

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580408

研究課題名(和文)ブタ精巣で発現するリラキシン様蛋白の造精細胞への結合とアポトーシス抑制作用の解明

研究課題名(英文)The binding and apoptosis inhibitory action to germ cells of relaxin-like peptide expressed in the boar testis

研究代表者

高坂 哲也 (Kohsaka, Tetsuya)

静岡大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：10186611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、信頼できるブタリラキシン(RXN)様蛋白を測定する免疫測定法の開発に成功し、血中リラキシン様蛋白が性成熟に伴い漸次増加することを明らかにした。加えて、ライディッヒ細胞から分泌されたRXN様蛋白は高濃度で精細管内に輸送されることを示した。次に、リラキシン様蛋白は減数分裂期や減数分裂後の生殖細胞で発現する85 kDaの受容体LGR8/RXFP2に高い親和性で結合し、活性化することを究明した。さらに、RXN様蛋白の不活性化は造精細胞のアポトーシスを増加させ、精子産生を低下させることを究明し、RXN様蛋白は精子形成を維持ために造精細胞のアポトーシス抑制因子として機能していることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：This study succeeded in developing a reliable immunoassay for measuring boar relaxin (RXN)-like peptide using a TR-FIA platform and demonstrated that circulating RXN-like peptide concentrations increased progressively in boar during sexual development. Additionally, RXN-like peptide secreted from Leydig cells showed to be transported into the seminiferous compartments at sufficient concentrations. RXN-like peptide revealed to bind with high affinity to, and activates its specific receptor, 85 kDa LGR8/RXFP2, which is expressed in boar meiotic and postmeiotic germ cells. Furthermore, the present study demonstrated that neutralization of RXN-like peptide led to increased germ cell apoptosis and substantially reduced sperm concentration, suggesting that RXN-like peptide functions as a germ cell anti-apoptotic factor in maintaining sperm production.

研究分野：動物生殖生理学

キーワード：relaxin INSL3 LGR8 INSL3 germ cells Apoptosis testis

## 1. 研究開始当初の背景

リラキシン[Relaxin, RXN と略す]は、分娩に備えた子宮頸部の軟化を始め、多岐に渡る組織で様々な作用を発現する 6 kDa の多機能性ホルモンである。

最近、申請者は新たにブタ精巣で 12 kDa の RXN 様蛋白(最近では insulin-like factor 3、INSL3 と呼ばれる)を見出し、その構造と機能の解明に取り組んできた。すなわち、1) 単離・構造決定の結果、12 kDa の RXN 様蛋白は高い生物活性を持つ A-B-C 鎖モノマーとして、アンドロゲンを産生するライディッヒ細胞で産生されること、2) ライディッヒ細胞で産生された RXN 様蛋白は、精巣間隙や精細管内へ運ばれる可能性が示唆されること、3) 本受容体 LGR8/RXFP2 の遺伝子が造精細胞(生殖細胞)で発現していること、など見出してきた。

しかし、造精細胞で発現する受容体遺伝子がタンパク質として翻訳され、実際に精子形成段階のどの造精細胞で受容体機能を発揮しているか証拠がなく、また受容体を介して RXN 様蛋白がどのような生理作用を発現するかも不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、RXN 様蛋白を造精機能との関連性で捕らえたいと考え、本蛋白が傍分泌因子(アポクリン因子)として標的細胞の造精細胞に作用し、アポトーシスの抑制を促し正常な造精機能(精子形成能)の維持を司る鍵分子の一つとして機能するのではないかとの作業仮説を立て、精巣ライディッヒ細胞で発現する RXN 様蛋白について、造精細胞への結合とその生理作用、とくに造精機能のアポトーシス抑制機能に焦点を当て、生理学的意義の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

造精細胞への結合面からは、受容体分子 LGR8 がタンパク質として造精細胞で発現していることを分子生物学的および免疫学的手法で究明し、RXN 様蛋白の受容体分子への結合とその特性を Far-western blot 法と ligand binding assay で明白にする。

一方、作用面からは、受容体を介して現れる生理機能をとくにアポトーシスに焦点を当て、免疫処理により造精機能を著しく低下させた雄ブタの精巣の組織化学的、生化学的、分子生物学的、内分泌学的解析より、造精細胞におけるアポトーシス抑制作用を明らかにする。

## 4. 研究成果

### (1) ブタ RXN 様蛋白の免疫測定法の開発と血中および体液中の濃度測定

RXN 様蛋白の血中ならびに体液中での濃度を正確に測定するために、時間分解蛍光免疫測定系(TR-FIA)を開発した。確立した測定

系の感度は 164 pg/ml で、ブタリラキシン、インスリンなどの他のホルモンとの交差は全く認められず、信頼できる高感度免疫測定法の開発に成功した。本アッセイ法を用いて濃度測定を行った結果、血中 RXN 様蛋白の濃度は性成熟に伴い漸次上昇することがわかった。

一方、精巣間隙や精細管内液中の RXN 様蛋白は、血中に比べ 8 - 10 倍高い濃度で検出されることを始めて明らかにした。このことは、精巣ライディッヒ細胞で産生される RXN 様蛋白の主な輸送先が精子形成の場として知られる精細管であることを強く示唆した。

### (2) ブタ精巣内の造精細胞における受容体 LGR8/RXFP2 の遺伝子・タンパク質の同定

特異抗体(申請者らにより既に特異性を検証済み)を用いて、受容体 LGR8/RXFP2 タンパク質の発現動態を Western blot 法で調べた。その結果、受容体タンパク質は 85 kDa の 1 本のバンドと、66 - 50 kDa 領域に存在する 3 本のバンドとして検出された。とくに、85 kDa のバンドの発現は性成熟に伴い上昇することがわかった。

次に、免疫組織化学による解析から、受容体 LGR8/RXFP2 タンパク質は精細管内の造精細胞でのみ見出され、その発現量は精祖細胞、精母細胞、円形精子細胞、伸長精子細胞、精子の順に増大することが判明した。さらに、レーザーマイクロディセクション装置で造精細胞を切り取り、遺伝子発現を RT-PCR で調べた結果、LGR8/RXFP2 mRNA の発現は同タンパク質発現細胞と一致していることを明らかにした。

### (3) 造精細胞で発現する機能的受容体の特定

ブタ造精細胞で見出された受容体タンパク質は、複数のバンドとして検出されたため、Far-western blot 法を用いてリガンド(RXN 様蛋白)と結合する機能的受容体を特定した。まず、ブタ精巣より単離した 12 kDa の RXN 様蛋白を基に、DTBTA-Eu で標識し、生物活性を保持した RXN 様蛋白のプロープを作製した。次に、次に、造精細胞の膜分画を調製し、Far-western blot に供した。その結果、85 kDa の受容体バンドにのみ RXN 様蛋白プロープが結合し、66 - 50 kDa 領域に存在する 3 本のバンドには全く結合しないことが判明した。このことから、造精細胞において RXN 様蛋白と結合する機能的な受容体は 85 kDa であることが明らかとなった。

### (4) 造精細胞における受容体 LGR8/RXFP2 の結合特性

DTBTA-Eu で標識した RXN 様蛋白プロープと、造精細胞の膜分画を用いて、ligand binding assay により結合特性を究明した結果、RXN 様蛋白プロープは Kd 値 5.44 nM、Bmax 8.44 x 10<sup>4</sup> CPS で hormone specific かつ saturable

に造精細胞の膜画分に結合することが判明した。さらに、その結合は 8.67 nM の未標識 RXN 様蛋白で競合的に阻害されることがわかった。

#### (5) 組換え体 RXN 様蛋白の作製の試み

ブタ精巣より単離した RXN 様蛋白は微量で、供給量に限界があり、生理機能解明に向けた生物活性を保持した組換え体の作製をカイコで試みた。すなわち、RXN 様蛋白の全塩基長 cDNA を BmNPV シャトルベクターに組み込み発現系を構築した後、バクミド化してカイコに注射し RXN 様蛋白を発現させた結果、カイコ脂肪体内で本組換え体が発現していることを認めた。各種クロマトを組み合わせて単離したところ、組換え体は分子量 12 kDa の一本のピークとして精製できた。精製の検証は、同時に行ったヤギ精巣由来の天然型 RXN 様蛋白の単離により評価した。受容体 LGR8/RXFP2 を遺伝子導入した HEK293 細胞に基づく生物活性の評価から、天然型に比べて組換え体は活性や発現量が低いことがわかり、更なる改良が必要と判断された。

#### (6) ブタにおける RXN 様蛋白のアポトーシス制御作用の解析

本研究では、雄ブタにおいて内因性 RXN 様蛋白の不活性化を図るために、RXN 様蛋白の B 鎖ペプチド 34 残基を抗原としてブタで能動免疫処理を行った。抗原ペプチドには、ブタと約 85% の相同性を示すヤギ RXN 様蛋白を用い、ペプチド合成後に N 末端に卵白アルブミン (OVA) を付加した。対照区は OVA を用いた。能動免疫処理は、生後 7 週齢 (未成熟) より開始し、性成熟期 (28 週目) まで行った。不活性化の指標となる RXN 様蛋白の抗体価を調べた結果、免疫区では 14 週齢より抗体価が上昇し、18 週齢で最大値となり、以降、恒常値を維持していたことから、能動免疫により内因性 RXN 様蛋白が不活性化されることが明白となった。次に、RXN 様蛋白、LH、FSH およびテストステロンの血中ホルモン動態を調べたところ、免疫区と対照区の間で相違のないことが分かった。しかし、精巣には甚大な影響が現れ、精巣重量は免疫区では対照区の約 15% 減少し、精子形成の場である精細管にダメージが認められた。とくに、精細管内の造精細胞の消失や、部分的な破壊が著しかった。TUNEL 法によるアポトーシスの検出では、アポトーシスが造精細胞で見出され、その頻度は対照区に比べて 4 倍高いことが判明した。加えて、精液性状を調べたところ、免疫区では、正常精子の割合が対照区に比べて低く、逆に死滅精子や未成熟精子の割合が高いことが明らかとなった。以上、RXN 様蛋白はブタ造精細胞においてアポトーシス抑制作用を発揮し、造精細胞の生存因子として精子形成の維持に関与することが示唆された。

#### 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 12 件)

1) Sagata D, Minagawa I, Kohriki H, Pitia AM, Uera N, Katakura Y, Sukigara H, Terada K, Shibata M, Park EY, Hasegawa Y, Sasada H, Kohsaka T. The insulin-like factor 3 (INSL3)-receptor (RXFP2) network functions as a germ cell survival/anti-apoptotic factor in boar testes. **Endocrinology**. 156:1523-1539 (2015). 査読有.

2) Yoshida T, Kumagai H, Kohsaka T, Ikegaya N. Protective effects of relaxin against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **Nephron Exp Nephrol**. 128:9-20 (2014). 査読有.

3) Minagawa I, Sagata D, Pitia AM, Kohriki H, Shibata M, Sasada H, Hasegawa Y, Kohsaka T. Dynamics of insulin-like factor 3 and its receptor expression in boar testes. **J. Endocrinol**. 220:247-261 (2014). 査読有.

4) Yoshida T, Kumagai H, Kohsaka T, Ikegaya N. Relaxin protects against renal ischemia-reperfusion injury. **Am J Physiol Renal Physiol**. 305:F1169-1176 (2013). 査読有.

5) Siqin, Minagawa I, Okuno M, Yamada K, Sugawara Y, Nagura Y, Hamano K, Park EY, Sasada H, Kohsaka T. The active form of goat insulin-like peptide 3 (INSL3) is a single-chain structure comprising three domains B-C-A, constitutively expressed and secreted by testicular Leydig cells. **Biol. Chem**. 394:1181-1194 (2013). 査読有.

6) Kohsaka T, Sagata D, Minagawa I, Kohriki H, Pitia AM, Sugii Y, Morimoto M, Uera N, Shibata M, Sasada H, Hasegawa Y. Expression and localization of RLF/ INSL3 receptor RXFP2 in boar testes. **Ital. J. Anat. Embryol**. 118:23-25 (2013). 査読有.

7) Yoshida T1, Kumagai H, Suzuki A, Kobayashi N, Ohkawa S, Odamaki M, Kohsaka T, Yamamoto T, Ikegaya N. Relaxin ameliorates salt-sensitive hypertension and renal fibrosis. **Nephrol Dial. Transplant**. 27:2190-2197 (2012). 査読有.

[学会発表](計 4 件)

1) 植羅直人・高力 宙・皆川至・佐々田比呂志・長谷川喜久・高坂哲也 .LGR-ectodomain

は精巢で発現するリラキシン関連因子受容体 LGR8 のスプライスバリエーションとして機能する。第 18 回日本生殖内分泌学会、東京砂防会館、2013 年 12 月 7 日。

2) 森本昌志・吉田卓也・池谷直樹・佐々田比呂志・長谷川喜久・高坂哲也。Cisplatin で精子形成障害を誘発させたラット精巢におけるリラキシンのアポトーシス抑制効果。第 18 回日本生殖内分泌学会、東京砂防会館、2013 年 12 月 7 日。

3) Kohsaka T, Sagata D, Minagawa I, Kohriki H, Pitia AM, Sugii Y, Morimoto M, Uera N, Shibata M, Sasada H, Hasegawa Y. Expression of RLF/INSL3 receptor RXFP2 and function of RLF/INSL3-RXFP2 signaling in germ cells of boar testes. The 6<sup>th</sup> International Conference on Relaxin and Related Peptides, Florence, Italy, 2012 年 10 月 9 日。

4) 皆川至・佐方醒・柴田昌利・高坂哲也。ブタ精巢におけるリラキシン関連因子(RLF)の発現・分泌動態と生殖細胞に対するパラクリン因子としての機能。第 105 回日本繁殖生物学会大会、筑波大学、2012 年 9 月 8 日。

〔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：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

<https://tdb.shizuoka.ac.jp/RDB/public/Default2.aspx?id=10880&l=0>

<http://scholar.google.co.jp/citations?user=r7xYS3EAAAAJ&hl=ja>

## 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 無し

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者 無し

( )

研究者番号：