

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21770067

研究課題名（和文）生体外排卵培養系を用いた哺乳類排卵酵素の同定と排卵機構の解明

研究課題名（英文）Identification of mammalian ovulation enzymes using in vitro ovulation system and elucidation of ovulation mechanism.

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

研究成果の概要（和文）：

本研究課題は、哺乳類（マウス）の排卵実行に重要な酵素（排卵酵素）の同定と排卵時の濾胞層分解の分子メカニズムの解明を目指して実施された。また、排卵酵素の同定に利用する生体外排卵培養系の改良にも取り組んだ。その結果、2種のMMPが排卵の前後の濾胞で発現変動することを発見したが、これらのMMPは排卵に関与しない可能性が高いことが明らかとなった。一方、MT2-MMPは排卵前にその活性体が増加することから、排卵への関与が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The aim of the present study were to identify the mouse ovulation enzymes responsible for degradation of the follicle wall during ovulation, and to elucidate the molecular mechanism of degradation of the follicle wall during ovulation. It was also attempted to improve the culture condition by optimizing the buffer system and by changing the supplements added. As results, it was found that two MMPs were changed their expression between before and after ovulation. However, it was suggested that they were not involved in ovulation. Active form of MT2-MMP was found to be increased before ovulation, implying that it was involved in ovulation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生殖生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、形態・構造

キーワード：卵巣、排卵、プロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

卵は、濾胞と呼ばれる袋状構造の中で成長し、受精能を獲得後、卵巣外へと放出（排卵）される。卵が、卵巣外に排卵されるためには、濾胞壁と呼ばれる濾胞の膜が溶解される必要があり、濾胞壁を溶解する酵素（以降、排

卵酵素と呼ぶ）としてタンパク質分解酵素（プロテアーゼ）がこの役割を担うと考えられている。哺乳類において、これまでに様々なプロテアーゼが排卵酵素の候補として報告されてきたが、排卵酵素同定の決め手となる研究は無かった。そのような状況の中、メ

ダカを用いた研究代表者らの排卵研究から、3種の酵素がメダカの排卵酵素として同定され、さらにメダカの排卵機構も解明された⁽¹⁾。この研究が脊椎動物における唯一の排卵酵素同定に関する研究であり、哺乳類においては、未だに排卵酵素は同定されていない。

本研究は、2007-2008年度に掛けて実施された研究代表者の研究により確立されたマウスの器官培養による生体外排卵培養系を用いて、哺乳類(マウス)の排卵酵素を探索、同定することを目的とし、さらに、マウスの排卵メカニズムを解明することを最終目的に実施された。

(1)PNAS 102:8442-8447. (2005)

2. 研究の目的

哺乳類(マウス)の排卵酵素を同定するとともに濾胞壁の溶解メカニズムについて分子レベルで解明することが本研究の目的である。また、排卵酵素を同定するために用いる器官培養を用いた生体外排卵培養系について、より高い排卵率で排卵する培養条件の検討を行い、培養系の改良を行うことも本研究の目的とした。

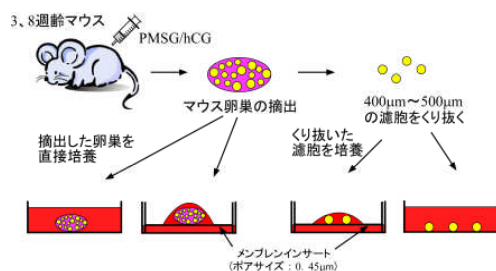
3. 研究の方法

本研究の目的を達成するために以下のことを実施した。

- (1) マウス器官培養を用いた生体外排卵培養系の培養条件について再検討を行った。
- (2) 排卵酵素候補因子のうち、特に可能性が高い Matrix metalloproteinase (MMP)について、排卵前後における発現変動解析を行った。
- (3) (2)で変動のあったMMPについて、タンパク質レベルでの発現変動を調査した。

(1) 生体外培養系の培養条件の再検討

これまでに確立していた培養系について、培養液の組成を変更し培養を試みた。他の条件は、これまでの条件と同じである。具体的には、ホルモンによる過排卵を誘導したマウス卵巣を器官培養する方法と、濾胞をくり抜き培養する方法の2通りについて試みた(下図参照)。なお、培養にはメンブレンインサートを用いる方法も試みた。



37°C CO₂インキュベーターで48時間培養

(2) 排卵前後におけるMMP mRNA発現変動解析

3週齢マウスにPMSG/hCGを注射し、hCG注射後6時間(排卵前)と16時間後(排卵前)に卵巣を回収した。その後、排卵予定の濾胞及び排卵後の濾胞(黄体)をくり抜き、それらからRNAを抽出後、RT-PCR解析を行った。

(3) 排卵前後におけるMMPタンパク質の発現変動解析

(2)と同様にて回収した濾胞および黄体からタンパク質を抽出後、Western blot解析を行った。なお、使用した抗体は、1種類が市販の抗体、2種類が自作の抗体である。

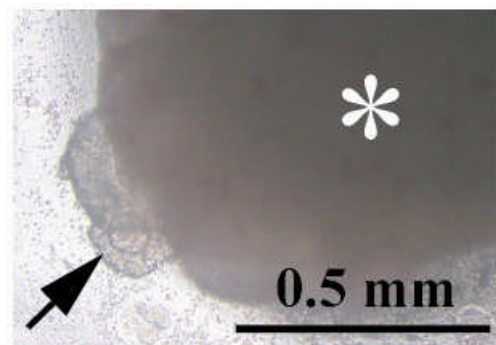
4. 研究成果

(1) 生体外培養系の培養条件の再検討

下表が、様々な条件下で培養を行った後の排卵の有無をまとめた表である。

週齢	ホルモン処理後の卵巣抽出時間(PMSG注射48時間後にhCG注射)	メンブレンインサート	排卵の有無
3w	PMSG注射48時間後	有	×
3w	PMSG注射48時間後	無	×
3w	hCG注射2時間後	有	×
3w	hCG注射2時間後	無	×
3w	hCG注射4時間後	有	×
3w	hCG注射4時間後	無	×
3w	hCG注射6時間後	有	○
3w	hCG注射6時間後	無	×

同条件で、くり抜き濾胞の培養も行ったが、排卵が観察された条件は無かった。



マウス卵巣から排卵した卵を矢印で示した。アスタリスクは卵巣を示している。

3週齢卵巣を用いてホルモン注射後から摘出までの時間を変え培養を試みるとともにメンブレンインサート内での培養も試みたが、これまでに確立された条件(表中の赤色)以外での排卵は観察されなかった。従って、今後は他の組成条件を試みる必要がある。なお、同様の実験をくり抜き濾胞を用いた培養、8

週齢卵巣を用いた培養について行ったが、結果はいずれもネガティブであった。

(2) 排卵前後における MMP mRNA 発現変動解析

26種類のMMPについて、排卵前後における発現の変動を解析したところ、2種のMMPが排卵の前後で変動していることを突きとめた。

(3) 排卵前後における MMP タンパク質の発現変動解析

排卵前後で発現変動することが確認された2種のMMPについて、排卵前後におけるタンパク質の発現変動について解析を行ったところ、顕著な発現量の差は確認できなかった。また、これらの抗体を培養液に添加、排卵の阻害実験を行ったところ、全く排卵を阻害しなかった。これらの結果を受け、今後は、他のMMPについて解析を進めていくとともにMMP以外のメタロプロテアーゼについても解析を行うことが必要であると考えられる。

(4) マウス MT2-MMP の発現解析

メダカの排卵研究から排卵酵素として同定されたMT2-MMPについても解析を進めた。MT2-MMPタンパク質は排卵前後において、顕著な発現変動は確認されなかったが、PMSG処理後、活性型MT2-MMPが検出されたことから、この酵素が排卵に関与することが示唆された。今後は、MT2-MMPのノックダウンや特異的抗体を用いた排卵阻害実験といった機能阻害実験を行い、排卵との関連性を調査することが必要と考えられる。

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3件)

① Fujimori, C. Ogiwara, K. Hagiwara, A. Rajapakse, S. Kimura, A. Takahashi, T. (2011) 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* 332(1-2), 67-77. (査読有)

② Ogiwara, K. Ikeda, T. Takahashi, T. (2010) A new in vitro ovulation model for medaka based on whole ovary culture. *Zoolog. Sci.* 27(9), 762-7. (査読有)

③ Kato, Y. Ogiwara, K. Fujimori, C. Kimura, A. Takahashi, T. (2010) Expression and localization of collagen type IV $\alpha 1$ chain in the medaka ovary. *Cell Tissue Research* 340(3), 595-605. (査読有)

[学会発表] (計12件)

① 荻原克益、高橋孝行
メダカ排卵酵素MT2-MMPの排卵誘導メカニズム—排卵に関与する新規チロシンキナーゼの探索と同定
日本比較内分泌学会第35回大会、平成22年11月18~20日、静岡

② 藤森千加、荻原克益、萩原茜、高橋孝行
メダカ排卵におけるプロスタグランジンの作用とアクチン重合への関与
日本比較内分泌学会第35回大会、平成22年11月18~20日、静岡

③ 萩原茜、藤森千加、荻原克益、高橋孝行
排卵と卵成熟は互いにコミュニケーションを取っているか？
日本比較内分泌学会第35回大会、平成22年11月18~20日、静岡

④ 荻原克益、高橋孝行
PA/プラスミン系による基底膜の分解がメダカ排卵には必要不可欠である
日本動物学会第81回大会、平成22年9月23~25日、東京

⑤ 萩原茜、荻原克益、高橋孝行

膜型プロゲステロン受容体はメダカの排卵に関与するか

日本動物学会第 81 回大会、平成 22 年 9 月 23～25 日、東京

- ⑥ 藤森千加、萩原茜、荻原克益、高橋孝行
EP4b が PG によるメダカ排卵の律速因子となる

日本動物学会第 81 回大会、平成 22 年 9 月 23～25 日、東京

- ⑦ 荻原克益、藤森千加、Sanath Rajapakse、高橋孝行

メダカ排卵を司る内分泌機構と排卵誘導機構の解明

日本比較内分泌学会第 34 回大会、平成 21 年 10 月 22～24 日、大阪

- ⑧ 藤森千加、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及びその受容体の解析

日本比較内分泌学会第 34 回大会、平成 21 年 10 月 22～24 日、大阪

- ⑨ 藤森千加、荻原克益、萩原茜、高橋孝行
メダカ卵巣におけるプロスタグランジンとその合成酵素 COX-2 の役割

日本動物学会第 80 回大会、平成 21 年 9 月 17～20 日、静岡

- ⑩ 古舘大樹、荻原克益、高橋孝行
メダカ卵巣特異的に発現する uPA の発現解析

日本動物学会第 80 回大会、平成 21 年 9 月 17～20 日、静岡

- ⑪ 荻原克益、高橋孝行
マウス卵巣における膜結合型 MMP、

MT2-MMP の発現および機能解析

日本動物学会第 80 回大会、平成 21 年 9 月 17～20 日、静岡

- ⑫ 藤森千加、萩原茜、荻原克益、高橋孝行
メダカの排卵とプロスタグランジン
日本動物学会北海道支部第 55 回大会、平成 21 年 8 月 8 日、函館

[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

名称：「魚類由来のエンテロペプチダーゼ」
発明者：高橋孝行、荻原克益
権利者：国立大学法人北海道大学
種類：特許
番号：第 4474543 号
取得年月日：平成 22 年 3 月 19 日
国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<https://www.sci.hokudai.ac.jp/~kogi/Reproductive2/Welcome.html>

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし