

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450404

研究課題名(和文)ウシ胎盤性ラクトジェンの生理的意義の解明

研究課題名(英文)The role of N-terminal fragments generated by enzymatic cleavage of bovine placental lactogen

研究代表者

高橋 透 (Takahashi, Toru)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：20355738

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ウシ胎盤性ラクトジェン(bPL)の生理的役割について、特に胎盤で産生される酵素による切断に注目し、切断されて生じるN末端断片の生理活性について検討した。bPLは、マトリックスメタロプロテナーゼやカテプシン類によってC末端側が切断され、完全長型よりも約6kDa小さなN末端断片が生じる。このN末端断片は、bPLが本来有するプロラクチン様活性を持たないが、血管内皮細胞の増殖を抑制作用が認められた。酵素切断処理をしていない完全長型のbPLは血管内皮細胞の増殖に影響を与えなかった。本研究によって、bPLは酵素切断によって本来のプロラクチン活性とは全く異なる新規の生物活性が発現する事が確認された。

研究成果の概要(英文)：Bovine placental lactogen (bPL) is a member of a placental prolactin (PRL) family that exhibits lactogenic activity. Bovine PL is a potential substrate for placental enzymes such as MMPs and cathepsins. These enzymes cleaved bPL and generated 25 kDa N-terminal fragments. Cathepsins and MMPs were detected in bovine placental conditioned medium (BPCM) and co-incubation of recombinant bPL with BPCM resulted in the generation of N-terminal bPL fragments. Lactogenic activity of intact bPL was ceased after enzymatic cleavage. Bioactivity for pro- and anti-angiogenesis of cleaved bPL was studied by cell proliferation assay using bovine brain vascular endothelial cells (BBMC). The cleaved bPL inhibited the proliferation of BBMC whereas intact bPL showed no significant effects in terms of BBMC proliferation. Anti-angiogenic activity of cleaved bPL might be shared in the regulation of bovine placental angiogenesis.

研究分野：家畜繁殖学

キーワード：胎盤 ウシ プロラクチン 血管新生 カテプシン MMP

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(Reprod Fertil Dev.2007;19(1):79-90.)。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 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(Biochem Biophys Res Commun 2005;326(2):435-41.)。

研究代表者は、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(BMC Dev Biol. 2007;7:16)。研究代表者がヒツジの 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(BMC Molecular Biology 2007;8:95)。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。

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 分子とは逆に血管新生を阻害する作用を示すというものである

(Hilfiker-Kleiner et al., Cell. 2007; 128(3): 589-600.)。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。現在、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。この興味ある知見を踏まえて研究代表者は、bPRP1 の C 末端側の酵素切断の可能性や派生した断片の生物活性を検討した。その結果 bPRP1 は、カテプシンやマトリックスメタロプロテナーゼ等の酵素によって C 末端側の約 6 kDa のポリペプチドが切断されることが判明し、

更に切断された bPRP1 の N 末端側の断片は血管内皮細胞の増殖を促進する事が明らかになった(Mol Cell Endocrinol. 2010;323:277-81.)。これは、それまで全く知られていなかったウシ胎盤性 PRL ファミリーのノンクラシカルメンバーの生理作用に関する初めての報告であった。

研究代表者は、「腫瘍組織等とは違って胎盤では調和のとれた血管新生が行われており、胎盤性 PRL ファミリーはそれを促進的/抑制的に同時に調節しているのではないか」という仮説を提唱するに至った。そして、「相反する作用をもたらすタンパク質が同一の細胞から同時に分泌されている意味は何であろうか?」という疑問を抱いた。そこで研究代表者は、「腫瘍組織等とは違って胎盤では調和のとれた血管新生が行われており、胎盤性 PRL ファミリーはそれを促進的/抑制的に同時に調節しているのではないか」という仮説を提唱するに至った。

2. 研究の目的

ウシ胎盤では少なくとも 10 種類以上のプロラクチン(PRL)ファミリータンパク質が発現しているが、その役割は不明な点が多い。研究担当者は、ウシ PRL 関連タンパク質 1(bPRP1)が酵素によって切断されて生成した N 末端側断片は血管内皮細胞増殖促進作用を有する事を報告したが、この現象は、ヒトやラットの PRL が酵素切断されて生じる N 末端側断片は血管内皮細胞増殖を抑制するという既報と正反対の結果である。同じ遺伝子ファミリーなのに、生物活性が正反対に乖離する機構は何か?本研究では、ウシ胎盤性 PRL ファミリーは、酵素切断によって活性化する血管新生調節因子の集団であるとの仮説を提唱し、RPL ファミリーの主要なメンバーである胎盤性ラクトジェン(PL)を対象として仮説を検証してゆく事とした。

3. 研究の方法

小課題 1. bPL の酵素切断の可能性の探索と切断部位の同定

bPL の組換えタンパク質を作製し、bPL が胎盤由来の酵素によって C 末端側を切断されるか否かを検討した。酵素はカテプシン及びマトリックスメタロプロテナーゼ(3, 8 及び 13)を用い、至適 pH の条件で bPL とインキュベートして反応産物をウェスタンブロットングで解析した。組換え bPL は N 末端側に His-タグと FLAG-タグを付加して発現させた。タグの抗体でウェスタンブロットを行って分子量の減少が認められた場合には、それが C 末端側の切断によるものと判断された。酵素活性の特異性を明らかにする目的で、特異的阻害剤の存在化で bPL の切断実験を行いカテプシン阻害剤(ペプスタチン A)または MMP 阻害剤(GM6001)によって bPL の切断活性が阻害される事を確認した。また、子宮や胎盤組織の培養上清と

組換え bPL をインキュベートして、bPL の切断が起きる事を証明し、この作用が酵素阻害剤の添加で消失する事も併せて検討した。

bPL の C 末端側を切断する活性を示した酵素遺伝子の子宮・胎盤における発現を in situ ハイブリダイゼーションで検索した。子宮・胎盤に発現するマトリックスメタロプロテナーゼの酵素活性をザイモグラフィ法で検出した。

小課題 2. bPL の N 末端断片の PRL 様生物活性と血管内皮細胞増殖活性の評価

上記の小課題 1 で明らかになった bPL の酵素切断部位に関する情報を元に bPL の N 末端断片を組換え発現で作成した。研究担者は予備実験を行った結果、人為的に短縮したポリペプチド断片の発現はうまく行かない事が多いことを経験している。そこで本研究では bPL をコードする配列にサイレント変異を導入することによって翻訳効率を高めて効率的に組換えタンパク質を発現させた。サイレント変異のデザインはウェブベースのソフトで実施した。

bPL の N 末端断片の生物活性を評価する目的で、Nb2 細胞を用いた PRL 様生物活性の検定とウシ血管内皮細胞 (BBMC) を用いた細胞増殖に及ぼす作用を検討した。Nb2 細胞はラットリンパ腫由来の細胞株で、PRL に反応して細胞増殖が起きることから、PRL およびその関連物質の活性評価に用いられる細胞である。

4. 研究成果

小課題 1. 「bPL の酵素切断の可能性の探索と切断部位の同定」

胎盤組織の培養上清を抗 bPL 抗体でウェスタンブロットすると、32kDa の天然型の bPL と共に約 26kDa のバンドが検出された。このことから胎盤組織の培養上清には bPL を切断する活性がある事がわかった (図 1-A)。

ヒト由来株化細胞である 293 細胞を用いて N 末端に FLAG タグと His タグを付加した組換え bPL を発現させて 677 μg の精製 bPL を得た。次いでこの組換えタンパク質を胎盤組織の培養上清とインキュベートして抗 FLAG 抗体でウェスタンブロットしたところ、インキュベーションによって 32kDa の組換えタンパク質の C 末端側が切断されて、25kDa 前後の N 末端断片が生成する事を確認した (図 1-B)。

このことから胎盤組織の培養上清には bPL の C 末端側を切断する活性があり、これによって生じる N 末端断片は胎盤組織の培養上清にも存在している事が示された。

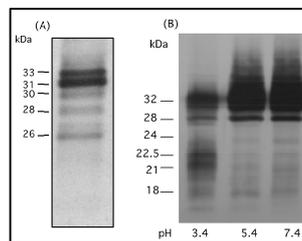


図 1-A. 胎盤組織の培養上清を抗 bPL 抗体で検出したウェスタンブロット

天然型の bPL は 32-33kDa であるが、26-28kDa 付近にもイムノリアクティブ bPL のバンドが認められる。

図 1-B. 組換え bPL と胎盤組織培養上清をインキュベートしたサンプルのウェスタンブロット

抗 FLAG 抗体で検出した。組換えタンパク質は N 末端側に FLAG タグを付加されているので、N 末端側断片が低分子バンドとして検出される。

培養上清中に存在する bPL を切断する活性はタンパク質分解酵素によるものと想定し、組換え bPL がマトリックスメタロプロテナーゼ (MMP) によって切断を受けるか否かを検討したところ、bPL は MMP-8、-9 および -13 によって C 末端側を切断されて約 25kDa の N 末端断片が生成した (図 2)。

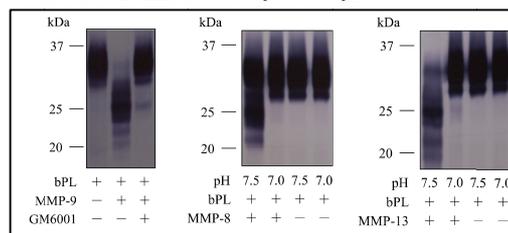


図 2. MMP で消化した組換え bPL のウェスタンブロット

組換え bPL を MMP-9 (左)、MMP-8 (中央) 及び MMP-13 (右) で消化して、抗 FLAG 抗体によるウェスタンブロットを行った。GM6001 は MMP 阻害剤。

MMP-8 および -13 はコラゲナーゼ、MMP-9 はゼラチナーゼであることから、胎盤組織の培養上清中の MMP 活性をゼラチンザイモグラフィ (図 3-左.) とカゼインザイモグラフィ (図 3-中央.) で検討したところ、胎盤組織培養上清中に両酵素の活性が証明された。胎盤組織の培養上清中の MMP-13 タンパク質を抗 MMP-13 抗体によるウェスタンブロットで検出した (図 3-右.)。MMP-13 の mRNA 発現を in situ ハイブリダイゼーション法で検討したところ、MMP-13 は栄養膜細胞で発現している事が示された (図 4)。

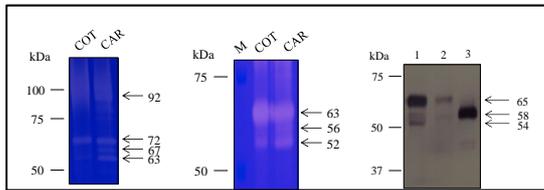


図 3. 胎盤組織の培養上清を試料としたゼラチンゼイモグラフィ(左) カゼインゼイモグラフィ(中央)及び抗 MMP-13 抗体によるウェスタンブロット

左および中央：胎子胎盤(COT)及び母体胎盤(CAR)の培養上清を試料とした。

右：胎子胎盤(レーン 1) 母体胎盤(レーン 2) および組換え MMP3(レーン 3)を試料とした。

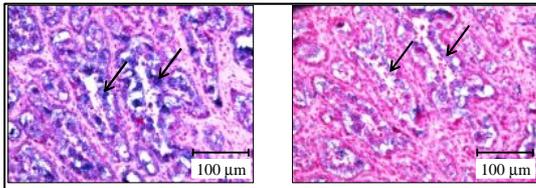


図 4. 胎盤組織を試料とした MMP-13 の in situ ハイブリダイゼーション

左：アンチセンスプローブ
右：センスプローブ

以上の成績から、ウシ胎盤組織の培養上清中には bPL を切断する活性があり、MMPs が bPL の酵素切断に関与している事が示唆された。

小課題 2. bPL の N 末端断片の PRL 様生物活性と血管内皮細胞増殖活性の評価

bPL の酵素切断で生じる N 末端断片を組換え発現で作成し、その生物活性を検討した。大腸菌の発現系で、酵素切断型と完全長型の 2 種類の bPL を発現させてそれぞれを精製した。それぞれの bPL をプロラクチン様生物活性を評価する Nb2 バイオアッセイ系で評価したところ、完全長型の bPL は標準品として用いたヒツジプロラクチンと同等の生物活性を示したが、bPL の N 末端断片はプロラクチン様生物活性を全く示さなかった(図 5-左)。

また、組換えタンパク質の血管新生に及ぼす影響を、ウシ血管内皮細胞(BBMC)を用いて検討したところ、完全長型 bPL は BBMC の増殖に影響を与えなかったが、bPL の N 末端断片は BBMC の増殖を抑制した(図 5-右)。

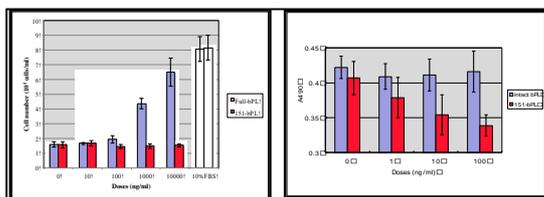


図 5. 完全長型 bPL と N 末端型 bPL のプロラクチン様生物活性(左)と血管内皮細胞の増殖に与える影響(右)

子宮組織における MMP 活性を胎盤の胎子側と母体側に分けて検討し、bPL の酵素切断に及ぼす影響について検討した胎盤組織の培養上清を用いたゼラチンゼイモグラフィの結果、培養上清のゼラチナーゼ活性は胎子胎盤側よりも母体胎盤側で高かった。また、母体胎盤組織から分泌される bPL は酵素切断がより効率的に生じている事がわかった。これらの成績は、胎盤から分泌される bPL の免疫活性と生物活性の相関性が胎子胎盤由来 bPL と母体胎盤由来 bPL で異なり、母体胎盤由来 bPL が生物活性が低く分子量が正常サイズとは異なるとする研究代表者の既報の論文の成績と一致していた。

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 4 件)

- Hosoe M, Inaba Y, Hashiyada Y, Imai K, Kajitani K, Hasegawa Y, Irie M, Teramoto H, Takahashi T, Hosoe M. Effects of supplemented sericin on the development, cell number, cryosurvival and number of lipid droplets in cultured bovine embryos. Anim. Sci. J. (2016) in press. DOI: 10.1111/asj.12628
- Irshad AR, Sasaki T, Kubo T, Odashima N, Katano T, Osawa T, Takahashi T, Izaike Y. Development of a programmable piggyback syringe pump and four-times-a-day injection regimen for superovulation in non-lactating Holstein cows. J. Reprod. Dev. (2015) 61: 485-488. DOI: doi.org/101262-jrd2015-047
- 高橋 透 ウシの繁殖研究の新展開 家畜診療 (2014) 61: 267-273. DOI なし
- Hayashi KG, Hosoe M, Sakumoto R, Takahashi T. Temporo-spatial expression of adrenomedullin and its receptors in the bovine placenta. Reprod. Biol. Endocrinol. (2013) 11: 62. DOI: 10. 1186/1477-7827-11-62.

〔学会発表〕(計 5 件)

- 金澤朋美、窪 友瑛、関 元秀、石山敬貴、金田義之、居在家義昭、高橋 透 ホルスタイン種受胎牛における黄体血流量と受胎性の関連について 第 158 回日本獣医学会大会 2015 年 9 月 北里大学獣医学部
- 窪 友瑛、金澤朋美、居在家義昭、高橋 透 カラー Doppler 超音波検査を用いた妊娠初期ウシ黄体の血流動態解析 第 108 回日本繁殖生物学会大会 2015 年

- 9月 宮崎大学農学部
3. 和田夏海、会津満理奈、居在家義昭、高橋透 時間分解蛍光免疫測定法によるウシ妊娠関連糖タンパク質 2 の測定系の構築 第 108 回日本繁殖生物学会大会 2015 年 9 月 宮崎大学農学部
 4. 吉野仁美、木崎景一郎、平田統一、山岸則夫、高橋透、居在家義昭、佐々木恒弥、橋爪一善 RNA 採血管によるウシの妊娠情報の収集と早期妊娠判定への適用 第 108 回日本繁殖生物学会大会 2015 年 9 月 宮崎大学農学部
 5. Sasaki S, Hayashi KG, Hosoe M, Kizaki K, Hashizume K, Takahashi T. Bovine placental lactogen is cleaved by matrixmetalloproteinases and resulted 25k N-terminal fragments inhibit the proliferation of vascular endothelial cells. World Congress of Reproductive Biology (2014) Edinburgh, UK.

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 透 (TAKAHASHI Toru)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：20355738

(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：