

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07120

研究課題名(和文)メダカ排卵後の迅速な組織修復、残留濾胞組織の分解・除去機構の解明

研究課題名(英文)Studies on the molecular mechanism for the rapid regeneration and degradation of follicle layers of the medaka follicles after ovulation.

研究代表者

荻原 克益 (OGIWARA, Katsueki)

北海道大学・理学研究院・准教授

研究者番号：00422006

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：排卵は受精可能となった卵母細胞が卵巣腔へと放出される過程である。この過程は、濾胞組織と卵巣最外層組織の分解を伴う組織破壊現象と捉えることもでき、毎日排卵するメダカの場合、排卵後、直ちに組織修復が開始され、さらに、卵巣内に残留した濾胞組織も迅速に分解され、翌日の排卵に備える必要がある。本研究では、迅速に進行するこの過程の分子機構を解明することを目的に研究を行った。その結果、卵巣開口部の修復にカドヘリンタンパク質の関与を示唆する結果が得られた。また、在留濾胞組織の分解にゼラチナーゼBやプラスミンが関与する結果を得た。今回の研究で得られた成果をもとに、今後も組織修復の分子機構の解明に取り組む。

研究成果の概要(英文)：Ovulation is the process that fertilizable oocytes are released into the ovarian sac. The process is involved in a breakdown of the follicular wall, which are composed of follicular tissues and ovarian surface tissues. In medaka, which ovulates every day, the tissue repair of the follicle wall starts just after ovulation, and follicular tissues that had released an oocyte are degraded rapidly in the ovary. The aim of the present study is to elucidate the molecular mechanism of the process. Cadherin protein was suggested to be involved in the tissue repair of the follicle wall. Gelatinase B and plasmin, both of which were expressed in follicular tissues that had released an oocyte, were implied to be implicated in the rapid degradation of the follicle tissues in the ovary. We will continue to study to elucidate the molecular mechanism of the rapid tissue repair, based on the results obtained from the present study.

研究分野：生殖生物学

キーワード：排卵 卵巣 修復 プロテアーゼ メダカ

## 1. 研究開始当初の背景

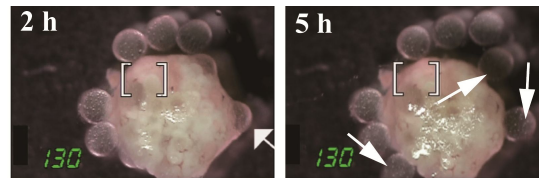
メダカ卵巣内には多数の濾胞が存在し、卵母細胞は濾胞内で成長、成熟する。排卵時には、卵母細胞を包む濾胞壁と卵巣最外層の被膜が分解されることで、卵母細胞のみが卵巣腔内即ち卵巣外へと放出される。排卵は濾胞組織の分解を伴う組織破壊現象と捉えることもでき、排卵後は卵母細胞が通り抜けた部分の迅速な組織修復が必要不可欠となる。さらに、排卵後には濾胞細胞層のみが残留組織として卵巣内に取り残されるが、注意深く観察を行っていくとその組織は徐々に卵巣中心部へと引き込まれていき、排卵後 20 時間前後という僅かな時間で分解、消失することが明らかとなった。これらの過程は種特有の速さで進行するが、毎日多くの卵を排卵するメダカでは卵巣開口部の修復と残留濾胞組織の除去が迅速に行われないと次の排卵に支障を来すため、これらの過程の進行が哺乳類に比べ圧倒的に速い。そこで、本研究ではこの迅速な組織修復ならびに残留濾胞組織の分解メカニズムに着目し、この過程が如何にして迅速に行われるのかを解明することを目標とし、研究に着手することとした。

## 2. 研究の目的

卵巣では、生殖細胞(卵)の産生、排卵、排卵後の組織修復(次回排卵の準備)というプロセスが繰り返される。この過程は種特有の速さで進行するが、毎日排卵を繰り返すメダカでは、この過程が極めて速い。本研究ではこの速さに注目し、排卵後の組織修復が如何にして迅速に進行するのかを分子レベルで解明することを目的とする。具体的には、排卵により生じた開口部(卵が放出された部分)の修復(閉口作業)機構、卵を放出し卵巣内に取り残された在留濾胞組織を卵巣中心部へと引き込むメカニズム、そして卵巣中心部付近での分解、除去機構の解明が本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

本研究では、研究代表者らが確立した卵巣器官培養による生体外卵巣培養系(下図:卵巣から卵母細胞が放出、排卵された写真)を用いて研究を行った。この系を用いて、下記の項目について解析を行った。



生体外卵巣培養系:培養 2 時間後の卵巣(左)と培養 5 時間後の卵巣(右)

矢印は、培養中に卵巣から排卵した卵母細胞を示す。

### (1) 排卵に伴う卵巣開口部の修復機構の解明

E-cadherin と N-cadherin の特異的抗体を作製し、Western blot 解析、免疫組織化学染色により抗体の特異性を解析した。その後、これらの抗体を卵巣培養系に添加し、排卵を確認後すぐに卵巣を回収し、galatinase B の in situ hybridization を行い、卵巣開口部の有無を確認した。

### (2) 残留濾胞組織の引き込みおよび除去メカニズムの解明

gelatinase B、MT2-MMP、cathepsin L、plasmin 及び urokinase plasminogen activator の特異的抗体を卵巣培養系に添加し培養後、組織切片を作製し、残留濾胞組織の有無を確認した。さらに、1 型及び 4 型コラーゲン免疫組織化学染色を行い、残留濾胞組織の有無を確認した。また、排卵後の卵巣で発現する TIMP や PAI、成長因子(FGF や TGF など)関連因子を RT-PCR で調べた。

排卵後の濾胞組織にゼラチン分解活性があるかどうかを In situ zymography により調べた。さらに、EDTA やロイペプチンなどの阻害剤を反応液に添加し、ゼラチン分解活性をもつ酵素の特定を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 排卵に伴う卵巣開口部の修復機構の解明

N-cadherin と E-cadherin の抗体を作製し、発現解析を行った。排卵前と排卵後の濾胞組織抽出液を用いて Western blot 解析を行ったところ、排卵後の濾胞組織において N-cadherin のみ特異的なバンドが確認された。E-cadherin については、残念ながら特異的抗体は作製できなかった。N-cadherin のみ native protein を特異的に認識する抗体が作製されたので、この抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。N-cadherin は開口部を含む排卵後の濾胞組織全体での発現が確認されたことから、開口部の修復に関与することが示唆された。E-cadherin については、in situ hybridization 解析から、排卵後の開口部付近にはその発現が確認できなかったことから、開口部への関与の可能性は低いことが示唆された。

続いて、卵巣培養系に N-cadherin の特異的抗体を添加し、開口部の修復の有無を確認したところ、残念ながら、開口部の修復は阻害されなかった。そこで、改めて開口部の修復に関与する因子の探索を目的として卵巣培養系に EGTA (カルシウムイオンのキレート剤) を添加し修復の有無を調査したところ、修復は阻害された。この結果は、カルシウムイオン要求性の因子が関与していることを示唆しており、N-cadherin や E-cadherin 以外の cadherin の可能性についても検討する必要があると考えられる。また、排卵直後の卵巣において、いくつかの成長ホルモン関連因子の誘導が確認されたことから、これらの因子の関与についても検討する必要がある。

##### (2) 残留濾胞組織の引き込みおよび除去メカニズムの解明

排卵 1 時間後の卵巣を、12~72 時間の範囲で器官培養した後、卵巣内の残存濾胞

組織の有無を組織切片で確認した。その結果、予想に反して 72 時間培養した卵巣内でも残存濾胞組織の存在が確認された (in vivo では、排卵 20 時間後には残存濾胞組織の消失が確認されている)。そこで、黄体形成ホルモン LH が作用した後の卵巣 (排卵 8 時間後) を器官培養し、残存濾胞組織の有無を組織切片で確認したところ、その消失が確認された。以上の結果から、残存濾胞組織の分解には、LH で誘導される何らかの因子が関与することが示唆された。今後は、LH によって誘導され、残存濾胞組織の分解に関与する因子の探索を行う必要がある。

卵巣内に取り残された濾胞組織の分解時期を特定するために In situ zymography 法を行った。その結果、排卵直後から卵巣内に取り残された濾胞組織周辺にゼラチン分解活性が見られ、これらの活性は EDTA とロイペプチンの両方が存在する時、阻害されることが明らかとなった。この結果は、排卵後の濾胞膜の分解に gelatinase B と plasmin の両方が関与していることを示唆している。

濾胞組織の分解機構についてはプロテアーゼ (MMP や plasmin など) の関与が示唆されていたことから、その酵素の内在の阻害因子である TIMP および PAI について解析を行った。TIMP については、mRNA、タンパク質ともに排卵後の濾胞組織において発現を確認できなかった。一方、PAI-1 mRNA は、排卵後の濾胞組織に発現していた。PAI-1 は、plasminogen の活性化因子である uPA を阻害する因子であることから、PAI-1 が濾胞組織分解を調節している可能性があることが示唆された。

#### 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4件)

- (1) 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.* 2018, 461:236-247. 査読有 DOI: 10.1016/j.mce.2017.09.019.
- (2) Ogiwara, K. Takahashi, T. Involvement of the nuclear progesterin 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.* 2017, 450:54-63. 査読有 DOI: 10.1016/j.mce.2017.04.016.
- (3) Ogiwara, K. Takahashi, T. A Dual Role for Melatonin in Medaka Ovulation: Ensuring Prostaglandin Synthesis and Actin Cytoskeleton Rearrangement in Follicular Cells. *Biol. Reprod.* 2016, 94(3):64. 査読有 DOI: 10.1095/biolreprod.115.133827.
- (4) Hagiwara, A. Ogiwara, K. Takahashi, T. Expression of membrane progesterin receptors (mPRs) in the granulosa cells of medaka preovulatory follicles. *Zoolog. Sci.* 2016, 33(1): 98-105. 査読有 DOI: 10.2018/zs150093.

〔学会発表〕(計9件)

- (1) 荻原克益、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  
日本動物学会第 88 回大会 2017 年 9 月
- (2) 萩原茜、洲鎌なつ、荻原克益、高橋孝行  
メダカ排卵前濾胞における GAP 結合の機能  
日本動物学会第 88 回大会 2017 年 9 月
- (3) 加用大地、神田真司、荻原克益、善方文太郎、岡良隆

真骨魚類メダカ ERβ1 の生殖制御における機能の解析

日本動物学会第 88 回大会 2017 年 9 月

- (4) 吉田裕、荻原克益、山下正兼、高橋孝行  
Comprehensive analyses of genes induced in the preovulatory follicles by GH using teleost medaka.

第 22 回国際動物学会・第 87 回日本動物学会合同大会(国際学会)2016 年 11 月

- (5) 洲鎌なつ、荻原克益、山下正兼、高橋孝行  
Molecular mechanism of synchronization between oocyte maturation and ovulation in medaka.

第 22 回国際動物学会・第 87 回日本動物学会合同大会(国際学会)2016 年 11 月

- (6) 荻原克益、高橋孝行  
Melatonin plays a dual role in medaka ovulation: Involvement in PGE2 synthesis and actin cytoskeleton reorganization.

第 22 回国際動物学会・第 87 回日本動物学会合同大会(国際学会)2016 年 11 月

- (7) 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~

日本分子生物学会第 38 回年会 2015 年 12 月

- (8) 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

日本動物学会第 86 回大会 2015 年 9 月

- (9) 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

日本動物学会第 86 回大会 2015 年 9 月

6. 研究組織

- (1) 研究代表者

荻原 克益 (OGIWARA, Katsueki)

北海道大学・理学研究院・准教授

研究者番号：00422006