

Studies on the mechanism of follicle rupture during ovulation in the medaka

（メダカ排卵における濾胞破裂のメカニズムに関する研究）

学位論文内容の要旨

排卵は、受精可能な成熟した卵母細胞が卵巣から放出される過程である。排卵が起きるためには卵母細胞を取り囲む濾胞の破裂が不可欠である。濾胞破裂にはある種のプロテアーゼが関わることが示唆されているが、その同定には至っていない。本研究は、メダカの利点を生かして、濾胞破裂に関わるプロテアーゼ（排卵酵素）の同定を目指して実施された。

第1章 メダカ生体外排卵評価系の確立と種々のプロテアーゼ阻害剤の排卵への効果

適切な環境下で飼育された雌メダカ卵巣から排卵の数時間前に単離した濾胞は、生体外でも首尾良く排卵する。申請者は、この系を本研究が目的とする排卵酵素の同定に利用できるよう改良し、種々のプロテアーゼ阻害剤の排卵に及ぼす影響を調査した。その結果、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）の特異的阻害剤による排卵抑制が観察された。また、排卵はアクチノマイシン D およびシクロヘキシミドによっても抑制された。これらの転写および翻訳阻害剤の排卵に及ぼす効果と EDTA による排卵抑制効果の詳細な解析から、排卵実行に必要な MMP が、排卵期に合わせて濾胞組織において生合成されることが明らかになった。

第2章 メダカ卵巣に発現するマトリックスメタロプロテアーゼの cDNA クローニング、発現および生化学的解析

排卵直前の濾胞組織には少なくとも7種の MMP が発現しており、本研究では、6種の MMP について cDNA クローニングを行った。7種の MMP のうち、5種の MMP の mRNA は小濾胞の卵母細胞の細胞質に、他の2種 MMP の mRNA は排卵後の濾胞細胞層に存在した。活性型リコンビナント gelatinase A および gelatinase B はウシ4型コラーゲンを分解し、MT2-MMP はメダカ1型コラーゲンを分解した。また、MT5-MMP を除く MT-MMP は不活性前駆体の progelatinase A を活性化した。免疫学的解析から MT3-MMP を除く6種の MMP が卵巣に発現しており、それらの局在は mRNA の局在と一致した。以上の結果に基づき、4種の MMP（gelatinase A、gelatinase B、MT1-MMP、MT2-MMP）がメダカ排卵に関与する可能性があることが示された。

第3章 メダカ排卵時の濾胞破裂におけるマトリックスメタロプロテアーゼの関与

第2章において、排卵時に gelatinase A、gelatinase B、MT1-MMP、MT2-MMP タンパク質が発現していることが明らかにされた。本章では、これら4種の MMP の排卵への関与を調べるために、特異的抗体を用いて排卵前後における発現部位、消長、プロセッシングパターンをタンパク質レベルで解析した。メダカ生体外排卵評価系を用いた実験では、gelatinase B 抗体以外について排卵抑制効果が確認された。また、MT1-MMP に対する抗体を用いた実験から排卵前の時期に MT1-MMP が progelatinase A を活性化し、活性型となった gelatinase A 活性は内在性 MMP 阻害因子 TIMP-2b によって調節されていることが明らかにされた。以上の結果から、gelatinase A および MT2-MMP が濾胞壁を溶解する実質的な排卵酵素であり、排卵時の MMP 活性調節に MT1-MMP および TIMP-2b が関与していることが明らかになった。

第4章 メダカ排卵における tPA/plasmin 系、ADAMTS-1、および Cathepsin L の役割

哺乳類の排卵においては、tPA/plasmin 系、ADAMTS-1、および Cathepsin L の関与が示唆されている。そこでメダカ排卵にこれらの分子が関わるかについて検討した。Northern blot 解析の結果、ADAMTS-1 および Cathepsin L mRNA は卵巣において検出されたが、tPA および plasmin は検出されなかった。ADAMTS-1 および Cathepsin L は小濾胞の卵母細胞の細胞質に発現していたが、Cathepsin L については成熟した濾胞の濾胞細胞層および排卵後の濾胞細胞層にも確認された。これら4種のリコンビナントタンパク質は1型および4型コラーゲンのいずれも分解できなかった。さらに特異的抗体による排卵抑制効果は見られなかった。以上の結果から、これら4種のプロテアーゼはメダカの排卵には関与しないと結論した。

以上、本研究によって、メダカ卵巣に発現する MMP のタンパク質レベルでの性質が明らかになったばかりでなく、排卵に関与する MMP が同定された。さらに排卵時における個々の MMP の役割を明らかにすることによって、メダカの排卵のメカニズムが解明された。これらの成果は、過去一世紀にわたって生殖生物学の分野で解明が待たれてきた課題に初めて明快な解答を与えるものである。よって本研究は、生殖生物学研究の発展に大きく貢献するものである。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 高 橋 孝 行

副 査 教 授 鈴 木 範 男

副 査 教 授 山 下 正 兼

学 位 論 文 題 名

Studies on the mechanism of follicle rupture during ovulation in the medaka

(メダカ排卵における濾胞破裂のメカニズムに関する研究)

排卵は、受精可能な成熟した卵母細胞が卵巣から放出される過程である。排卵が起きるためには卵母細胞を取り囲む濾胞の分解が不可欠である。濾胞破裂にはある種のプロテアーゼが関与することが示唆されているが、その同定には至っていない。本研究は、メダカの利点を生かして、濾胞破裂に関わるプロテアーゼ（排卵酵素）の同定を目指して実施された。

第1章 メダカ生体外排卵評価系の確立と種々のプロテアーゼ阻害剤の排卵への効果

適切な環境下で飼育された雌メダカ卵巣から排卵の数時間前に単離した濾胞は、生体外でも首尾良く排卵する。申請者は、この系を本研究が目的とする排卵酵素の同定に利用できるよう改良し、種々のプロテアーゼ阻害剤の排卵に及ぼす影響を調査した。その結果、マトリクスメタロプロテアーゼ（MMP）の特異的阻害剤による排卵抑制が観察された。また、排卵はアクチノマイシン D およびシクロヘキシミドによっても抑制された。これらの転写および翻訳阻害剤の排卵に及ぼす効果と EDTA による排卵抑制効果の詳細な解析から、排卵期に合わせて排卵を実行する酵素が濾胞組織で生合成されることが明らかになった。

第2章 メダカ卵巣に発現するマトリクスメタロプロテアーゼの cDNA クローニング、発現および生化学的解析

排卵直前の濾胞組織には少なくとも 7 種の MMP が発現しており、本研究では、6 種の MMP について cDNA クローニングを行った。7 種の MMP のうち、5 種の MMP の mRNA は小濾胞の卵母細胞の細胞質に、他の 2 種 MMP の mRNA は排卵後の濾胞細胞層に存在した。活性型リコンビナント gelatinase A および gelatinase B はウシ IV 型コラーゲンを分解し、MT2-MMP はメダカ I 型コラーゲンを分解した。また、MT5-MMP を除く MT-MMP は不活性前駆体の progelatinase A を活性化した。免疫学的解析から MT3-MMP を除く 6 種の MMP が卵巣に発現しており、それらの局在は mRNA の局在と一致した。以上の結果に基づき、4 種 MMP (gelatinase A、gelatinase B、

MT1-MMP、MT2-MMP) が排卵に関与する可能性があることが示された。

第3章 メダカ排卵時の濾胞破裂におけるマトリクスメタロプロテアーゼの作用

第2章において、排卵期に gelatinase A、gelatinase B、MT1-MMP、MT2-MMP タンパク質が発現していることが明らかにされた。本章では、これら4種の MMP の排卵への関与を調べるために、特異的抗体を用いて排卵前後における発現部位、消長、プロセッシングパターンをタンパク質レベルで解析した。メダカ生体外排卵評価系を用いた実験では、gelatinase B 抗体以外について排卵抑制効果が確認された。また、MT1-MMP に対する抗体を用いた実験から排卵前の時期に MT1-MMP が progelatinase A を活性化し、活性型 gelatinase A は内在性 MMP 阻害因子 TIMP-2b によって調節されていることが明らかにされた。以上の結果から、gelatinase A および MT2-MMP が濾胞を溶解する実質的な排卵酵素であり、排卵時の MMP 活性調節に MT1-MMP および TIMP-2b が関与していることが明らかになった。

第4章 メダカ排卵における tPA/plasmin 系、ADAMTS-1、および cathepsin L の役割

哺乳類の排卵においては、tPA/plasmin 系、ADAMTS-1、および cathepsin L の関与が示唆されている。そこでメダカ排卵にこれらの分子に関わるかについて検討した。Northern blot 解析の結果、ADAMTS-1 および cathepsin L mRNA は卵巣において検出されたが、tPA および plasmin は検出されなかった。ADAMTS-1 および cathepsin L は小濾胞の卵母細胞の細胞質に発現していたが、cathepsin L については成熟した濾胞の濾胞細胞層および排卵後の濾胞細胞層にも確認された。これら4種のリコンビナントタンパク質は I 型および IV 型コラーゲンのいずれも分解できなかった。さらに特異的抗体による排卵抑制効果は見られなかった。以上の結果から、これら4種のプロテアーゼはメダカの排卵には関与しないと結論した。

以上、本研究によって、メダカ卵巣に発現する MMP についてタンパク質レベルでそれらの性質が明らかになったばかりでなく、排卵に関与する MMP が同定された。さらに排卵時における個々の MMP の役割を明らかにすることによって、メダカの排卵のメカニズムが解明された。これらの成果は、過去一世紀にわたって生殖生物学の分野で解明が待たれてきた課題に対して、初めて明快な解答を与えるものである。一部の成果は、すでに国際的学術専門誌に公表されており、申請者の研究が世界的レベルで評価を受けていることは明らかである。

よって、申請者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。