

令和元年6月20日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07424

研究課題名(和文)動物の排卵開始の刺激因子の解明

研究課題名(英文)A new ovulation inducing factor of sea cucumber

研究代表者

吉国 通庸 (Yoshikuni, Michiyasu)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：50210662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ナマコ類の生殖腺を刺激して排卵・排精を誘起した時の培養液中に、卵成熟(減数分裂の再開を指標)の有無に関わらず排卵を誘起する卵巣由来の排卵誘起因子が存在することを明らかにした。この排卵誘起因子は限外ろ過、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相HPLCを用いた部分精製により、低分子性のイオン性化合物であることが判明したが、化学構造の特定には至っていない。また、セリンプロテアーゼ阻害剤である1mM濃度で作用させると、卵成熟の有無に関わらず排卵を誘起できることを見出した。卵巣組織から分泌される排卵誘起因子とAEBSFが同じ部位に作用しているかについては不明である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

排卵現象は、卵巣内の卵が卵成熟誘起ホルモンの作用で減数分裂を再開し、受精可能となった卵が濾胞組織から放出されることである。減数分裂を再開しない卵(未成熟卵)は排卵されないことから、排卵後に精子と出会う卵は全て受精可能であることを保証する機構と言える。しかし、排卵を始動させる仕組みについては何も判っていない。本課題で、卵の減数分裂の再開の有無に関わらず、排卵機構のみを刺激する活性因子が卵巣組織中に存在することを明らかにした。その化学的実体が判れば、その作用機構の解析を手掛かりに排卵現象の制御機構を明らかにすることが可能となり、排卵異常等の病態の解明が可能となる。

研究成果の概要(英文)：We found a new biological factor to induce ovulation of sea cucumber, *Apostichopus japonicus* and *Holothuria leucospilota*. The factor did not induce any oocyte maturation and induced ovulation of oocytes without resumption of meiosis. The factor was found in an incubation medium where eggs and sperms were released from stimulated gonads. The factor was an ionic compound with a molecular size less than 10,000 Da estimated by methods of ultrafiltration and gel filtration chromatography. It was able to be separated by a reverse-phased HPLC. We also found that a serine protease inhibitor, AEBSF(4-(2-aminoethyl) benzensulfonyl fluoride), induced ovulation without oocyte maturation at 1 mM. Released oocytes retained nuclei and looked as normal. It may indicate that there is some mechanism to initiate ovulation process independent from a physiological state of oocytes. It is still unclear whether a site of action of AEBSF is similar to that of the ovulation-inducing factor found in the study.

研究分野：生殖生物学、比較内分泌学、無脊椎動物学

キーワード：棘皮動物 排卵 卵成熟 生殖 生理活性物質

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

1. 研究開始当初の背景

動物の卵の最終成熟は、始めに生殖腺刺激ホルモンが卵巣に働き、卵巣内で卵を個々に取り巻く濾胞細胞を刺激して開始される。刺激された濾胞細胞は2次ホルモンとしての卵成熟誘起ホルモンを分泌し、この卵成熟誘起ホルモンが卵母細胞を直接刺激することで、受精能を持たない卵母細胞が受精可能な卵細胞へと変化する(卵成熟)。また、卵を包む濾胞細胞層が離脱して成熟した卵細胞を放出する排卵現象は、卵成熟の進行に合わせて生じされると考えられている。排卵現象の素過程については、メダカでは、排卵時に蛋白質分解酵素の作用で濾胞層の特定部分が部分的に分解されて構造的強度が低下し、同時にプロスタグランジンが働くことで濾胞層の収縮と開裂が起こり、その結果として卵細胞が押し出される仕組みが明らかにされている。しかし、排卵現象そのものを開始する刺激因子やその作用機構は全く不明である。

我々は、マナマコの卵成熟誘起機構の解析の過程で、産卵誘発ホルモン“クビフリン”で刺激した卵巣内に、卵母細胞の卵成熟の有無に関わらず、排卵反応のみを発動させる活性を見いだした。従来、排卵現象の開始機構は、個々の卵母細胞を取り巻く濾胞細胞が、卵母細胞の変化をリアルタイムにモニタリングし、卵成熟が順調に進んでいることを確認してから排卵機構を自発的に発動させる。または、生殖腺刺激ホルモンの刺激を受けて卵成熟誘起ホルモンの分泌を行うと共に、それと前後して予め決められた進行表に基づいて排卵機構を自動的に発動させるのであろうと考えられてきた。この場合では、卵母細胞の変化が排卵開始の刺激要因と考えられ、この場合には、生殖腺刺激ホルモンが刺激因子であると考えられることができる。しかし、我々が見出した現象は、卵成熟誘起ホルモンとは異なる未知の排卵誘発因子が存在する事を示している。

卵成熟を起こしていない卵母細胞(未成熟卵母細胞)には受精能が備わっておらず、濾胞細胞の庇護を離れて裸となった未成熟卵母細胞は、やがてアポトーシスなどで死滅すると考えられる。それ故、未成熟卵を排卵させてしまう生理活性の存在は、極めて不可解な生物現象と言える。これまでに、未成熟卵母細胞を排卵させてしまう生理活性に関する報告は無く、我々の見出したマナマコでの現象が初めての例となる。予想される未知の排卵誘発因子とその作用機構を明らかにすることで、この活性因子の生物学的意義を明らかにしたい。

2. 研究の目的

(1) 排卵誘発因子の解明

ヒトデの卵母細胞は数十個ほどの濾胞細胞で覆われている。濾胞細胞は卵表層に点在し、互いに長く伸ばした仮足で繋がっている。この濾胞層には基底膜の様な結合組織は見られず、Caイオンを除くだけで容易に卵表から離れる。その排卵の過程は、卵表から剥がれた濾胞細胞が互いに縮みあい一つの小さな細胞塊となって卵から離脱するものである。一方、ナマコ類の濾胞層は基底膜の裏打ちを持つ丈夫な構造で、ヒトデの濾胞細胞の様に容易に剥がれ落ちることはない。ナマコ類の排卵は、濾胞層に空いた小孔から卵を強引に絞り出すようにして行われる。その時に卵は大きくくびれて変形しながら出てくることから、濾胞層に極めて大きな力が発生している事が窺われる。この排卵の様式は多くの魚類で見られるものとよく似ている。こうした排卵様式では、濾胞層全体に連動した収縮運動や、恐らくそれに前後して起きる様々な反応を協調的に引き起こすことが必須と考えられ、それを制御する何らかの機構が必要であらう。先行研究で検出した排卵のみを誘起する活性因子(排卵誘発因子)は、このような排卵現象の制御機構の発動因子であると考えられる。本研究は、マナマコの卵巣培養液中に検出される排卵誘発因子の化学的実体を明らかにし、動物の排卵開始の分子機構の研究にとって重要な研究基盤を構築することを目的とする。

(2) 卵成熟誘起因子の解明

本課題で解明をめざす排卵誘発因子は卵巣培養海水中に分泌される。この培養海水中には、同時に、クビフリンが卵巣組織に作用してその分泌を刺激する2次因子も含まれている。これら、排卵誘発因子と2次因子は、予備検討から逆相クロマトグラフィーで互いに分離され検出されることが予想されていることから、排卵誘発因子の精製過程で、同時に2次因子の精製を進めることが可能である。生殖腺刺激ホルモンの作用で卵巣から分泌される卵成熟誘起ホルモン(ヒトデでは1-メチルアデニン、脊椎動物ではプロゲステロン類)は、種を越えて広く卵成熟を誘起することが知られている。ナマコ類の2次因子がこの卵成熟誘起ホルモンに相当するものであれば、1-メチルアデニン、プロゲステロン類に次いで、動物界で3番目に明らかとなる卵成熟誘起ホルモンとなる。また、水産業界でマナマコの種苗生産に広く利用されている産卵誘発剤としてのクビフリンは、マナマコに種特異的なホルモンであり、世界的に天然資源の枯渇が懸念されている熱帯性食用ナマコ類には効果を持たない。ナマコ類の卵成熟誘起ホルモンが明らかとなれば、世界的な食用ナマコ類の種苗生産に画期的に産卵誘発剤を提供する事が可能となる。本課題で、排卵開始活性成分の解明と共に、この2次因子の解明を進めたい。

3. 研究の方法

先行研究で、クビフリン刺激で排卵したマナマコ卵巣培養海水中に、排卵開始活性成分と卵

成熟を誘発する2次因子が分泌されること、及び、これら二つの活性成分は逆相クロマトグラフィーで同時に精製が可能であるが、その存在量は極めて微量であることを見だしている。本課題では、これら二つの成分の化学的実体を解明するために、充分量の精製材料を元に大規模精製を計画した。マナマコの産卵期は4~5月であるため、周年の実験を可能とするために、9~10月に産卵期を持つニセクロナマコも材料として用いる予定とした。産卵期に購入したマナマコは、九州大学附属水産実験所において自然海水より3-4度低めに調節した冷却海水中で蓄養することで自然産卵を抑制することが可能で、これにより7月前半まで発達した卵巣を持つ個体を実験に使用することが出来る。ニセクロナマコは沖縄で採集した個体を水産実験所(九州)で蓄養することで、海水温の違いにより、マナマコと同様の理由で自然産卵を抑制して維持する事が可能である。

(1) 卵巣培養液(精製材料)の調製

マナマコの卵巣を1nM程度の産卵誘発ホルモン“クビフリン”と共に一時間ほど室温で培養すると卵成熟と排卵が誘起される。この時の培養液(人工海水)中に、濾胞から分泌され卵母細胞に直接作用すると考えられる卵成熟誘起因子(ヒトでの1-メチルアデニン、脊椎動物のプロゲステン類に相当)と排卵誘発因子が検出される。この培養液をこれら成分の精製の出発材料とした。ニセクロナマコでは、本研究開始時には産卵誘発ホルモンが未同定であったので、同ホルモンが含まれる神経抽出物を使用した。本研究の過程で、クビフリンや神経抽出物を使用しないでも、卵巣組織を培養液中で小型剪刀で切断し小片化する刺激を与えることで、卵成熟と排卵の効果的な誘発が可能であることが明らかとなった。精製過程で、クビフリンの分離位置は既知であったが、ニセクロナマコ神経抽出物中の産卵誘発ホルモン活性の溶出位置が不確定であったため、本課題の後半では、切断刺激による卵成熟・排卵誘発(切断刺激法)のみに切り替えた。排卵誘導後の培養液(卵巣培養液)は、GF/F濾過後、液体窒素で凍結し-80度で保存することで、長期間、生理活性が保持された。精巣組織を卵巣と同様に処理することで、培養液中に同様の活性が検出されることが確認できた。精巣組織では培養液中に多量の精子が遊出してくるので、凍結保存前に多段階の濾過処理で精子を完全に除く処理が必要である。計画当初、大量のマナマコ個体の入手を予定していたが、本課題期間を通して不漁が続く、マナマコは計80個体が入手できたのみであった。ニセクロナマコは産卵期の大型個体50匹を沖縄の業者より購入した。

(2) 排卵誘発因子・卵成熟誘起因子の精製

マナマコ卵巣・精巣培養液をSephadex G-10脱塩用カラムで処理すると、両活性共に高分子画分に溶出された。しかし、同高分子画分を試料として実施したSuperdex 30pgゲル濾過クロマトグラフィーでは、卵成熟誘起活性は分子量2,100-3,300領域に溶出し、排卵誘発活性は低分子塩の溶出領域の後ろに溶出された。排卵誘発因子の溶出遅延はゲルマトリックスと相互作用を起こす性状を持つと判断された。卵成熟誘起活性と排卵誘発活性は、人工海水中でのマナマコ卵巣片を試料と共に培養し、一時間後の卵成熟・排卵の有無を計数するバイオアッセイにより検出した。

ニセクロナマコ卵巣・精巣培養液を、マナマコ試料と同様(Sephadex G-10、Superdex 30pg)に処理し、マナマコと同様の溶出結果を得た。しかし、個体毎の活性の強さを比較すると、マナマコ試料の方が、バイオアッセイ時の段階希釈法で2倍以上の活性度を示した。マナマコ・ニセクロナマコ間で活性成分が同様の化合物であると仮定し、材料個体の入手性に大差が無い場合には、精製にはマナマコを用いた方が良いと思われた。

マナマコ試料を4ロットに分けて、脱塩(Sephadex G-10)ゲル濾過(Superdex 30pg)HPLC(C30逆相クロマトグラフィー:RP-Aqueous G-30)の3段階の液体クロマトグラフィーを実施した(計4回)。内、3ロットは精巣培養液、1ロットは卵巣培養液であった。卵成熟誘起活性は4ロットの内の2ロットでは検出されず、排卵誘起活性は4ロット全てで検出された。卵成熟誘起活性のロット間での検出の有無の原因については、同活性の安定性・含量・アッセイに用いた卵巣の感受性など複数の原因が考えられるが、いずれが主要因であるかは特定できなかった。

HPLCでは水・アセトニトリル・0.1%トリフルオロ酢酸系を用いた直線濃度勾配法で溶出した。排卵誘発活性は20%アセトニトリル付近、卵成熟誘起活性は25-30%アセトニトリル付近で溶出した。排卵誘発活性の測定ではHPLC画分のほぼ半量をバイオアッセイに用いて活性の検定が可能であったが、希釈系列を設定できるほどの活性量は無く、HPLCによる再クロマトグラフィーでは活性が検出できなかった。

マナマコ漁が不漁で契約漁業者からの大量個体の入手ができず、大規模精製が実施出来なかったことから、今後の精製過程の改善のために幾つかの検討を実施した。

大量の試料培養液の処理効率を上げるために、イオン交換法の条件を検討した。Sephadex G-10脱塩カラムを用いて溶媒置換を行い、Mono Q(Cl型)、Mono S(Na型)によるイオン交換クロマトグラフィーを実施した。

排卵誘発活性はpH8.5でMono Qカラムによく保持され、0.9-1MのNaClで溶出された。

大容量試料の減容と不純物分離を兼ねて精製の初期段階に導入可能である。

試料調製時におけるプロテアーゼによる活性成分の分解の程度を検討する為に、プロテアーゼ阻害剤の効果を検討した。6種の阻害剤からなる広域阻害カクテル(Merck)を所定濃度で用いるとクビフリン(10⁻⁹M)による卵成熟が抑制されることから、クビフリンによる卵成熟誘起過程はプロテアーゼの活性化を伴うことが予想された。個々の検討では、セリンプロテアーゼ阻害剤 AEBSF (4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride) は、1mM でクビフリンによる卵成熟を完全に抑制するが、排卵現象は抑制しなかった。一方、興味深いことに 1mM の AEBSF 単独投与で卵成熟を伴わない排卵が誘導されることが明らかとなった。本研究課題で追求している排卵誘起活性と同様の効果が、プロテアーゼ阻害剤によりもたらされたことになる。

4. 研究成果

(1) 排卵誘発因子

マナマコ・ニセクロナマコの生殖腺培養液中に、排卵のみを誘発する活性が存在することが確認できた。個体辺りの活性量は、マナマコ生殖腺の方がより多いことが明らかとなった。

生殖腺を小型剪刀で切断し小片にする切断刺激法で、排卵が誘起される現象を見出した。組織の切断により生殖腺組織内の神経組織が刺激され、何らかの情報が発火することにより、排卵誘起活性因子の放出が起こるのではないかと考えている。

排卵誘起活性は、Sephadex G-10 では高分子画分に溶出され、分画分子量 10,000 の限外ろ過ではろ液に回収された。Superdex 30pg では、塩溶出領域の後に遅れて溶出された。以上の事から、分子量は塩類よりは大きく、ゲルマトリックスと何らかの相互作用をする構造を有すると予想される。

材料動物が十分に得られず、HPLC を繰り返すほどの試料が用意できなかった。その為、精製度を高めることができず、質量分析等での構造解析までに至らなかった。逆相 HPLC では、アセトニトリル濃度 20% 付近で溶出されることから、弱い疎水性を持つ化合物であると予想された。

イオン交換クロマトグラフィーにより、pH8.5 で陰イオン交換樹脂に吸着するイオン性物質であることが明らかとなった。精製初期段階での大量試料の濃縮・分離に有用である。

クビフリンによる卵成熟誘起作用が、1mM のセリンプロテアーゼ阻害剤 AEBSF (4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride) で完全に抑制されることが分かった。ホルモン処理によるヒトデヤツメガエルの卵成熟誘起がセリンプロテアーゼで阻害されることが知られていることから、それらと同様に細胞内情報伝達経路上での抑制作用の可能性が考えられる。

AEBSF は排卵誘発作用は阻害しないことが分かった。逆に、1mM の AEBSF の単独投与で卵成熟を伴わない排卵のみが誘発された。しかし、現時点では、生殖巣切断刺激法で培養液中に検出される排卵誘発活性と AEBSF の作用過程に共通点があるかどうかは不明である。

(2) 卵成熟誘起因子

マナマコ・ニセクロナマコの生殖腺培養液中に、卵成熟誘起活性が存在することが確認できた。卵成熟誘起活性は微弱であることから、2種マナマコ間での分泌量の差の詳細は不明である。

生殖腺刺激法により、排卵誘起活性と同様に卵成熟誘起活性が検出された。4-(1)- と同様の理由によるかと考えている。

本課題実施中に、別の研究課題で実施中であったニセクロナマコ神経組織由来の産卵誘発ホルモンの精製に成功した。このホルモンと、本課題で追跡していた卵成熟誘起活性成分が同一のものである可能性が想定されたことと、卵成熟誘起活性が極めて微弱であったことから、本因子の探索を中止した。

5. 主な発表論文等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当なし

(2) 研究協力者

該当なし

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。