

氏名	窪田 早耶香		
授与した学位	博 士		
専攻分野の名称	農 学		
学位授与番号	博甲第	7 5 1 0	号
学位授与の日付	2 0 2 6 年 3 月 2 5 日		
学位授与の要件	環境生命自然科学研究科 環境生命自然科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	Study on the mechanisms regulating bovine oviductal tonus during peri-ovulatory period (排卵前後におけるウシ卵管緊張度制御メカニズムに関する研究)		
論文審査委員	教授 舟橋 弘晃	教授 西野 直樹	准教授 若井 拓哉
学位論文内容の要旨			
卵管は卵巣と子宮の間に位置する細管であり、精子の受精能獲得や初期胚発生を支える環境を提供するとともに、配偶子および初期胚の輸送経路として機能する。その輸送には卵管平滑筋の収縮弛緩運動が重要であり、特に峡部では収縮運動が精子や胚の輸送に大きく影響する。平滑筋機能が低下すると受精障害や初期胚発生不良を引き起こし、ウシでは夏季の受胎率低下、ヒトでは異所性妊娠の一因となることが示唆されている。収縮運動は頻度・振幅・緊張度から構成されるが、緊張度に関する研究は少なく、その制御機構の解明が求められている。本研究では、排卵前後のウシ卵管における緊張度制御に着目し、エストラジオール-17β (E2) および卵胞液が卵管緊張度に与える影響を検討した。 ウシ卵管峡部組織を4つのステージに分類し、E2 がウシ卵管収縮能 (収縮頻度、収縮弛緩力、緊張度) に与える影響を検討したところ、E2 は収縮頻度や収縮弛緩力には影響を与えなかったが、排卵直後のステージ I においてのみ E2 が対照区と比較して有意に卵管緊張度を増加させた。この効果は G タンパク質共役型 E2 受容体 (GPER1) アゴニストで再現され、GPER1 アンタゴニストおよび Rho キナーゼ (ROCK) 阻害剤により抑制されたことから、GPER1-ROCK 経路が関与することが示唆された。さらに、ステージ I の卵管平滑筋では ROCK II のタンパク質発現量および ROCK 活性が他のステージより高く、E2 刺激により RhoA/ROCK 経路の下流因子であるミオシンホスファターゼ標的サブユニット 1 (MYPT1) およびミオシン軽鎖 (MLC) のリン酸化レベルが増加した。ROCK の阻害効果を有する Rho 関連 GTP 結合タンパク質 (RND) 3 は、黄体期と比較して排卵前であるステージ IV の卵管平滑筋組織で有意に高く発現していた。RND 阻害剤は、ステージ IV の卵管における RhoA/ROCK シグナル経路の活性化を促進し、E2 誘導性の卵管緊張度増加効果を回復させた。以上の結果から、排卵直後の卵管においてのみ E2 の卵管緊張度増加効果が見られるのは、ROCK、MYPT1 および MLC の活性レベルに依存する可能性が示された。また、排卵前の卵管においては、RND3 の高発現が E2 誘導性の卵管緊張度増加効果を阻害したと考えられた。 次に、卵胞液のウシ卵管収縮能に対する作用を、排卵前のステージ IV の卵管を用いて検討した。黄体形成ホルモン (LH) サージ前の卵胞液は収縮能に影響を与えなかったが、LH サージ後の卵胞液は添加後すみやかに卵管緊張度を増加させ、卵管長を短縮させた。この効果は、血小板活性化因子受容体 (PAFR) アンタゴニスト、ROCK 阻害剤、およびプロテインキナーゼ Cα (PKCα) の阻害剤により抑制された。PKCα は RND3 抑制効果を有することが報告されていることから、LH サージ後の卵胞液は PAFR を介した PKCα の活性化により排卵前の卵管に高発現する RND3 を阻害し、RND3 の ROCK 阻害効果を抑制することによって緊張度を上昇させることが示唆された。 以上の結果より、E2 は排卵直後のウシ卵管において GPER1 を介した ROCK/MYPT1/MLC の活性化により緊張度を増加させた一方、卵胞液は PAFR を介した ROCK の活性化により排卵前の卵管緊張度を増加させた。これらの知見は、家畜動物やヒトにおける卵管輸送機能の理解および繁殖効率向上に重要な示唆を与える。			

論文審査結果の要旨

牛の受胎率低下は畜産業において喫緊に解決すべき問題である。また、人間においても、2023 年の統計によると生まれた子供の 8.5 人に 1 人が何らかの生殖補助技術によって誕生している。これら家畜の受胎低下や人間の不妊治療件数の増加の要因は様々であり、抜本的な解決がなされていない。多くの不受胎において受精から胚の初期発生に問題が生じていると考えている。卵巣から排卵された卵母細胞が精子と受精し、初期胚発生・着床に至るまでのイベントは卵管・子宮で行われ、適切にこの生殖管内を配偶子または胚が移送されない場合、受精の不成立、胚損耗や人間においては異所性妊娠という重篤な状況に陥る。本研究はこのような背景を踏まえ、その原因探求と対策を最終的な目的として、卵管の輸送能に関わる卵管平滑筋の排卵前後における緊張度制御機構について検討を行っている。最初に、排卵前に血中レベルが上昇するエストラジオール 17β (E2) が直接ウシ卵管平滑筋の緊張度を上昇させることを示している。これまで、E2 が直接卵管平滑筋の緊張度を増加させる報告はなく、これは本研究で見いだされた新しい知見である。さらに、排卵前の卵管では E2 には反応せず、排卵後の卵管で反応性が見らることを見出した。本来血中の E2 レベルが高い排卵前で反応性が見られないことは、ホルモンの作用としては非常に特徴的であり、本研究ではこの点について深く検討を進めている。E2 はその膜上レセプターである GPER1 から RHO/ROCK 系を経てミオシンのリン酸化制御を行っている。申請者は排卵直前の卵管平滑筋では ROCK 活性が低下しており、これは ROCK を制御している RND3 が高発現していることによるとしている。すなわち、排 RND3 を高発現させることで排卵前の高 E2 への感受性を低下させて、過度な卵管の収縮を抑えるというメカニズムを提唱している。これは卵管峡部に存在する精子が卵管収縮によって、排卵前に受精の場である膨大部へ尚早に輸送しないようにしていると考えられる。では、排卵後には精子は卵管峡部から膨大部に輸送される必要があるが、これはどのように制御されているのかについて、検討されている。排卵後に卵母細胞とともに卵胞液が卵管内に流入することに申請者は注目している。卵胞液中には卵管平滑筋を収縮させる物質が存在することを明らかにし、さらに卵胞液中の血小板活性化因子 (PAF) であることを示している。しかし前述のように排卵前の卵管平滑筋は RND3 によって ROCK 活性が抑制されており、PAF の ROCK 活性化能は発揮できない。申請者は PAF のシグナル伝達経路のなかでもプロテインキナーゼ $C\alpha$ (PKC α) に注目した。PKC α を抑制すると ROCK 活性も阻害され、平滑筋緊張度は低下した。これは PKC α が RND3 の活性を低下させ、ROCK 活性を回復するためと考えられる。これらの一連の結果から、排卵直前の卵管は高濃度 E2 への感受性を抑えるために RND3 を高発現・活性化させており、これによって卵管峡部に貯蔵されている精子の尚早な卵管膨大部の輸送を押さえ、この機構が排卵と同時に卵管内に流入する卵胞液中の PAF により解除され、受精に適切な精子の膨大部への輸送が行われることが明らかとなった。これは排卵前後の卵管収縮が受精の成功のために高度に制御されていることを示した初めての報告であり、この知見は家畜や人間における妊孕性低下メカニズムの解明、さらに、新たな受胎率向上技術開発へとつながる大きな足掛かりとなりうる。以上から、本論文は博士（農学）の学位論文として適格と認め、合格と判断した。