

機関番号：10101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23687009

研究課題名(和文)脊椎動物に共通する排卵の内分泌制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the endocrine regulatory mechanism common in vertebrate ovulation.

研究代表者

荻原 克益 (OGIWARA, Katsueki)

北海道大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00422006

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,600,000円、(間接経費) 6,480,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、メダカ排卵の内分泌制御機構の解明を目指して実施された。LHにより誘導される核内プロゲステロン受容体nPR(排卵関連遺伝子の誘導に必要不可欠な転写因子)の発現誘導機構を解明し、メダカ排卵において重要な役割を担うMT2-MMPとPAI-1(共に排卵時に急激に誘導される)の発現誘導にnPRが関与することを突き止めた。さらに、nPRのリガンドである卵成熟誘起ホルモン(17 β , 20 β -DHP)産生に関する酵素群の発現パターンを明らかにした。これらの結果から、排卵時に濾胞細胞層の分解に関与する排卵関連酵素の発現誘導機構モデルを提唱するに至った。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study is to elucidate the endocrine regulatory mechanism of ovulation in the medaka. The study disclosed a mechanism for inducing nuclear progesterin receptor (nPR), which was the essential transcription factor for induction of ovulation-associated genes. It was revealed that nPR was involved in the induction of MT2-MMP and PAI-1, both which played an important role on ovulation. An expression pattern of the synthesizing enzymes for a maturation inducing hormone (17 β , 20 β -DHP), a ligand of nPR, was elucidated. Based on the results, we propose the novel model of the endocrine regulatory mechanism for inducing the ovulation-related enzymes responsible for degradation of follicle layer during ovulation.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：形態・構造

キーワード：ovulation endocrinology LH progesterone ovary

1. 研究開始当初の背景

卵母細胞(卵)は濾胞と呼ばれる袋状構造の中で成長し、受精可能な状態になった卵母細胞は濾胞の破裂に伴い卵巣外へと放出、排卵される。濾胞破裂は、濾胞組織の溶解を伴う濾胞破壊現象であるが、この溶解を担う酵素(以降、排卵実行酵素とよぶ)は、長年の間、不明なままであった。ところが、近年我々のメダカを用いた排卵研究から、メダカの排卵実行酵素が同定され、排卵時の濾胞溶解(破裂)メカニズムも明らかにされた⁽¹⁾。また、この排卵モデルの正しさが卵巣の器官培養系を用いた研究からも確認された⁽²⁾。さらに、その後の排卵研究からウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子(uPA)/プラスミン系が、排卵に関与する可能性があることも明らかとなった。これらの解析から、プラスミン産生の制御タンパク質である内在性の uPA 阻害タンパク質 PAI-1 と濾胞組織溶解の最終段階で働く MT2-MMP(排卵実行酵素の1つ)が排卵の key enzyme であること、そして、これらの因子は共に排卵直前に劇的に誘導されることが判明した。また、これら2因子の誘導には、黄体形成ホルモン(LH)により誘導される核内プロゲスチン受容体(nPR)が関与する可能性があることも示唆されていた。

参考文献

- (1) Ogiwara et al. PNAS 2005 102:8442-8447.
- (2) Ogiwara et al. Zool. Sci. 2010 27(9):762-767.

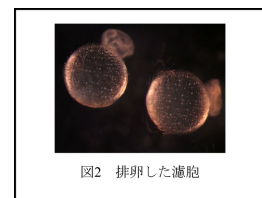
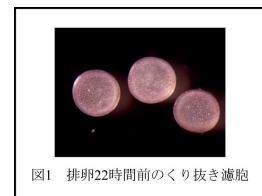
2. 研究の目的

本研究では、排卵メカニズムが分子レベルで明らかになっているメダカを用いて、排卵実行酵素 MT2-MMP と排卵関連因子である PAI-1 の発現誘導機構を明らかにし、排卵(濾胞破裂)の内分泌制御メカニズムについて、そのシグナリング経路を含めた全体像を明らかにすることを目的とした。具体的には、以下に示す3つの課題について取り組んだ。

排卵関連遺伝子の発現誘導に関与する nPR の発現誘導機構の解明
nPR のリガンドである卵成熟誘起ホルモン(17 α , 20 β -DHP)産生酵素の発現解析
nPR による MT2-MMP および PAI-1 の発現誘導機構の解明

3. 研究の方法

メダカは、一定の温度(26-27℃)と一定の明暗周期(明期 14 時間、暗期 10 時間)下で飼育することにより、暗期から明期に変わるタイミングで毎日排卵することが知られている。本研究では、この時間を排卵予定時刻 0 時間とした。排卵予定時刻より前に卵巣から濾胞(卵母細胞が濾胞細胞層に包まれた状態)を摘出し、培養液中で培養することにより、*in vitro* で排卵させることが可能である(生体外排卵培養系)。本研究では、この培養系を用いて、種々の実験を行った。排卵予定時刻の 22 時間前(この時間ではまだ LH の作用を受けていない)に卵巣から濾胞をくり抜き(図 1)、リコンビナントメダカ LH と共に種々の阻害剤存在化で培養後、排卵の有無(図 2)や nPR、MT2-MMP、PAI-1 の mRNA およびタンパク質の発現を調査した。



本研究では、この培養系を用いて、種々の実験を行った。排卵予定時刻の 22 時間前(この時間ではまだ LH の作用を受けていない)に卵巣から濾胞をくり抜き(図 1)、リコンビナントメダカ LH と共に種々の阻害剤存在化で培養後、排卵の有無(図 2)や nPR、MT2-MMP、PAI-1 の mRNA およびタンパク質の発現を調査した。

上記の発現阻害実験から、誘導に関与する候補因子の絞り込みを行い、選出された因子について、排卵前濾胞における活性化のタイミングやリン酸化パターンなどの調査を行った。また、クロマチン免疫沈降法(ChIP 法)を用いて、候補転写因子の関与について調査した。

MT2-MMP または PAI-1 を誘導する際、nPR と複合体を形成し、協調して機能する因子

(cofactor) を探索するために、濾胞の抽出液を用いて共免疫沈降法を行った。哺乳類での報告をもとに、nPR と相互作用する可能性が高い因子について、濾胞における mRNA およびタンパク質の発現を調査し、発現が確認できた因子について、nPR との相互作用を解析した。

4. 研究成果

本研究により、図 3 に示した nPR および MT2-MMP、PAI-1 の誘導モデルを提唱するに至った。

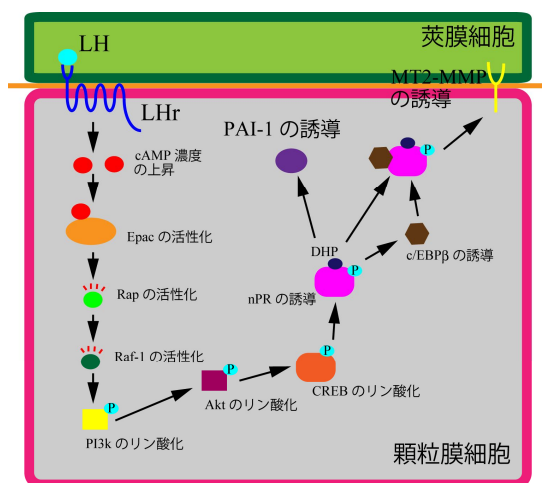


図 3 MT2-MMP および PAI-1 の誘導機構

培養系を用いた研究から、nPR 誘導に関する可能性がある因子を絞り込み、それらの因子について、活性化の有無やリン酸化の時期を調査した結果、図 3 に示すシグナリング経路を突き止めた。排卵予定時刻の 18 時間程度前に LH が排卵前濾胞に作用すると LH 受容体を介して、cAMP の上昇、Epac、Rap、Raf-1 の活性化、PI3k のリン酸化(活性化)、Akt のリン酸化(活性化)が順次おこり、活性化された Akt により CREB がリン酸化(活性化)され、nPR が誘導されるというモデルである。

一方、誘導された nPR は、c/EBPβ、PAI-1、MT2-MMP の誘導に関与することも突き止めた。これら 3 因子は、共に LH により誘導されることが培養系を用いた解析から明らか

となり、さらに ChIP 解析から nPR により誘導されることが判明した。nPR により誘導された c/EBPβ が nPR と複合体を形成することが共免疫沈降法を用いた解析から判明し、nPR と c/EBPβ が相互作用することで MT2-MMP の誘導に関与することが示唆された。なお、c/EBPβ、PAI-1 も nPR によって誘導されるが、その詳細な誘導メカニズムについては未解明であり、さらなる研究が必要である。

nPR のリガンドである卵成熟誘起ホルモン (17α, 20β-DHP) の産生酵素の発現についても解析を行った。3β-HSD と 20β-HSD の抗体を作製し、24 時間の排卵周期におけるタンパク質の発現変動を調査したところ、両因子ともほぼ一定の発現をしていることが明らかとなった。17α, 20β-DHP は排卵前 12 時間前後で急激に産生されることから、今回解析した酵素とは別の産生酵素がこのホルモンの産生のタイミングに重要な役割を担っている可能性が高いと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

1. Hagiwara A., Ogiwara K., Katsu Y., Takahashi T. "Luteinizing hormone-induced expression of Ptger4b, a prostaglandin E2 receptor indispensable for ovulation of the medaka *Oryzias latipes*, is regulated by a genomic mechanism involving nuclear progesterin receptor." Biol. Reprod. 2014, In press (査読有)
2. Takahashi T., Fujimori C., Hagiwara A., Ogiwara K. "Recent advances in the understanding of teleost medaka ovulation: The roles of proteases and prostaglandins." Zoolog. Sci. 2013, 30(4):

239-247. DOI:

10.1095/biolreprod.111.093880 (査読有)

3. Ogiwara K., Fujimori C., Rajapakse S., Takahashi T. "Characterization of luteinizing hormone and luteinizing hormone receptor and their indispensable role in the ovulatory process of the medaka." PLOS ONE 2013 DOI: 10.1371/journal.pone.0054482 (査読有)
4. Fujimori C., Ogiwara K., Hagiwara A., Takahashi T. "New evidence for the involvement of prostaglandin receptor EP4b in ovulation of the medaka, *Oryzias latipes*." Mol. Cell. Endocrinol. 2012, 362(1-2):76-84. (査読有)
5. Ogiwara K., Minagawa K., Takano N., Kageyama T., Takahashi T. "Apparent involvement of plasmin in early-stage follicle rupture during ovulation in medaka." Biol. Reprod. 2012, 86(4) 113: 1-10. DOI: 10.1095/biolreprod.111.093880 (査読有)
6. Fujimori C., Ogiwara K., Hagiwara A., Rajapakse S., Kimura A., Takahashi T. "Expression of cyclooxygenase-2 and prostaglandin receptor EP4b mRNA in the ovary of the medaka fish, *Oryzias latipes*: Possible involvement in ovulation" Molecular and Cellular Endocrinology 2011, 332(1-2):67-77. (査読有)

[学会発表] (計 6 件)

1. 荻原克益 「メダカ排卵関連遺伝子の発現に關与する核内プロゲステロン受容体 nPR の発現誘導機構」日本比較内分泌学会、2013 年 10 月 25 日、宮崎市民プラザ (宮崎市)
2. 荻原克益 「nPR によるメダカ排卵酵素 MT2-MMP の発現誘導の解明」日本動物学会、2013 年 9 月 26 日、岡山大学 (岡

山市)

3. 荻原克益 「メダカ排卵酵素 MT2-MMP 誘導の内分泌制御機構」日本動物学会、2012 年 11 月 30 日、福井大学 (福井市)
4. 荻原克益 「A proposed model for molecular mechanism of follicle rupture during medaka ovulation.」Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology、2012 年 3 月 4 日、Sunway Resort Hotel and Spa (マレーシア・クアラルンプール)
5. 荻原克益 「メダカ排卵酵素 MT2-MMP の発現誘導に關与する nPR の発現誘導 - 新規誘導経路の発見」日本比較内分泌学会、2011 年 11 月 23 日、都道府県会館 (東京都千代田区)
6. 荻原克益 「メダカ卵巣におけるメラトニン生合成酵素の発現解析」日本動物学会、2011 年 9 月 21 日、旭川市大雪アリーナ (旭川市)

[産業財産権]

取得状況 (計 1 件)

名称 : MODIFIED ENTEROPEPTIDASE POLYPEPTIDES.

発明者 : Ogiwara, K. Takahashi, T.

権利者 : 北海道大学

種類 : 特許権

番号 : 8,013,137 号

取得年月日 : 2011 年 9 月 6 日

国内外の別 : 国外 (米国)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

荻原 克益 (OGIWARA, Katsueki)

北海道大学・大学院理学研究院・助教

研究者番号 : 00422006