

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

坂口 健一郎

専攻分野：産婦人科学

コース：

指導教授：鈴木 直

主論文の題目：

The Rat Oocyte Synthesises Melatonin

(ラットの卵母細胞はメラトニンを合成する)

共著者：

**Masanori T. Itoh, Noriyuki Takahashi, Wataru Tarumi
and Bunpei Ishizuka**

緒言

メラトニンは松果体で産生されるインドールアミンであり、松果体ではアシルアルキルアミン N-アセチルトランスフェラーゼ (AANAT) やアセチルセロトニン O-メチルトランスフェラーゼ (ASMT) の2つの酵素による一連の反応でセロトニンからメラトニンが合成されることが知られている。メラトニンは直接的に卵巣機能に影響を及ぼすことが明らかにされており、我々の研究グループはメラトニンが卵巣内で合成される可能性を示してきた。そこで今回我々は、ラットを用いて AANAT や ASMT などの酵素の卵巣における発現の有無を検討した。

方法・対象

12 時間明期と 12 時間暗期の光条件下で飼育されたメスの Wistar-Imamichi ラットを使用した。10 週齢のラットを用いて、AANAT と ASMT の発現を RT-PCR、ウエスタンブロットそして免疫染色にて検討した。ラットは夜間（23 時から 24 時 30 分）に、薄暗い赤いライト下で処置し断頭後、速やかに卵巣と松果体を摘出した。なお松果体は AANAT と ASMT 発現のポジティブコントロールとして使用した。次に、卵母細胞におけるセロトニン代謝とメラトニン産生を検討した。10 週齢のラットに 10IU の eCG (equine chorionic gonadotropin) を皮下注入し、48 時間後に germinal vesicle ステージの卵母細胞を取り出し、modified Krebs-Ringer bicarbonate solution で培養した。メラトニンなどのセロトニン代謝物の同定は、我々の研究グループで確立した high-performance liquid chromatography (HPLC) 法を用いた。なお、各群の平均値の比較は Student's *t* -test を用いて行った。統計的有意性は $p < 0.05$ の水準で確定した。当実験は聖マリアンナ医科大学動物実験委員会の承認を得て行われた。

結果

RT-PCR の結果、成熟ラット卵巣組織において、松果体と同様に AANAT mRNA と ASMT mRNA が検出された。一方、ウエスタンブロットでは、AANAT に相当する 24kDa のタンパク質のバンドが検出された。なお、卵巣組織から抽出された AANAT タンパク質量は松果体のそれよりも少なかった。また、免疫組織化学染色により、AANAT の免疫活性は卵母細胞、黄体、卵巣髄質で認められた。原始卵胞から排卵直前の胞状卵胞までの発育中のすべての卵胞内の卵母細胞に AANAT 免疫活性が認められた。以上よりラット卵母細胞にメラトニン合成酵素の 1 つである AANAT が発現していることが明らかになった。一方、マウス卵母細胞がセロトニンを取り込む事実が既に報告されている。そこで、卵母細胞に取

り込まれたセロトニンがメラトニンに代謝される可能性を検討した。単離した卵母細胞を、セロトニンを含む培養液で培養した結果、HPLCによってメラトニンとその他のセロトニン代謝物が同定された。さらに卵母細胞をセロトニン添加とセロトニン未添加（コントロール）で培養した結果、メラトニンのピークはセロトニン添加群の方がコントロール群よりも高かった。以上の結果よりセロトニン存在下で培養された卵母細胞はメラトニン産生を高めることが明らかになった。一方、メラトニンの前駆物質である N-アセチルセロトニンのピークはセロトニン添加群でコントロール群より高かった。そして ELISA 法で定量を行った結果、メラトニン産生量は、培養時間とセロトニン投与量に依存してコントロール群より有意に増量した ($p < 0.01$)。

考察

本研究により、ラット卵巣におけるメラトニン合成に関与する2つの酵素（AANAT と ASMT）の発現が明らかになった。また、AANAT が、卵母細胞、黄体そしてマスト細胞を含む髄質において検出された。このことから卵巣内のこれらの部所でメラトニンが合成されている事実が示唆された。卵母細胞内の AANAT 濃度が卵胞の発育に伴い増加したことから、セロトニン存在下で培養された卵母細胞がメラトニン産生を高めることが明らかになった。これはラット卵母細胞においてセロトニンからメラトニンが合成されることを示している。マウスでは、卵母細胞周囲の cumulus granulosa cell がセロトニンを産生し、さらに卵母細胞がセロトニントランスポーターを有することで、セロトニンを取り込むことが知られている。今回のラットを用いた研究では、卵母細胞内でメラトニンがセロトニンから合成され、産生されたメラトニンが、卵母細胞外へと放出された。

一方、マスト細胞は卵巣髄質内に多く認められる。さらに、メラトニンやその前駆物質のセロトニンがマスト細胞内に存在することが明ら

かになっている。本研究で、AANAT がマスト細胞内で検出されたことにより、マスト細胞内でもメラトニンが合成されていることが明らかになった。

メラトニンは抗酸化剤やフリーラディカルスカベンジャーとして働いており、酸化ストレスは卵母細胞発育や成熟を抑制すると考えられている。メラトニンにより卵母細胞は酸化ストレスから守られており、受精や一連の胚発育を促している。以上の結果から、卵母細胞自身が酸化ストレスから守るために卵母細胞でメラトニンを合成している可能性が考えられる。