HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on the mechanism of luteinizing hormone-induced expression of prostaglandin E2 receptor EP4b essential for ovulation of the medaka [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	萩原, 茜
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第11844号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59038
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Akane_Hagiwara_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（**生命科学**）　　氏 名　萩 原　茜

審査担当者	主 査	特任教授	高 橋 孝 行
	副 査	教 授	山 下 正 兼
	副 査	准教授	勝 義 直
	副 査	准教授	木 村 敦

学 位 論 文 題 名

Studies on the mechanism of luteinizing hormone-induced expression of prostaglandin E_2 receptor EP4b essential for ovulation of the medaka
（メダカ排卵に必須なプロスタグランジン E_2 受容体 EP4b の LH による発現誘導機構に関する研究）

博士学位論文審査等の結果について（報告）

脊椎動物の卵巣には、1 つの卵母細胞が濾胞細胞層 (莢膜細胞と顆粒膜細胞から成る) に包まれた濾胞が多数存在する。濾胞内で十分に成長し、受精可能となった (卵成熟した) 卵母細胞が卵巣外へと放出 (排卵) される。排卵は魚類から哺乳類にいたる脊椎動物に共通し、次世代に生命をつなぐために必要不可欠な現象である。排卵は脳下垂体から分泌される黄体形成ホルモン (LH) の働きにより誘導されるが、排卵実行には複数の因子が関与しているため、その詳細な分子機構については未解明の点が多く残されている。

私は、排卵について詳細な解析を行うために小型魚類であるメダカを実験動物として用いた。メダカは a) 24 時間周期で決まった時間に排卵・産卵すること、b) ゲノムサイズが比較的小さくデータベースが確立していること、c) 排卵前に単離したメダカの濾胞を *in vitro* 条件下で培養しても排卵を再現できる実験系 (*in vitro* 排卵実験系) が確立していることなど、排卵研究を行う上で様々な利点をもつ。実際に、当研究室のメダカを用いた研究から、排卵時に濾胞細胞層を溶解する役割をもつ排卵酵素が脊椎動物で初めて同定された。

その後の研究からメダカ排卵時には排卵酵素以外の因子も必要とされることが明らかとなってきた。その中の 1 つがプロスタグランジン (PG) である。PG は隣接した標的細胞上の PG 受容体に結合することで、様々な生理活性作用を発揮する。PG の中でも特に、PGE_2 と $PGF_{2\alpha}$ による排卵誘導作用は哺乳類から魚類にいたる様々な種で報告されているが、その具体的な作用機構は明らかになっていない。これまでの研究から、メダカにおいては PGE_2 が排卵に関わること、さらにその受容体 EP4b の濾胞細胞層における急激な発現上昇が排卵に伴って起こり、EP4b の機能阻害が排卵阻害をもたらすことが明らかとなってきた。そこで本研究においては、排卵に必須である EP4b の発現誘導機構の解明を目指した。

第 1 章：LH および核型プロゲスチンホルモン受容体 (nPR) による EP4b の発現誘導

メダカ排卵時に EP4b mRNA 量が増加することが明らかになっている。そこで EP4b が LH によって誘導を受けるかどうかを *in vitro* 排卵実験系を用いて解析した。培養終了後に Real-Time RT-PCR 解析を行ったところ、リコンビナントメダカ LH (rLH) と共に培養した濾胞において EP4b の発現が劇的に誘導された。また、LH 刺激により活性化されると予想されるアデニル酸シクラーゼを forskolin (FSK) を用いて強制的に活性化させた場合も、EP4b の発現は誘導された。よって EP4b が LH 誘導性の因子であることが明らかとなった。さらに下流のシグナル経路の解析のため、様々な阻害剤を添加し EP4b mRNA 量を測定したところ、プロゲスチンホルモンの合成阻害剤である trilostane によって排卵と EP4b の発現は阻害され、さらにメダカにおいてプロゲスチンホルモンとして機能する 17α, 20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) によって排卵および EP4b の発

現誘導が共に回復したため、EP4b の発現誘導には LH および DHP の関与が示された。

DHP に対する受容体として 2 種類、核型受容体 (nPR) と膜型受容体 (mPR)、が知られている。nPR は転写因子として働き、排卵酵素の誘導に必須であることが明らかとなっていることから、まず nPR について解析を行った。nPR の mRNA およびタンパク質について発現解析を行ったところ、いずれも rLH によって発現が誘導され、その発現時期は EP4b の発現上昇に先立つことが明らかとなった。また発現部位も、EP4b と同様に濾胞細胞層であることが確認できた。

さらに nPR アンタゴニスト (RU486) を排卵前濾胞に添加したところ EP4b の発現が有意に抑制されたことや、単離した濾胞細胞層を用いたクロマチン免疫沈降法により nPR の EP4b 上流領域への結合が確認できたことなどから、nPR は EP4b の直接の転写因子であることが示された。

第 2 章：膜型プロゲスチンホルモン受容体 (mPR) の EP4b 発現誘導への関与

膜型プロゲスチンホルモン受容体 (mPR) は、これまで、卵母細胞膜上に存在し、プロゲスチンホルモンを受容することで細胞内の cAMP 濃度の減少を引き起こし、卵成熟促進因子(MPF) の形成とそれに続く一連の卵成熟のプロセスの進行を促すことが知られている。しかし近年、濾胞細胞層における mPR の発現が確認され、その機能に注目が集まりつつある。事実、mPR はメダカ卵母細胞のみではなく濾胞細胞層にも発現することが確認された。メダカゲノムデータベースには mPRα、β、γ の 3 種類が登録されていたが、Real-Time RT-PCR 解析によりメダカ卵巣においては mPRα と γ の発現が顕著であることが明らかとなった。さらにこの 2 種類の mPR は卵母細胞を囲む濾胞細胞層、さらには顆粒膜細胞層においても発現が確認された。そこで、mPR の排卵及び EP4b 発現への影響を解析した。

LH サージ後の濾胞を DHP 合成が高まる時期に単離し、25 μM FSK を添加すると卵成熟、排卵および EP4b mRNA 上昇が阻害された。しかし、低濃度の 1 μM FSK を加えた培養液で濾胞を培養すると、卵成熟は阻害されず排卵と EP4b の発現上昇にのみ阻害効果が確認された。このことから、mPR が濾胞細胞層において EP4b の発現誘導に関わることが予想された。そこで、メダカ mPR の機能解析を行った。mPRα もしくは γ を HEK293T 細胞に強制発現させ、この細胞に cAMP に反応しルシフェラーゼの蛍光を示す、改変ルシフェラーゼ発現ベクターを導入した。FSK 処理後に DHP もしくは溶媒のみを細胞に添加しルシフェラーゼ活性を測定したところ、mPRα を強制発現させた細胞への DHP の添加により有意にルシフェラーゼ活性が減少することが確認された。一方、mPRγ を強制発現させた細胞においては DHP 添加による cAMP の減少が起こらなかった。このことから、濾胞細胞層において mPRα が DHP に応答して cAMP 濃度を減少させることが EP4b 発現誘導に重要であることが示唆された。

nPR や EP4b を含む PG 受容体が排卵に関与することは多くの種で報告されていたが、本研究は nPR が EP4b の直接の転写因子であることを明らかにした。さらに本研究は、卵母細胞に発現し、リガンドの DHP と結合して卵成熟を引き起こすことが明らかとなっている mPR が、メダカ濾胞細胞層においても発現していることを示すとともに、その作動が濾胞細胞層における EP4b 遺伝子の発現に関わることを明らかにした。これらの発見は本研究によって初めてなされたものであり、脊椎動物の排卵現象のさらなる理解に貢献した。よって、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。