

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008年  
 課題番号：19770047  
 研究課題名（和文） 哺乳類排卵酵素の同定を可能にする培養系の確立と排卵酵素の同定  
 研究課題名（英文） Establishment of culture system for identification of mammalian ovulatory enzymes and their identification using the system.  
 研究代表者  
 荻原 克益 (OGIWARA KATSUEKI)  
 北海道大学・理学研究院・助教  
 00422006

## 研究成果の概要：

本研究は、哺乳類（マウス）排卵酵素の探索ならびに同定を目指して実施された。その結果、排卵酵素探索のツールとして重要な生体外排卵培養系について、より排卵数の多い培養条件を突きとめることに成功した。また、メタロプロテアーゼが排卵酵素であることを示唆する結果を得た。さらに、排卵前後で発現変動するいくつかのメタロプロテアーゼを発見した。これらの結果は、哺乳類排卵酵素同定の足がかりとして重要な成果であると考えられる。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	0	2,400,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	300,000	3,700,000

## 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

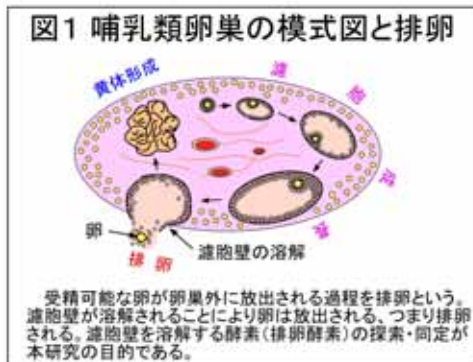
## 1. 研究開始当初の背景

卵巣には、次世代に生殖細胞（卵）を提供するという重要な役割がある。卵巣内において、卵は濾胞と呼ばれる袋状構造内で成長し、受精可能な状態になると卵巣外に放出される。この過程は排卵とよばれ、卵巣機能の総決算ともいべき過程である。

排卵は、卵を包む濾胞の膜（濾胞壁）の一部が溶解され、卵が放出されることにより達成される（図1参照）。濾胞壁の溶解には、タンパク質分解酵素（プロテアーゼ）が関与することが古くから知られているが、実際に濾胞壁溶解を実行し、排卵をおこさせている

プロテアーゼ（排卵酵素）の正体については、数多くの研究が行われてきたにも関わらず、全く明らかにされていなかった。ところが近年、研究代表者らのグループがメダカを用いた排卵研究により排卵酵素の同定に成功し、さらに、メダカの排卵メカニズムも解明した（Ogiwara, et al. 2005）。メダカの排卵酵素発見により、次に焦点となるのが哺乳類の排卵酵素同定である。メダカ排卵研究では、生体外排卵培養系（生体外で排卵をおこさせる培養系）の利用が排卵酵素の発見に繋がったことから、哺乳類の排卵研究においても同様な手法を用いることにより排卵酵素の同

定が可能になると考えた。そこで、マウスで生体外排卵培養系の確立を目指し、それを用いることにより、遅々として進まぬ哺乳類の排卵酵素の同定を行うことにした。



(参考文献)

Ogiwara et al. (2005) PNAS 102(24): 8442-8447

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、哺乳類(マウス)排卵酵素の同定である。また、排卵酵素の探索および同定を行ううえで重要な生体外排卵培養系について、より良い培養条件を模索することで生体外排卵培養系の確立を目指す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) 排卵酵素の同定に必要な不可欠な生体外排卵培養系についてより良い培養条件を検討した。
- (2) 生体外排卵培養系を用いて、排卵酵素の探索を行った。
- (3) 排卵酵素候補因子の排卵前後における発現変動解析を行った。

### (1) 生体外排卵培養系の改良

3週齢の雌マウスに排卵を誘導するために PMSG/hCG を処理し、その後卵巣を摘出、器官培養を行った(図2参照)。検討した条件は、hCG 処理の有無、hCG 処理の時間、培養液の組成、培養液への添加物の有無、培養環境(培養液中の培養、コラーゲンゲル中での培養、メンブレンインサート上での培養など)の変更などである。

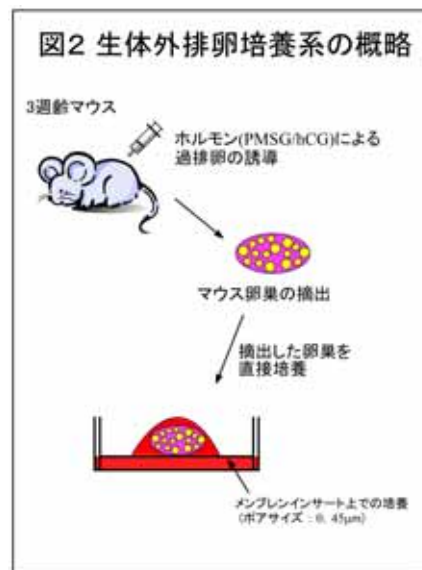
### (2) 生体外排卵培養系を用いた排卵酵素の探索

生体外排卵培養系にプロテアーゼ阻害剤を添加し、培養を行った。加えた阻害剤は、EDTA(メタロプロテアーゼの阻害剤)、DFP(セリンプロテアーゼの阻害剤)、E-64(システ

インプロテアーゼの阻害剤)、ペプスタチン(アスパラギン酸プロテアーゼの阻害剤)の4種類である。培養後、排卵数をカウントし、排卵数を求めた。

### (3) 排卵前後における排卵酵素候補因子の発現変動解析

3週齢の雌マウスに PMSG/hCG を処理した。hCG 処理 6 時間後に卵巣を摘出し、最大サイズの濾胞を物理的に単離した。同様に、hCG 処理 16 時間後にも濾胞(黄体)を単離した。単離した濾胞から RNA を抽出し、RT-PCR を行った。



## 4. 研究成果

### (1) 生体外排卵培養系の改良

本研究開始時点で、生体外排卵培養系(器官培養系)を用いて、生体外で排卵させることには成功していたが(図3参照)、予想される排卵数よりも実際に排卵される卵の数が少なかったことから、さらなる排卵数の増加を目指して培養条件の検討を行った。その

### 図3 排卵した卵の写真



結果、培養条件検討前の段階では一つの卵巣から2、3個の卵が排卵するのみであったが、検討後には、排卵数の改善がみられ、一つの卵巣から5、6個の卵が排卵するまでに改善された。しかしながら、予想される排卵数にはまだ至っておらず、今後も条件検討を継続する必要があると考えている。

## (2) 生体外排卵培養系を用いた排卵酵素の探索

濾胞壁が溶解されるためには、濾胞壁を構成するタンパク質の分解が必須であることから、この過程にはプロテアーゼが関与すると考えられる。そこで、生体外排卵培養系を用いて、マウスの全プロテアーゼ遺伝子628種から排卵酵素の絞り込みを行うことを試みた。プロテアーゼはその性質から大きく4つのグループに分けることができるので、それらのグループ特異的な阻害剤(研究方法(2)参照)を培養液に添加し、排卵への影響を調査したところ、EDTA(メタロプロテアーゼの阻害剤)にて顕著に排卵阻害されることが明らかとなった。この結果は、メタロプロテアーゼが排卵酵素であることを示唆する結果である。また、この結果より排卵酵素の候補を197種類まで絞り込むことができた。

## (3) 排卵前後における排卵酵素候補因子の発現変動解析

過去の研究により、マトリクスメタロプロテアーゼ(MMP)が排卵酵素の最有力候補と考えられている。EDTAによる排卵阻害という結果をうけ、メタロプロテアーゼの中でも排卵酵素の候補として重要視されているMMPについて、濾胞における排卵前後の発現変動をRT-PCR解析により調査した。その結果、排卵前後で発現量の変動するMMPを4種類発見した。これまでの卵巣を用いた先行研究から、排卵前後でその発現量の変動するMMPが数種明らかになっているが、これらのMMP以外に、今回の解析から発現量の変動するMMPを新たに発見することができた。この結果は排卵酵素絞り込みを行ううえで必要不可欠な重要な情報となり得る。

## 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)

Horiguchi, M. Fujimori, C. Ogiwara, K. Takahashi, T. (2008) Collagen type I  $\alpha 1$  chain mRNA is expressed in the follicle cells of the

medaka ovary. *Zoolog. Sci.* 25(9), 937-945. (査読有)

Rajapakse, S., Yamano, N., Ogiwara, K., Hirata, K., Takahashi, S., Takahashi, T. (2007) Estrogen-dependent expression of the tissue kallikrein gene (Klk1) in the mouse uterus and its implications for endometrial tissue growth. *Mol. Reprod. Dev.* 4(8): 1053-1063. (査読有)

Ogiwara, K., Takahashi, T. (2007) Specificity of the medaka enteropeptidase serine protease and its usefulness as a biotechnological tool for fusion-protein cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104(17): 7021-7026. (査読有)

〔学会発表〕(計 12件)

荻原克益、高橋孝行

メダカ排卵実行酵素 MT2-MMP の発現誘導機構  
日本比較内分泌学会第 33 回大会、平成 20 年  
12 月 5~6 日、広島

藤森千加、荻原克益、高橋孝行

メダカの卵巣における I 型コラーゲンの分布  
と排卵に伴う変化  
日本比較内分泌学会第 33 回大会、平成 20 年  
12 月 5~6 日、広島

荻原克益、高橋孝行

メダカ卵巣におけるプラスミノゲン活性化  
因子 / プラスミン系の役割  
日本動物学会第 79 回大会、平成 20 年 9 月 5~  
7 日、福岡

藤森千加、荻原克益、Sanath Rajapakse、  
高橋孝行

メダカ卵巣における COX-2 の発現解析  
日本動物学会第 79 回大会、平成 20 年 9 月 5~  
7 日、福岡

荻原克益、高橋孝行

「厳格な基質特異性を有するメダカエンテロペプチダーゼの生化学的解析」第 80 回日本生化学会大会、平成 19 年 12 月 11～15 日、横浜

荻原克益、高橋孝行

「メダカの排卵における膜結合型 MMP の役割」第 80 回日本生化学会大会、平成 19 年 12 月 11～15 日、横浜

荻原克益、柴田安司、長濱嘉孝、高橋孝行

「メダカ卵巣におけるプロゲステロン核内受容体の発現および機能解析」日本動物学会第 78 回大会、平成 19 年 9 月 20～22 日、弘前

柴田安司、荻原克益、高橋孝行、吉国通庸、長濱嘉孝

「メダカ卵濾胞の成長・成熟・排卵期における GTH 受容体、ステロイド関連遺伝子発現変化」日本動物学会第 78 回大会、平成 19 年 9 月 20～22 日、弘前

皆川一人、荻原克益、高橋孝行

「メダカ卵巣におけるプラスミンの発現及び機能解析」日本動物学会第 78 回大会、平成 19 年 9 月 20～22 日、弘前

鈴木敬嗣、Sanath Rajapakse、荻原克益、高橋孝行

「メダカ生殖腺におけるカリクレイン様タンパク質の解析」日本動物学会第 78 回大会、平成 19 年 9 月 20～22 日、弘前

池田貴志、荻原克益、高橋孝行

「メダカの排卵における水温の影響と

MT2-MMP の発現」日本動物学会第 78 回大会、平成 19 年 9 月 20～22 日、弘前

北出あずさ、荻原克益、高橋孝行

「メダカ卵巣における caspase family の発現解析」日本動物学会第 78 回大会、平成 19 年 9 月 20～22 日、弘前

#### 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