

令和元年6月10日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04810

研究課題名(和文)メダカにおける排卵と卵成熟の同調メカニズムの解明

研究課題名(英文) A study on medaka ovulation with an emphasis on the relation with oocyte maturational event

研究代表者

高橋 孝行 (Takahashi, Takayuki)

北海道大学・理学研究院・名誉教授

研究者番号：80197152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、「排卵」と「卵成熟」の関係、特に、「排卵」の実行過程に「卵成熟」の進行がどのように関わるかについて、硬骨魚類のメダカを用いて調べた。「排卵」と「卵成熟」の連携には濾胞細胞と卵細胞の間に存在するギャップ結合の役割の可能性について検討した結果、メダカの排卵に必須の濾胞壁溶解酵素であるMT2-MMPの発現がギャップ結合阻害剤により抑制されることを見出し、さらにギャップ結合阻害剤によるMT2-MMPの発現抑制のメカニズムを明らかにした。加えて、細胞間のコミュニケーションに関わると予想されるギャップ結合構成単位のコネキシン分子の数種を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生殖生物学の重要課題のひとつである排卵現象は、これまで主に哺乳類を用いて活発に研究されてきた。100年以上の長い研究の歴史を背景に膨大な知見が蓄積されているが、今なお多くの未解明の課題が残されている。近年になって、魚類を用いた排卵研究が展開されるようになり、脊椎動物の排卵に共通するメカニズムがあることが明らかになった。脊椎動物の排卵研究で残された大きな課題は卵成熟と排卵の連関性の解明である。本研究成果は、我国発祥のモデル生物であるメダカを用いて、「排卵と卵成熟はどのように連関するのか？」という永年の疑問の解明に資するものである。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this project was to examine whether ovulation and oocyte maturation, which are both triggered by the ovulatory surge of LH in vertebrates, would be closely linked, and if any, what would be the mechanism by which the two processes occur in harmony? To this end, we used an in vitro ovulation system established for medaka ovarian follicles. Assuming that gap junctional communication between follicle cells and the oocyte and/or between two neighboring follicle cells might play an important role in ovulating follicles, we examine the effect of gap junction blockers on ovulation and oocyte maturation. In vitro follicle ovulation, but not oocyte maturation, was strongly inhibited by the blockers. The inhibition of follicle ovulation by gap junction blockers was demonstrated to be accompanied by the inhibition of MT2-MMP expression. In addition, we suggest that several connexin species may be involved in the gap junctional communication for successful ovulation.

研究分野：生殖生物学

キーワード：メダカ 排卵 卵成熟 ギャップ結合

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

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、哺乳類では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、排卵に関わる細胞内情報伝達系の作動様式、排卵過程でのプロスタグランジンやメラトニンの役割等が明らかにされ、メダカを用いた排卵研究は一気に進展した。しかし、今なお解明されていない課題のひとつとして、「排卵と卵成熟の進行に密接な連携があるか」という問題がある。

2. 研究の目的

有性生殖を行うほとんど全ての動物(無脊椎動物と脊椎動物を問わず)の卵巣では、卵細胞は体細胞に囲まれて(濾胞組織として)成長し、やがて「排卵」されて受精する。最近、メダカを用いる研究が展開されるようになり、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」として同定されたばかりでなく、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るに及んで、排卵に関する知識は格段に深まった。脊椎動物の排卵は黄体形成ホルモン(LH)により誘起されるが、排卵に先立って、例外なく、「卵成熟」も誘起される。動物界に広く保存されている「卵成熟」と「排卵」の連動現象は、両者の間に密接なコミュニケーションがあることを示唆する。しかし、両者の連関性について分子レベルで解析した研究は皆無である。本研究では、「排卵」と「卵成熟」の関係、特に、「排卵」の実行過程に「卵成熟」の進行がどのように関わるかについて明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

研究代表者らの研究室では、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」を確立している。この実験系を用い、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詳細を明らかにした。さらにこの手法を用いて、ギャップ結合阻害剤であるカルベノキソロン(CBX)がメダカ排卵を阻害することを発見した。そこで本研究では、以下の方法により課題解決に取り組んだ。

(1) メダカ排卵の律速酵素である MT2-MMP の発現を阻害する CBX の作用

MT2-MMP 発現を制御する転写因子 nPR (核内プロゲスチン受容体) の一次応答遺伝子/タンパク質 (c/EBP β , c-Jun, Fos11a: いずれも転写因子) の発現に対する CBX 作用の解析

転写因子 nPR の一次応答遺伝子/タンパク質 (c/EBP β , c-Jun, Fos11a) の発現に対し、排卵濾胞の CBX 処理がどのような影響を与えるかについて調べることとした。CBX 処理を施した排卵濾胞と無処理排卵濾胞からそれぞれ RNA を抽出し、これらの転写因子の発現レベルを Real-time RT-PCR により定量した。すでに、研究代表者らはメダカ c/EBP β , c-Jun, Fos11a の特異的抗体を作製済みであるので、ウェスタンブロット解析によりタンパクレベルの解析も行う計画を立てた。

c/EBP β , c-Jun, Fos11a のリン酸化状態の解析

これらの転写因子の機能はリン酸化状態に依存することが知られている。そこで、CBX 処理がこれら転写因子のリン酸化を阻害するかどうかについて検討した。これには、当該研究室で作製した特異的抗体を免疫沈降用を使用し、沈降したタンパク質のリン酸基検出には市販の抗体を用いた。

(2) CBX 処理 (ギャップ結合の閉塞) によりもたらされる卵細胞と顆粒膜細胞における変化 卵細胞と顆粒膜細胞の間の連携にエキソサイトーシスが関与する可能性についての検討

これまでの実験では、ギャップ結合を介した卵細胞と顆粒膜細胞の間のコミュニケーションの阻害が排卵と排卵酵素の発現を抑制する可能性のあることが示された。しかし、卵細胞からエキソサイトーシスにより分泌される因子が顆粒膜細胞により受容されるという可能性も否定できない。そこで、*in vitro* 排卵実験系を用いて、エキソサイトーシスの阻害剤である「Exo1」が排卵および排卵酵素の発現を抑制するかどうかについて検討した。「Exo1」による阻害効果が無視できないレベルである場合には、ギャップ結合を介した連携機構の解析と平行して、エキソサイトーシスが関与する連携機構についても解析することとした。

メダカ排卵濾胞における卵細胞-顆粒膜細胞の間のギャップ結合を介する色素移動の確認

ギャップ結合の研究においてよく用いられるルシファー・イエローを排卵濾胞の卵細胞に注入し、その色素が時間経過とともに顆粒膜細胞に移動するかどうかの観察を試みた。未処理排卵濾胞において色素の移動が確認できたら、CBX 処理した排卵濾胞に適用し、色素の移動の阻害が起こることを確かめる。メダカ排卵濾胞の卵細胞の中心には巨大な卵黄顆粒が存在するた

め、卵細胞膜のすぐ内側を内張りするように分布する薄い細胞質に色素を正確に注入することは難しいと考えられている。しかし、ギャップ結合の役割の確認には必要な実験であることから、色素導入の成功率が低くてもこの実験には拘泥した。

ギャップ結合を介して移動する候補因子の探索

ギャップ結合を介した両細胞間の連絡に寄与する移動因子は、分子量が 1200 以下とされる。従って、候補因子として、Ca イオンなどのイオン類、cAMP や cGMP などのヌクレオチド類、inositol-3-リン酸(IP3)など、イオンや細胞内情報伝達関連の低分子物質が考えられる。排卵濾胞においては、一方の細胞内にこれらの因子(のすべて、あるいは、いくつか)の産生が高まり、ギャップ結合を通して他方に移動することが予想される。そこで、因子が移動すると予想される時間帯(-12 時間~-6 時間)に注目して、卵細胞と濾胞細胞(顆粒膜細胞と莖膜細胞層からなる)のそれぞれにおいてどのような細胞内変動が見られるかを、未処理排卵濾胞および CBX 処理排卵濾胞を用いて調べることとした。両者のデータの比較によって CBX 処理によりいずれの因子の移動が阻害されたかを推測できると考えた。

(3) コネキシン(ギャップ結合構成分子)の発現

ギャップ結合はその構成単位分子であるコネキシンが 6 個集合して円筒状に並び、コネクソンと呼ばれる中空の構造を形成したものである。隣り合った細胞のコネクソン同士は、頭と頭をつき合わせて細胞質をつなぐチャンネルを作る。コネキシンには多くの相同なファミリータンパク質があるため、動物種によって、あるいは、細胞によって、コネクソンの性質が異なる。本研究の課題を解決する上で、どのようなコネキシンによりコネクソンが形成されるかを知ることが重要である。そこで、メダカ排卵濾胞の卵細胞-顆粒膜細胞間あるいは隣接する 2 つの顆粒膜細胞間に形成されるギャップ結合の構成タンパク(コネキシン)の解析を行った。この課題には本研究開始前からすでに着手していた。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ズ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, Cx34.5, Cx35.4 および Cx43.4)の発現が示唆された。そこでこれらのコネキシンのうち、排卵時の細胞間コミュニケーションに関与している可能性のある分子の同定を目指した。そのために Real-time RT-PCR およびコネキシンに特異的な抗体を利用した免疫組織化学的手法により、それぞれの mRNA およびタンパク質の発現と局在の解析を行った。

4. 研究成果

(1) ギャップ結合阻害剤であるカルベノキソロン(CBX)の作用について

本研究によって得られた結果を要約すると、以下ようになる。

24 時間の排卵周期で排卵するメダカの卵巣から LH サージを受けた排卵予定の濾胞を単離して CBX 存在下で培養すると、卵成熟過程の進行の指標となる卵核胞崩壊は影響を受けないが、排卵は強く阻害される。

CBX 以外の 2 つのギャップ結合阻害剤(mefloquine および flufenamic acid)においても、CBX 処理で観察された結果と同様に、排卵阻害は起こるが卵核胞崩壊は起こらなかった。他方、エキソサイトーシス阻害剤によっては濾胞の排卵阻害は起こらないことを確認した。以上のことから、ギャップ結合が排卵過程で重要な役割を果たしていることが明らかになった。

CBX, mefloquine および flufenamic acid による排卵阻害を受けた濾胞では、メダカの排卵時に濾胞壁分解に関わることが明らかになっている濾胞壁溶解酵素 MT2-MMP の発現が抑制されていた。

MT2-MMP の発現に必須の 4 つの転写因子(nPR, c/EBP β , c-Jun および Fos11a)は、いずれも CBX 処理により発現レベルは影響を受けなかった。しかし、nPR のリン酸化レベルは顕著に低下していた。

CBX 処理により cyclin-dependent protein kinase 9(Cdk9)とその制御因子である cyclin I(Ccni)の発現が抑制されていた。生理的条件下においては、Cdk9 は濾胞細胞に恒常的に発現していたが、Ccni は LH サージにより発現誘導されることが明らかになった。

CBX 処理により nPR のリン酸化が抑制された条件下では、転写因子 nPR が MT2-MMP 遺伝子のプロモーター領域に結合できなくなっており、転写因子として機能しないことを確認した。

以上の結果を踏まえると、メダカの排卵では、CBX および他の 2 つのギャップ結合阻害剤の作用について以下のように説明することが可能である。すなわち、ギャップ結合阻害剤処理排卵濾胞においては、ギャップ結合が閉塞すると LH により排卵濾胞の濾胞細胞に誘導されるべき cyclin I の発現が抑制され、また nPR のリン酸化酵素である cyclin-dependent protein kinase 9 の発現抑制も起こる。そのため nPR のリン酸化過程が進まなくなる。その結果、nPR が MT2-MMP 遺伝子のプロモーター領域に結合できないため発現誘導作用を発揮できない。よって濾胞壁溶解酵素である MT2-MMP が不在が原因となって排卵されないと考えられる。

(2) 排卵時の細胞間コミュニケーションに関わるギャップ結合構成コネキシンについて

本研究において排卵予定濾胞に発現するコネキシンに関して以下のような知見を得た。

次世代シーケンス解析法により、メダカに備わっているコネキシン遺伝子 19 個のうち、5 個 (Cx30.3, Cx34.4, Cx34.5, Cx35.4, および Cx43.4) の発現が示唆されたが、Real-time RT-PCR 解析によって、Cx34.5 と Cx43.4 が排卵濾胞の濾胞細胞層に強く発現するコネキシンであることが判明した。Cx34.5 は 24 時間の排卵周期の前半において優勢に発現しており、排卵時間が近づくと徐々に低下する。他方、Cx43.4 の発現は排卵周期の前半には低い、その後排卵時間に向けて発現が上昇するというパターンを示した。

Cx43.4 に対する特異的抗体を作成し、濾胞における Cx43.4 タンパク質の局在を調べたところ、排卵予定濾胞の濾胞細胞層に存在していた。Cx34.5 に対する抗体は作製できなかったため、タンパク質レベルでの局在解析はできなかった。

上記 (1) に記したように、ギャップ結合の役割として明らかにされた点は、LH サージ後の cyclin I の発現誘導のプロセスに関与することと cyclin-dependent protein kinase 9 の恒常的発現を保証することにより、MT2-MMP 遺伝子の発現に必須の転写因子 nPR をリン酸化することである。この nPR のリン酸化は 24 時間の排卵周期においては、排卵前の 10 時間 ~ 7 時間に起こっていた。この nPR のリン酸化のタイミングを考慮すると、Cx34.5 と Cx43.4 から構成されるギャップ結合はともにメダカの排卵過程に関わる可能性がある。

(3) ギャップ結合の形成場所について

当初、CBX および他の 2 つのギャップ結合阻害剤の作用により排卵が抑制されるという現象は、排卵濾胞の卵細胞 - 濾胞細胞間のギャップ結合の閉塞によるものとの仮説を立てた。これを証明するために、ルシファー・イエローを排卵濾胞の卵細胞に注入し、その色素が時間経過とともに顆粒膜細胞に移動するかどうかの観察を試みた。しかし、この試みは失敗に終わった。現段階では、排卵濾胞の卵細胞 - 濾胞細胞間のギャップ結合ではなく、隣接する濾胞細胞間のギャップ結合が CBX および他の 2 つのギャップ結合阻害剤のターゲットになったのではないかと予想している。実際、この考えを支持する実験結果も得られ始めている。確固たる証拠の提示により隣接する濾胞細胞間のギャップ結合の重要性を確立することは将来の課題として残った。また本研究では、当初、ギャップ結合を介して移動する候補因子の探索と同定も解決すべき課題として掲げたが、この点についても未解決に終わった。

(4) その他

本研究においては、当該研究課題の申請時に魚類を含めた脊椎動物の排卵研究に関する現状と最新の動向について展望するという事も提案した。事実、3 年の研究期間内に総説論文 2 編を公表して当初の目標を達成した。

5. 主な発表論文等

本科研費に直接関わる研究発表論文は、以下の論文リストのうち No.1 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、本科研費がメダカの排卵の仕組みを探ることを基本にしていることから、以下に上げたすべての公表論文は間接的に関連する成果である。研究期間中に発表したこれらの論文を公表する際に必要となった経費は本科研費により賄った。

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Ogiwara, K., Takahashi, T. Nuclear Progesterone Receptor Phosphorylation by Cdk9 Is Required for the Expression of Mmp15, a Protease Indispensable for Ovulation in Medaka. *Cells* 査読有 8:215 (2019) DOI:10.3390/cells8030215
2. Takahashi, T., Hagiwara, A., Ogiwara, K. Follicle Rupture during Ovulation with an Emphasis on Recent Progress in Fish Models. *Reproduction* 査読有 157:R1-R13 (2019) DOI: 10.1530/REP-18-0251 (Review)
3. Takahashi, T., Hagiwara, A., Ogiwara, K. The Roles of Prostaglandins in Vertebrate Ovulation. *Glob. J. Reprod. Med.* 査読有 4(3) 555639 (2018) DOI:10.19080/GJORM.2018.04.555639 (Mini-review)
4. Takahashi, T., Hagiwara, A., Ogiwara, K. Prostaglandins in Teleost Ovulation: A Review of the Roles with a View to Comparison with Prostaglandins in Mammalian Ovulation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 査読有 461:236-247 (2018) DOI: org/10.1016/j.mce.2017.09.019 (Review)
5. Ogiwara, K., Takahashi, T. Involvement of the Nuclear Progesterone Receptor in LH-induced Expression of Membrane Type 2-Matrix Metalloproteinase Required for Follicle Rupture during Ovulation in the Medaka, *Oryzias latipes*. *Mol. Cell. Endocrinol.* 査読有 450:54-63 (2017) DOI:org/10.1016/j.mce.2017.04.016
6. Ogiwara, K., 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
7. Hagiwara, A., Ogiwara, K., 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

〔学会発表〕(計7件)

1. 萩原茜, 洲鎌なつ, 萩原克益, 高橋孝行 「メダカ排卵前濾胞における GAP 結合の機能」第 88 回日本動物学会, 2018 年 9 月 21~23 日, 富山市 富山 (富山県民会館)
2. 萩原克益, 高橋孝行 「メダカ排卵酵素 MT2-MMP 誘導における卵母細胞の関与」第 88 回日本動物学会, 2018 年 9 月 21~23 日, 富山市 富山 (富山県民会館)
3. 高橋孝行 「メダカ排卵酵素発見のその後--脊椎動物の排卵を制御する内分泌機構の多様性と共通性」第 42 回日本比較内分泌学会, 大会実行委員会主催合同シンポジウム「生殖機構の多様性と共通性: 温故知新と渾然一体」, 2018 年 11 月 17~19 日, 奈良市 奈良 (奈良女子大学) 招待講演
4. Takahashi, T., 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, 岡崎 愛知県 (基礎生物学研究所 岡崎コンフェランスセンター) 招待講演
5. Sugama, N., Ogiwara, K., Yamashita, M., Takahashi, T. 「Molecular mechanism of synchronization between oocyte maturation and ovulation in medaka」第 87 回日本動物学会, 2016 年 11 月 17~18 日, 宜野湾市 沖縄 (沖縄コンベンションセンター)
6. Yoshida Y., Ogiwara, K., Yamashita, M., Takahashi, T. 「Comprehensive analyses of genes induced in the preovulatory follicles by growth hormone using teleost medaka」第 87 回日本動物学会, 2016 年 11 月 17~18 日, 宜野湾市 沖縄 (沖縄コンベンションセンター)
7. Ogiwara, K., Takahashi, T. 「Melatonin plays a dual role in medaka ovulation: involvement in PGE2 synthesis and actin cytoskeleton reorganization」第 87 回日本動物学会, 2016 年 11 月 17~18 日, 宜野湾市 沖縄 (沖縄コンベンションセンター)

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 萩原 克益

ローマ字氏名: Ogiwara Katsueki

所属研究機関名: 北海道大学

部局名: 理学研究院

職名: 准教授

研究者番号 (8 桁): 00422006

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。