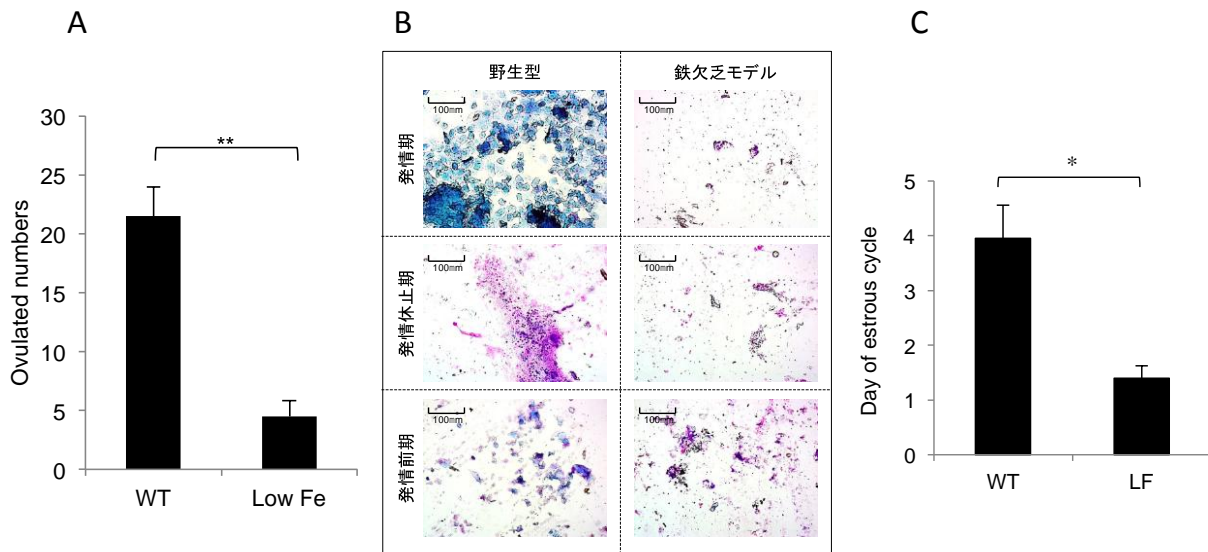


図3. 野生型マウスと鉄欠乏モデルマウスにおける排卵数(A)、膣垢画像(B)および性周期期間(C)

③メタボロームアッセイによるTF依存的に活性化する経路の網羅的解析

TF—鉄イオンの詳細な役割を調べる目的で、TF受容体が多く存在するマウスの顆粒膜細胞に卵巣中のTF量を添加して培養したサンプルをメタボローム解析に供した。この結果、TF無添加区で細胞増殖時の核酸合成の材料として必要な塩基の合成量(ATP、GTP、CTP、UTP)や後天的なDNA修飾に関与するメチル基、TCAサイクルの基質(Pyruvic acid、Asp、Arg、Citric Acid、Glu)などが極めて低値を示していた。この結果から、TFにより運ばれる鉄イオンは、細胞増殖のみならず、細胞の代謝を向上させること、この結果、卵胞内の顆粒膜細胞や卵丘細胞が健全性を維持し、卵胞発育を誘導することが明らかになった。

④TFの培地への添加がブタCOCの成熟能、発生能に及ぼす影響

卵胞液中のTF量を測定した結果、14mg/mlと血液(約4mg/ml)の3倍以上のTFが存在することから、この濃度を添加した培地でブタ卵丘細胞卵複合体(COC)を体外培養した。対照区として、TF無添加区と鉄イオンを抱合していないApo-TF区を設けた。その結果、TF添加区では、卵成熟と胚移植前に胚盤胞率が著しく向上した。この結果から、体外培養時におけるTF-鉄イオンを添加した新規体外成熟培養法の開発に成功した。