

学 位 論 文 題 名

Studies on the molecular mechanism of ovulation
induction by prostaglandin E₂ in the medaka
(メダカにおけるプロスタグランジンE₂による排卵誘導の分子機構に関する研究)

学位論文内容の要旨

排卵とは、濾胞細胞層の一部が溶解し、受精可能な卵母細胞が卵巣濾胞から放出される現象であり、魚類から哺乳類に至るまで脊椎動物で共通してみられる。排卵時にはゴナドトロピンサージによって、濾胞で遺伝子発現が誘導されるが、多くのタンパク質、ホルモンが複雑に相互作用しているため、その詳細な分子機構については不明な点が多い。

排卵時に働く代表的な因子としてプロスタグランジン(PG)が知られている。PG はシクロオキシゲナーゼ(Cox)によって産生され、分泌された PG は、近傍に存在する PG 受容体に受容されることによって、様々な生理作用を引き起こす。排卵への PG の関与は、魚類から哺乳類まで広く報告されているが、これまで主に哺乳類を用いて解析が行われてきた。ノックアウトマウスの解析から、PG は、排卵前濾胞に存在する卵-卵丘細胞複合体(COC)の再構成に働くことが明らかになった。しかしながら、PG の濾胞細胞層の溶解過程への関与はもとより、COC を持たない魚類や両生類での PG の役割については未だに明らかになっていない。

メダカは卵生の淡水魚であり、ゲノムサイズが比較的小さく、ゲノムデータベースが確立していることから、遺伝子解析に有用な種である。また、明期 14 時間/暗期 10 時間で飼育することで明期の開始時に毎日排卵するため、卵成熟・排卵のタイミングを特定することができる。さらに、メダカの排卵前濾胞を摘出し、培養液中でインキュベートすることによって、濾胞細胞層の一部が溶解し卵母細胞が培養液中に放出され、*in vitro*で排卵を再現することができる(*in vitro* 排卵実験系)。この *in vitro* 排卵実験系は、排卵時に作用する因子の作動時期の特定及びそのカスケードの解明に強力なツールとなる。そこで本研究では排卵研究に適した種であるメダカを用いて、未解明である PG の排卵時における作用メカニズムを明らかにすることを目的とした。

第 1 章 PG 合成酵素 Cox の解析

メダカ排卵において PG が関与するかどうかを確かめるために、*in vitro* 排卵実験系に PG 合成酵素 Cox の阻害剤であるインドメタシンを添加し、培養を行った。その結果、排卵は有意に阻害された。また、この排卵阻害は PGE₂ の添加によって回復した。そこで、メダカゲノムデータベースに存在する 3 種の Cox 遺伝子について、卵巣での発現量を調査したところ、Cox-2 の発現が最も高かった。そこで、Cox-2 についてクローニングと詳細な発現解析を行った。その結果、Cox-2 mRNA は排卵前濾胞において発現していたが、その発現レベルは排卵周期を通して一定であった。また、排卵前濾胞を用いて Cox 活性および PGE₂

レベルについて調べたところ、Cox-2 mRNA と同様に、排卵周期を通して有意な変動は見られなかった。以上の結果から、メダカの排卵には PGE₂ が関与するが、PG 産生の段階での調節は行われていない可能性が考えられた。

第2章 PGE₂受容体の解析

メダカゲノムデータベースより、メダカでは PGE₂ 受容体(EP)は全部で 6 種類確認された。そこで、これら EP 遺伝子について、卵巣における発現量を調査したところ、EP4b が最も強く発現していたため、EP4b に着目し、クローニングと詳細な発現解析を行った。その結果、排卵前濾胞の濾胞細胞層で EP4b mRNA の発現が見られ、その発現は排卵が近づくにつれて増加した。また、排卵前濾胞を単離し、PMSG の存在下で *in vitro* で培養を行うと、EP4b mRNA の発現量が増加した。PMSG はメダカで黄体形成ホルモン(LH)の作用を示すことから、排卵前濾胞における EP4b mRNA の発現上昇は LH によって引き起こされていると考えられる。さらに、*in vitro* 排卵実験系に EP4 アンタゴニストを添加し培養を行うと、排卵はアンタゴニスト濃度依存的に阻害された。したがって、PGE₂/EP4b がメダカの排卵に関与していると考えられた。

第3章 排卵前濾胞における PGE₂ の役割

PG は様々な生理作用を持つが、その中にアクチン重合を調節し、平滑筋の収縮や細胞移動に関与する報告がある。そこで、メダカ排卵時に PGE₂ によってアクチン重合調節が行われていると予想し、調査を行った。*In vitro* 排卵実験系にアクチン重合に関わる薬剤を添加し、培養を行ったところ、排卵は強力に阻害された。さらにアクチン重合調節に関わる因子の一種である Rho 及びその下流因子 Rho キナーゼの阻害剤を *in vitro* 排卵実験系に添加し、排卵率を調べたところ、排卵は有意に阻害された。そこで、排卵前濾胞における活性型 Rho の検出を試みた。その結果、排卵前濾胞において活性型 Rho は検出された。また、EP4 アンタゴニストの存在下で培養した排卵前濾胞では、活性型 Rho の量が減少した。以上の結果から、メダカ排卵前濾胞では、EP4b が PGE₂ に受容されると細胞内で Rho、Rho キナーゼを活性化し、アクチン重合調節を行うことで排卵を引き起こしていると予想される。

これまで多くの種で PG が排卵に関与することが報告されており、合成酵素および受容体の解析がなされてきたが、その作用機構については不明であった。本研究は排卵時に PGE₂ が細胞内でアクチン重合調節を行うことによって排卵に寄与していることを示した初めての報告となった。

学位論文審査の要旨

主査	教授	高橋孝行
副査	教授	山下正兼
副査	准教授	勝義直
副査	准教授	木村敦

学位論文題名

Studies on the molecular mechanism of ovulation induction by prostaglandin E₂ in the medaka

(メダカにおけるプロスタグランジンE₂による排卵誘導の分子機構に関する研究)

博士学位論文審査等の結果について(報告)

排卵とは、濾胞細胞層の一部が溶解し、受精可能な卵母細胞が卵巣濾胞から放出される現象であり、魚類から哺乳類に至るまで脊椎動物で共通してみられる。排卵時にはゴナドトロピンサージによって、濾胞で遺伝子発現が誘導されるが、多くのタンパク質、ホルモンが複雑に相互作用しているため、その詳細な分子機構については不明な点が多い。

排卵時に働く代表的な因子としてプロスタグランジン(PG)が知られている。PGはシクロオキシゲナーゼ(Cox)によって産生され、分泌されたPGは、近傍に存在するPG受容体に受容されることによって、様々な生理作用を引き起こす。排卵へのPGの関与は、魚類から哺乳類まで広く報告されているが、これまで主に哺乳類を用いて解析が行われてきた。ノックアウトマウスの解析から、PGは、排卵前濾胞に存在する卵-卵丘細胞複合体(COC)の再構成に働くことが明らかになった。しかしながら、PGの濾胞細胞層の溶解過程への関与はもとより、COCを持たない魚類や両生類でのPGの役割については未だに明らかになっていない。

メダカは卵生の淡水魚であり、ゲノムサイズが比較的小さく、ゲノムデータベースが確立していることから、遺伝子解析に有用な種である。また、明期14時間/暗期10時間で飼育することで明期の開始時に毎日排卵するため、卵成熟・排卵のタイミングを特定することができる。さらに、メダカの排卵前濾胞を摘出し、培養液中でインキュベートすることによって、濾胞細胞層の一部が溶解し卵母細胞が培養液中に放出され、*in vitro*で排卵を再現することができる(*in vitro*排卵実験系)。この*in vitro*排卵実験系は、排卵時に作用する因子の作動時期の特定及びそのカスケードの解明に強力なツールとなる。そこで本研究では排卵研究に適した種であるメダカを用いて、未解明であるPGの排卵時における作用メカニズムを明らかにすることを目的とした。

第1章 PG合成酵素Coxの解析

メダカの*in vitro*排卵実験系にPG合成酵素Coxの阻害剤であるインドメタシンを添加したところ、排卵は有意に阻害され、また、この排卵阻害はPGE₂の添加によって回復した。メダカゲノムデータベースに存

在する 3 種の Cox 遺伝子について卵巣での発現量を調査した結果、Cox-2 の発現が最も高かった。そこで、Cox-2 に注目し、クローニングと詳細な発現解析を行った。その結果、Cox-2 mRNA は排卵前濾胞において発現していたが、その発現レベルは排卵周期を通して一定であること、さらに、Cox 活性および PGE₂ レベルは、Cox-2 mRNA と同様に、排卵周期を通して有意な変動は見られないことから、メダカの排卵には PGE₂ が関与するが、PG 産生の段階での調節は行われていないことが示された。

第 2 章 PGE₂ 受容体の解析

メダカゲノムデータベース解析により確認された 6 種類のメダカ PGE₂ 受容体(EP)について、卵巣における発現量を調査したところ、EP4b が最も強く発現していた。そこで、EP4b に着目してクローニングと詳細な解析を行った。その結果、EP4b mRNA が排卵前濾胞の濾胞細胞層で発現することが判明した。さらに、EP4b mRNA の発現は排卵が近付くにつれて増加すること、PMSG により発現量が増加すること、EP4 アンタゴニストの添加により *in vitro* 排卵が顕著に阻害されることが示された。よって、PGE₂/EP4b がメダカの排卵に関与していることが明らかになった。

第 3 章 排卵前濾胞における PGE₂ の役割

排卵における PGE₂ の作用として、アクチン重合調節を予想した。*In vitro* 排卵実験系にアクチン重合に関わる薬剤を添加し、培養を行ったところ、排卵は強力に阻害された。さらにアクチン重合調節に関わる因子の一種である Rho 及びその下流因子 Rho キナーゼの阻害剤の効果を、*in vitro* 排卵実験系を用いて調べた。その結果、排卵が有意に阻害されることが明らかになった。加えて、排卵前濾胞において検出される活性型 Rho は、EP4 アンタゴニストの存在下で培養した排卵前濾胞では減少することを示した。以上の結果から、メダカ排卵前濾胞では、EP4b が PGE₂ に受容されると細胞内で Rho、Rho キナーゼを活性化し、アクチン重合調節を行うことで排卵を引き起こしていると結論された。

これまで多くの種で PG が排卵に関与することが報告されており、合成酵素および受容体の解析がなされてきたが、その作用機構については不明であった。本研究は排卵時に PGE₂ が細胞内でアクチン重合調節を行うことによって排卵に寄与していることを示した初めての報告となった。このように、著者の研究成果は、生殖生物学の分野の発展に大きく貢献するものであり、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。