

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21370024

研究課題名（和文） 脊椎動物に共通するプロスタグランジンの排卵誘導機構の解明

研究課題名（英文） Studies on the role of prostaglandins in the induction of ovulation in vertebrates

研究代表者

高橋 孝行 (TAKAHASHI TAKAYUKI)

北海道大学・大学院理学研究院・教授

研究者番号：80197152

研究成果の概要（和文）：メダカの卵巣濾胞の *in vitro* 排卵系を用いて、プロスタグランジ E2 (PGE2) が排卵過程に関与することを確認した。濾胞における PGE2 合成酵素 cyclooxygenase-2 の活性及び PGE2 レベルは変化せず、PGE2 受容体である EP4b の発現レベルが排卵時に急激に上昇したことから、EP4b 受容体遺伝子の転写が重要なステップであることが明らかになった。EP4b 受容体の誘導には黄体形成ホルモンと、その後にプロゲステロン受容体に関与することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In *in vitro* ovulation system using medaka ovarian preovulatory follicles, we confirmed that prostaglandin E2 (PGE2) played a role in the fish ovulation. Activity levels of cyclooxygenase-2, the enzyme responsible for PGE2 synthesis, and intrafollicular levels of PGE2 were both relatively constant, while the transcript levels of EP4b, a PGE2 receptor subtype, were drastically induced at ovulation, indicating the importance of induction of the receptor for PGE2's effect on medaka ovulation. Transcription of EP4b gene was demonstrated to be regulated by luteinizing hormone and nuclear progesterone receptor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2010 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2011 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：形態・構造

キーワード：メダカ、生殖、排卵、プロスタグランジン

## 1. 研究開始当初の背景

排卵は内分泌制御のもとにあり、これには脳下垂体ホルモンである黄体形成ホルモン (LH) が関与する。LH と並んで、排卵誘導作用をもつ因子としてプロスタグランジン (PG) (特に E2 と F2 $\alpha$ ) が古くから知られている。哺乳類においては、排卵直前に観察さ

れる卵細胞/卵丘細胞複合体の崩壊に PG が関与することが証明された。

PG の排卵誘導作用は、魚類から鳥類まで、広く脊椎動物でも報告されている。哺乳類以外の脊椎動物では卵細胞/卵丘細胞複合体は形成されないため、卵細胞/卵丘細胞複合体の崩壊に PG が関与するという考えは、

哺乳類以外の脊椎動物には適応できない。よって、PGには脊椎動物に共通する別の作用があると想定される。その作用を解明するためには、哺乳類以外の動物を用いた研究が必要である。

## 2. 研究の目的

すでに排卵研究に適することが示されたメダカを材料として、脊椎動物の排卵におけるPGの普遍的な作用を明らかにすることが本研究の目的である。具体的には、(1)メダカ排卵にPGが関与することを示すこと、(2)PGの産生に関わる酵素系を明らかにすること、(3)PGの排卵への作用を発揮するにあたり重要な役割を果たすPG受容体を同定し、その機能を解析することを目指した。

以上までが当初の計画であったが、本研究期間では予定より早く目的を達成できたため、新たな目的として、(4)PG/PG受容体系の内分泌制御機構を明らかにすることも加えた。

## 3. 研究の方法

### (1)メダカ排卵に及ぼすPGの作用

排卵濾胞を用いた *in vitro* 排卵実験系が確立しているメダカは排卵研究に適する動物モデルとして認識されてきた。このモデルを利用して、PGの排卵に及ぼす作用の解明を目指すために、最初に、メダカにおいてもPGが排卵に関与することを確認する必要がある。そこで、当該研究室において利用している *in vitro* 排卵実験系により、PGの排卵に及ぼす作用を調べる。PG合成酵素阻害剤とPG受容体のアンタゴニストにより、メダカの排卵がどのような影響を受けるか調査する。

### (2)メダカ卵巣におけるPG産生系

PG産生に必須の酵素として cyclooxygenase (COX)が関与することが知られている。COXにはCOX-1とCOX-2の2つのアイソザイムが存在するが、いずれがメダカ排卵において重要な役割を果たしているか決定する。そのために、メダカCOX cDNA単離とCOX mRNAの発現解析を行う。さらに、メダカ濾胞におけるPGの産生についても、PG検出キットを使用して定量し、排卵とPG産生の関係を明らかにする。

### (3)PG受容体の同定と解析

濾胞において産生されたPGは、排卵予定の濾胞に作用することが考えられるので、排卵予定の濾胞に発現するPG受容体があるかないか、あるとすればその分子的正体を明らかにする。メダカ卵巣に発現するPG受容体を特定し、排卵に関与すると考えられる受容体に焦点を絞り、発現消長や発現細胞について調べる。

### (4)PG/PG受容体系の内分泌制御機構

PG産生酵素とPG受容体の発現が内分泌制御を受けている可能性が考えられる。そこで、排卵に合わせて発現が上昇する遺伝子について、その発現上昇をもたらすホルモンが何かを決定する。*in vitro* 排卵実験系において、各種ホルモン存在下で排卵予定の濾胞を培養し、効果のあるホルモンが何かを探索する。

## 4. 研究成果

### (1)メダカ排卵に及ぼすPGの作用

メダカの排卵におけるPGの作用を確認するために、排卵予定濾胞による *in vitro* 排卵実験系を用いて、PG合成酵素COXの阻害剤である indomethacin の排卵への影響を調べた。排卵前12時間で排卵予定の濾胞を摘出し、異なる濃度で indomethacin を加えた培養液中で培養したところ、濾胞の排卵は indomethacin の濃度依存的に阻害された(図1)。indomethacin による排卵阻害は、プロスタグランジンE2 (PGE2) の同時添加によりほぼ完全に解除された。これらの結果から、メダカの排卵においても、PG(特にPGE2)が重要な因子であることが示された。

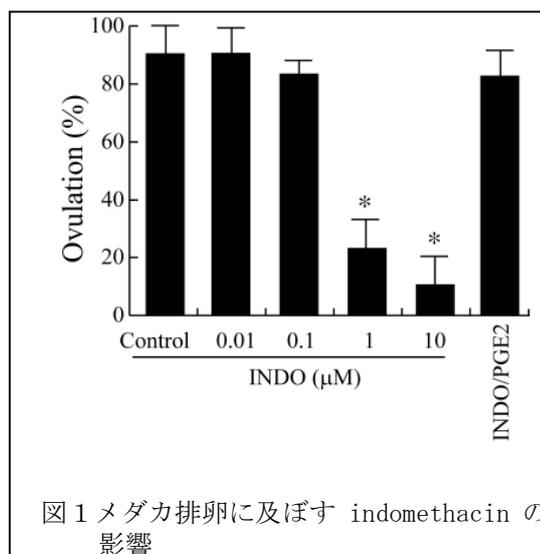


図1 メダカ排卵に及ぼす indomethacin の影響

同様の実験系において、プロスタグランジン受容体EP4のアンタゴニストとして知られているGW627368Xによっても、濃度依存的に排卵阻害が観察された。培養液に10 μMでこのアンタゴニストを加えると、メダカの排卵予定濾胞は完全に排卵が抑えられた(図2)。

以上のデータから、メダカにおいても、他の多くの脊椎動物で報告されているように、排卵過程にPGが必須の役割を果たしていることが確認された。

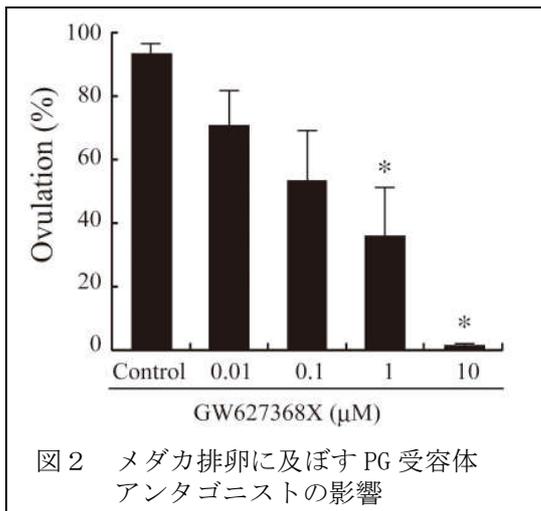


図2 メダカ排卵に及ぼすPG 受容体アンタゴニストの影響

(2) メダカ卵巣における PG 産生系

メダカは、COX-1a、COX-1b 及び COX-2 の 3 つの遺伝子をもつことがメダカ遺伝子データベースから判明している。メダカ卵巣においては、COX-1a 及び COX-1b 遺伝子発現は極めて低いか検出されなかったため、COX-2 遺伝子がメダカ卵巣における PG 産生に関与していると考えられた。そこで、COX-2 遺伝子に注目してさらなる解析を進めた。単離した COX-2 cDNA の解析から、607 アミノ酸残基からなるタンパク質であり、signal peptide (21 残基)、EGF-like domain/dimerization domain (36 残基)、membrane-binding domain (50 残基)、catalytic domain (492 残基) 及び ER retention signal (4 残基) からなることが明らかになった。酵素活性の発現に不可欠な残基はすべて保存されており、PG 産生酵素として機能

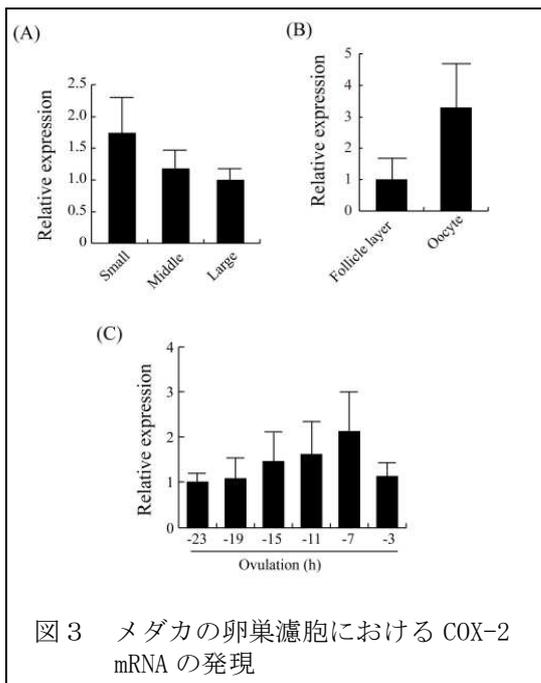


図3 メダカの卵巣濾胞における COX-2 mRNA の発現

を発揮できると考えられた。COX-2 mRNA は、メダカ卵巣の様々なサイズの濾胞において発現していた。排卵予定濾胞においては、COX-2 mRNA は濾胞細胞にも卵母細胞にも発現していた。さらに、24 時間からなる産卵周期中、濾胞では COX-2 mRNA のレベルはほとんど変動しなかった (図 3)。卵巣における COX 活性のレベルと卵巣濾胞における PGE2 レベルは、ともに、24 時間の産卵周期を通じて有意な変動はなかった。

(3) PG 受容体の同定と解析

排卵濾胞において産生された PGE2 は、その受容体により受容され排卵に必須の作用を発揮することになる。そこで、メダカ卵巣における PGE2 受容体について調査した。メダカゲノム情報データベースから、メダカは 6 つの PGE2 受容体遺伝子をもつことが判明している。そのうち、卵巣においては、EP4b 遺伝子が圧倒的に高い発現を示すことが明らかになった。EP4b mRNA レベルは、24 時間の産卵周期の終りに、すなわち、排卵が迫った濾胞において極めて高くなった (図 4)。

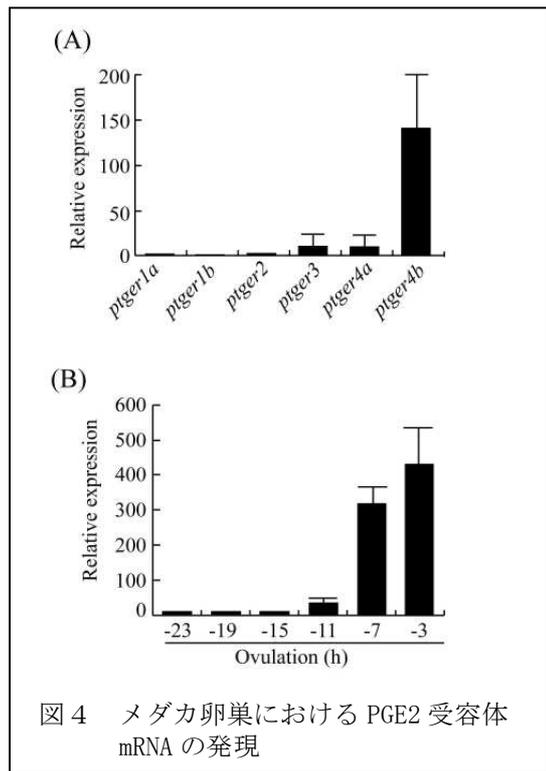


図4 メダカ卵巣における PGE2 受容体 mRNA の発現

以上の結果から、メダカ排卵において必須の役割を果たす PGE2 の作用は、PGE2 受容体の発現により調節されていることが示された。

(4) PG/ PG 受容体系の内分泌制御機構

最後に、PG/ PG 受容体系の調節機構について検討した。このために、in vivo の LH サー

ジを受ける前に卵巣から濾胞を摘出し、それを各種ホルモンの存在下で培養する実験系を確立した。排卵 23 時間前の摘出濾胞を、PMSG 存在下で培養することによって、首尾よく生存させることができ、かつ、排卵に至らしめることができた。PMSG の添加により、PGE2 受容体 (EP4b) mRNA の劇的な発現誘導ができた (図 5)。

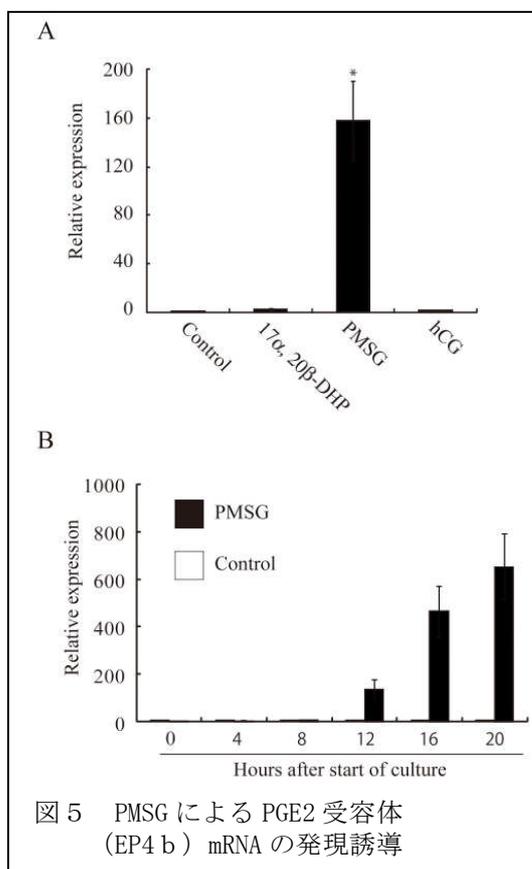


図 5 PMSG による PGE2 受容体 (EP4b) mRNA の発現誘導

その後、PMSG と同様に、メダカリコンビナント LH により *in vitro* での排卵と PGE2 受容体 mRNA の発現を誘導することが可能であることを確認した。

本研究では、次のような新知見が得られた。

- 1) メダカの排卵に PGE2 が重要な役割を担ったこと
- 2) PGE2 の産生酵素 COX-2 は常に一定のレベルで発現し、活性も変動しないこと、
- 3) PGE2 レベルの変動はないこと
- 4) PGE2 の受容には EP4b 受容体が関与すること
- 5) EP4b 受容体の発現は *in vivo* においては、LH により誘導されること

これらの知見は、脊椎動物に広く知られているプロスタグランジンによる排卵誘導現象の背景にある分子機構を解明する重要な発見である。今後の課題は、EP4b 受容体の発

現 LH による内分泌制御下にあるという発見を基に、LH 受容体への LH の結合から EP4b 受容体の発現に至る情報伝達経路の解明である。

## 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)

本科研費に関わる研究発表論文は、以下の論文リストのうちの No. 4 である。現在、審査中のもの 1 編と投稿準備中のもの 1 編がある。

また、本研究計画とは直接的な関係はないが、以前からの課題でこの研究期間中に完成した成果・発表についても、以下のリストに記載した。

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Ogiwara, K., Minagawa, K., Takano, N., Kageyama, T., Takahashi, T. Apparent Involvement of Plasmin is Involved in Early-stage Follicle Rupture during Ovulation in Medaka. *Biol. Reprod.* (2012) 86(4):113, 1–10
2. Moriyama, K., Hanai, A., Mekada, K., Yoshiki, A., Ogiwara, K., Kimura, A., Takahashi, T. Kbus/ldr, a Mutant Mouse Strain with Skeletal Abnormalities and Hypophosphatemia: Identification as an Allele of 'Hyp'. *J. Biomed. Sci.*, doi:10.1186/1423-0127-18-60 (2011)
3. Matsubara, S., Takahashi, T., Kimura, A. Localization and Subcellular Distribution of Prolyl Oligopeptidase in the Mouse Placenta. *J. Mol. Histol.*, 42(3), 251-264 (2011)
4. Fujimori, C., Ogiwara, K., Hagiwara, A., Rajapakse, S., Kimura, A., Takahashi, T. Expression of Cyclooxygenase-2 and Prostaglandin Receptor EP4b mRNA in the Ovary of the Medaka Fish, *Oryzias latipes*: Possible Involvement in Ovulation. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 332(1-2), 67-77 (2011)
5. Matsubara, S., Takahashi, T., Kimura, A. Epigenetic Patterns at the Mouse Prolyl Oligopeptidase Gene Locus Suggest the CpG Island in the Gene Body to be a Novel Regulator for Gene Expression. *Gene* 465, 17-29 (2010)
6. Ogiwara, K., Ikeda, T., Takahashi, T. A New *In Vitro* Ovulation Model for Medaka Based on Whole Ovary

- Culture. *Zool. Sci.*, 27, 762-767 (2010)
7. Kato, Y., Ogiwara, K., Fujimori, C., Kimura, A., Takahashi, T. Expression and Localization of Collagen Type IV  $\alpha 1$  chain in the medaka ovary. *Cell Tissue Res.*, 340(3), 595-605 (2010)
  8. Sakurai, Y., Inoue, H., Nishii, W., Takahashi, T., Iino, Y., Yamamoto, M., Takahashi, K. Purification and Characterization of a Major Collagenase from *Streptomyces parvulus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73(1), 21-8 (2009)
  9. Takano, N., Kimura, A., Takahashi, T. Two Distinct Localization Patterns of Testis-specific Serine Protease-1 (TESSP-1) in the Seminiferous Tubules of the Mouse Testis. *Zool. Sci.*, 26(4), 294-300 (2009)

[学会発表] (計 23 件)

1. 江口さやか、横田弘文、藤森千加、荻原克益、高橋孝行 「メダカの in vitro 排卵アッセイを利用したジクロフェナクの排卵阻害活性評価」 第 17 回日本環境毒性学会、2011 年 9 月、鹿児島、鹿児島大学水産学部
2. 藤森千加、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の役割--アクチン重合との関連--」 第 82 回日本動物学会、2011 年 9 月、旭川、旭川大雪アリーナ
3. 荻原克益、高橋孝行 「メダカ卵巣におけるメラトニン合成酵素の発現解析」 第 82 回日本動物学会、2011 年 9 月、旭川、旭川大雪アリーナ
4. 萩原茜、藤森千加、荻原克益、高橋孝行 「排卵に関わるプロスタグランジン受容体 EP4b の発現を調節する因子の研究」 第 82 回日本動物学会、2011 年 9 月、旭川、旭川大雪アリーナ
5. 高城幹太、荻原克益、高橋孝行 「ダカ卵巣濾胞におけるメラトニン合成」 第 82 回日本動物学会、2011 年 9 月、旭川、旭川大雪アリーナ
6. 藤森千加、荻原克益、高橋孝行 「メダカ排卵時におけるアクチン重合の変化に対するプロスタグランジンの関与」 日本比較内分泌学会第 36 回大会、平成 23 年 11 月、東京、都道府県会館
7. 萩原茜、荻原克益、高橋孝行 「メダカ排卵時に重要な因子 EP4b の発現誘導経路における GAP 結合の関与」 日本比較内分泌学会第 36 回大会、2011 年 11 月、東京、都道府県会館
8. 荻原克益、高橋孝行 「メダカ排卵酵素 MT2-MMP の発現誘導に関与する nPR の誘導機構--新規誘導経路の発見」 日本比較内分泌学会第 36 回大会、2011 年 11 月、東京、都道府県会館
9. 萩原茜、藤森千加、荻原克益、高橋孝行 「排卵を制御する因子プロスタグランジンの研究：プロスタグランジン受容体の発現機構」 日本動物学会北海道支部第 56 回大会、2010 年 8 月、旭川、大雪クリスタルホール
10. 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」 第 81 回日本動物学会、2010 年 9 月、東京、東京大学教養学部
11. 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？」 第 81 回日本動物学会、2010 年 9 月、東京、東京大学教養学部
12. 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」 第 81 回日本動物学会、2010 年 9 月、東京、東京大学教養学部
13. 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、2010 年 11 月、静岡、グランシップ
14. 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、2010 年 11 月、静岡、グランシップ
15. 荻原克益、高橋孝行 「メダカ排卵酵素 MT2-MMP の誘導メカニズム：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、2010 年 11 月、静岡、グランシップ
16. 米田竜馬、木村敦、高橋孝行 「マウス TESSP クラスターの精巣における特異的発現とその調節」 日本動物学会北海道支部第 55 回大会、2009 年 8 月、函館、北大水産学部
17. 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、2009 年 8 月、函館、北大水産学部
18. 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」 第 80 回日本動物学会、2009 年 9 月、静岡、グランシップ
19. 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」 第 80 回日本動物学会、2009 年 9 月、静岡、グランシップ
20. 米田竜馬、木村敦、高橋孝行 「マウス精巣特異的 TESSP クラスターの発現解析」 第 80 回日本動物学会、2009 年 9 月、静岡、グランシップ

21. 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とその合成酵素 COX-2 の役割」第 80 回日本動物学会、2009 年 9 月、静岡、グランシップ
22. 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、2009 年 10 月、大阪、千里ライフサイエンスセンター
23. 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、2009 年 10 月、大阪、千里ライフサイエンスセンター

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 2 件)

名称：魚類由来エンテロペプチダーゼ

発明者：高橋孝行、荻原克益

権利者：北海道大学

種類：特許

番号：特許第 4474543 号

取得年月日：平成 22 年 3 月 19 日

国内外の別：国内

名称：MODIFIED ENTEROPEPTIDASE PROTEIN

発明者：Katsueki Ogiwara

Takayuki Takahashi

権利者：Hokkaido University

種類：特許

番号：8013137

取得年月日：平成 23 年 9 月 6 日

国内外の別：国外 (米国)

〔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

高橋 孝行 (TAKAHASHI TAKAYUKI)

北海道大学・大学院理学研究院・教授

研究者番号：80197152

### (2) 研究分担者

荻原 克益 (OGIWARA KATSUEKI)

北海道大学・大学院理学研究院・教授

研究者番号：00422006

### (3) 連携研究者 なし