

# 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 久留主 志 朗

哺乳類の卵巣機能は主に下垂体や胎盤により制御されているが、近年卵巣自身による局所での調節機構の重要性が指摘されてきている。プロスタグランジン (PG) に代表されるエイコサノイドはその代表的な局所調節因子の一つである。PGは必要時に生成され、作用を発現した後、速やかに代謝・分解されるため、その生物学的意義を理解するためには産生機構を解析することが重要である。PG合成系には、ホスホリパーゼA<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>)による膜リン脂質からのアラキドン酸(AA)の遊離と、シクロオキシゲナーゼ(COX)によるAAからPGH<sub>2</sub>への変換の2つの律速段階がある。これらの酵素には幾つかのイソタイプが存在するが、中でも細胞質型PLA<sub>2</sub>(cPLA<sub>2</sub>)は、AA含有リン脂質に基質選択性を示し、低濃度のカルシウム及びmitogen-activated protein kinaseによるリン酸化で活性化されることから、特に重要視されている。本論文はcPLA<sub>2</sub>に着目し、ラット卵巣における本酵素の発現と生理的役割を追究したものである。

緒論において研究の背景と意義について概説した後、第1章ではまずラット卵巣におけるcPLA<sub>2</sub>の遺伝子発現と細胞局在について検討している。RT-PCR法によりcPLA<sub>2</sub> mRNAの検出を試みた結果、脾臓や腎臓と同様に卵巣総RNAからも予想されるサイズのDNA断片が増幅され、卵巣におけるcPLA<sub>2</sub>遺伝子の発現が確認された。次いで卵巣におけるcPLA<sub>2</sub>の分布を免疫組織化学的に検討したところ、最も強い免疫シグナルは、卵子と閉鎖卵胞や退行黄体に見られた。これらのことより、cPLA<sub>2</sub>は積極的な発現調節を受け、ダイナミックに変動する卵巣の形態と機能の調節に寄与している可能性が示された。中でも卵子と排卵前後の顆粒層細胞の免疫反応の知見より、卵子成熟及び排卵過程への関与と、組織の再構築の盛んな卵巣でのアポトーシスへの関与が示唆された。

第2章では、排卵過程の解析に汎用される幼若ラットの誘起排卵モデルを用いて、cPLA<sub>2</sub>の発現動態と機能的役割を調べた。その結果、ウマ絨毛性性腺刺激ホルモン(eCG)刺激により卵胞膜での免疫反応が増強し、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)投与後は顆粒層細胞が黄体細胞へ分化しつつあるところで増強する傾向が観察された。卵巣のサイトゾルを調製し、そのPLA<sub>2</sub>活性を経時的に測定したところ、eCG刺激後若干の増加が見られるが、hCG投与の少なくとも8時間後までは低く推移し、排卵後の黄体化にともなって増加した。この活性は、cPLA<sub>2</sub>の特異的阻害薬であるarachidonyl trifluoromethylketone(ATK)により約20-30%にまで低下した。卵胞局所のPG濃度が最も高まることが明らかにされているhCG投与8時間後に、ATKを卵巣嚢内に投与すると、卵巣PGE<sub>2</sub>含量が半減し、また排卵数も用量依存的に減少した。これらの結果より、卵巣におけるPLA<sub>2</sub>活性の主体はcPLA<sub>2</sub>であり、PG(E<sub>2</sub>)産生を介して排卵過程に関与していることが示された。

第3章では、機能黄体における本酵素の活性発現と機能的役割について検討した。黄体の加齢に伴う発現量をイムノブロット法あるいは免疫組織化学法で調べたところ、偽妊娠黄体において機能的退行の起こる12日目で発現が増強した。黄体のサイトゾルPLA<sub>2</sub>活性は偽妊娠6日目から12日目にかけて上昇し、また、強力な黄体退行因子であるPGF<sub>2</sub>αの黄体での含量はPLA<sub>2</sub>活性の推移にほぼ一致して増加した。PLA<sub>2</sub>活性は黄体の機能的退行に伴って上昇するとともに、その後の形態的退行過程においても高いレベルで推移した。以上の結果から、cPLA<sub>2</sub>活性はラットの機能的退行、さらには形態的退行時において亢進し、黄体退行を誘導並びに促進するよう機能していると考えられる。そこで幼若偽妊娠ラットを用いて、cPLA<sub>2</sub>の遺伝子発現を抑制することが知られているdexamethasoneを、偽妊娠6日目から卵巣嚢内に36時間おきに4回投与したところ、黄体の機能的退行は約5日間遅延した。すなわち、偽妊娠末期に活性の上昇するcPLA<sub>2</sub>はPG産生を介して黄体退行を誘導及び促進していることが強く示唆された。これら第1章から第3章までの結果について、総括において総合的な考察がなされている。

以上、本研究はラットの卵巣にはcPLA<sub>2</sub>が発現し、卵子、退行黄体や閉鎖卵胞のアポトーシス過程の組織に多く局在することを明らかにするとともに、排卵と黄体の機能的退行においては本酵素の発現制御がその過程に重要な役割を果たしていることを示したもので、学術上、応用上貢献するところが少ない。よって審査員一同は本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものとして認めた。