

研究種目	<input checked="" type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input type="checkbox"/> 21 世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 21 世紀教育開発奨励金 (教育推進研究助成金)
研究課題名	卵巣機能における生物時計の分子制御機構の解明：マウス卵巣にて時計遺伝子群に転写制御される遺伝子の探索	
研究者所属・氏名	研究代表者：天野 朋子 共同研究者：	

1. 研究目的・内容

近年の研究から、卵巣にて時計遺伝子群(*clock*, *bmal1*, *period*, *cryptochrome*)が、排卵や卵胞発育、ホルモン分泌などの卵巣の諸機能に関与していることが示唆されている。そこで本課題では、卵巣にて時計遺伝子群に制御される分子機序の同定を目的として、時計遺伝子群の変異/欠損マウスの卵巣と野生型マウスの卵巣に発現する遺伝子を網羅的手法によって解析・比較した。

2. 研究経過及び成果

本課題では、*Clock* が変異したマウス(*Clock* 変異マウス)の卵巣と、野生型マウスの卵巣に発現する遺伝子を、マイクロアレイ解析にて網羅的に解析・比較を行った。さらに、本課題の申請時には入手のめどがたっていなかった、*Period1* と *Perod2* を両方とも欠損したマウス (*Per1/Per2* 欠損マウス) の卵巣も入手できることとなったので、合わせて検討を行った。また当初の計画では、時計遺伝子群変異/欠損マウス、及び野生型マウスの卵巣から顆粒層細胞を採取・培養し、これから得られる mRNA をマイクロアレイ解析に供する予定であった。しかし、卵巣より採取した顆粒層細胞の増殖能力が低く、実験に適さなかったため、顆粒層細胞が卵巣に占める割合が多く、黄体を含まない、妊馬血清性腺刺激ホルモン(PMSG)処理後の幼若マウス(3 週齢マウス)の卵巣を解析に用いることとした。

Clock 変異マウスでは、性周期の異常や、排卵にいたる個体数が減少することなどが示されている。このことから、卵巣において排卵に関わる遺伝子や、ステロイドホルモン合成に関わる遺伝子などの発現に時計遺伝子群に関わる可能性が示されている。一方、*Per1/Per2* 欠損マウスではこの情報が得られていなかったため、マイクロアレイ解析に先立って検討を行った。その結果 *Per1/Per2* 欠損マウスでは、発情期に排卵の見られる個体の割合が低下しており、(93% vs 50%, $P < 0.05$)。発情期が延長する個体が多く認められた(5.1 ± 0.1 日 vs. 6.3 ± 0.2 日, $P < 0.05$)。そのため *Per1/Per2* 欠損マウスでは、排卵に関わる遺伝子や、ステロイドホルモン合成に関わる遺伝子などの発現が正常ではない高い可能性が示された。

次に、PMSG 投与後の *Clock* 変異マウスと野生型マウスの卵巣に発現する遺伝子種の違いを、マイクロアレイ解析によって網羅的に検討した。時計遺伝子群は転写フィードバックループを形成しており、このループによって制御される遺伝子は、*Clock* によって促進される。したがって、*Clock* 欠損マウスを用いた解析では、転写量が有意に減少している遺伝子群に焦点をあてて解析を行った。その結果、このような発現のプロファイルを示す遺伝子が 373 得られ、その中には、コレステロールの取り込みの律速要因であり、ステロイド合成に重要な遺伝子である *StAR* 遺伝子の他、卵胞の発育に関連の深い数十の遺伝子が確認された。一方、時計遺伝子群の転写フィードバックループによって制御される遺伝子は、*Period1* と *Period2* によって抑制されるため、*Per1/Per2* 欠損マウスを用いた解析では、野生型マウスにくらべ、*Per1/Per2* 欠損マウスにて発現量が有意に高い遺伝子群に焦点をあてて解析した。その結果、このような遺伝子は 252 得られ、

その中には、*Padi6*や*Amh*などの卵子形成に重要な遺伝子の他、*Cyp7b1*のような、ステロイド合成と関わりの深い数十の遺伝子が確認された。これらの網羅的解析より確認された遺伝子群の中には、*Clock* 変異マウスや *Per1/Per2* 欠損マウスに観察される妊孕性の異常との関わりが、必ずしも顕著ではないものも含まれていた。しかし、卵巣にて時計遺伝子群に制御される分子メカニズムがひとつではなく、加算的に卵巣機能に影響することも十分考えられる。したがって、卵巣の機能に重要であることが知られている遺伝子とともに、野生型マウスとの間に発現量の大きな差(統計的に有意差があり、発現量の差が 4 倍以上)が認められる遺伝子群を、時計遺伝子群に制御される可能性のある候補遺伝子群とし、これらが時計遺伝子群に転写が制御される可能性を追求する予定である。

3. 本研究と関連した今後の研究計画

今後の予定：本課題にて、卵巣にて時計遺伝子群に制御される遺伝子として挙げられた候補遺伝子群から、時計遺伝子群に実際に制御を受ける遺伝子を探す。

1. マイクロアレイ解析にて確認された遺伝子の転写産物の局在が、卵巣での時計遺伝子群タンパク質の局在がと重なっていることを確認する。
2. マイクロアレイ解析にて確認された遺伝子群のプロモーターに時計遺伝子群が関与する可能性を調べる。

4. 成果の発表等

発表機関名	種類(著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
第104回日本繁殖生物学会	口頭	2011年 9月16日
16th World Congress on In Vitro Fertilization	口頭	2011年9月14日
第105回日本繁殖生物学会	口頭	2012年9月6日(予定)