

平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書

◆ 記入に当たっては、「平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書記入要領」を参照してください。

ローマ字	SATO EIMEI					
①研究代表者氏名	佐藤 英明		②所属研究機関・部局・職		東北大学・大学院農学研究科・教授	
③研究課題名	和文	卵子の細胞分化・死滅調節系の解明による次世代型動物発生工学技術の基盤形成				
	英文	Analysis of regulatory mechanisms of differentiation and apoptosis of mammalian oocytes for establishment of developmental biotechnology in next generation				
④研究経費 18年度以降は内約額 金額単位：千円	平成16年度	平成17年度	平成18年度	平成19年度	平成20年度	総合計
	19,100	15,300	15,300	15,300	15,400	80,400
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者） *平成18年3月31日現在						
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担（研究実施計画に対する分担事項）			
佐藤 英明	東北大学・大学院農学研究科・教授	生殖生物学	研究全般の実施と受精能・体細胞初期化能獲得の分子メカニズムの解明			
西森 克彦	東北大学・大学院農学研究科・教授	分子生物学	卵子（卵胞）の分子メカニズムの解明と卵巣特異的遺伝子ノックアウト動物の作製法の開発			
竹家 達夫	奈良先端科学技術大学院大学・バイオインフォ研究科・教授	分子生物学	卵胞におけるシグナルの生成・伝搬のメカニズムの解明			
眞鍋 昇	東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授	生殖生物学	卵母細胞の死滅と生存制御の分子メカニズムの解明			
佐々田比呂志	東北大学・大学院農学研究科・助教授	生殖生物学	卵母細胞の生存促進の分子メカニズムの解明とミトコンドリア置換法の開発			
松本 浩道	東北大学・大学院農学研究科・助手	生殖生物学	卵母細胞・卵丘細胞のギャップ結合蛋白質の同定と卵母細胞の受精能・体細胞初期化能獲得の分子メカニズムの解明			
⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）						
<p>家畜生産に卵子の体外成熟・体外受精・受精卵移植技術、体細胞クローンや胚の凍結保存、顕微授精が導入され、家畜の改良・増殖が進むとともに、家畜を医薬品生産あるいはヒトへ移植可能な臓器生産に使用しようとする動きが強まっている。これらの技術をより有効にし、さらに生殖細胞の体外形成、胚の遺伝子診断など、新しく登場することが予想される技術を充実することが次世代の発生工学の基盤形成に必要である。これを実現するためには1個体からの卵子の大量生産、受精能・体細胞初期化能の高い卵子の大量生産、受精能の改良、卵子の分化・死滅を制御する遺伝子などの解明が必要であり、そのため次の4点にわたる研究を行う。</p> <p>1) 受精能・体細胞初期化能獲得の分子メカニズムの解明：受精能・体細胞初期化能発現の調節系は成熟の調節系のカスケードの下流とリンクすると予想されることから卵母細胞の成熟に係わる因子の解析を通して受精能・体細胞初期化能の発現調節系を明らかにする。2) 卵母細胞の死滅のメカニズムの解明：申請者らは卵胞顆粒層細胞にのみ局在する新規細胞死受容体とそのデコイ受容体及び卵母細胞の生存を促進するヒアルロン酸合成酵素3を同定し、卵母細胞の生存、死滅誘導と救助に関する知見を得ているが、これを手がかりに、卵母細胞の死滅と救助のプロファイルや卵母細胞・卵胞の選択的死滅を制御する分子機構の解明を行う。3) 卵胞におけるシグナルの生成・伝搬のメカニズムの解明：顆粒膜細胞、卵丘細胞及び卵母細胞に発現するギャップ結合蛋白質の同定とその開閉の制御機構を解明する。とくに、卵母細胞内で発現するコネクシン分子やその発現調節因子を同定し、卵子・卵丘細胞間の相互応答に直接関わるギャップ結合とその透過機構の実体を明らかにする。4) 受精能・体細胞初期化能の高い卵子の大量生産及びミトコンドリア置換技術の開発：上記の1)～3)の研究をもとに家畜及び実験動物に有効な技術開発を行う。</p>						

⑦これまでの研究経過 (研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。)

1) 受精能・体細胞初期化能獲得の分子メカニズムの解明

(1) Akt カスケードが卵成熟及び初期化能発現に関わることを明らかにした。また、Akt のリン酸化パターンは減数分裂特異的であった。(2) アフリカツメガエル卵子にマウス及びラット体細胞の初期化(体細胞における Oct4 の発現など)を誘導する能力のあることを明らかにした。(3) 体外で成熟能力を高めた卵子が体細胞クローン作製に使えるか否か、すなわち初期化能を発現するか否かを検討した。申請者らの開発した培養液で体外成熟させて作製したレシピエント卵を用いてミニブタ体細胞クローンの誕生に成功した。ミニブタ体細胞クローンは順調に発育している。(4) Maturation promoting factor (MPF)を高発現するブタ成熟卵子を用いた体細胞クローン胚は早期染色体凝縮を誘起する能力をもつことを明らかにした。また、早期染色体凝縮能は体細胞クローン胚の発育能と相関することも明らかにした。

(5) 減数分裂中期で卵母細胞の分裂を人為的に停止させる方法により、受精・発生能力の高い成熟卵子を得ることに成功した。(6) LGR4 遺伝子欠損マウスを作成し、LGR4 が卵巣形成に関与することを明らかにした。また、初期胚卵巣で発現する dmrt7 遺伝子-Cre マウスと交配を行っており、致死性を回避して卵巣特異的に LGR4 遺伝子欠損を誘導する実験を行っている。また、新生♀ヌルマウスの卵巣を摘出し、野生型の成熟前雌マウスへ卵巣移植する実験を行っており、これにより LGR4 遺伝子が卵巣形成や卵胞形成に必須であるか否かが明らかになるものと考えている。

2) 卵母細胞の死滅のメカニズムの解明

(1) 卵胞閉鎖に伴うアポトーシス残渣除去にマクロファージが関与するが、ブタ卵胞閉鎖におけるマクロファージでの CD44 mRNA、CD44 タンパク質、CD44 糖鎖修飾のプロファイルを明らかにし、効率的除去のメカニズムを明らかにした。TAP-GDF-9 遺伝子及び TAP-VEGF 遺伝子連続投与により、顕著な卵胞閉鎖抑制が認められた。(2) 申請時にブタ卵胞の顆粒層細胞を抗原として作製したモノクローナル抗体をプローブとして新規な細胞死受容体 (PFG-5) と囮受容体 (PFG-6) を見出ししていたが、これらに関して、完全性周期動物では両受容体とも顆粒層細胞に発現しているが、不完全性周期動物には発現しておらず、両受容体の細胞外ドメインは tumornecrosis factor 受容体 (TNFR) に類似しており、PFG-5 は細胞内に death ドメインをもつが、囮受容体の PFG-6 は death ドメインを欠いていること、顆粒層細胞にはこれら以外にも Fas 等の複数の TNFR ファミリー細胞死受容体が発現しており、これらが協調して細胞死を制御していること PFG-5 受容体は他の TNFR ファミリーと共通な細胞内シグナル伝達系因子を利用してアポトーシスを誘導していること、健全な卵胞の顆粒層細胞には受容体を介したシグナル伝達を阻害している2種の細胞死阻害因子 (cFLIPs と cFLIPL) が発現しており、これらが消滅することで顆粒層細胞が死滅することを明らかにした。

3) 卵胞におけるシグナルの生成・伝搬のメカニズムの解明

(1) 初期卵胞の分化に基底膜形成に関わることを明らかにし、また基底膜形成にヒアルロン酸に関わることを明らかにした。(2) マウス卵胞の体外培養系では直径 70 μ m 以下の卵胞を培養し、成熟卵子を得ることは不可能であったが、培地中に TAP-GDF-9 遺伝子を導入することによって成熟卵子を得ることが可能となり、IVMFC・ETにより、産子を得ることに成功した。また、70 μ m 前後の卵胞に発現する遺伝子を網羅的に同定した。(3) ブタ卵母細胞特異的 cDNA ライブラリーを作成するとともに、それを利用したコネクシン遺伝子の探索により、マウスとの比較解析を行った。degenerateRT-PCRにより、マウス/ヒト Cx45 の相同遺伝子および申請者らが以前ブタ卵胞から単離した新規遺伝子 Cx60 の発現が認められた。しかし、マウスで唯一その発現が報告されている Cx37 は、mRNA、蛋白質ともに認められなかった。(4) FSH 刺激が Cx43 のリン酸化レベルを亢進すること、さらにこのリン酸化が物質透過活性に重要であることなどを明らかにしてきたが、今回、分子量約 150kD の新規会合分子を同定し、CIP150 と命名した。さらに、それらの会合様式を明らかにするとともに、その会合が機能的なギャップ結合構築に必須であることなどを明らかにした。また、FSH の刺激下、PKA が Cx43 のリン酸化を担うことを明らかにした。(5) 二つの ES 細胞株 RW-4 mouse ES cell line (129/SvJ♂mice) と E14TG2a, ES cell line (129/SvJ♂mice) を用い、卵胞様凝集体が誘導出来る条件を確定した。形成された凝集体は、PAS 染色、発現遺伝子(例えば、SYCP3、Dmch1、FIG α 、GDF-9、c-Kit、aromatase など)の解析などから、一次・二次卵胞の特徴を持つことが確認された。また、VASA に関しては、ウェスタンブロッティングにより、Cx43 に関しては免疫蛍光染色により顆粒膜細胞層と莖膜細胞層における発現をそれぞれ確認した。

4) 受精能・体細胞初期化能の高い卵子の大量生産及びミトコンドリア置換技術の開発

(1) ラット卵胞発育と卵胞膜における VEGF120 及び 164, angiopoietin 及びそれらのレセプターの発現を解析し、hCG 投与により、発現が上昇することを確認し、さらに自然発情を示すラット卵巣に VEGF120 及び 164 を直接注入することにより卵胞血管網の増殖が誘起され、血中エストロゲン濃度が上昇した。また、排卵数も有意に上昇し、排卵卵子はすべて受精し、新生子に発育した。(2) 卵巣の未成熟卵子の凍結保存に取り組み、ブタ未成熟卵子を遠心し、偏在した脂質を細胞質から除去し、ガラス化凍結保存し、成熟卵子を得た。段階的に耐凍剤に曝露する新しい凍結保存法(SWEID と命名)を考案し、凍結保存マウス未成熟卵子由来の新生子を得ることに成功した。(3) 活性型ミトコンドリア分布と受精・発生能発現に相関のあることを明らかにした。(4) 凍結融解卵子(卵核胞期)における活性型ミトコンドリアの分布は異常を示したが、正常卵子との間で卵核胞置換を行うと体外成熟能は回復した。

⑧特記事項 (これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。)

1) 受精能・体細胞初期化能獲得の分子メカニズムの解明

- (1) ミニブタにおいて初期化能発現を制御しうる方法 (MPF の発現量や減数分裂中期で卵母細胞の分裂を人為的に停止させる) を発見したことは、効率的なミニブタクローン作製法の開発につながると考える。
- (2) 減数分裂特異的に機能する Akt を発見し、受精能・初期化能発現のメカニズムに新しい考えを導入することができた。Akt カスケードの上流・下流の検索により、調節系の全体像が明らかになるものと思われる。
- (3) アフリカツメガエル卵子に体細胞の初期化を誘導する能力のあることを示し、現在、初期化に関わる因子の分離に努力している。独自の解析方法も蓄積しており、急速に展開することを期待している。
- (4) 卵巣特異的な LGR4 遺伝子欠損マウスの作成は、既に作成した LGR4F_x/F_x マウスと別に作成した *dmrt7-cre* の交配により雌、E11.5 程度の初期卵巣体細胞期に始まる *dmrt7* 遺伝子発現に連動して開始する LGR4 遺伝子の欠損により、LGR4 遺伝子が初期卵巣形成と卵胞形成に果たす役割が明らかになると考えている。またそのリガンドの発見と投与により生体での卵子の分化や卵胞形成の促進、及び死滅調節系の制御に応用できる知見が必ず得られるものと予想される。

2) 卵母細胞の死滅のメカニズムの解明

- (1) ブタ卵巣において TAP-GDF-9 遺伝子及び TAP-VEGF 遺伝子連続投与により、顕著な卵胞閉鎖抑制が認められたが、現在、ヒアルロン酸合成酵素遺伝子の導入も試みており、より有効な方法が生み出されるものと期待している。
- (2) 顆粒層細胞にのみ特異的に発現している細胞死受容体が存在することを明らかにした。また、家畜卵巣組織を重症複合免疫不全 (SCID) マウスの腎臓下に移植し、遺伝子導入によって細胞死阻害因子を強発現させて卵胞を三次卵胞まで発育させて卵母細胞を成熟させる技術を開発した。この三次卵胞の卵母細胞を取り出して受精させ得るまで成熟させる無血清培養法も確立した。

3) 卵胞におけるシグナルの生成・伝搬のメカニズムの解明

- (1) 直径 70 μ m 以下のマウス卵胞を TAP-GFP-9 を導入して培養し、成熟卵子を得、IVMFC・ET により、産子を得ることに成功したが、これは世界初の成功である。70 μ m 前後の卵胞に発現する遺伝子を網羅的に同定しているが、これらを併用することにより、より効率的な培養系ができるのではないかと考えている。
- (2) 基底膜形成と卵胞の選択的発育に相関のあることを示したが、基底膜形成とヒアルロン酸合成酵素遺伝子発現に相関があることからヒアルロン酸合成酵素遺伝子発現制御により、卵胞の選択的発育を制御しうる可能性がある。
- (3) ブタにおいては、マウス卵母細胞において唯一発現するとの報告がある Cx37 の発現がみられず、Cx45 ならびに Cx60 の発現がみられたことは、卵母細胞で発現・機能するギャップ結合が種により異なることを示唆しており、哺乳類卵形成、卵胞発育機構ならびに卵子の機能を考えるうえで大きな手がかりとなる。しかも、Cx60 は申請者が単離、報告した新規遺伝子であることは意義のある結果である。
- (4) 卵巣ライブラリーを用いて新規会合蛋白質を同定するとともに、その会合が Cx43 を介したギャップ結合の構築、機能に重要であることを明らかにした。このような機能をもつコネクシン会合蛋白質の報告は例がない。また、Cx43 の膜局在に必須なドメイン領域を明らかにすることができた。さらに Cx43 のリン酸化には FSH の刺激による PKA が関わることを明らかにしたのは、卵胞発育に関わるシグナル伝達機構を理解するうえで大きな成果である。
- (5) 独自の改良を加え、ES 細胞から効率良く卵胞様構造体を誘導出来る実験系を確立した。今後さらに、高効率でしかも胞状卵胞の形成が見られる条件検討を行うことや、得られた卵母細胞の生殖性などを確認する実験などを進めていきたい。もし、その系が確立されれば、マウスのみならず哺乳類における卵胞発育、卵母細胞の発育・成熟などに関わる様々な研究課題を達成する大きな成果となる。

4) 受精能・体細胞初期化能の高い卵子の大量生産及びミトコンドリア置換技術の開発

- (1) ラット卵巣に VEGF120 及び 164 を直接注入することによって排卵させた卵子数は顕著に増加した。また、排卵卵子はすべて受精し、新生子に発育した。家畜を用いる実用的方法につながると考え、実用化に向けた実験を行っている。
- (2) 死滅から救助された卵巣卵由来のレシピエント卵を用いてミニブタ体細胞クローンの誕生に成功した。クローン個体作製には多数の卵子が必要であるが、卵子の大量調整に一つの可能性を示したものと考えている。
- (3) 新規の未成熟卵子の凍結保存法 (SWEID) を開発し、凍結保存マウス未成熟卵子からも受精能の高い卵子を調整しうる可能性を示すことができた。家畜 (ウシ、ブタ) への応用が課題である。
- (4) 活性型ミトコンドリア分布と受精・発生能発現に相関のあること、凍結融解卵子 (卵核胞期) と正常卵子との間で卵核胞置換を行うと体外成熟能は回復することを示したが、未だ、卵子のミトコンドリアを特異的に殺傷する方法は確立できていない。今後の課題である。

⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

佐藤英明・佐々田比呂志・松本浩道(東北大学大学院農学研究科動物生殖科学分野)

○原著論文

- 1) Shinozawa,T., Mizutani,E., Tomioka,I., Kawahara,M., Sasada,H., Matsumoto,H., Sato,E.: Differential effect of recipient cytoplasm for microtubule organization and preimplantation development in rat reconstituted embryos with two-cell embryonic cell nuclear transfer. *Mol.Reprod. Dev.*, 68:313-318, 2004
- 2) Matsumoto,H., Daikoku,T., Wang,H., Sato,E., Dey,S.K.: Differential expression of ezrin/radixin/moesin(ERM) and ERM-associated adhesion molecules in the blastocyst and uterus suggests their functions during implantation. *Biol.Reprod.*, 70:729-736, 2004
- 3) Jiang,J.Y., Shimizu,T., Sasada,H., Tsang,B.K., Sato,E.: Increased ovarian follicular angiogenesis and dynamic changes of follicular vascular plexuses induced by equine chorionic gonadotropin in the gilt. *Cell Tissue Res.*, 316:349-357, 2004
- 4) Kobayashi,J., Nagayama,H., Uchida,H., Oikawa,T., Numabe,T., Takada,N., Sasada,H., Sato,E.: Selection of sexed bovine embryos using rapid fluorescence in situ hybridisation. *Vet.Rec.*, 154:789-791, 2004
- 5) Somfai,T., Kikuchi,K., Onishi,A., Iwamoto,M., Fuchimoto,D., Papp,A.B., Sato,E., Nagai,T.: Relationship between the morphological changes of somatic component and the kinetics of nuclear and cytoplasmic maturation of oocytes during in vitro maturation of porcine follicular oocytes. *Mol.Reprod.Dev.*, 68:484-491, 2004
- 6) Yoshida,T., Tomioka,I., Nagahara,T., Holyst,T., Sawada,M., Hayes,P., Gama,V., Okuno,M., Chen,Y., Abe,Y., Kanouchi,T., Sasada,H., Wang,D., Yokota,T., Sato,E., Matsuyama,S.: Bax inhibiting peptide (BIP) derived from mouse and rat Ku70. *Biochem.Biophys.Res.Communn.*, 321:961-966, 2004
- 7) Hoshino,Y., Yokoo,M., Yoshida,N., Sasada,H., Matsumoto,H., Sato,E.: Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt participate in the FSH-induced meiotic maturation of mouse oocytes. *Mol.Reprod.Dev.*, 69:77-86, 2004
- 8) Shimizu T, Miyahayashi Y, Yokoo M, Hoshino Y, Sasada H, Sato E : Molecular cloning of porcine growth differentiation factor 9 (GDF-9) cDNA and its role in early folliculogenesis: direct ovarian injection of GDF-9 gene fragments promotes early folliculogenesis. *Reproduction*, 128:537-543, 2004
- 9) Shimizu,T., Yokoo,M., Miyake,Y., Sasada,H., Sato,E.: Differential expression of bone morphogenetic protein 4,5,6 (BMP-4,-5,-6) and growth differentiation factor-9(GDF-9) during ovarian development in neonatal pigs. *Domestic Animal Endocrinol*, 27:397-405, 2004
- 10) Iijima K, Jiang,J.Y., Shimizu,T., Sasada,H., Sato,E.: Acceleration of follicular development by administration of vascular endothelial growth factor in cycling female rats. *J.Reprod.Dev.*, 51(1):161-168, 2004
- 11) Hara,K., Abe,Y., Kumada,N., Aono,N., Kobayashi,J., Matsumoto,H., Sasada,H., Sato E.: Extrusion and removal of lipid from the cytoplasm of porcine oocytes at the germinal vesicle stage: centrifugation under hypertonic conditions influences vitrification. *Cryobiology*, 50:216-222, 2005
- 12) Abe,Y., Hara,K., Matsumoto,H., Kobayashi,J., Sasada,H., Ekwall,H., Rodriguez-Martinez,H., Sato,E.: Feasibility of a nylon mesh holder for vitrification of bovine germinal vesicle oocytes in subsequent production of viable blastocysts. *Biol.Reprod.*, 72:1416-1420, 2005
- 13) Miyabayashi, K., Shimizu, T., Kawauchi, C., Sasada, H., Sato, E.: Changes of mRNA expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), angiopoietins and their specific receptors during the periovulatory phase in eCG/hCG-primed immature female rats. *J.Exp.Zool.*, 303A:590-597, 2005
- 14) Tanemura,K., Ogura,A., Cheong,C., Gotoh,H., Matsumoto,K., Sato,E., Hayashi,Y., Lee,H.W., Kondo,T. : Dynamic rearrangement of telomeres during spermatogenesis in mice. *Dev.Biol.*, 281:196-207, 2005
- 15) Aono,N., Abe,Y., Hara,K., Sasada,H., Sato,E., Yoshida,H.: Production of live offsprings from mouse germinal vesicle-stage oocytes vitrified by a modified step-wise method, SWEID. *Fertil.Steril.*, 84(suppl.2):1078-1082, 2005
- 16) Kawahara,M., Wakai,T., Yamanaka,K., Kobayashi,J., Sugimura,S., Shimizu,T., Matsumoto,H., J.K.Kim, Sasada,H., Sato,E.: Caffeine promotes premature chromosome condensation formation and in vitro development in porcine reconstructed embryos via a high level of maturation promoting factor activity during nuclear transfer. *Reproduction*, 130(3): 351-357, 2005
- 17) Ann-Sofi,B., Killian,G., Erikson,D., Hoshino,Y., Bage,R., Sato,E., Rodriguez-Martinez,H.: Detection of Fas ligand in the bovine oviduct. *Anim.Reprod.Sci.*, 86:71-88, 2005
- 18) Mizutani,E., Ohta,H., Kishigami,S., Thuan,N.V., Hikichi,T., Wakayama,S., Sato,E., Wakayama,T.: Generation of Progeny from Embryonic Stem Cells by Microinsemination of Male Germ Cells from Chimeric Mice. *Genesis*, 43:34-42, 2005
- 19) Ann-Sofi,B., Yokoo,M., Heldin,P., Frendin,J., Sato,E., Rodriguez-Martinez,H.: Hyaluronan and its binding protein in the epithelium and intraluminal fluid of the bovine oviduct. *Zygote*, 13:207-218, 2005
- 20) Miyake,Y., Matsumoto,H., Yokoo,M., Miyazawa,K., Kimura,N., Tunjung,W.A.S., Shimizu,T., Sasada,H., Aso,H., Yamaguchi,T., Sato,E., Expression and glycosylation with polylysosamine of CD44 antigen on macrophages during follicular atresia in pig ovaries. *Buil.Reprod.*, 74:501-510 2006
- 21) Shinozawa1,T., Sugawara,A., Matsumoto,A., Han,Y.J., Tomioka,I., Inai,K., Sasada,H., Kobayashi, E., Matsumoto,H., Sato,E.: Development of rat tetraploid and chimeric embryos aggregated with diploid cells. *Zygote*, in press, 2006

○総説

- 1) Yokoo,M., Sato,E.: Cumulus-oocyte complex interactions during oocyte maturation. *Int.Rev.Cytol.*, 235:251-291, 2004
- 2) Sato,E., Yokoo,M.: Morphological and biochemical dynamics of porcine cumulus-oocyte complexes: role of cumulus expansion in oocyte maturation. *It.J.Anat.Embryol.*, 110(suppl.1): 205-217, 2005
- 3) Sato,E., Kimura,N., Yokoo,M., Sasada,H., Ikeda,J.: Morphodynamics of ovarian follicles during oogenesis in mice. *Microsc.Res.Techniq.*, in press, 2006
- 4) Shimizu,T., Sato,E.: Manipulation of ovarian follicle development by injecting vascular endothelial growth factor(VEGF) gene. *Reprod.Biol.* 5(3):257-268, 2005

⑨ 研究成果の発表状況（続き）（この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（掲載が確定しているものを含む。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。）

- 5) 松本浩道・阿部靖之・星野由美・富岡郁夫・三宅裕子・佐藤英明：卵の受精能-卵子の受精に必要な分子の解説と卵子側で原因となる受精異常のメカニズムについて-、産科と婦人科、印刷中、2006

○著書

- 1) 佐藤英明：哺乳類の卵細胞、pp.1-114、朝倉書店、2004
- 2) 横尾正樹・清水 隆・佐藤英明：生殖系列細胞の基礎、1.細胞の流れ、生命の誕生に向けて、生殖補助医療（ART）胚培養の理論と実際、日本哺乳動物卵子学会編、pp.20-26、近代出版、2005

○国際学会(招請講演)

- 1) Sato,E. : In vitro production of blastocyst-stage embryos and blastocyst-derived cell lines in the pigs. The fifth Royan International Research Award (Tehran, Iran, September 1-3, 2004, Proceedings, pp.114, 2004)
- 2) Sato,E. : Cryopreservation of immature bovine oocytes using a new tool. The fifth Royan International Research Award (Tehran, Iran, September 1-3, 2004, Proceedings, pp.114, 2004)
- 3) Sato,E. : Recent advances in molecular basis of follicular growth and oocyte maturation : use of farm animals for biology and biomedical science. Proc.11th AAAP Congress (Kuala Lumpur, September 5-9, 2004, Proceedings, pp.162-163, 2004)
- 4) Sato,E., Yokoo,M., Kimura,N.: Molecular basis of meiotic arrest at metaphase II and activation of oocytes by sperm-oocyte interaction.The XIX International Congress of Zoology, (Beijing, China, August23-27, 2004)
- 5) Sato,E., Shimizu,T., Abe,Y.: A new technology for induction of follicular development by VEGF gene constructs. International Symposium on Future Development of Agricultural Biotechnology Park, (Pingtung, Taiwan,November 18-20, 2004, Propceeding, pp.128-136, 2004)
- 6) Sato,E. : Artificial control of follicular development and atresia by VEGF and GDF-9 gene constructs. A special seminar of the Department of Experimental Medicine, University of L'Aquila (L'Alquila, Italy, December 2, 2004)
- 7) Sato,E. :Morphological dynamics of follicular development in the porcine ovaries injected with VEGF and GDF-9 gene fragments. In Malpighi Symposium: In memoriam of professor Liberato J.A.Didio, Recent advances in microscopic anatomy:The bridge between molecular biology and functional morphology (Belgrade, Serbia and Montenegro, June 5-8, 2005, Abstract book, pp.207, 2005)
- 8) Sato,E. : Molecular basis of oocyte maturation and fertilization in mice: Role of Akt, c-mos and integrins, Associazione Marcello malpighi per gli Studi di Anatomia Microscopica (Universita di Romsa La Sapienza, June 10, 2005)
- 9) Sato,E. : Regulation of follicular development and atresia in the porcine ovaries by VEGF and GDF-9 gene fragments. The 4th Symposium of the Society for Biology of Reproduction and Joint Polish-Japanese Seminar (Krakow, Poland, September 22-24, 2005, Book of Abstracts, pp.28, 2005)
- 10) Sato,E. : Cumulus-oocyte complex interactions during oocyte maturation. Workshop, Mammalian Oogenesis & Epigenetic Modification (Kazusa Arc, The Conference Center, Kazusa, Chiba, Japan, October 22-23, 2005, Abstracts, pp.32-33, 2005)
- 11) Sato,E. : Cumulus-oocyte complex interactions during oocyte maturation. International Congress on Gamete Biology: Emerging Frontier in Fertility and Contraceptive Development(New Delhi, India, February 22-25, 2006, Program and Abstracts, pp.26-27, 2006)

○国際学会（一般発表）

- 1) Abe,Y., Hara,K., Matsumoto,H., Sasada,H., Ekwall,H., R-Martinez,H., Sato,E. : In vitro maturation, fertilization and development of bovine immature oocytes cryopreserved by vitrification with stepwise exposure using nylon mesh Annual Conference of the International Embryo Transfer Society (Portland, Oregon, USA, January 10-14, 2004, Reprod.Fertil.Dev., 16(1,2):152, 2004)
- 2) Iijima,K., Shimizu,T., Ogawa,Y., Sasada,H., Sato,E. : The development of ovarian antral follicles after vascular endothelial growth factor (VEGF) gene fragment injection in immature female rats. The 4th Conference of the Pacific Rim Society for Fertility and Sterility (Okinawa, Japan, March 8-11, 2004, Program&Abstracts, pp.88-89, 2004)
- 3) Miyake,y., Yokoo,M., Matsumoto,H., Sasada,H., Sato,E. : Detection of CD44 in porcine granulose cells of atretic follicles The 4th Conference of the Pacific Rim Society for Fertility and Sterility (Okinawa, Japan, March 8-11, 2004, Program&Abstracts, pp.133, 2004)
- 4) Mizutani,E., Jiang,J.Y., Mizuno,S., Tomioka,I., Shinozawa,T., Kobayashi,J., Sasada,H., Sato,E. : Determination of optimal conditions for parthenogenetic activation and subsequent development of rat oocytes in vitro. 1st Workshop of the Asian Reproductive Biotechnology Society(Ho Chi Minh, Vietnam, April 12-14, 2004, Proceedings, pp.68-70, 2004)
- 5) Sugimura,S., Wakai,T., Kawahara,M., Yamanaka,K., Kobayashi,J., Sasada,H., Sato,E. : Inconsistency between nuclear maturation during in vitro culture and developmental ability in pig oocytes. The International Ovarian Conference 2004 (Tokyo, Program & Abstracts pp.53, 2004)
- 6) Iijima,K., Jiasng,J.Y., Shimizu,T., Sasada,H., Sato,E. : A new technology for induction of follicular development by angiogenic factor onjection. Proc.11th AAAP Congress (Kuala Lumpur, Malaysia, Proceeding Vol.3, pp230-232, 2004)
- 7) Somfai,T., Kikuchi,K., Medvedev,S.F., Onishi,A., Iwamoto,M., Fuchimoto,D., Noguchi,J., Kaneko,H., Pupp,A.B., Sato,E., Nagai,T. In vitro fertilization and development of immature porcine oocytes arrested before metaphase-II stage. Proc.11th AAAP Congress (Kuala Lumpur, Malaysia, Proceeding Vol.3, pp233-235, 2004)

⑨研究成果の発表状況(続き) (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

- 8) Mizutani,E., Ohta,H., Kishigami,S., Nguyen,T.V., Hikichi,T., Wakayama,S., Sato,E., Wakayama,T. Efficient production of offspring from ES cells in chimeric mice. 13th Conference of the international Society of Differentiation (Hawaii, USA, September 5-9, 2004, Differentiation, 72(6):265, 2004)
- 9) Hoshino,Y., Matsumoto,H., Sasada,H., Sato,E. Distribution and expression of Akt/protein kinase B during oocyte meiotic maturation and preimplantation development in mice. 37th Annual Meeting of Society for the Study of Reproduction (University of British Columbia, Canada, Biol.Reprod.,special issue, 100, 2004)
- 10) Yamamoto,R., Sato,E., Takagaki,Y., Yasue,H. Cloning and comparative analysis of swine pre-T-cell receptor α -chain gene. 29th International Conference on Animal Genetics (Meiji University, Tokyo, Japan, proceedings, pp.60, 2004)
- 11) Sugawara,A., Tomioka,I., Yamanaka,K., Inai,K., Sasada,H., Sato,E. Parthenogenetic induction with different stimuli in rat and pig oocytes. The International Ovarian Conference 2005 (Kaiun Club, Tokyo, Japan, June 4, 2005, Program&Abstracts, pp43, 2005)
- 12) Abe,Y., Aono,N., Hara,K., Matsumoto,H., Sasada,H., Sato,E. Morphological status of active mitochondria in vitrified bovine GV oocytes affects subsequent development. 38th Annual Meeting of Society for the Study of Reproduction (University of Laval, Canada, Biol.Reprod.,special issue, 230, 2005)
- 13) Tomioka,I., Sugawara,A., Shinozawa,T., Inai,K., Sasada,H., Sato,E. Cleavage of rat clone embryos by somatic nuclear transfer using fetal fibroblast cells reprogrammed by Xenopus egg extracts. 38th Annual Meeting of Society for the Study of Reproduction (University of Laval, Canada, Biol.Reprod.,special issue, 231, 2005)
- 14) Shimizu,T., Iijima,K., Miyabayashi,K., Ogawa,Y., Miyamoto,A., Sasada,H., Sato,E. Injection of vascular endothelial growth factor gene stimulates ovarian follicular development by promoting thecal angiogenesis in immature female rats. 38th Annual Meeting of Society for the Study of Reproduction (University of Laval, Canada, Biol.Reprod.,special issue, 236-237, 2005)
- 15) Kimura,N., Suda,M., Hoshino,Y., Sato,E., Totsukawa,K. Cellular features of oocytes associated with reproductive aging in mice. The 4th Symposium of the Society for Biology of Reproduction and Joint Polish-Japanese Seminar (Krakow, Poland, September 22-24, 2005, Book of Abstracts, pp.45, 2005)
- 16) Miyake,Y., Matsumoto,H., Tunjung,W.A.S., Kimura,N., Sasada,H., Sato,E. The changes of CD44 post-translational modification in atretic follicles during follicular atresia in pig ovaries. The 4th Symposium of the Society for Biology of Reproduction and Joint Polish-Japanese Seminar (Krakow, Poland, September 22-24, 2005, Book of Abstracts, pp.47, 2005)
- 17) Yoshida,T., Sato,E., Gomez,J., Matsuyama,S. Development of a new death inhibitor-Bax inhibiting peptides(BIPs) derived from Ku70-. International Symposium on Recent Advances in Animal Science (Sendai, November 16-18, 2005, Abstracts, pp.23, 2005)
- 18) Yamanaka,K., Sugimura,S., Wakai,T., Shoji,T., Sasada,H., Sato,E. Effects of different activation protocols on actin filament distribution and in vitro development of miniature pig NT embryos. The Annual Conference of the International Embryo Transfer Society(Orlando, FL, USA, January 7-11, 2006, Proceedings, pp.147, 2006)

西森克彦(東北大学大学院農学研究科分子生物学分野)

○原著論文

- 1) Takayanagi,Y., Yoshida,M., Bielsky,I.F., Ross,H.E., Kawamata,M., Onaka,T., Yanagisawa,T., Kimura,T., Matzuk,M.M., Young,L.J., Nishimori,K. Pervasive social deficits, but normal parturition, in oxytocin receptor-deficient mice. Proc Natl Acad Sci USA 102: 16096-16101,2005
- 2) Kimura,T., Saji,F., Nishimori,K., Ogita,K., Nakamura,H., Koyama,M., Murata,Y. Molecular regulation of the oxytocin receptor in peripheral organs. J Mol. Endocrinol. 30: 109-115, 2003

竹家達夫(奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科分子生物学分野)

○原著論文

- 1) Yogo,K., Ogawa,T., Akiyama,M., Ishida-Kitagawa,N., Sasada,H., Sato,E., Takeya,T. PKA is implicated in the phosphorylation of Cx43 induced by stimulation with FSH in rat granulosa cells. J. Reprod. Dev., in press
- 2) Akiyama,M., Ishida,N., Ogawa,T., Yogo,K., Takeya,T. Molecular cloning and functional analysis of a novel Cx43 partner protein CIP150. Biochem. Biophys. Res. Commun. 335:1264-71 (2005)

○国際会議

- 1) Akiyama,M., Ishida,N., Ogawa,T., Yogo,K., Takeya,T. Molecular cloning and functional analysis of a novel gene KDN encoding Cx43 partner protein at Gap junction conference Aug. 13-18, 2005 Columbia, Canada
- 2) Takeya,T. Gap junctions in ovarian folliculogenesis at "International Seminar on Cancer Diagnostic and Therapy" Sept. 10-12, 2005 Gadjah Mada University, JokJakarta, Indonesia

眞鍋昇(東京大学大学院農学生命科学研究科実験資源動物科学分野)

○原著論文

- 1) Goto Y., Matsuda F., Matsui T., Maeda A., Inoue N., Manabe N. The porcine (*Sus scrofa*) cellular Flice-like inhibitory protein (cFLIP): molecular cloning and comparison with the human and murine cFLIP. J.Reprod. Dev, 50: 549-555, 2004.
- 2) Manabe N., Goto F., Fuko Matsuda-Minehata F., Inoue N., Maeda A., Sugimoto M., Sakamaki K., Miyano T., Regulation mechanism of selective atresia in porcine follicles: regulation of granulosa cell apoptosis during atresia. Journal of Reproduction and Devevelopment, 50: 493-514, 2004.
- 3) Goto Y., Manabe N., Uchio U., Yamaguchi-Yamada M., Inoue N., Yamamoto Y., Ogura A., Nagano N., Miyamoto N., Myofibroblastic differentiation in tubulointerstitial cells is provoked by augmented cytoplasmic Smad4 protein in hereditary nephrotic ICGN mice with chronic renal fibrosis. Cell Tissue Res., 315: 209-221, 2004.
- 4) Manabe N., Matsuda-Minehata F., Goto F, Maeda A, Cheng Y, Sai T., Kohori M, Endo M, Li J., Anti-apoptotic activity of porcine cFLIP in ovarian granulosa cell lines. Eur. J. Cell. Mol.Physoph., 44: 125-129, 2006.