

# ツメガエル卵細胞の排卵と成熟，受精， および細胞死の分子機構特にホルモン 依存的な排卵に関する新知見について

佐藤 賢 一\*

## 要 旨

排卵は、有性生殖に欠かせないユニークな生理現象であり、ホルモン刺激に対する卵胞の反応から、卵胞や卵巣から成熟した受精能力のある卵子が放出されるまでの一連のプロセスを指す。驚くべきことに、さまざまな生物種における排卵は、体外で高い再現性をもって行うことができる。さらに、このプロセスに関与する分子メカニズムとシグナル伝達経路のほとんどが、*in vitro* 排卵モデルを用いて解明されている。ここでは、カエル（主にアフリカツメガエル *Xenopus laevis*）で観察された排卵の主要な分子・細胞学的イベントを、減数分裂期の卵母細胞の成熟と卵胞の破裂に焦点をあてて、主に *ex vivo* のアプローチで概観する。

キーワード：アフリカツメガエル，卵巣，排卵，試験管内再構成，シグナル伝達

## 排卵プロセスの試験管内再構成

野生のカエルは、気温、降水量、昼間の長さ、オスの存在などの良好な環境因子により、視床下部、下垂体、卵巣卵胞細胞が関与するホルモンカスケードを介して卵子の排卵が開始される（図1）。通常、繁殖期には、ホルモン刺激後、数時間以内に卵の沈着と受精が起こる。しかし、一部の卵はもっと長い時間、カエルの生殖器管に保持され、そこでアポトーシスを起こして分解されることがある（Iguchi et al. 2013; Tokmakov et al., 2018）。加齢したカエルは、若い動物よりも多くの排卵された卵を長期間保持すること（Iguchi et al., 2013）、また、気温の低下により、成熟した卵を数日間輸卵管に保持することが報告されている（Witschi, 1952）。このように、季節的、環境的、個体的な要因により、カエルの卵母細胞の排卵を生体内で制御することは困難です。注目すべきは、同じ要因が異なる魚種、特にカエルと同様に外部受精を行う真骨魚類においても排卵プロセスを制御することが実証されている（Munakata and Kobayashi, 2010）。

---

\* 京都産業大学生命科学部産業生命科学科

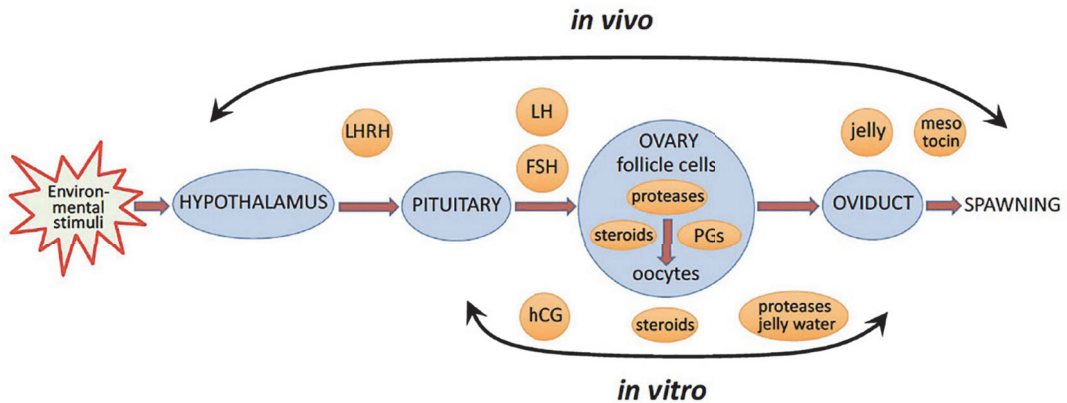


図1：カエル卵母細胞の *in vivo* および *in vitro* での排卵。生体内では、好ましい環境因子が視床下部 - 下垂体 - 性腺軸を介してホルモンカスケードを起こし、卵子の排卵を誘発して産卵に至る。In vitro では、下垂体抽出物、黄体形成ホルモン (LH)、LH の機能的アナログであるヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG)、複数のステロイドホルモンなどにより、卵巢片や単離された卵胞で卵子の排卵が誘発される (Tokmakov ら, 2020)。

新しい *in vitro* 排卵モデルを用いた我々の最近の研究では、*Xenopus* 卵子の排卵時の卵胞破裂に MAPK (マップキナーゼ) および MMP (マトリクスメタロプロテイナーゼ) 活性が関与することを示す初めての直接的な証拠が示された (Tokmakov ら, 2019; 2020)。プロゲステロン投与の前にコラゲナーゼで少し前処理した単離卵胞を用いて、減数分裂の成熟と卵胞破裂の両方を *in vitro* で再現できることがわかった。また、hCG (ヒト絨毛性ゴナドトロピン) を投与した卵胞では、卵子の成熟と卵胞の破裂が、やや低い確率で観察されました。特に、卵胞破裂は GVBD (卵核胞崩壊) とほぼ同時に起こり (図2)、プロゲステロン非投与時には起こらなかったことから、今回開発したモデルが生理学的に妥当であることが示された。

カエルの自然排卵では、成熟した卵母細胞は卵巢に留まらず、未成熟な卵母細胞は排卵しないので、この2つのプロセスは生体内で高度に連携しています。重要なことは、このモデルでは、汎MMP阻害剤である GM6001 の存在下で、卵胞からの卵子の放出は阻害されたが、卵子の成熟は阻害されなかったことである。さらに、特異的 MEK (MAPK キナーゼ) 阻害剤 U0126 を用いて MAPK 経路を薬理的に阻害すると、減数分裂成熟と卵胞破裂の両方が抑制されることが実証された (Tokmakov ら, 2019; 2020)。これらの知見は、MAPK および MMP 活性が、カエルの卵巢卵胞からの卵子解放のプロセスに関与していることを証明している。卵胞破裂に関与するタンパク質分解酵素を特定し、カエルの排卵時に卵胞細胞で MAPK が活性化される経路を解明するには、さらなる研究が必要である。

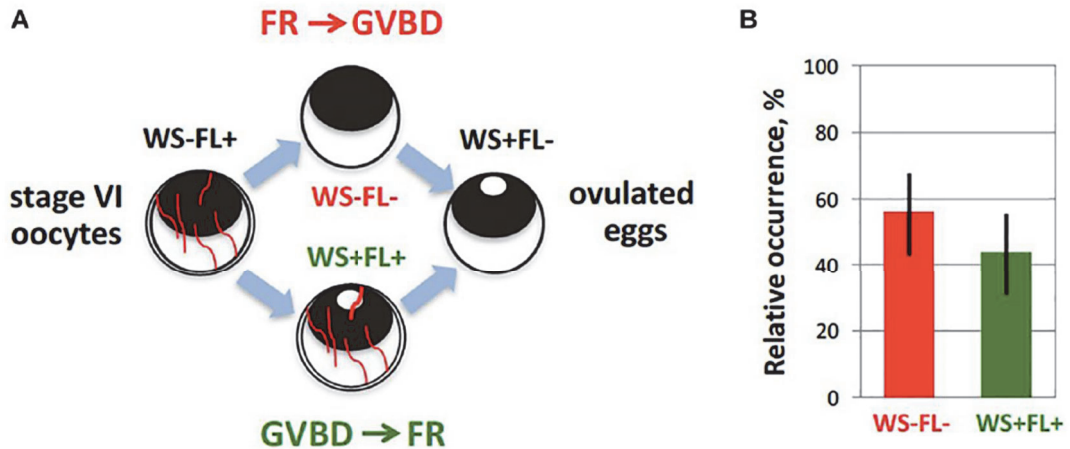


図2: *Xenopus* 卵子の排卵における成熟と卵胞破裂のタイミング。開発した *in vitro* 排卵モデル (Tokmakov et al., 2019) における減数分裂成熟の進行は、胚軸小胞破壊 (GVBD) を反映した卵母細胞の動物半球上の白斑 (WS) の出現によって判断し、卵胞破裂 (FR) の発生は卵胞層 (FL) の消失によって定義した。A) 理論的には、図に示すように、排卵時に GVBD → FR と FR → GVBD という2つの代替シナリオがありうる。両者を区別するために、ホルモン剤による排卵時に、形態的に異なる4種類の細胞を数えた。それらには、FLに囲まれたWSを持たない卵母細胞 (WS-FL+)、WSとFLを持つ卵母細胞 (WS + FL+)、WSとFLを持たない卵母細胞 (WS-FL-)、そしてWSを持ちFLを持たない卵母細胞 (WS + FL) が含まれていた。WS-FL+の表現型は元の卵子集団を特徴づけ、WS + FL-の表現型は排卵された成熟卵に対応する。B) 実験的に観察された2つの中間的な表現型、WS + FL+とWS-FL-の相対頻度は非常に近く、GVBDとFRがほぼ同時に起こることを示している (Tokmakov ら, 2020)。

## 参考文献

- Iguchi, S., Iwasaki, T., Fukami, Y., and Tokmakov, A. A. (2013). Unlaid *Xenopus* eggs degrade by apoptosis in the genital tract. *BMC Cell Biol.* 14:11. doi: 10.1186/1471-2121-14-11
- Munakata, A., and Kobayashi, M. (2010). Endocrine control of sexual behavior in teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 456-468. doi: 10.1016/j.ygcen.2009.04.011
- Tokmakov, A. A., Sato, K. I., and Stefanov, V. E. (2018). Postovulatory cell death: why eggs die via apoptosis in biological species with external fertilization. *J. Reprod. Dev.* 64, 1-6. doi: 10.1262/jrd.2017-100
- Tokmakov, A. A., Matsumoto, Y., Isobe, T., and Sato, K.-I. (2019). In Vitro Reconstruction of *Xenopus* Oocyte Ovulation. *Int. J. Mol. Sci.* 20:4766. doi: 10.3390/ijms20194766
- Tokmakov, A. A., Stefanov, V.E., and Sato, K.-I. (2020) Dissection of the Ovulatory Process Using *ex vivo* Approaches. *Front Cell Dev Biol.* 8, 605379. doi: 10.3389/fcell.2020.605379.
- Witschi, E. (1952). Overripeness of the egg as a cause of twinning and teratogenesis: a review. *Cancer Res.* 1952, 763-786.

# Molecular Mechanisms of Ovulation, Maturation, Fertilization, and Cell Death in Clawed Frog Oocytes: New findings on hormone-dependent ovulation in particular

Ken-ichi SATO

## Abstract

Ovulation is a unique physiological phenomenon essential for sexual reproduction, and refers to a series of processes from the response of the follicle to hormonal stimulation to the release of mature, fertilization-capable oocytes from the follicle and ovary. Surprisingly, ovulation in various species can be performed in vitro with a high degree of reproducibility. Furthermore, most of the molecular mechanisms and signaling pathways involved in this process have been elucidated using in vitro ovulation models. Here, we review the major molecular and cytological events of ovulation observed in frogs (mainly the African clawed frog *Xenopus laevis*), focusing on oocyte maturation and follicle rupture during meiosis, using mainly ex vivo approaches.

**Keywords :** African clawed frog (*Xenopus laevis*), ovary, ovulation, reconstitution, signal transduction