

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24247010

研究課題名(和文)メダカ排卵の内分泌制御機構の解明と排卵/卵成熟の関連性の実証

研究課題名(英文)Ovulation in medaka: Endocrine regulation and the relation with the event of oocyte maturation

研究代表者

高橋 孝行 (Takahashi, Takayuki)

北海道大学・理学(系)研究科(研究院)・特任教授

研究者番号：80197152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,100,000円

研究成果の概要(和文)：メダカ排卵濾胞の*in vitro*実験系を用いて、排卵時に作動する排卵関連遺伝子(MT2-MMPおよびプロスタグランジンE2受容体EP4b)の発現誘導機構を調べた。排卵に伴うMT2-MMPおよびEP4bの発現誘導は、排卵濾胞の顆粒膜細胞がLH刺激に応答して起こる。この一連のプロセスでは、最初に転写因子nPRの発現が起こり、続いてnPRを含む複数の転写因子がこれらの遺伝子の発現に関与することを明らかにした。また、ギャップ結合阻害剤カルペノキソロンを利用した実験結果から、顆粒膜細胞でのMT2-MMPの発現には卵細胞と顆粒膜細胞間のギャップ結合を介した分子的連携が必要であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Using *in vitro* ovulation system established for medaka ovarian follicles, we investigated the mechanism by which ovulation-related genes/proteins, membrane type-2 matrix metalloproteinase (MT2-MMP) and prostaglandin E2 receptor subtype (EP4b) were induced at ovulation. Expression of both genes/proteins was under the control of LH. Our data indicated that LH induced the expression of a transcription factor nuclear progesterin receptor (nPR) in the granulosa cells and that nPR, together with other transcription factors, played roles in the subsequent expression of MT2-MMP and EP4b. We next examined if a communication between granulosa cells and the oocyte in the follicles may be important for successful ovulation. Preovulatory follicles were treated with carbenoxolone, a gap-junction inhibitor, using *in vitro* ovulation system. We found strong inhibition of MT2-MMP expression by the treatment, indicating that ovulation would be influenced by oocyte maturation event occurring in the oocyte.

研究分野：生殖生物学

キーワード：排卵 メダカ 内分泌制御

1. 研究開始当初の背景

排卵現象は生殖生物学の重要課題として、主に、哺乳類で活発に研究が行われてきた。すでに膨大な知見が蓄積されているが、排卵を司る排卵酵素の特定には至っていない等、今なお肝心な点は未解決のままである。近年、哺乳類以外の動物を材料として、生殖生物学的研究が行われるようになり、脊椎動物の生殖が共通の内分泌制御のもとで進行することが明らかになってきた。メダカやゼブラフィッシュといった魚類の排卵が、哺乳類と同様に、脳下垂体ホルモンである黄体形成ホルモン(LH)により引き起こされることは、今や、共通の認識となっている。そこで脊椎動物全般に通底する排卵機構の解明に、in vitro 排卵実験系が利用できる魚類が注目されるようになった。実際、申請者らは、メダカを用いて、哺乳類では特定できなかった排卵酵素を、世界に先駆けて、同定することに成功した。その後、メダカを用いた排卵研究は一気に進展した。しかし、全容の解明には、今なお残されている課題の解決が必要である。具体的には、排卵を制御する内分泌機構の解明は急務である。また、脊椎動物において排卵とともに進行する卵成熟との関連性を明らかにすることも重要課題として残されている。

2. 研究の目的

脊椎動物の卵巣は卵を育み放出(排卵)する。最近、メダカを用いた研究によって、排卵の実行に関わる数種の遺伝子/タンパク質が「排卵責任遺伝子/タンパク質」として同定され、さらに、それらの分子が排卵時に果たす役割と作用機序が明らかにされて、排卵に関する知識は格段に深まった。本研究では、「排卵責任遺伝子/タンパク質」が黄体形成ホルモン(LH)誘導性であることに着目し、それらの発現誘導の背景にある内分泌制御機構を解明する。加えて、「排卵責任遺伝子/タンパク質」の誘導に必須の卵由来因子の探索・同定・機能解析を通して、排卵と卵成熟の関連性について実証する。これらの知見を総合して、メダカの排卵機構の全容を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) LH による nPR (転写因子) の発現誘導機構

申請者らは、メダカ排卵濾胞における内分泌制御機構、特に排卵実行に必須のタンパク質(MT2-MMP と EP4b) の発現制御機構の解明に取り組んできた。その結果、MT2-MMP と EP4b の発現は LH により誘導されること、さらに LH サージを受けた排卵濾胞の顆粒膜細胞において、細胞内 cAMP レベルの上昇の後に転写因子 nPR が誘導されることが示唆された。また、このプロセスでは、さまざまな因子が関与することも示唆されている。そこで、「LH サージ→nPR 誘導」のプロセスの

全容を明らかにすることを目指す。この目的を達成するために、排卵濾胞を用いた in vivo および in vitro 排卵実験系を利用して、遺伝子およびそのタンパク質の詳細な発現解析を行うとともに、適切な市販の阻害剤の影響を調査することによって、関与する可能性のある種々の因子の絞り込みと同定を行う。

(2) nPR (転写因子) による MT2-MMP (排卵酵素) および EP4b (PGE2 受容体) の発現誘導機構

nPR タンパク質の発現量は、排卵前 12 時間に排卵予定の濾胞で最大になり、nPR はこの時期に DHP (卵成熟誘起ホルモン(MIH)と呼ばれるステロイドホルモン) と結合して転写因子となると予想される。この因子(nPR/DHP 複合体、ホモ 2 量体) は MT2-MMP および EP4b 遺伝子を間接的に誘導することがこれまでの実験から推定された。すなわち、nPR はまず別の転写因子 X を誘導し(一次応答反応)、その転写因子 X が次に MT2-MMP 及び EP4b を誘導する(二次応答反応)というプロセスである。そこで、喫緊の課題である転写因子 X の正体を明らかにすることを目指す。この目的を達成するために、先の(1)と同様に、排卵濾胞を用いた in vivo および in vitro 排卵実験系の利用、遺伝子およびそのタンパク質の詳細な発現解析、阻害剤の添加がもたらす遺伝子/タンパク質の発現変化の解析を通して、関与する転写因子を特定する。

(3) MT2-MMP と EP4b の発現に必須の卵由来因子の探索・同定・作用機構

排卵予定の濾胞の顆粒膜細胞に発現する MT2-MMP と EP4b の遺伝子発現に、卵細胞由来の因子が必要であることが示唆されている。この因子は、排卵前 12~7 時間に、卵-顆粒膜細胞の間にあるギャップ結合を通過して卵から顆粒膜細胞に供給されると考えられる。ここでは、上記の予備実験の結果の正否を確かめることと、ギャップ結合の正体の解明、および通過すると推測される低分子化合物(分子量 < 1,000) あるいはイオンについての情報を得ることを目指す。この目的を達成するために、排卵濾胞を用いた in vitro 排卵実験系を利用する。

4. 研究成果

(1) LH による nPR (転写因子) の発現誘導機構

メダカ卵巣から取り出した排卵予定濾胞を in vitro 培養系に移しても排卵させることができる「in vitro 排卵実験系」を用い、これに種々の解析法を組み合わせた解析によって、メダカ排卵の実行過程で作動する細胞内情報伝達の解明に取り組んだ。本研究により、脳下垂体ホルモン LH が顆粒膜細胞の細胞膜で受容されてから nPR (転写因子) の発現誘導は、「LH→LH 受容体→アデニル酸シクラー

ゼ活性化→細胞内 cAMP 濃度上昇→Epac1 活性化→Rap1 活性化→PI3K 活性化→AKT 活性化→CREB リン酸化→核内受容体 nPR 発現」というプロセスで起こることが判明した。この経路の他に、補助的経路として Raf1 や STAT3 が関与するプロセスも作動することが示唆された。

(2) nPR (転写因子) のよる MT2-MMP (排卵酵素) および EP4b (PGE2 受容体) の発現誘導機構

LH が顆粒膜細胞の細胞膜で受容されてから nPR が発現誘導された後、MT2-MMP が発現するプロセスについて調べた。その結果、nPR、c/EBPb および AP-1(c-Jun と Fos11a の複合体)の少なくとも3種類の転写因子が必要であることが明らかになった。一方、EP4b の発現誘導には nPR が必須であることを実証した。EP4b の発現に nPR 以外の転写因子が必要かどうかについては明らかにできなかったため、今後の課題として残された。

(3) MT2-MMP と EP4b の発現に必須の卵由来因子の探索・同定・作用機構

体内で LH サージを受けた(すなわち、卵成熟と排卵のスイッチが入った)排卵濾胞を、in vitro でギャップ結合阻害剤カルベノキソロン(CBX)とともにインキュベートすると、排卵が強く阻害され、かつ、顆粒膜細胞に発現誘導されるべき排卵酵素 MT2-MMP の発現が抑制されることを確認した。これは、ギャップ結合の閉塞により、卵細胞と顆粒膜細胞の間の情報が遮断されたことによる効果と理解される。一方、メダカ排卵に必須の働きをするプロスタグランジン E2 受容体(EP4b)の発現については、カルベノキソロン処理による発現抑制効果は、MT2-MMP の発現抑制効果ほど顕著には現れなかった。次に、卵-顆粒膜細胞の間にあるギャップ結合の正体を明らかにするために、排卵濾胞に発現するコネキシン(ギャップ結合構成分子)の種類を決定した。24時間の排卵周期を確立しているメダカの排卵予定濾胞を、排卵の22時間、12時間前、2時間前の3点で単離し、それぞれの濾胞に発現する遺伝子を次世代シーケンス解析法により網羅的に解析した。その結果、メダカがもつコネキシン遺伝子19個のうち5個(Cx30.3、Cx34.4、Cx35.4、Cx34.5、Cx43.4)の発現が示唆されたが、real-time RT-PCR による解析により、3個(Cx30.3、Cx34.4、Cx43.4)のコネキシン mRNA が、卵細胞と顆粒膜細胞間の因子の移動が予想される時期に、発現していることが確認された。今後、排卵周期の時間経過とともに、ギャップ結合の構成に貢献する Cx30.3、Cx34.4、Cx43.4 の程度が変動するかどうかを調べ、排卵と卵細胞の連携に関わる因子の移動に影響を及ぼすか否かについて考察する必要がある。

排卵濾胞において卵-顆粒膜細胞の間に

あるギャップ結合を通過すると推測される低分子化合物(分子量<1,000)あるいはイオンについての情報を得るための実験は試行錯誤の段階にあり、再現性のある結果を得るまでに至っていない。将来の解決すべき課題として残されている。

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)

本科研費に関わる研究発表論文は、以下の論文リストのうち No.1, No.2, No.5, No.8, および No.9 である。現在、本科研費に関連する投稿中の論文1編がある。

また、本研究課題とは直接的な関係はないが、以前からの課題でこの研究期間中に完成した成果・発表についても、以下のリストに記載した。

[雑誌論文](計10件)

1. Ogiwara, K. and Takahashi, T. A Dual Role for Melatonin in Medaka Ovulation: Ensuring Prostaglandin Synthesis and Actin Cytoskeleton Rearrangement in Follicular Cells. *Biol. Reprod.* 査読有, 94(3):64, 1-15 (2016) doi: 10.1095/biolreprod.115.133827
2. Hagiwara, A., Ogiwara, K. and Takahashi, A. Expression of Membrane Progesterone Receptors (mPRs) in the Granulosa Cells of Medaka Preovulatory Follicles. *Zool. Sci.* 査読有, 33(1): 98-105 (2016) doi: http://dx.doi.org/10.2108/zs150093.
3. Ogiwara, K., Hagiwara, A., Rajapakse, S. and Takahashi, T. The Role of Urokinase Plasminogen Activator and Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Follicle Rupture During Ovulation in the Teleost Medaka. *Biol. Reprod.* 査読有, 92(1): 10, 1-17 (2015) doi: 10.1095/biolreprod.114.121442
4. Rajapakse, S., Ogiwara, K. and Takahashi, T. Characterization and Expression of Trypsinogen and Trypsin in Medaka Testis. *Zool. Sci.* 査読有, 31(12), 840-848 (2014) doi: 10.2108/zs140111
5. Hagiwara, A., Ogiwara, K., Katsu, Y. and 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 Progesterone Receptor. *Biol. Reprod.* 査読有, 90(6), 126, 1-14 (2014) doi: 10.1095/biolreprod.113.115485
6. Takahashi, T., Fujimori, C., Hagiwara, A. and Ogiwara, K. Recent Advances in the Understanding of Teleost Medaka Ovulation: The Roles of Proteases and Prostaglandins. *Zool. Sci.* 査読有, 30, 239-247 (2013)

Review

doi: <http://dx.doi.org/10.2108/zsj.30.239>

7. Yoneda, R., Takahashi, T., Matsui, H., Takano, N., Hasebe, Y., Ogiwara, K., Kimura, A.P. Three Testis-specific Paralogous Serine Proteases Play Differential Roles in Murine Spermatogenesis and Are Involved in Germ Cell Survival during Meiosis. *Biol. Reprod.* 査読有, 88(5):118, 1-14 (2013)
doi: 10.1095/biolreprod.112.106328.
8. Ogiwara, K., Fujimori, C., Rajapakse, S. and Takahashi, T. Characterization of Luteinizing Hormone and Luteinizing Hormone Receptor and Their Indispensable Role in the Ovulatory Process of the Medaka. *PLoS ONE* 査読有, 8(1):e54482 (2013).
doi: 10.1371/journal.pone.0054482
9. 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.* 査読有, 362(1-2):76-84 (2012)
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2012.05.013>
10. Ogiwara, K., Minagawa, K., Takano, N., Kageyama, T. and Takahashi, T. Apparent Involvement of Plasmin is Involved in Early-stage Follicle Rupture during Ovulation in Medaka. *Biol. Reprod.* 査読有, 86(4):113, 1-10 (2012)
doi: 10.1095/biolreprod.111.093880

〔学会発表〕(計 28 件)

1. Takahashi, T. and Ogiwara, K. 「Medaka is a good experimental model for studies of vertebrate ovulation」International Meeting on Aquatic Model Organisms for Human Disease and Toxicology Research」2016 年 3 月 18-19 日,基礎生物学研究所 岡崎コンフェレンスセンター 愛知県・岡崎市
2. 洲鎌なつ, 荻原克益, 高橋孝行 「排卵と卵成熟は communication をとっているか? ~排卵における Gap junction の関与~」第 88 回日本生化学会大会, 2015 年 12 月 1 日~4 日, 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)
3. 洲鎌なつ, 荻原克益, 高橋孝行 「メダカ排卵濾胞における卵成熟と排卵の関係」第 86 回日本動物学会, 2015 年 9 月 17 日~19 日, 朱鷺メッセ: コンベンションセンター (新潟県・新潟市)
4. 荻原克益, 高橋孝行 「メダカ排卵においてメラトニンは PGE2 産生とアクチン繊維の再構築に関与する」第 86 回日本動物学会, 2015 年 9 月 17~19 日, 朱鷺メッセ: コンベンションセンター (新潟県・新潟市)
5. 高橋孝行, 寶柳みゆき, 荻原克益 「メダカの排卵誘導の背景にある内分泌現象」日本動物学会北海道支部第 60 回大会,

2015 年 8 月 22 日,北海道大学理学部(北海道・札幌市)

6. 洲鎌なつ, 荻原克益, 高橋孝行 「メダカ排卵における卵成熟と排卵の連関性に関する研究」日本動物学会北海道支部第 60 回大会, 2015 年 8 月 22 日, 北海道大学理学部 (北海道・札幌市)
7. 高橋孝行 「脊椎動物の排卵研究: メダカをモデル生物として解明されたこと」(特別総説講演)日本生化学会北海道支部第 52 回例会, 2015 年 7 月 17 日, 北海道大学フロンティア応用科学研究棟 鈴木章ホール (北海道・札幌市)
8. Takayuki Takahashi 「Tiny freshwater fish medaka (*Oryzias latipes*) tell us a lot about ovulation of vertebrate animals」Lecture, University of Peradeniya, May 27, 2015 Kandy (Sri Lanka)
9. 萩原茜, 荻原克益, 高橋孝行 「Involvement of two kinds of progesterin hormone receptors in the expression of the prostaglandin receptor EP4b necessary for medaka ovulation」第 39 回日本比較内分泌学会大会 2014 年 11 月 7-9 日,基礎生物学研究所 (愛知県・岡崎市)
10. 萩原茜, 荻原克益, 洲鎌なつ, 高橋孝行 「メダカ濾胞における膜型プロゲステロン受容体(mPR)の排卵への役割」第 85 回日本動物学会, 2014 年 9 月 11-13 日, 東北大学川内北キャンパス(宮城県・仙台市)
11. 熊田傑, 荻原克益, 高橋孝行 「メダカの濾胞成長, 卵成熟及び排卵への成長ホルモンの関与」第 85 回日本動物学会, 2014 年 9 月 11-13 日, 東北大学川内北キャンパス (宮城県・仙台市)
12. 荻原克益, 藤森千加, 高橋孝行 「メダカ排卵時における PGE2 の役割と PGE2 により活性化されるシグナルカスケードの解析」第 85 回日本動物学会, 2014 年 9 月 11-13 日, 東北大学川内北キャンパス (宮城県・仙台市)
13. 萩原茜, 松村麻未, 荻原克益, 高橋孝行 「メダカ排卵必須遺伝子 EP4b の発現誘導経路における MAPK シグナルカスケードの機能解析」第 38 回日本比較内分泌学会, 2013 年 10 月 24-26 日, 宮崎市民プラザ (宮城県・宮崎市)
14. 荻原克益, 寶柳みゆき, 萩原茜, 高橋孝行 「メダカ排卵関連遺伝子の発現誘導に関与する核内プロゲステロン受容体 nPR の発現誘導機構」第 38 回日本比較内分泌学会, 2013 年 10 月 24-26 日, 宮崎市民プラザ (宮城県・宮崎市)
15. 寶柳みゆき, 荻原克益, 高橋孝行 「メダカ排卵前濾胞における Epac/Rap 経路の nPR 発現誘導への関与」第 84 回日本動物学会, 2013 年 9 月 26-28 日, 岡山大学津島キャンパス (岡山県・岡山市)
16. 萩原茜, 荻原克益, 高橋孝行 「メダカ排卵に必須のプロスタグランジン受容体

- EP4b の LH による発現誘導機構」第 84 回日本動物学会, 2013 年 9 月 26-28 日, 岡山大学津島キャンパス(岡山県・岡山市)
17. 荻原克益, 高橋孝行「nPR によるメダカ排卵酵素 MT2-MMP の誘導機構の解明」第 84 回日本動物学会, 2013 年 9 月 26-28 日, 岡山大学津島キャンパス(岡山県・岡山市)
 18. 熊田傑, 荻原克益, 高橋孝行「メダカ卵巣における成長ホルモン受容体(GHr)及びプロラクチン受容体(PRLr)の発現解析」第 84 回日本動物学会, 2013 年 9 月 26-28 日, 岡山大学津島キャンパス(岡山県・岡山市)
 19. 松村麻未, 萩原茜, 荻原克益, 高橋孝行「メダカ排卵時におけるプロスタグランジン受容体 EP4b の発現制御に関わる因子の研究」日本動物学会北海道支部第 58 回大会, 2013 年 8 月 24 日, 北海道教育大学札幌校(北海道・札幌市)
 20. 高橋孝行「排卵の研究:なぜメダカを用いたのか?」(特別講演)日本動物学会北海道支部第 58 回大会, 2013 年 8 月 24 日, 北海道教育大学札幌校(北海道・札幌市)
 21. Akane Hagiwara, Katsueki Ogiwara, Yoshinao Katsu, Takayuki Takahashi 「Nuclear progesterone receptor is involved in the LH-induced expression of EP4b, a prostaglandin E₂ receptor indispensable for ovulation of the medaka」The 17th International Congress of Comparative Endocrinology, July 15-19th, 2013, Barcelona (Spain)
 22. Takayuki Takahashi, Chika Fujimori, Akane Hagiwara, and Katsueki Ogiwara 「Roles of proteases and prostaglandins in follicle rupture during ovulation in the medaka」The 17th International Congress of Comparative Endocrinology, July 15-19th, 2013, Barcelona (Spain)
 23. 藤森千加, 荻原克益, 高橋孝行「メダカ及びゼブラフィッシュ卵巣における PG 受容体発現の比較解析」日本比較内分泌学会第 37 回大会, 2012 年 11 月 29 日-12 月 1 日, 福井大学(福井県・福井市)
 24. 荻原克益, 高橋孝行「メダカ排卵酵素 MT2-MMP 誘導の内分泌制御機構」日本比較内分泌学会第 37 回大会, 2012 年 11 月 29 日-12 月 1 日, 福井大学(福井県・福井市)
 25. 寶柳みゆき, 藤森千加, 荻原克益, 高橋孝行「メダカの排卵に必須な因子 nPR の誘導に関する Epac/Rap の発現解析」第 83 回日本動物学会 2012 年 9 月 13-15 日, 大阪大学豊中キャンパス(大阪府・豊中市)
 26. 藤森千加, 荻原克益, 岸川拓斗, 高橋孝行「メダカ排卵時における PG-アクチン重合調節経路の解析」第 83 回日本動物学

- 会, 2012 年 9 月 13-15 日, 大阪大学豊中キャンパス(大阪府・豊中市)
27. 荻原克益, 藤森千加, 高木幹太, 高橋孝行「メラトニンはメダカ排卵時に PGE₂ 産生系の酵素 cPLA₂ の発現に關与する」第 83 回日本動物学会, 2012 年 9 月 13-15 日, 大阪大学豊中キャンパス(大阪府・豊中市)
 28. 藤森千加, 岸川拓斗, 荻原克益, 高橋孝行「メダカ排卵時に起こるアクチンフィラメントの重合調節機構」日本動物学会北海道支部第 57 回大会, 2012 年 8 月 25 日, 北海道大学理学部(北海道・札幌市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 孝行(TAKAHASHI TAKAYUKI)
北海道大学・大学院理学研究院・特任教授
研究者番号: 80197152

(2)研究分担者

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

(3)連携研究者

なし