

機関番号：13801

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20580308

研究課題名（和文）豚精巣で発現するリラキシン様蛋白の構造と受容体 LGR8 を介した造精機能制御の解明

研究課題名（英文）The structure of relaxin-like peptide expressed in the boar testis and the implication in testicular function via its receptor LGR8

研究代表者

高坂 哲也 (KOHSAKA TETSUYA)

静岡大学・農学部・教授

研究者番号：10186611

研究成果の概要（和文）：ブタ精巣よりRXN様蛋白を初めて単離し、それは12 kDa のA-B-C鎖からなる前駆体構造をとり、S-S結合と生物活性を保持した状態でライディッヒ細胞から分泌されることを明らかにした。分泌されたRXN様蛋白は血中のみならず、精巣間隙にも放出され、精細管内へ運ばれることを示した。さらに、受容体LGR8が精細管内の造精細胞やライディッヒ細胞に存在することを見出し、RXN様蛋白が内分泌、自己分泌、傍分泌因子として機能する可能性を突き止めた。

研究成果の概要（英文）：This study has purified native relaxin-like peptide (RLF) from boar testes, and demonstrated for the first time at nay species that native RLF is secreted from the Leydig cells as a 12-kDa heterotrimeric proform structure consisting of an A-B-C-domain with site-specific disulphide bonds and full biological activity. RLF secreted from Leydig cells was released not only into the blood circulation, but also into the interstitial compartment and is transported into the seminiferous compartments, where its own receptor LGR8 was expressed, suggesting that RLF may function as a paracrine and an autocrine and/or endocrine factor on seminiferous germ cells and Leydig cells, respectively.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究代表者の専門分野：動物生殖生理学

科研費の分科・細目：畜産獣医学・応用動物科学

キーワード：relaxin、RLF、LGR、testis

1. 研究開始当初の背景

リラキシン[Relaxin、以下 RXN と略す]は、子宮改変作用のほか、多岐に渡る組織でその多彩な機能を発現する多機能性ホルモンである。これまでに申請者は、RXN と構造の類似したファミリー蛋白（RXN 様蛋白；relaxin-like peptide, RLF）をブタ精囊腺

で発見し、本蛋白がプロセッシング（翻訳後修飾）を経て A 鎖と B 鎖からなる分子量 6 kDa のヘテロダイマーとして精液中に放出され、精子の受精能獲得を司る鍵分子として作用することを明らかにしてきた。

しかし最近、精巣でも精囊腺由来の RXN 様蛋白の抗体と強く反応する類似の物質を見

出した。その推定分子量は精嚢腺由来のものに比べ約2倍も大きく、さらに本蛋白の受容体分子 LGR8 の遺伝子も精巢で強く発現しているなどの事実を掴んだ。しかし、ブタ精巢で発現する RXN 様蛋白がいつ、どの細胞で、どのような構造分子として作られ、また、精巢のどの細胞に働きかけ、どのような作用を發揮するのか、現時点で全く不明であった。

2. 研究の目的

そこで本研究は、精巢で発現する RXN 様蛋白を精巢生理との関連性で捕らえたいと考え、本蛋白が精巢機能の制御を司る鍵分子となり得るのではないかと作業仮説を立て、精巢で発現する RXN 様蛋白の構造特性の解明と本蛋白の受容体 LGR8 を介した造精機能の制御についての解明を目指した。

3. 研究の方法

本研究は、精巢で発現する RXN 様蛋白について構造面と機能面からその存在意義を明らかにしようとした。

まず、構造面からは、in situ hybridization と免疫組織化学により産生細胞を同定した上で、生化学的手法を駆使し本蛋白を精製しその質量・構造特性を決定する。加えて、精製蛋白のプロセッシングの実態と生理活性の保有を分子生物学的手法で明らかにする。

一方、機能面からは、受容体分子 LGR8 の発現動態と発現細胞を分子生物学的及び免疫学的手法 (Western blot, 免疫組織化学) で究明し、RXN 様蛋白のリガンド-レセプターシステムの存在をセルアナリシス法で解析し、機能発現することを立証する。これらの知見を基に、造精機能制御の関連性を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 豚精巢で発現する RXN 様蛋白の産生細胞の同定

ブタ精巢で発現する RXN 様蛋白の産生細胞を mRNA とタンパク質の両レベルで同定を行った。その結果、in situ ハイブリダイゼーションと免疫染色により、RXN 様蛋白の mRNA とタンパク質の局在を示すシグナルはテストステロンの分泌源として知られるライディッヒ細胞で発現していることを見出した。

(2) ブタ精巢で発現する RXN 様蛋白の単離と構造解析

ゲル濾過を始め各種クロマトグラフィーを組み合わせて、ブタ精巢抽出液より RXN 様蛋白の単離・精製に成功した。この精製物はウエスタンブロットで約

12 k Da の単一バンドを示した。MS/MS 解析の結果、本蛋白は A-B-C 鎖ドメインからなるヘテロトリマー構造をとり、C 鎖ドメインが蛋白分解的に切断されない前駆体 (プロ) フォームとして存在することを世界に先駆け明らかにした。MS 解析により質量は 12031 と判明した。さらに、peptide mass fingerprinting (PMF) 法により解析の結果、S-S 結合が部位特異的に保持されていることも明らかとなった。

(3) ブタ精巢におけるプロセッシング酵素の発現状況とプロセッシングの有無

プロセッシング酵素 (PC1/3) の遺伝子発現状況を発育段階の精巢で RT-PCR 法により調べた結果、何れの時期の精巢においても PC1/3 の発現が全く検出できないことが判明し、構造解析の結果を強く示唆した。

(4) 単離した RXN 様蛋白の生理活性の解析：受容体 LGR8 を遺伝子導入した HEK-293 細胞の構築とそれを用いた検討

単離した RXN 様蛋白の生物活性の有無を検討するために、精巢より RXN 様蛋白の受容体 LGR8 の全塩基長 cDNA を PCR クローニングして哺乳動物の発現ベクターを構築し、HEK293 細胞に遺伝子導入して細胞ベースの assay 系を構築した。本細胞系を用いて RXN 様蛋白の反応性を調べた結果、RXN 様蛋白は nM オーダーで受容体発現細胞に作用し、濃度依存的 (ED_{50} が 10 nM) に cAMP 産生を増加させることが明らかとなった。これにより、ブタ精巢より単離した RXN 様蛋白には、十分に高い生理活性が保持されていることが証明できた。

(5) RXN 様蛋白の分泌の行方

精巢のライディッヒ細胞で産生された RXN 様蛋白の行方を調べるために Western blot 法解析を行った。その結果、RXN 様蛋白はライディッヒ細胞から分泌された後、血中のみならず、精巢間隙液でも高濃度で検出されることが判明した。さらに精細管内へも運ばれていることを明らかにした。

(6) 受容体分子 LGR8 の抗体作製と特性解析

抗原としては、クローン化した LGR8 の部分 cDNA 配列を基に N 末端に His-tag を付与した発現ベクターを構築して大腸菌で発現させた組換え体 LGR8 のほかに、LGR8 の N 末領域および C 末領域の配列を

基に作製した合成ペプチドについても、ウサギに免疫して16種類のポリクローナル抗体を作製した。さらに、研究遂行中に海外メーカーより市販された抗体についても特異性の解析を実施した。全24種類の抗体について、受容体遺伝子を遺伝子導入したHEK293細胞を用いて2重蛍光免疫細胞化学を行い、抗体の特性の解析を行った。その結果、細胞表面に発現する受容体分子を認識する抗体を見出すことができた。

(7) 精巣内の造精細胞における受容体分子LGR8の同定

クローン化したLGR8部分cDNA配列を鋳型として各部位でcRNAプローブを作製し、精巣における受容体LGR8のmRNA発現細胞をin situ hybridization法により同定を試みた。何種類ものcRNAプローブを作製してmRNA発現細胞の可視検出を試みたが、再現性のある満足ゆく結果を得ることができなかった。

一方、LGR8の特異抗体を用いて本受容体の発現細胞の同定を免疫組織化学法で行ったところ、ブタ精巣のほかヤギ精巣でも受容体LGR8が精子形成段階の生殖細胞で特異的に発現している事実を突き止めることができた。さらに、RXN様蛋白の産生源であるライディッヒ細胞にも受容体が存在する可能性を示唆した。

(8) 造精機能の発達に伴うRXN様蛋白質とその受容体LGR8の遺伝子・蛋白質発現動態

精巣を経時的に採取し、判定量 RT-PCR と Western blot 法ならびに免疫組織化学法により、RXN 様蛋白とその受容体分子の発現動態を解析した。当初、定量 PCR を計画していたが、増幅結果にバラツキが見られたため、半定量 RT-PCR に切り替えて実験を実施した。その結果、RXN 様蛋白質の遺伝子ならびに蛋白質の発現は、性成熟に伴い増大することが判明した。しかし一方で、受容体 LGR8 に関しては未だ検討の域を脱しておらず、更なる解析が必要と判断された。

(9) 標的細胞へのRXN様蛋白質の結合とシグナル伝達カスケードの解析

本研究課題により既にブタ精巣より単離・精製したリラキシン様蛋白質を用いて、ジゴキシゲニン (Dig) で標識し、生理活性を保持したリラキシン様蛋白質のプローブの作製に成功した。ブタ凍結切片を作製し、申請者が既に関与したin situ binding法により解析した

ところ、Dig標識プローブは生殖細胞に特異的に結合していることを可視証明することができ、シグナル伝達カスケードの糸口を見出すことが出来た。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

1) Kato S, Siqin, Minagawa I, Aoshima T, Sagata D, Konishi H, Yogo K, Kawarasaki T, Sasada H, Tomogane H and Kohsaka T. Evidence for expression of relaxin hormone-receptor system in the boar testis. **J. Endocrinol.** 207: 135-149 (2010). 査読有

2) Siqin, Nakai M, Hagi T, Kato S, Pitia AM, M. Kotani, Y. Odanaka, Y. Sugawara, K. Hamano, K. Yogo, Y. Nagura, M. Fujita, H. Ssasada, E. Sato, and Kohsaka T. Partial cDNA sequence of a relaxin-like factor (RLF) receptor, LGR8 and possible existence of the RLF ligand-receptor system in goat testes. **Anim. Sci. J.** 81: 681-686 (2010). 査読有

3) Kohsaka T, Yogo K and Mori M. Potential actions of relaxin and its related peptide on male reproductive processes in domestic animals. In: **The 14th AAAP animal Science Congress Proceedings Vol 1 (Key Speech Plenary Sessions):** 259-263 (2010). 査読有

4) Kinoshita M, Rodler D, Sugiura K, Matsushima K, Kansaku N, Tahara K, Tsukada A, Ono H, Yoshimura T, Yoshizaki N, Tanaka R, Kohsaka T, Sasanami T. Zona pellucida protein ZP2 is expressed in the oocyte of Japanese quail (*Coturnix japonica*). **Reproduction** 139:359-371 (2010). 査読有

5) Kohsaka T, Kato S, Qin S, Minagawa I, Yogo K, Kawarasaki T, Sasada H. Identification of boar testis as a source and target tissue of relaxin. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 1160:194-196 (2009). 査読有

[学会発表] (計 9 件)

1) 皆川至、高力宙、佐方醒、柴田昌利、河原崎達雄、高坂哲也。ブタ精巣で発現するリラキシン関連因子 (RLF) は生物活性を持った前駆体として単離され、内分泌、傍分泌または自己分泌因子として機能する。第103回日本繁殖生物学会大会 北里大学獣医学部(十和田市) 2010年9月2日

2) Kohsaka T, Yogo K and Mori M. Potential actions of relaxin and its related peptide on male reproductive processes in domestic animals. 屏東科技大学(屏東市、台湾)、2010年8月24日

3) Kohsaka T, Minagawa I, Ishige H, Kohriki H, Yogo K, Kawarasaki T, Sasada H. Purification and characterization of testicular relaxin-like factor in boars. The 3rd Asia-Pacific Forum on Andrology 国際会議ホテル、南京、中国、2009年10月12日

4) 皆川至、高力宙、石毛久子、与語圭一郎、河原崎達雄、高坂哲也 ブタ精巢で発現するリラキシン関連因子の単離とその特性 日本畜産学会 琉球大学、沖縄、2009年9月28日

5) Kohsaka T, Kato S, Qin S, Minagawa I, Yogo K, Kawarasaki T, Sasada H. Boar testis acts as a source and target tissue of relaxin. 5th International Conference on relaxin and related peptides. Maui, Hawaii, USA, May 22, 2008.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高坂 哲也 (KOHSAKA TETSUYA)

静岡大学・農学部・教授

研究者番号：10186611

(2) 研究分担者 なし