

## 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 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591834

研究課題名（和文） 卵巣選択的プロテアーゼ“Prss35”の酵素特性と霊長類の卵巣内発現に関する検討

研究課題名（英文）

The identification and characterization of protease serine 35 in the primate ovary

研究代表者

宮越 敬 (Miyakoshi Kei)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：70265883

研究成果の概要（和文）：

我々は、Protease serine 35 (Prss35) のアカゲザル卵巣内発現およびその基質特異性を検討した。種々のアカゲザル組織検体を用いた RT-PCR では、卵巣および精巣に強い Prss35mRNA 発現を認めた。Real-time PCR 解析では、卵巣内 Prss35 mRNA 発現は月経開始直後に比べ卵胞期に増加したが、排卵期の hCG 投与後～黄体期の発現レベルは低値であった。さらに前胞状・胞状卵胞の顆粒膜細胞を中心に Prss35 mRNA 発現が観察された。卵巣周期に伴って局在と発現レベルが変化することから、Prss35 は卵胞発育や排卵現象に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The expression of protease serine 35 (PRSS35) in the rhesus macaque tissues was investigated in this study. First, significant levels of rhesus PRSS35 gene expression were observed in testis, ovary, heart, and lung. PRSS35 mRNA levels were detectable in non-active controls and significantly increased in ovaries containing preovulatory follicles before the ovulatory stimulus of hCG. In the periovulatory interval, levels of PRSS35 mRNA were highest prior to the ovulatory stimulus of hCG. Thereafter, PRSS35 gene expression levels dropped and were low during the luteal phase as well as the remaining period of periovulatory interval. The expression of rhesus PRSS35 mRNA was observed in the granulosa cells of preantral, antral, and preovulatory follicles. These findings suggest that PRSS35 gene plays critical roles in follicular growth and ovulation in the primate.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：卵巣、PRSS35、プロテアーゼ、排卵、黄体、霊長類

## 1. 研究開始当初の背景

卵巣における卵胞発育、排卵および黄体形成・退縮にはダイナミックな組織再構築が必要不可欠であり、この過程においてプロテアーゼが重要な役割を担うことが推測される。諸家の研究により、種々のプロテアーゼおよびその阻害因子が卵巣組織の再構築に関与することが示されている。しかしながら、knockout mouse による検討では、a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin-like motifs -1 欠損マウスのみ排卵率の軽度低下を認め、その他のプロテアーゼ欠損マウスの表現型は wild type と同等であった。したがって、新規プロテアーゼが月経周期における卵巣の組織再構築に関与する可能性が推測される。

研究代表者らは Suppression Subtractive Hybridization 法により検出された新規卵巣選択的プロテアーゼ遺伝子 Protease serine 35 (Prss35) gene がマウスの卵胞発育、排卵、黄体形成・退縮にともなう組織再構築に深く関与することを報告した (Miyakoshi K, et al. Biol Repro, 2006)。また、アカゲザル (rhesus macaque) においても Prss35 gene が同定され、DNA データベース解析ではラット、ヒトおよびチンパンジーにも ortholog が存在すること、Prss35 タンパクは異動物種間で高い相同性 (75-99%) を示すことが判明した (Miyakoshi K, et al. Biol Repro, 2006)。マウスとヒトの Prss35 遺伝子のゲノム構造は類似していることから、Prss35 が哺乳類の卵巣機能調節に関与するものと考えられた

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、(1)アカゲザル卵巣における Prss35 の発現、(2)Prss35 タンパクの基質特異性を検討することである。

## 3. 研究の方法

### (1)Prss35gene 発現の検討

月経開始 6 日目からのホルモン値のモニタリングにより月経周期を判定し、月経開始直後、排卵期、黄体期 (早期: Day 3-5; 中期: Day 6-8; 中後期: Day 10-12; 後期: Day 14-16) に卵巣組織を採取した。また、卵巣以外の組織 (例: 脳、肺、肝臓など) は剖検例から採取した。アカゲザル (rhesus macaque) の組織検体採取は米国 Oregon National Primate Research Center (ONPRC) の共同研究者 (Dr. Hennebold) により施行された (ONPRC 倫理審査委員会承認)。

①PCR 法を用いて、脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、膵臓、子宮、卵巣、精巣における Prss35mRNA 発現を検討した。②各月経周期における卵巣組織の Prss35 mRNA 発現レベルの変化を real-time PCR を用いて検討した。③

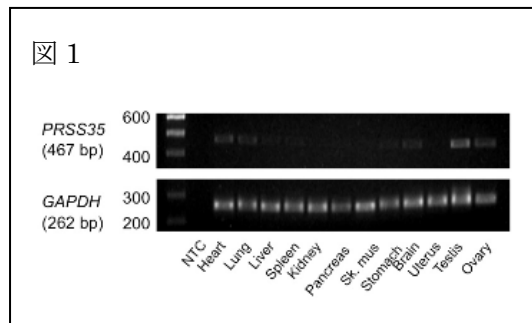
35S-UTP による in situ hybridization (ISH) 法を用いて各月経周期における Prss35mRNA の卵巣内局在を検討した。④抗 Prss35 抗体 (Abcam Inc.) およびホルマリン固定後の卵巣組織による免疫組織染色 (IHC) を用いて Prss35 タンパクの局在を検討した。

(2)Prss35 タンパクの基質特異性解析 recombinant Prss35 (rPrss35, Abnova Inc.)、Trypsin (Promega Inc.) および trypsin 基質 ( $N_{\alpha}$ -Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride, Sigma) を用いて kinetic assay を行った。

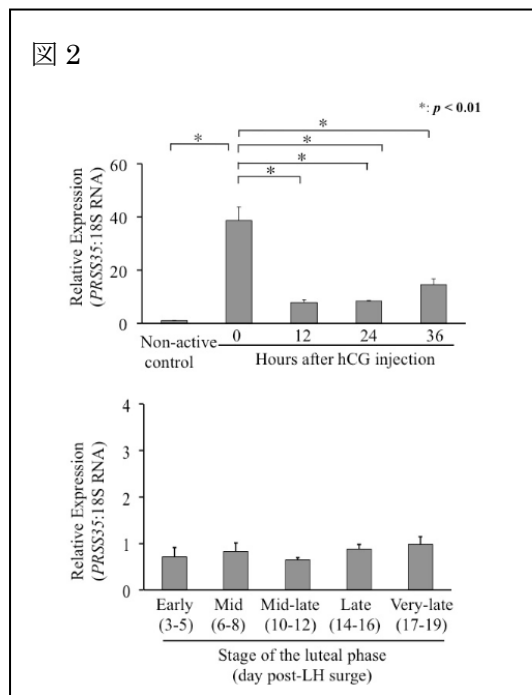
## 4. 研究成果

### (1)Prss35gene 発現の検討

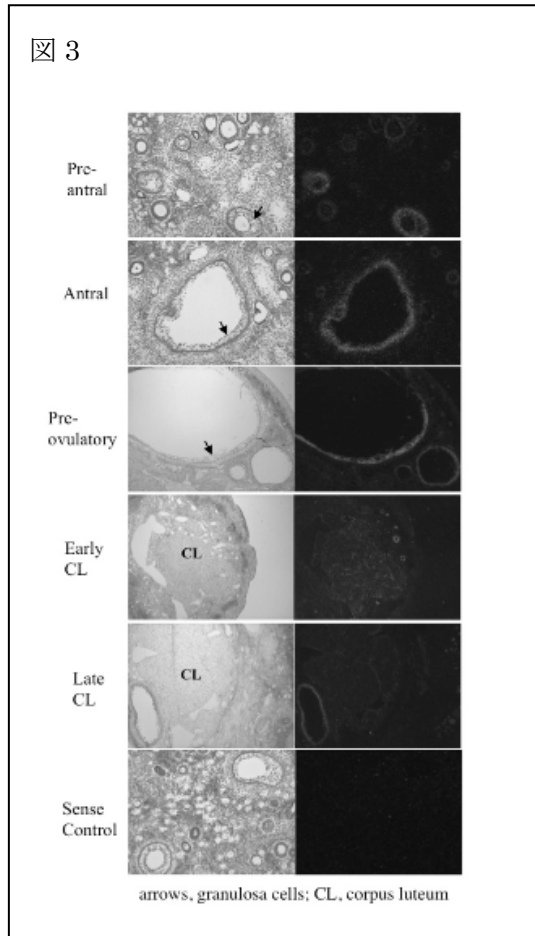
①種々の組織のなかで、特に卵巣、精巣に Prss35 mRNA の強い発現を認めた (図 1)。



②Prss35 mRNA 発現は月経開始直後に比べ卵胞期に有意に増加した (図 2)。また、排卵期には、hCG 投与後に Prss35 mRNA 発現レベルは低下し、黄体期全期間を通じて発現レベルは低値であった。

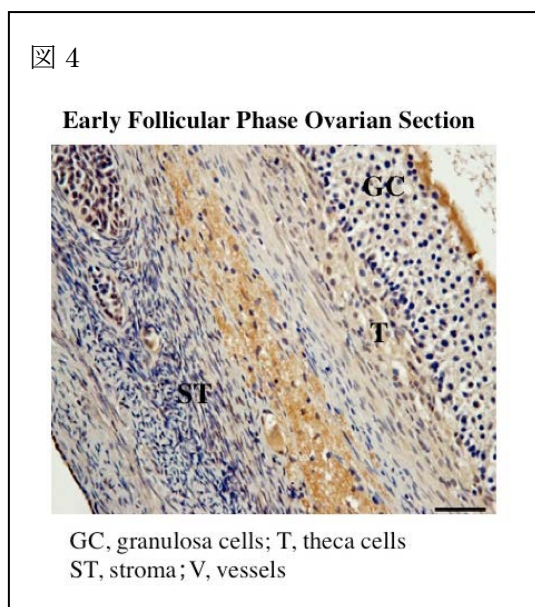


③ ISH では前胞状・胞状卵胞 (preantral/antral follicle) の顆粒膜細胞を中心に Prss35 mRNA 発現を認めた(図 3)。

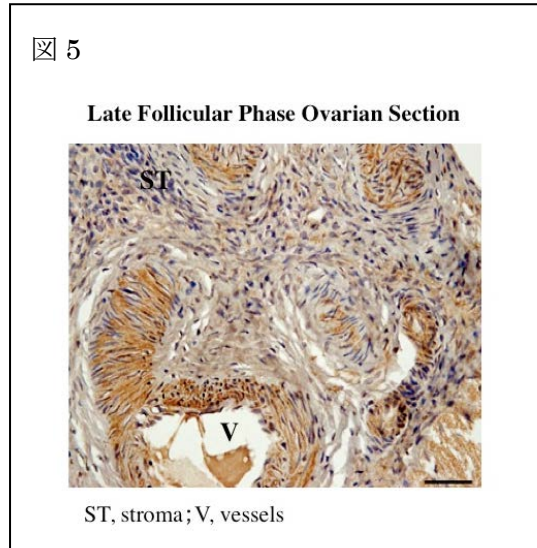


また、黄体にも弱い発現が確認された。

④ IHC により Prss35 蛋白は顆粒膜細胞の卵胞内腔側細胞壁および血管壁に強く発現す

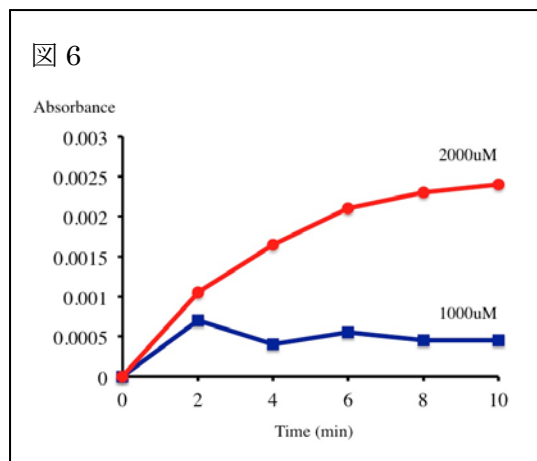


ることが示された(図 4, 5)。



(2) Prss35 蛋白の基質特異性解析

アミノ酸配列により、Prss35 は trypsin 様酵素活性を有することが推測される。そこでまず、Tryptase および trypsin 基質 ( $N_{\alpha}$ -Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride) を用いて、至適基質濃度を設定した。至適基質濃度を設定後の rPrss35 (濃度: 1000uM および 2000uM) と  $N_{\alpha}$ -Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride との反応を図 6 に示す。反応時間の経過とともに吸光度が上昇したが、trypsin としても反応が示唆された。しかしながら、吸光度変化およびその絶対値からは trypsin 活性は極めて弱いものと考えられた。



以上の結果より、卵巣周期に伴って局在と発現レベルが変化することから、Prss35 は卵胞発育および排卵現象に関与している可能性が示唆された。しかしながら、現在までの

検討では Prss35 の基質特異性に関しては未  
解明であり、Trypsin 以外の酵素活性につい  
ても今後検討する必要がある。

本研究期間において、Prss35 の ortholog  
である Protease serine 23 (Prss23) のアカ  
ゲザル卵巣における発現解析も試みた。  
Real-time PCR では Prss23 mRNA 発現は卵胞  
期に有意に増加すること、発現レベルは hCG  
投与後には減少傾向を示したが黄体期には  
再上昇し、特に黄体後期には早期に比べ有意  
に増加することが判明した。また、ISH では  
前胞状・胞状卵胞の顆粒膜細胞、退縮期黄体  
に強い Prss23 mRNA 発現を認めた。したがっ  
て、Prss23 は卵胞発育に加え、黄体退縮にも  
関与することが推測された。

アカゲザル卵巣周期において Prss35 およ  
び Prss23 の局在および発現は動的变化を呈  
することが判明した。したがって、これら新  
規プロテアーゼは霊長類における卵胞発  
育・排卵現象・黄体形成と退縮に関与するも  
のと考えられた。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等：なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮越 敬 (Miyakoshi Kei)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：70265883

### (2) 研究分担者

田中 守 (Tanaka Mamoru)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：20207145

峰岸一宏 (Minegishi Kazuhiro)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：30276331

### (3) 連携研究者

なし