

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 5 日現在

機関番号：10105

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14843

研究課題名(和文) 卵管繊毛の微小管ネットワーク構築と協調的波打ち運動の制御メカニズム

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of coordinated beating of oviductal cilia

研究代表者

奥田 潔 (Kiyoshi, OKUDA)

帯広畜産大学・その他部局等・学長

研究者番号：40177168

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：卵管上皮細胞に無数に存在する繊毛の運動は卵母細胞や初期胚の輸送に必須の生理現象で、この繊毛運動は一方向性を持つ必要があるがその制御機構には不明な点が多い。本研究はホルマウント免疫組織化学法を用いることでPCPタンパク質の一つであるVANGL1がウシ卵管繊毛上皮細胞の細胞膜のうち卵巣子宮軸に直行する面に局在することを見出した。さらに同タンパク質の下流シグナル因子であるDVL3およびInturnedも繊毛上皮細胞に局在することを示した。これらのシグナルが卵管の入り口側から出口側まで走ること、組織を通じて繊毛運動の方向性が統一され、子宮方向への卵管液の流れを生み出すことが推察される。

研究成果の概要(英文)：Uni-directional ciliary beating is required for successful transport of oocytes and embryos. In some tissues including airway and skin, planar cell polarity (PCP) signaling arranges the direction of cells throughout these tissues. In the present study, we demonstrated that VANGL1, one of PCP core protein, is localized in the ovarian and uterus sides of the cellular membranes of bovine oviductal ciliated cells. Additionally, DVL3 and Inturned, which are the downstream proteins of VANGL1, are also localized in the ciliated cells. These series of VANGL1 signaling may arrange the direction of ciliated cells and cilia throughout the whole tissues from distal to proximal, producing the stream of oviductal fluid toward the uterus to transport the oocytes and embryos.

研究分野：生殖内分泌学

キーワード：卵管 ウシ 繊毛 平面内細胞極性

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

卵管は、受精の場・初期胚発育の場である。これらの生理現象が適切に誘導されるために、卵母細胞は受精部位に到達する必要があり、また初期胚は子宮へと赴く必要がある。しかしながら卵母細胞・初期胚には精子とは異なり自走能が無く、外的要因により輸送される必要がある。これに働くのが卵管上皮細胞上に無数に存在する繊毛の運動である。この繊毛運動によって卵巣方向から子宮方向への卵管液の流れが生まれ、卵母細胞を受精部位へ、初期胚を子宮へと正常に輸送される。卵管腔内の繊毛はほとんど全てが協調的に同一方向へ波打つことが知られていたが、これがどのようなメカニズムで制御されているのか、明らかでなかった。

2. 研究の目的

皮膚上の体毛がある一定の方向に向かって生える現象は、planar cell polarity (PCP) シグナルによって調節されることが近年明らかとなった。このシグナルが細胞同士の間で次々に伝達されることで、組織の先端から末端まで細胞が同一の方向を向き、体毛の向きが揃うのである。同様のメカニズムが卵管上皮組織に存在し、繊毛運動の方向性統一に寄与するかどうかを明らかにすることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) ホールマウント免疫組織化学法を用い、PCP core タンパク質のひとつである VANGL1 の局在を検討した。なお VANGL1 は細胞膜表面のタンパク質であるため、F-actin との共染色を行い細胞膜上に存在するかどうかを確認した。さらに VANGL1 の下流シグナルタンパク質である DVL3 ならびに Inturned についても同様の検討を行った。これらの実験すべてにおいて繊毛構成タンパク質である acetylated-tubulin と共染色を行い、上述のタンパク質が卵管上皮を主に構成する繊毛細胞および分泌細胞のどちらに局在するかを調べた。

(2) ウシ卵管より繊毛上皮細胞を磁気ビーズ抗体法により単離し、同細胞における siRNA 法による VANGL1 のノックダウンを試みることで(1)で示されたタンパク質の互いの関係性を調べた。なお磁気ビーズ抗体法を用いるために繊毛細胞に特異的な細胞膜上マーカータンパク質抗体を用いる必要があるため、同タンパク質の検索を免疫組織化学的に試みた。また、通常の単層培養法では繊毛が正常に形成されず、(1)で示されたタンパク質の関係性を明らかにすることができないため、新たに air-liquid interface culture 法を用いることで卵管上皮繊毛細胞をより生体内に近い環境で培養し、繊毛が正常に形成される培養系の確立を試みた。

4. 研究成果

(1) VANGL1 タンパク質は卵管上皮組織の子宮 卵巣軸に直行する細胞膜表面に局在していた。さらにこの VANGL1 は繊毛細胞により多く発現していることを明らかにした。また、VANGL1 の下流タンパク質 DVL3 および Inturned も同様に繊毛細胞に発現することが明らかとなった。

(2) 繊毛細胞特異的細胞膜表面タンパク質として RAMP2 を同定した。抗 RAMP2 抗体を用いて単離した細胞を air-liquid interface culture 法により培養したところ培養開始 2 週間後には繊毛形成に必須のタンパク質である FOXJ1 の発現が確認できたことから繊毛細胞を単離できたと評価するとともに繊毛の正常に形成する培養系の確立にも成功したと評価した。また VANGL1 のノックダウンを目的に作製した siRNA の導入により、繊毛細胞における VANGL1 mRNA のノックダウンに成功した。しかしながら、上述した air-liquid interface culture により培養した繊毛上皮細胞には非ノックダウン試験区においても平面内細胞極性が形成されておらず、siRNA による VANGL1 のノックダウン実験による平面内細胞極性への影響を評価することができなかった。

(総括) 本研究より、卵管繊毛細胞において PCP core タンパク質のひとつである VANGL1 とその下流のシグナル因子が発現し、その局在は特徴的であることが

示された。体毛の向きが揃うメカニズムと同様に、卵管においても繊毛の向きは PCP シグナルによって調節され、一方向性の繊毛運動に寄与することが示唆された。その一方で、一連のシグナルが本当に VANGL1 DVL3 Inturned の順で走っているか否かに関して本研究で示すことができなかった。今後は、in vitro において平面内細胞極性を形成することのできる培養系の確立を試み、より詳細なメカニズムを明らかにしていく必要がある。

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. Kobayashi Y, Yamamoto Y, Kageyama S, Hirayama H, Kimura K, Okuda K: Regulation of bovine oviductal NO synthesis by follicular steroids and prostaglandins. *Reproduction*, 151, 577-587, doi: 10.1530/REP-15-0254 (2016) 査読有り
2. Kobayashi Y, Yoshimoto Y, Yamamoto Y, Kimura K, Okuda K: Roles of EDNs in regulating oviductal NO synthesis and smooth muscle motility in cows. *Reproduction*, 151 615-622, doi: 10.1530/REP-15-0586 (2016) 査読有り

3. Ito S, Kobayashi Y, Yamamoto Y, Kimura K, Okuda K: Remodeling of bovine oviductal epithelium by mitosis of secretory cells. Cell and Tissue Research, 366, 403-410, doi: 10.1007/s00441-016-2432-8 (2016) 査読有り

〔学会発表〕（計 4 件）

1. 小林芳彦, 伊藤さやか, 木村康二, 奥田潔: 基底膜下 stem-like cells による卵管上皮組織リモデリング. 第 109 回日本繁殖生物学大会、2016 年 9 月 11 日～9 月 15 日（麻布大学、神奈川県相模原市）
2. 伊藤さやか, 小林芳彦, 山本ゆき, 木村康二, 奥田潔: ウシ卵管分泌上皮細胞の増殖と分化による卵管機能の制御. 第 109 回日本繁殖生物学大会、2016 年 9 月 11 日～9 月 15 日（麻布大学、神奈川県相模原市）
3. Sayaka Ito, Yoshihiko Kobayashi, Tatsuya Muraki, Yuki Yamamoto, Koji Kimura, Kiyoshi Okuda: The proportion of oviductal epithelial cells dynamically changes during the estrous cycle and is regulated by secretory cell mitosis. Society for the Study of Reproduction, 2016 年 7 月 16 日～7 月 20 日（San Diego, USA）

4. Sayaka Ito, Yuka Yoshimoto, Takumi Nishie, Yoshihiko Kobayashi, Yuki Yamamoto, Kiyoshi Okuda, Koji Kimura. Adrenomedullin regulates fluid flow speed in the bovine oviduct. World Congress of Reproductive Biology 2017, 2017 年 9 月 27 日～9 月 29 日（沖縄コンベンションセンター、沖縄県宜野湾市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥田 潔 (OKUDA, Kiyoshi)
帯広畜産大学・その他部局など・学長
研究者番号: 40177168

(2) 研究分担者

木村 康二 (KIMURA, Koji)
岡山大学・環境生命科学研究所・教授
研究者番号: 50355070