

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：82112

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580327

研究課題名（和文）ウシおよびヒツジにおける胎盤性プロラクチン関連タンパク質 1 の生理活性

研究課題名（英文）Biological activities of ovine and bovine placental prolactin family proteins

研究代表者 高橋 透（TAKAHASHI TORU）

独立行政法人農業生物資源研究所・動物生産生理機能研究ユニット・上級研究員  
研究者番号：20355738

### 研究成果の概要（和文）：

ウシのプロラクチン関連タンパク質-1 (bPRP1) は、ウシのプロラクチン/成長ホルモンファミリーのノンクラシカルメンバーの一つである。しかしながら、その機能は未だ明らかでない。PRL は、カテプシン D やマトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP) で切断されると 16kDa の N 末端側断片が生成し、この断片はヒトやげっ歯類の血管新生を抑制する。本研究では、bPRP1 にも此の様な機構が存在するのかどうか検証した。bPRP1 は本来 33kDa のタンパク質であるが、カテプシン、MMP およびウシ胎盤組織外植片の培養上清によって切断されて 26kDa の N 末端断片を生成する事が明らかになった。酵素切断の前後における bPRP1 の生物活性を、ウシ大脳毛細血管内皮細胞の増殖を指標として検索した。酵素切断で生じた bPRP1 断片は、培養血管内皮細胞の増殖を促進した。本研究の成績から、bPRP1 の N 末端断片の血管内皮細胞増殖促進作用は、胎盤における血管新生に促進的に作用しているものと推察された。

### 研究成果の概要（英文）：

Bovine prolactin-related protein-I (PRP1) is a non-classical member of prolactin (PRL) family proteins. However, its function is still unknown. PRL, when cleaved by cathepsin D and matrix metalloproteinases (MMPs), resulted in N-terminal 16 kDa fragments (16K-PRL) that have antiangiogenetic properties in human and rodents. We examined the possibility of similar activity of bovine PRP1. PRP1 (normally 33 kDa) was cleaved by cathepsins (CTSs), MMPs, and bovine cotyledonary-conditioned medium (BCCM), and generated mainly 26 kDa N-terminal fragments. Two specific enzyme families, CTSs and MMPs cleaved intact PRP1, and BCCM also contained PRP1 cleavage activity. Bioactivity of cleaved PRP1 was examined in a cell proliferation assay using bovine brain vascular endothelial cells. The cleaved PRP1 stimulated the proliferation of endothelial cells in vitro. The endothelial cell proliferation activity of cleaved PRP1 may be shared in specific bovine placentomal angiogenesis.

### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：畜産学

科研費の分科・細目：応用動物科学

キーワード：ウシ 胎盤 プロラクチン

## 1. 研究開始当初の背景

ほ乳類の胎盤は各種の胎盤特異タンパク質を発現している事が知られている。その中でも胎盤性 PRL ファミリー遺伝子群は、下垂体性 PRL のパラログとして各種ほ乳類胎盤に発現が認められ、ウシ胎盤においても 10 種類以上の胎盤性 PRL ファミリー遺伝子が発現している。ウシの胎盤性 PRL ファミリータンパク質は、クラシカルメンバーと呼称される胎盤性ラクトジェン (PL) とノンクラシカルメンバーと呼称される PRPs (PRP1 から PRP10 までの少なくとも 10 種類) に大別される。研究代表者等はこれまでにノンクラシカルメンバーの PRP7 から PRP10 までの 4 種類の分子種を発見し、遺伝子クローニング、発現プロファイリングおよびタンパク質の機能解析を行なって来た。

ウシの胎盤性 PRL ファミリーの中で、PL は PRL 受容体に結合して PRL 様生物活性を示す事から、クラシカルメンバーの分子は下垂体性 PRL に類似した生理的意義を有するとされている。しかしノンクラシカルメンバーである PRP (現在までに報告されている 10 種類の全て) は、その生物活性が明らかでない。研究代表者らは機能未解明な PRP タンパク質の中で PRP1 に注目し、その機能解析を進め、PRP1 が組織の基底膜成分である IV 型コラーゲンと特異的に結合する事を報告して来た。

近年、PRL が血管新生において相反する二重の役割を果たす事が報告された。完全な形の PRL タンパク質 (22 kDa) は毛細血管の新生を促進するが、代謝系の酵素で切断されて生じた 16kDa の断片は PRL 受容体に結合せず、完全型 PRL 分子とは逆に抗血管新生作用

を示すというものである。この知見は、PRL が PRL 受容体に結合して PRL 様生物活性を発揮するだけではなく、代謝系の酵素を介在させる事によって全く役割の異なるタンパク質として振る舞う事を示している。PRL 断片の抗血管新生作用は、血管制御による癌治療戦略への応用が期待されている。

研究代表者らは、これまでウシの胎盤性 PRL ファミリータンパク質の研究を進めて来たが、広く反芻類胎盤に普遍的な遺伝子機構を解明する事を目的として、ヤギやヒツジの胎盤性 PRL ファミリー遺伝子同定と発現検索も併せて行なって来た。研究代表者らがヒツジの PRP1 遺伝子をクローニングして発現プロファイルとタンパク質の構造を調べたところ、ヒツジ胎盤における PRP1 の時間的・空間的発現プロファイルは、ウシ PRP1 と良く一致しており、ヒツジ PRP1 の塩基およびアミノ酸配列はウシと類似しているものの、ヒツジの場合は途中で終止コドンが存在するために 179 番目のアミノ酸で翻訳が終了してしまう事が明らかになった。この ORF で翻訳されて細胞外に分泌されたタンパク質は、ウシの PRP1 の約 2/3 のポリペプチド鎖長の分子となる。

研究代表者らはこの興味深い成績を踏まえて、未だ明らかでない PRP1 の生理活性を考える時には、ウシとヒツジにおける類似点や相違点が大きなヒントになるのではないかと推論した。即ち、ウシ PRP1 は何らかの代謝酵素によってポリペプチド鎖長が約 2/3 の断片に分解された後に生理活性を発現しているという仮説である。そこで、申請者らは、胎盤組織抽出物に PRP1 を切断する

活性があるかどうかを検討したところ、分子量約 32 kDa の組換えウシ PRP1 が胎盤抽出物によって消化され、分子量約 22 kDa の断片が生成して来る事を確認した。また、PRP1 をこの部位で切断する事が出来る酵素として、カテプシンやマトリックスメタロプロテアーゼ等が想定された。

## 2. 研究の目的

本研究は、ウシ胎盤で発現するプロラクチン関連タンパク質 1(Prolactin-related protein 1, PRP1)の生理的意義を解明する事を目的とする。PRP1 はプロラクチン(PRL)と同一遺伝子ファミリーに属するが、PRL 様生物活性を示さず、その生物活性は不明であった。本研究では、PRP1 が胎盤における血管の新生/退行のkey ファクターであるとの仮説を提唱し、これを実証してゆくこととした。

## 3. 研究の方法

### 3-1 試薬類

N 末端に FLAG タグを付加した組換え bPRP1 タンパク質は HEK293 細胞に pFLAG-CMV3 発現ベクターをトランスフェクションして発現させた。bPRP1 の N 末端断片は組換え bPRP1 をタンパク質分解酵素で消化して作成した。酵素切断にはカテプシン B (CTSB)、カテプシン D (CTSD)、マトリックスメタロプロテナーゼ 3(MMP3)および MMP13 を使用し、酵素切断反応の特異性を確認するために、それぞれの酵素の特異的阻害剤であるペプスタチン A、シスタチン C および GM6001 を使用した。

### 3-2 ウシ胎盤組織の培養上清の作成

bPRP1 の酵素切断と胎盤における切断型 bPRP1 の存在を確認するために、ウシ

胎盤組織の外植片培養の培養上清 (BCCM) を作成した。妊娠 150 日齢の黒毛和種から胎盤を採取して、細切した 120-130mg の組織を 3ml の無血清培養液に浮遊させて炭酸ガス培養器を用いて 37°C で 24 時間培養し、培養上清を回収した。回収した培養上清は -20°C で保存し、実験に先立って遠心式の限外濾過フィルターで約 10 倍に濃縮した。

### 3-3 組換え bPRP1 タンパク質の作成

ウシ胎盤からクローニングした bPRP1 の cDNA の成熟タンパク質領域をコードする配列をベクターに挿入した。組換えタンパク質は N 末端に FLAG-His-FLAG タグが付加されている。トランスフェクション後に G418 で細胞を選択し、生残細胞を限界希釈法で 96 穴プレートに播種し、培養上清中の bPRP1 濃度の高いクローンを選択した。細胞を無血清浮遊培養に馴化させた後に、スピナーフラスコによる大量培養を行い、約 10L の培養上清を得た。培養上清をタンジェンシャルフロー型の限外濾過装置を用いて約 50 倍に濃縮し、ニックルカラムと抗 FLAG 抗体カラムの 2 段階アフィニティクロマトグラフィで精製した。

### 3-4 bPRP1 の酵素切断実験

上記の方法で作成した組換え bPRP1 の 100ng を CTSB、CTSD、CTSL 等のカテプシンや MMP3、MMP8、MMP13 等のマトリックスメタロプロテナーゼとインキュベートして、反応液をウェスタンブロット法で解析した。また、カテプシン阻害剤であるシスタチン C や MMP 阻害剤である GM6001 の影響についても検討した。

### 3-5 血管内皮細胞増殖に及ぼす bPRP1 切断断片の影響

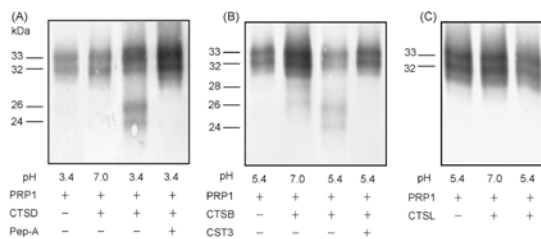
ウシ大脳毛細血管内皮細胞 (BBMC) を培養し、培養系に酵素切断された bPRP1

断片を添加して、細胞増殖に及ぼす効果を検討した。96穴プレートに1穴あたり3000個のBBMCを播種し、酵素切断されたbPRP1断片を添加して24時間培養した後細胞数を計測した。

#### 4. 研究成果

##### 4-1 カテプシンおよびMMPによる26K-bPRP1断片の生成

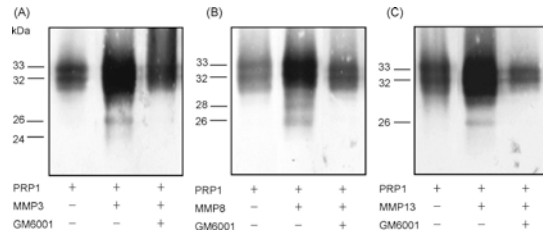
本研究で作成した組換えbPRP1の分子量は、32-33kDaであったが、bPRP1をCSTDとともにインキュベートするとC末端側を切断され、24-26kDaのN末端断片が生じた。N末端断片の生成は、アスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤であるペプスタチンAによって抑制されたので、CSTDの特異的な反応であると思われた。カテプシンBも同様にbPRP1のC末端側を切断する活性があり、酵素処理によって24、26および28kDaのN末端断片が生成した。CTSBの作用は特異的阻害剤であるシスタチンCによって特異的に阻害されたことから、CTSBに特異的な反応であると思われた。CTSLにはbPRP1を切断する活性は認められなかった。以上の成績から、bPRP1はカテプシン類によって切断されて主に26kDaのN末端断片を生じる事が明らかになった。



カテプシンによるbPRP1の切断

MMP3、MMP8およびMMP13もbPRP1のC末端側を切断する活性が認められ、酵素処理によって24、26および28kDaのN末端断片が生じた。MMPによ

るbPRP1の断片生成は、MMPの阻害剤であるGM6001によって抑制されたことから、MMPに特異的な反応であると思われた。以上の成績から、bPRP1はMMPによっても切断されて主に26kDaのN末端断片を生じる事が明らかになった。



MMPによるbPRP1の切断

##### 4-2 胎盤組織の培養上清によるbPRP1の切断

胎盤組織の培養上清とbPRP1をインキュベートすると、23-28kDaの数種類のN末端断片が生成した。胎盤培養上清によるbPRP1の切断はアスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤であるペプスタチンAやMMP阻害剤であるGM6001によって抑制されたので、培養上清によるbPRP1の切断は、カテプシンやMMPを介したものである事が示唆された。

##### 4-3 酵素切断で生じたbPRP1のN末端断片が血管内皮細胞の増殖に及ぼす影響

CTSBおよびCTSDで切断されたbPRP1のN末端断片は、BBMCの増殖を促進した。酵素切断されないbPRP1は、BBMCの増殖に影響を与えなかった。MMPの3、8および13で切断されたbPRP1もBBMCの増殖を促進した。

#### 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5件)

1. Ushizawa K, Takahashi T, Hosoe M, Kizaki K, Hashizume K. Cleaved bovine prolactin-related protein-I stimulates vascular endothelial cell

- proliferation *Molecular and Cellular Endocrinology* 査読あり、323; 277-281, 2010.
2. Mishra B, Kizaki K, Koshi K, Ushizawa K, Takahashi T, Hosoe M, Sato T, Ito A, Hashizume K. *Reproductive Biology and Endocrinology* 査読あり、8; 60, 2010.
  3. Mishra B, Kizaki K, Koshi K, Ushizawa K, Takahashi T, Hosoe M, Sato T, Ito A, Hashizume K. Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) and its expected roles in the bovine endometrium during gestation. *Domest Anim Endocrinol.* 査読あり、42; 63-73, 2011.
  4. 橋爪一善、高橋透、木崎景一郎 着床とプロラクチン-ウシPRL/GHファミリーは着床誘導物質か？ *HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY* 査読あり、18; 259-267, 2011.
  5. Takahashi T, Hosoe M and Hayashi KG. Biology of the placental proteins in domestic ruminants: Expression, proposed roles and practical applications. *Japan Agricultural Research Quarterly* 査読あり、47; 43-51. 2013.

[学会発表] (計3件)

1. Takahashi T, Ushizawa K, Hosoe M, Kizaki K, Hashizume K. A novel factor for the regulation of utero-placental angiogenesis. *SRD Symposium*, 2010年9月4日、青森県十和田市
2. Toru Takahashi, Koichi Ushizawa, Shobu Sasaki, Misa Hosoe, Keiichiro Kizaki and Kazuyoshi Hashizume. Novel proteins affecting cell proliferation and angiogenesis of bovine placenta. *International Meeting for Evolution of Reproductive Biology and Task of Frontiers: Trajectory and Prospects of IVF, Stem Cell and Epigenetic Studies*. 2011年9月13-15日 岩手県盛岡市
3. 橋爪一善、木崎あゆみ、茂野智子、木崎景一郎、松田秀雄、橋谷田豊、今井敬、古澤軌、細江実佐 ウシ抹消白血球に発現する妊娠シグナル 第27回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会(招待講演) 2013年02月07日~08日 栃木県宇都宮市

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋透 (TAKAHASHI TORU)

独立行政法人 農業生物資源研究所  
上級研究員

研究者番号：20355738

(2) 研究分担者 なし

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし

( )

研究者番号：