

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22591839

研究課題名(和文) 卵母細胞によるメラトニン合成とその意義

研究課題名(英文) The synthesis and function of melatonin in the ovary

研究代表者

伊藤 正則 (Itoh, Masanori)

東京医科歯科大学・教養部・教授

研究者番号：30257349

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：メラトニンは松果体等においてセロトニンからarylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT)とacetylserotonin O-methyltransferase (ASMT)の作用によって合成されることが知られている。この研究においてラット成体卵巣においてAANATとASMTが発現していることを明らかにした。AANATは卵母細胞に局在していた。また卵母細胞をセロトニン存在下で培養すると、メラトニンが合成された。卵母細胞で合成されたメラトニンは自身の成長や成熟に関与している可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Melatonin is originally identified in the pineal gland, where it is synthesized enzymatically from serotonin by the sequential action of arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT) and acetylserotonin O-methyltransferase (ASMT). Our data revealed that AANAT and ASMT are expressed in the adult rat ovary, like the pineal gland. AANAT protein is localized to the oocyte, corpus luteum, and medulla including mast cells. AANAT protein was found in oocytes at all stages of follicular development, and its levels in oocytes increased progressively throughout the follicular development. Furthermore, we showed that melatonin is synthesized from serotonin in oocytes. Melatonin synthesized in the oocyte may be implicated in its own growth and/or maturation, for example, by acting as a calmodulin antagonist and/or an antioxidant.

研究分野：神経科学、内分泌学

科研費の分科・細目：産婦人科学

キーワード：メラトニン セロトニン 卵巣 卵母細胞 ラット

1. 研究開始当初の背景

(1)卵胞液中のメラトニン濃度は血中メラトニン濃度よりも有意に高いことが知られている。ラットとヒト卵巣においてメラトニン合成酵素活性とメラトニン前駆体であるセロトニンが存在する。以上の事実から卵巣でメラトニンが合成されている可能性が示唆される。

(2)メラトニンは、昼夜情報のメディエーター、カルモジュリンアンタゴニスト、フリーラジカルスカベンジャー等として機能していることが主張されている。フリーラジカルは卵母細胞の老化の原因となると考えられている可能性がある。

2. 研究の目的

- (1)卵巣でメラトニンが合成されているのか?
- (2)合成されるとすれば卵巣のどこで合成されているのか?

上記2点を明らかにすることが本研究の目的である。さらに、メラトニン合成部位と従来の報告からメラトニンの機能を推定する。

3. 研究の方法

Wistar-Imamichi ラット成体を用いて次の実験を行った。

- (1)卵巣と松果体を切除し、RT-PCR を用いて N-acetyltransferase (AANAT) と acetylserotonin O-methyltransferase (ASOMT) の mRNA の発現を調べた。
- (2)Western blotting によりラット卵巣と松果体における AANAT タンパク質の発現調べる。
- (3)AANAT 抗体を用いた免疫組織化学でラット卵巣における AANAT タンパク質の存在部位を調べた。
- (4)卵母細胞をセロトニンを含む培養液で培養した後、HPLC でメラトニンを検出した。また、EELISA でメラトニンを定量した。

4. 研究成果

(1)松果体と同様に、成体卵巣において AANAT と ASOMT mRNAs が発現していた (Fig 1a)。

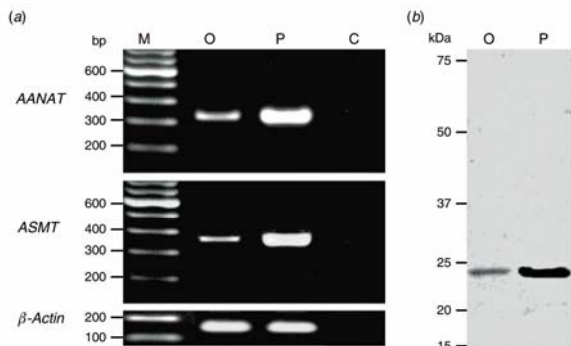


Fig. 1. Expression of melatonin-synthesising enzymes AANAT and ASMT in the ovary. (a) RT-PCR for *AANAT* and *ASMT* mRNAs. M, molecular weight standard; O, ovary; P, pineal gland; C, control (performed with gene-specific primers on ovarian RNA without reverse transcription treatment). One ovary and two pineal glands were obtained from adult (10-week-old) female rats in pro-oestrus. The pineal glands were used as positive controls for expression of *AANAT* and *ASMT*. The expected 325-bp product corresponding to *AANAT* and the expected 363-bp product corresponding to *ASMT* were amplified from total RNA from ovary and pineal gland samples (top and middle panels). In addition, the expected 166-bp product corresponding to β -actin was amplified (bottom panel). (b) Western blotting for AANAT protein. The mobilities of the molecular size standards are shown on the left. O, ovary; P, pineal gland. One ovary and four pineal glands were obtained from adult (10-week-old) female rats in pro-oestrus or diestrus. The pineal glands were used as positive controls. The amounts of loaded protein was as follows: ovary, 15.8 μ g; pineal gland, 16.2 μ g. The anti-AANAT antibody specifically recognised a protein with a molecular mass of 24 kDa in ovary and pineal gland samples. Results presented in both (a) and (b) are representative of three independent experiments.

また、AANAT タンパク質が松果体と同様に卵巣でも検出された (Fig 1b)。

(2)AANAT タンパク質は主に卵母細胞において検出され、卵母細胞におけるタンパク質レベルは卵胞の成長とともに増加した。黄体細胞と卵巣に侵入しているマスト細胞でもメラトニンが検出された (Fig 2、3)。

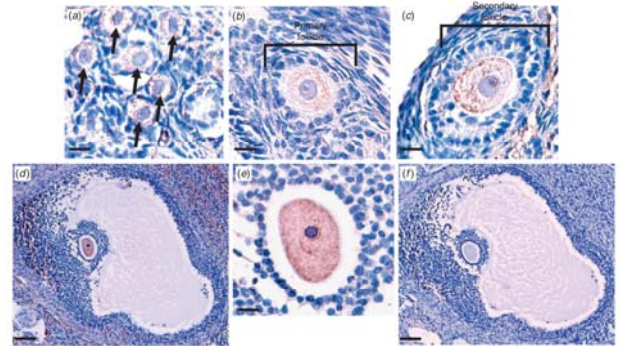


Fig. 2. Immunohistochemical staining of AANAT in oocytes throughout follicular development: (a) primordial follicles, which are indicated by arrows; (b) primary follicle; (c) secondary (preantral) follicle; (d-f) large antral (preovulatory) follicle; (e) high-power magnification of the oocyte in (d); (f) negative control, which was produced by preincubating anti-AANAT antibody with the immunogen. The ovary was obtained from adult (10-week-old) rats in diestrus or oestrus. The brown colour shows the immunoreactivity of AANAT. The sections were counterstained with hematoxylin, which is shown by the dark blue coloration. Scale bars: (a-c, e) 20 μ m, (d, f) 100 μ m. Note that AANAT immunoreactivity was found in the oocyte. As shown in (g), mast cells were also detected in the medulla at the circumference of the follicle. Micrographs are representative of the results obtained from four different rats.

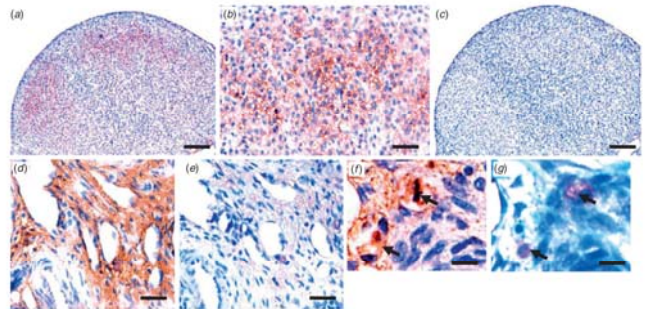


Fig. 3. Immunohistochemical staining of AANAT in (a-c) corpus luteum and (d-g) ovarian medulla. The ovary was obtained from adult (10-week-old) rats in diestrus. The brown colour shows the immunoreactivity of AANAT. The sections in (a-f) were counterstained with hematoxylin, which is shown by the dark blue coloration. (b) is a high-power magnification of (a). (c, e) negative controls, which were produced by preincubating anti-AANAT antibody with the immunogen. (f, g) show adjacent sections: (f) was immunostained with AANAT antibody, followed by counterstaining with hematoxylin and (g) was stained with toluidine blue. Arrows point to mast cells. Mast cells were stained metachromatically with toluidine blue. Scale bars: (a, c) 200 μ m; (b) 50 μ m; (d, e) 25 μ m; (f, g) 5 μ m. Micrographs are representative of the results from four different rats.

(3)生殖腺刺激ホルモンを注射したラット卵巣から卵母細胞を単離し、メラトニン前駆体であるセロトニンを含む培養液で培養したところ、セロトニンからメラトニンが合成された (Fig 4)。その合成量は、セロトニンの用量と培養時間に依存していた。

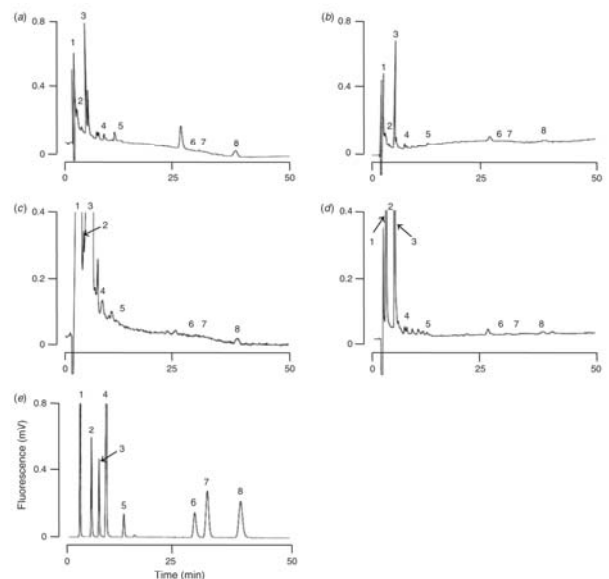


Fig. 4. Representative HPLC chromatograms for detection of melatonin in cultured rat oocytes and medium. Germinal vesicle-stage oocytes were isolated from prepubertal (3-week-old) rats. Ten oocytes were incubated in 100 μ l of medium, which contained 10 μ M serotonin, for 120 min at 37°C. As controls, oocytes were incubated without serotonin. (a) Oocytes after culture in the presence of serotonin; (b) oocytes after culture in the absence of serotonin; (c) culture medium of oocytes exposed to serotonin; (d) culture medium of oocytes incubated without serotonin; (e) standard solution containing 150 pg (0.606-0.848 pmol) of each of several indole compounds. The numbers in the figures indicate the elution positions of the following compounds: (1) serotonin; (2) 5-hydroxyindole-3-acetic acid and 5-hydroxytryptophol; (3) N-acetylserotonin; (4) 5-methoxytryptamine; (5) 6-hydroxymelatonin; (6) 6-methoxyindole-3-acetic acid; (7) 5-methoxytryptophol; (8) melatonin.

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 5 件)

①Effects of 5 alpha-dihydrotestosterone and 17 beta-estradiol on the mouse ovarian follicle development and oocyte maturation. Tarumi, W., Itoh, M.T., Suzuki, N. Plos One. 査読有、2014, 9,e99423.

doi: 10.1371/journal.pome.0099423.
eCollection.

②The rat oocyte synthesizes melatonin. Sakaguchi, K., Itoh, M.T., Takahashi, N., Tarumi, W., Ishizuka, B. Reprod. Fertile. Dev. 査読有、2013, 25, 674-682.

doi: 10.1071/RD12091.

③Androstenedione induces abnormalities in morphology and function of developing oocytes, which impairs oocyte meiotic competence. Tarumi, W., Tsukamoto, S., Okutsu, Y., Takahashi, N., Horiuchi, T., Itoh, M.T., Ishizuka, B. Fertil. Steril. 査読有、2012, 97, 469-476.

doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.11.040.

④Number of CGG repeats in the FMR1 gene of Japanese patients with primary ovarian insufficiency. Ishizuka, B., Okamoto, N., Hamada, N., Sugishita, Y., Saito, J., Takahashi, N., Ogata, T., Itoh, M.T. Fertile. Steril. 査読有、2011, 96, 1170-1174.

doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.08.028.

⑤Gonadotropins up-regulate the expression of enolase 2, but not enolase 1, in the rat ovary. Yoshioka, N., Endocr. J. 査読有、2011, 58, 941-948.

PMID: 21857146

[学会発表] (計 20 件)

①高橋則行、樽見航、浜田直美、伊藤正則、河村和弘、田中守、鈴木直、石塚文平 (2013) 3,3'-iminodipropionitrile (IDPN) の生殖軸に対する毒性. 第 58 回日本生殖医学会総会・学術講演会、神戸.

②Tarumi, W., Itoh, M.T., Suzuki, N., Ishizuka, B. (2013) Effects of 5 α -dihydroxytestosterone and 17- β estradiol on the ovarian follicles. The 9th Conference of the Pacific Rim Society for Fertility and Sterility-Cutting-edge Advances in Reproductive Medicine、神戸.

③高橋則行、河村和弘、樽見航、浜田直美、伊藤正則、田中守、鈴木直、石塚文平 (2012) 卵成熟/卵変性と Neurofilament-H のリン酸化との関連. 第 17 回日本生殖内分泌学会、東京.

④樽見航、伊藤正則、河村和弘、石塚文平、田中守、鈴木直 (2012) アンドロゲン

細胞の紡錘体形成異常を誘起する. 第 17 回日本生殖内分泌学会学術集会、東京.

⑤和田友里子、山下萌、丸山雄介、伊藤正則、服部淳彦 (2012) ウズラにおけるメラトニンの血糖低下作用. 第 37 回日本比較内分泌学会大会、福井.

⑥高橋則行、樽見航、杉下陽堂、浜田直美、伊藤正則、河村和弘、田中守、鈴木直、石塚文平 (2012) ラット卵で発現する

Neurofilament H は卵の変性および成熟時にリン酸化される. 第 57 回日本生殖医学会総会・学術講演会、長崎.

⑦樽見航、伊藤正則、河村和弘、石塚文平、田中守、鈴木直 (2012) アンドロステンジオンによる卵成熟阻害作用: 単一卵胞培養系を用いた解析. 第 57 回日本生殖医学会総会・学術講演会、長崎.

⑧樽見航、伊藤正則、河村和弘、洞下由記、塚本早苗、石塚文平、田中守、鈴木直 (2012) 卵発育・成熟に対するアンドロステンジオンの影響: 単一卵胞培養系による検討. 生殖バイオロジー東京シンポジウム 2012、東京.

⑨Tarumi, W., Tsukamoto, S., Okutsu, Y., Takahashi, N., Horiuchi, T., Itoh, M.T., Ishizuka, B. (2012) Androstenedione induces abnormalities in morphology and function of developing oocytes, which impairs oocyte meiotic competence. The International Ovarian Conference 2012、東京.

⑩岡本直樹、寺山隼人、石塚文平、平井宗一、内藤宗和、高橋則行、伊藤正則、伊藤正裕 (2011) Day 3 thymectomy mouse を用いた抗卵巣自己抗体の同定. 第 26 回日本生殖免疫学会・学術集会、名古屋.

⑪高橋則行、吉岡伸人、坂口健一郎、樽見航、伊藤正則、石塚文平 (2011) ラット卵巣で発現するエノラーゼ 2. 第 56 回日本生殖医学会総会・学術講演会、横浜.

⑫Murakami, S., Satou, T., Niihara, K., Itoh, M.T., Yoshida, M., Voro, T., Prasad, S. (2011) Effects of Kava suspension prepared from roots of *Piper methysticum* on behaviors in mice. International Conference on Chemistry, Environment and Climate Change 2011、フィジー共和国スヴァ.

⑬高橋瑞穂、石橋拓也、宮川三千世、佐藤忠章、定本清美、小池一男、伊藤正則、村上志緒、林真一郎 (2011) 6 種ラベンダー精油と情動行動の関係. 日本生薬学会第 58 回年会、東京.

⑭Tarumi, W., Tsukamoto, S., Okutsu, Y., Takahashi, N., Horiuchi, T., Itoh, M.T., Ishizuka, B. (2011) Androstenedione induces abnormalities in morphology and function of developing oocytes, which impairs oocyte meiotic competence. 16th World Congress on In Vitro Fertilization/5th World Congress on In Vitro Maturation、仙台.

⑮岡本直樹、寺山隼人、平井宗一、内藤宗和、高橋則行、伊藤正則、伊藤正裕、石塚文平 (2011) Day 3 thymectomy mouse を用いた自

己免疫性POF原因因子の検討. 第29回日本受精着床学会総会・学術講演会、東京.

⑯岡本直樹、高橋則行、伊藤正則、石塚文平 (2011) 新生仔期の胸腺除去マウスにおける卵巣機能に影響を及ぼす自己免疫因子. 第63回日本産科婦人科学会学術集会、大阪.

⑰樽見航、塚本早苗、奥津由記、石山めぐみ、田村みどり、堀内俊孝、伊藤正則、石塚文平 (2010) 卵胞の発育・成熟に対するandrostenedioneの影響-単一卵胞培養系での検討. 第55回日本生殖医学会総会・学術講演会、徳島.

⑱Okamoto, N., Takahashi, N., Itoh, M.T., Ishizuka, B. (2010) Experimental autoimmune factor affects ovarian function after neonatal thymectomy in the mouse. FertiLink 2010/International Ovarian Conference 2010、京都.

⑲丸山雄介、鈴木信雄、伊藤正則、服部淳彦 (2010) 繁殖期の雌キンギョにおけるカルシウム代謝に対するメラトニンの作用. 日本動物学会第81回大会、東京.

⑳高橋則行、伊藤正則、石塚文平 (2010) Nestinの発現は卵胞の状態により変動する. 第28回日本受精着床学会総会・学術講演会、横浜.

〔図書〕(計 1 件)

石塚文平、鈴木秋悦 編、医歯薬出版、2011、2-8 頁.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤正則 (Itoh, Masanori)

東京医科歯科大学・教養部・教授

研究者番号 : 22591839

(2) 研究分担者 ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ()

研究者番号 :