

平成 23 年度

修士論文

MMP 切断により生じたウシ胎盤性ラクトジェン N 末端側断片の血管新生に及ぼす影響

東京大学大学院 新領域創成科学研究科

先端生命科学専攻 応用生物資源学分野

106325 佐々木将武

指導教員 高橋透

目次

I. 要旨	
II. 序論.....	2
III. 組換え bPL の作製	
i. 序論.....	9
ii. 材料と方法.....	9
iii. 結果.....	13
iv. 考察.....	14
IV. bPL の酵素切断	
i. 序論.....	16
ii. 材料と方法.....	16
iii. 結果.....	22
iv. 考察.....	24
V. bPL 断片の生物活性	
i. 序論.....	27
ii. 材料と方法.....	27
iii. 結果.....	29
iv. 考察.....	30
VI. 総合考察.....	32
VII. 謝辞.....	34
VIII. 参考文献.....	35
IX. 図表.....	43

II. 序論

哺乳類の胎盤

哺乳類の胚は自力で呼吸や摂食をなし得るまで母体内で成長する。ウシにおいても胚は母体内で発育し、約 280 日の妊娠期間を経て体重 35 kg の新生子ウシとして誕生する。この間の胎仔の成長は急激であり、妊娠 220 日齢付近のウシ胎仔の体重は 1 日当たり 350 g も増加する (Prior and Laster, 1979)。この胎仔成長をサポートするためには膨大な量の栄養素や酸素の供給が必要であり、子宮内膜上皮細胞からの受動的な拡散では全く不十分である。胎仔成長に必要な栄養素を賄いガス供給や代謝産物の排泄等を行うための器官として、多くの哺乳類の母体と胎仔の間には胎盤が形成される。ウシの場合、胎盤は胎仔側の絨毛叢組織が母体側の子宮小丘組織の間に入り込む形で母体と胎仔の血中物質の受け渡しを行っている。胎盤は妊娠期にのみ形成される一過性の器官であるが、胎仔の呼吸、代謝、内分泌組織等、数多くの役割を担っている。

胎盤性プロラクチンファミリー

妊娠期の哺乳類の胎盤では、多数のタンパク質ホルモンが分泌される。なかでも霊長類、齧歯類、反芻類の胎盤では、下垂体ホルモンであるプロラクチン (PRL) やそのパラログが発現することが知られている (Josimovich and MacLaren, 1962 ; Kohmoto and Bern, 1970 ; Buttle and Forsyth, 1976)。胎盤性ラクトジェン (placental lactogen ; PL) は胎盤絨毛を構成する栄養膜細胞で産生される糖タンパク質ホルモンのひとつで、PRL の活性を示す。齧歯類、反芻類の胎盤では PL 以外にも多数の PRL パラログが発現し、これら一群のタンパク質は胎盤性 PRL ファミリーと呼ばれている。胎盤性 PRL ファミリータンパク質は PRL の活性をもつラシカルメンバーである PL と、構造的には PRL に近いが PRL 様生物活性をもたない PRL 様タンパク質 (prolactin like protein ; PLP) や PRL 関連タンパク質 (prolactin-related protein ; PRP) 等のノンクラ

シカルメンバーに大別される。

齧歯類の胎盤性 PRL ファミリータンパク質

マウスの胎盤性 PRL ファミリータンパク質はマウス PL の他にプロリフェリン (PLF) (Linzer *et al.*, 1985), PLF 関連タンパク質 (proliferin-related protein ; PLF-RP) (Linzer and Nathans, 1985 ; Colosi *et al.*, 1988), 15 種類の PLP (Soares *et al.*, 2007), 脱落膜/栄養膜 PRL 関連タンパク質 (decidual prolactin-related protein ; d/tPRP) が存在する。マウス PL は mPL-I と mPL-II の 2 種類が存在し, それぞれ妊娠中期, 妊娠後期に優位に分泌される (Colosi *et al.*, 1987)。mPL-I は分子量 36.5-42 kDa 及び 29-32 kDa の糖タンパク質であり, 糖鎖修飾パターンによって 2 種類のアイソフォームが存在する (Colosi *et al.*, 1987)。一方で mPL-II は糖鎖が無く, 分子量 22 kDa の単純タンパク質である。

ラットの胎盤性 PRL ファミリータンパク質にはマウスと同様に複数の PL, PLF-RP (Soares *et al.*, 2007), 15 種類の PLP (Duckworth *et al.*, 1986 ; Duckworth *et al.*, 1988 ; Deb *et al.*, 1991) が存在する。ラット PL は糖タンパク質である rPL-I (Soares *et al.*, 2007) と糖鎖を持たない rPL-II (Duckworth *et al.*, 1986) が報告されている。

反芻類の胎盤性 PRL ファミリータンパク質

ヤギやヒツジにおける胎盤性 PRL ファミリータンパク質はそれぞれ PL と 2 種類の PRP が報告されている (Ushizawa, 2007)。

ウシにおける胎盤性 PRL ファミリータンパク質は PL (Schuler *et al.*, 1988) と 10 種類の PRP (Schuler and Hurley, 1987 ; Kessler *et al.*, 1989 ; Yamakawa *et al.*, 1990 ; Tanaka *et al.*, 1991 ; Schuler *et al.*, 1991 ; Ushizawa *et al.*, 2005) が報告されている。

PL の分子進化

霊長類や齧歯類、反芻類の成長ホルモン (GH), PRL, PL は GH/PRL ファミリーに属し、共通の祖先遺伝子から進化してきたものと考えられている (Miller and Eberhardt, 1983 ; Goffin *et al.*, 1996 ; Soares *et al.*, 1998). 祖先遺伝子は脊椎動物の出現とほぼ同時期に GH と PRL へと進化したと考えられている (Wallis, 1992). GH と PRL はその後、PL 等を含む GH/PRL ファミリーへと進化するが、その分子進化の経路は霊長類とその他動物種とで大きく異なっている。霊長類では祖先遺伝子から進化した GH から PL が進化した。一方で齧歯類や反芻類では祖先遺伝子から進化した PRL が下垂体 PRL や胎盤性 PRL ファミリー等の PRL ファミリーへと進化した。このことから霊長類の PL は構造的に GH に関連が深い、齧歯類や反芻類の PL は PRL と関連が深く PRL 受容体への結合を介して PRL 様生物活性を示すことが知られている (Byatt *et al.*, 1992).

ウシ胎盤性ラクトジェンの構造

ウシ PL (bovine PL ; bPL) はウシの胎盤で発現する胎盤性 PRL ファミリータンパク質のひとつであり、PRL 様生物活性をもつ糖タンパク質ホルモンである。cDNA から予想される bPL の分子量は 23.5 kDa であるが (Schuler *et al.*, 1988), 糖鎖付加を含む修飾後の分子量は 31 kDa 及び 33 kDa である (Eakle *et al.*, 1982 ; Murthy *et al.*, 1982 ; Arima and Bremel, 1983 ; Shimomura and Bremel, 1989). bPL のアミノ酸配列は他の胎盤性 PRL ファミリータンパク質とは大きく異なっているため (Schuler and Hurley, 1987 ; Schuler *et al.*, 1988 ; Kessler *et al.*, 1989), 他のウシ胎盤性 PRL ファミリータンパク質よりもさらに PRL に近い構造となっている。

PL の分泌動態

多くの動物種において PL は妊娠前期から中期に母体血中に検出され始め、妊娠の

経過と共に濃度が上昇し妊娠末期に最高値を示して分娩後に消失する。

ヒトでは妊娠後 5-10 日目に合胞体栄養膜細胞から母体側にのみ分泌される (Morikawa *et al.*, 1971)。マウスやラットでは妊娠後 11-13 日目に PL-I の分泌が最高値を示し、妊娠後 19-20 日目に PL-II の分泌が最高値を示す (Colosi *et al.*, 1987)。

ウシにおける bPL の mRNA は妊娠後約 20 日から栄養膜二核細胞で転写され始め (Yamada *et al.*, 2002)、翻訳された bPL は膜結合型分泌顆粒に蓄えられる (Wooding, 1982)。栄養膜二核細胞は子宮内膜上皮細胞と融合することで三核細胞を形成し、分泌顆粒内の bPL を母体血中に分泌する (Wooding, 1982)。妊娠約 60 日から母体血中で bPL が検出され始め (Patel *et al.*, 1996)、血中 bPL 濃度は妊娠後約 200 日まで徐々に上昇し、最大で 0.6 ng/mL に達する。妊娠後約 200 日から 220 日では急激に血中 bPL 濃度が上昇し、最大で 1.3 ng/mL に達する。その後分娩時まで血中濃度は維持され、分娩後は急速に減少する。ウシ胎仔側血中における bPL 濃度は妊娠中期に最高値を示し、その後妊娠の経過と共に減少するが、常に母体側の 10 倍以上に保たれている。

PL の生理的役割

ウシを始めとして PL の生物学的機能を探る研究は多くなされており、霊長類及び齧歯類では PL の生理的な作用が明らかになっている。ヒトでは PL のもつ成長ホルモン様作用やインスリンの拮抗作用による安定的な胎仔成長が主な役割とされる

(Friesen, 1965 ; Riggi *et al.*, 1966)。ラットでは PL が妊娠期に PRL の機能を代替することが知られている (Grattan and Averill, 1990 ; Tomogane *et al.*, 1992, 1993)。すなわちラット PRL は黄体内の PRL 受容体に結合して黄体を刺激し機能性黄体を維持するが、ラット PL も同様に PRL 受容体に結合し機能性黄体を維持する機能を持つ。ラットにおいては妊娠前期に 1 日 2 回の下垂体 PRL サージにより機能性黄体が維持されるが、妊娠 6 日以降になると PL が分泌され始め、PRL のサージが抑制される。分泌が抑制された PRL に代わり、PL が黄体刺激ホルモンとして機能する。しかしウ

シの PL は成長ホルモン様作用が弱く、また機能性黄体の維持に PRL が必要とされないことから bPL の黄体維持機能も必要とされない。さらに妊娠中の母体血中 bPL 濃度は PRL のそれよりも著しく低いことから (García-Ispuerto I *et al.*, 2010), 未だに明確な役割は知られていない。しかし bPL は PRL 受容体に結合できることから、基本的に PRL 受容体やその他の受容体に結合して作用を示すことが予想されている (Byatt *et al.*, 1992)。すなわち bPL は受容体に結合して下流のシグナル伝達経路を活性化させ、乳汁産生や黄体維持等、妊娠に伴う母体適応や胎仔自身がホルモン生産を開始するまでの胎仔成長等の機能を担っていると考えられる。ウシにおける血中 bPL 濃度は他の動物種とは異なり母体側よりも胎仔側で高くなっているため、胎仔側組織を標的とした何らかの作用が存在している可能性も考えられる。しかし PL に特異的な受容体は未だに発見されていない。ヒツジにおいてはその存在が指摘されている一方で (Freemark *et al.*, 1987), その報告は決定的ではなく、それゆえ明確な PL 特異的作用も発見されていない。つまりウシ PL はその構造や分泌細胞、発現時期等は明らかとなっているが、bPL に特異的な受容体の存在や、霊長類や齧歯類に見られるような明確な生理的機能が決定されていない。

N 末端側 bPL 断片生成の可能性

長い間、バイオアッセイやラジオレセプターアッセイにより bPL の役割の研究が行われてきたが (Forsyth, 1986), その生理的意義は未だに不明である。このことから近年、bPL は分泌後にさらに修飾を受けることで生理活性をもつ成熟タンパク質となる可能性が考えられた。近年の研究から、ラット PRL は代謝酵素で切断されると新たな生物活性をもつ断片が生成してくることが確認された (Andries *et al.*, 1992 ; Baldocchi *et al.*, 1993)。ラット PRL (22.5 kDa) は pH 3 の条件下では全体の 0.6-1.0% が代謝酵素であるカテプシン D (CTS-D) や乳腺培養液によって切断され、N 末端側から順に 16kDa, 0.5 kDa , 6 kDa の断片が生成される。この N 末端側の 16 kDa の断

片はもとのラクトジェニック活性を失っており、代わりに抗血管新生作用という新しい生物活性をもつことが示された (Struman *et al.*, 1999). すなわち PRL がラット生体内において酵素切断を受けることで、全長の PRL とは異なる機能をもつ新規タンパク質が生成されている可能性が示唆された. ラット PRL 断片の抗血管新生作用は完全長 PRL がもつ血管新生作用と共調し、組織における血管新生を調節していると考えられる.

bPL はウシ胎盤性 PRL ファミリータンパク質の中で構造的・機能的に PRL に最も近縁と考えられることから、PRL と同様に酵素切断によって N 末端側の断片を生成する可能性が考えられる. また bPL の末梢血中濃度は PRL に比べて低く保たれているため、血中の bPL 断片濃度は極めて低いと考えられる. bPL は分泌されたその場で断片化され胎盤組織局所的にラクトジェニック活性とは異なる生理作用を示す可能性が考えられる. bPL の標的組織は、bPL の血中濃度が母体側よりも胎仔側で常に高く保たれていることから、胎仔側が主であると考えられる. bPL の作用は bPL 特異的な受容体が発見されていないこと、及びラット PRL の N 末端側断片が PRL 受容体以外の伝達系を介して作用していることから、ウシにおいても bPL またはその断片は PRL 受容体以外の伝達系を介している可能性がある.

本研究の目的

本研究では bPL の新しい生物活性を探索することを目的として bPL の酵素切断の可能性について検討し、生成した bPL 断片の生物活性を評価した. 完全長 bPL はラクトジェニック活性をもつが、酵素によって断片化されることで胎盤形成に伴う急激な細胞増殖や血管新生等の妊娠に関連する新規の機能を担う可能性が考えられる. すなわち単一のタンパク質の機能を局所的、時期特異的に変化させることで効率的な妊娠適応メカニズムを構築していると考えられる. 本研究において bPL の酵素による切断の可能性と新たな機能を探索することは、これまで明らかでなかったその他のウシ

胎盤性 PRL ファミリータンパク質の機能の解明にも繋がることが期待される.

III. 組換え bPL の作製

i. 序論

初めに本研究の試料となる bPL の作製を行った。

bPL は製品として販売されておらず頒布箇所も限られている。bPL をウシ胎盤から精製した場合、胎盤で発現する多くの PRL パラログタンパク質のために精製されたタンパク質の同定が困難であることが予想される。また組換え bPL の作製は過去に大腸菌で行われているが (Helman *et al.*, 1998), 発現した bPL は菌体内で封入体を形成するため、変性剤による変性及び精製後のリフォールディング等の操作が必要となる。そのためタンパク質のリフォールディングミスによる活性喪失や最終収量の減少に繋がる恐れがある。

一方で哺乳類の培養細胞で bPL を発現させた場合、発現量は大腸菌に比べて劣るが、合成された bPL は封入体を形成せずに培地へ分泌されるため、精製の過程において煩雑な操作を必要としない。さらに組換えタンパク質には糖鎖付加が可能であるため、大腸菌で発現させた場合よりも天然型 bPL に近い構造になることが予想される。

以上の理由から本研究では HEK293 細胞を用いて組換え bPL を作製することとした。本研究では組換え bPL の N 末端に 2 種類のタグを付加した融合タンパク質を発現させ、タグに対する 2 種類のアフィニティ精製を行うことで、精製プロセスの簡便化と精製中のタンパク質量のロス低減を図ることとした。

ii. 材料と方法

(1) 組換え bPL の発現

pFLAG-CMV-3 発現ベクター (Sigma, MO, USA) (Takahashi *et al.*, 2008) を用いて組換え bPL を発現させた。このベクターは FLAG-6xHis-FLAG タグを組換えタンパク質の N 末端に付加するようになっている (図 1)。妊娠 26 日齢のウシ胎膜 cDNA を

テンプレートとして, *Pfu* DNA ポリメラーゼ (Stratagene, CA, USA) と, *Hind* III (Fw プライマー) 及び *Bam*H I (Rv プライマー) 認識配列をもつプライマー (表 1) を用いて PCR を行い, bPL の成熟タンパク質領域をコードする配列を増幅した. PCR 産物及びベクターを *Hind* III (タカラバイオ, 滋賀) 及び *Bam*H I (タカラバイオ) で処理し, T4 リガーゼ (Promega, WI, USA) を使用してライゲーションした後, XL-1 Blue super competent cell (Stratagene) に導入した. 形質転換体はアンピシリン添加 LB 寒天培地 (1%トリプトン, 0.5%酵母抽出物, 1%NaCl, 1.5%寒天) で培養し, 形成された各コロニーをアンピシリン添加 LB 液体培地 (1%トリプトン, 0.5%酵母抽出物, 1% NaCl) で 37°C で 12 時間振盪培養した. 培養後, QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) でプラスミドを精製した. 精製したプラスミドの挿入配列の塩基配列を決定し, N 末端に FLAG-6xHis-FLAG タグを付加した bPL を発現するベクターをスクリーニングした.

目的のプラスミド 25 µg を FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche, Basel, Swiss) を用いて HEK293 細胞 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) に導入し, 培地 (10%FBS [Biologic Industry, Beit HaEmek , Kibbutz, Israel], DMEM / F12 [Sigma], Penicillin-Streptomycin [Sigma]) で培養した. 48 時間後, 500 µg/mL G418 (Sigma) で 3 週間培養し, 生育細胞を 0.5 細胞/ウェルとなるように限界希釈法を用いて 96 ウェルマイクロプレート (BD Falcon, NJ, USA) 6 枚に播種した. 2 週間後, 生育細胞を含むウェルから細胞を回収し, 48 ウェルマイクロプレート (BD Falcon) 2 枚に播種した. 培養後, 各ウェルからコンディション培地を回収してウェスタンブロッティングを行い, 高発現のクローン 9 株を 24 ウェルマイクロプレート (BD Falcon) に播種した. 培養後, 各ウェルからコンディション培地を回収してウェスタンブロッティングを行い, 高発現のクローン 7 株を選択して以降のローラーボトル培養に用いた.

選択した株をローラーボトル (Wheaton Scirnce Products, NJ, USA) を用いてロー

ローボトル培養した。ローボトルは以下の方法で準備した。I 型コラーゲン (Cellmatrix Type I-A, 新田ゼラチン, 大阪) を滅菌超純水で希釈して 0.05% コラーゲン溶液を作製し, ローボトルに 25 mL ずつ分注してボトルローラー (Wheaton Scirnce Products) を用いて 0.4 rpm で回転させながら一晩インキュベートした。コラーゲン溶液を捨て, ボトル内を培地 (10%FBS, DMEM / F12, 250 µg/mL G418) で 1 回洗浄して培養に使用した。選択した株は T-75 フラスコ (培養面積 75 cm², BD Falcon) で培養し, 90%コンフルエントまで増殖させた。培養した T-75 フラスコの側壁を手で叩いて細胞を剥離させ, 50 mL のコニカルチューブに移して遠心 (200×g, 5 分間) した。上記のコラーゲンコートしたローボトルに細胞約 1×10⁷ 個及び培地 200 mL を加え, 0.4 rpm で回転させながら 5%炭酸ガス, 95%空気の気相下で 37°C で培養した。8-10 日間培養し, 培養液が黄変してきたら培養液を回収し, 遠心 (600×g, 30 分間) して上清を回収して, コンディション培地約 2.3 L を得た。

培養上清を Stirred Cell 8400 (Millipore, MA, USA, カットオフ 10 kDa) で約 2.3 L から約 150 mL にまで濃縮した。濃縮した培養上清を遠心 (10,000×g, 4°C, 5 分) し上清を得てこれを精製に使用した。

(2) 組換え bPL の精製

濃縮した上清約 150 mL と 10×結合緩衝液 (1 M リン酸緩衝液 [pH 8.0], 1 M NaCl, 0.1 M イミダゾール, pH 7.9) 16.7 mL を混合した。1×結合緩衝液で洗浄したゲル担体 (Ni Sepharose 6 Fast Flow, GE Healthcare, CA, USA) 2 mL を上清 - 10×結合緩衝液混合液に加え, 4°C で 14 時間インキュベートした。ゲルスラリーをエコノカラム (Bio-Rad, CA, USA) に入れ, 1×結合緩衝液で洗浄後, 溶出緩衝液 (0.1 M リン酸緩衝液 [pH 8.0], 0.1 M NaCl, 0.5 M イミダゾール, pH 7.5) 32.5 mL を 13 回に分けて加え, 溶出した。溶出液中の組換え bPL の存在は抗 FLAG M2 マウスモノクローナル抗体 (Sigma) によるウェスタンブロッティング (Towbin *et al.*, 1979) で確認した。

ウェスタンブロッティングで組換え bPL が確認された 1-5 回目の溶出画分を 1× Tris-buffered saline (TBS) (20 mM トリス, 500 mM NaCl, pH 7.4) で洗浄した anti-FLAG M2 Affinity Gel (Sigma) 1 mL と混合し, 4°C で 13 時間インキュベートした. ゲルスラリーをエコノカラムに入れ, 1×TBS で洗浄後, 溶出緩衝液 (FLAG Peptide [Sigma], 200 µg/mL) 1.5 mL を 10 回に分けて加え, 溶出した. 溶出液中の組換え bPL の存在は SDS-PAGE で確認した.

溶出液を Amicon Ultra-15 遠心式フィルターユニット (Ultracel-10 メンブレン装着) (Millipore, カットオフ 10 kDa) で約 5 mL から約 200 µL まで遠心 (5,000×g) し, 濃縮した. 濃縮した溶液のタンパク質濃度を, ウシ血清アルブミン (BSA) をスタンダードとしたブラッドフォード法により定量した.

(3) ドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 及びウェスタンブロッティング

SDS-PAGE (Laemmli, 1970) には 15%アクリルアミドゲルを用いた. 泳動緩衝液 (25 mM トリス, 192 mM グリシン, 0.1%SDS) を満たした泳動槽にゲル板をセットし, 電源 (パワーパック 3000 [Bio-Rad]) で定電流 30 mA の条件で 80 分間泳動した.

ポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜をメタノールに 10 秒, 超純水に 5 分, 1×転写緩衝液 (25 mM トリス, 200 mM グリシン, 20%メタノール) に 15 分浸した. SDS-PAGE 終了後, ゲルをガラス板から外して, ろ紙, PVDF 膜と共にブロッティング装置 (ミニトランスブロットセル [Bio-Rad]) にセットした. 定電流 200 mA で 1.5 時間通電した.

ブロッティング終了後, PVDF 膜をプラスチック容器内の 10%スキムミルクに浸し, 30 分間振盪させた. 振盪後, 3,000 倍に希釈した抗 FLAG M2 マウスモノクローナル抗体, またはポリクローナル抗 bPL ウサギ抗体 (Nakano *et al.*, 2001) 20 mL に浸し,

1.5時間振盪させた。抗体反応終了後、PVDF膜をTBS-T(20 mM トリス, 500 mM NaCl, 0.05%Tween20, pH 7.4) で10分間洗浄する操作を3回繰り返した。洗浄後、10%スキムミルクに浸し、30分間振盪させた。振盪後、3,000倍に希釈した抗マウスIgG抗体アルカリホスファターゼ標識ヤギ抗体 (Sigma), または抗ウサギIgG抗体アルカリホスファターゼ標識ヤギ抗体 (Sigma) 20 mLに浸し、1時間振盪させた。抗体反応終了後、PVDF膜をTBS-Tで10分間洗浄する操作を3回繰り返した。

アルカリホスファターゼによる発色には発色キット (Bio-Rad) を用いた。発色キット溶液10 mLにPVDF膜を浸して30分間振盪させ、水道水で洗浄した後、風乾させた。

(4) Nb2細胞によるバイオアッセイ

組換えbPLのラクトジェニック活性はNb2細胞を用いたバイオアッセイで測定した (Tanaka *et al.*, 1980)。Nb2細胞 (American Type Culture Collection) 1.5×10^7 個をアッセイ培地 (DMEM / F12, 10%ウマ血清, 0.1 mM 2-メルカプトエタノール [Bio-Rad], 1%ペニシリン-ストレプトマイシン [Sigma]) 30 mLに懸濁し (5.0×10^5 cells/mL), 28時間培養した。

培養後、24ウェルマイクロプレートに 1×10^5 cells/mLの細胞懸濁液2 mLと被験物質を添加して37°C, 5%炭酸ガス培養器内で71時間培養した。被験物質はヒツジPRL (oPRL-19, NIDDK, MD, USA) 及び組換えbPLを各ウェル10 ng/mL, 1 ng/mL, 100 pg/mL, 10 pg/mL, 1 pg/mLとなるように添加した。培養後、TC10セルカウンター (Bio-Rad) で細胞数を測定した。

iii. 結果

初めにbPL cDNAのN末端側にFLAG-6xHis-FLAGタグを付加した組換えbPLの発現系を構築し (図1), HEK293細胞で発現させた。発現させたタンパク質をHisタグ

について Ni Sepharose 6 Fast Flow で精製した溶液について抗 FLAG 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った結果, 1-7 回目の溶出画分において 32 kDa 及び 31 kDa にバンドが検出された (図 2). His タグについて精製したタンパク質を, 続いて FLAG タグについて anti-FLAG M2 Affinity Gel で精製しクーマシーブリリアントブルー (CBB) 染色を行った結果, 32 kDa 及び 31 kDa にバンドが検出された (図 3). 精製されたタンパク質は 677 µg 得られた.

精製後の溶液について抗 bPL 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った結果, 32 kDa 及び 31 kDa にバンドが検出された (図 4)

精製したタンパク質が PRL 様生物活性 (ラクトジェニック活性) を有するかを検証するため Nb2 細胞を用いてバイオアッセイを行った結果, 組換え bPL は陽性対照であるヒツジ PRL と同程度の PRL 様生物活性を有することが示された (図 5).

iv. 考察

本実験では, 本研究の試料となる組換え bPL の作製を行った.

この実験で精製した組換えタンパク質はおよそ 32 kDa 及び 31 kDa の分子量をもち, PRL と同等のラクトジェニック活性を示すことが分かった. 天然型 bPL は糖鎖修飾パターンによって 33 kDa 及び 31 kDa の 2 種類の分子量をもつが (Eakle *et al.*, 1982 ; Murthy *et al.*, 1982 ; Arima and Bremel, 1983 ; Shimomura and Bremel, 1989), 今回作製した組換え bPL は合計 2.9 kDa のタグが付加された状態で 32 kDa 及び 31 kDa の分子量をもつことが示された. この天然型 bPL と組換え bPL の分子量の差は発現細胞の違いによる修飾された糖鎖の分子量の差によるものだと考えられる. 糖鎖を除いた bPL の予想分子量は 23.5 kDa であるが (Schuler *et al.*, 1988), 大腸菌で発現させた bPL を SDS-PAGE した場合, 還元条件では 26 kDa, 非還元条件では 22 Da を示し, 移動度が分子量を反映しないことが分かっている (Byatt *et al.*, 1991). この現象の理由は明らかになっていないが, bPL の立体構造が関係しているとされる (Takahashi,

2006). すなわち天然型 bPL と組換え bPL の糖鎖の分子量は、見かけの分子量の違い以上に大きく異なっている可能性がある。

組換え bPL の N 末端側には 2 箇所の FLAG タグ及び 1 箇所の His タグが付加されているため、コンディショニング培地からの精製が容易となっている (Takahashi *et al.*, 2008). N 末端側にタグを付加した胎盤性 PRL ファミリータンパク質の bPRP-I は酵素によって切断されて N 末端側の断片を生じ、その N 末端側断片はタグに対する抗体で検出されることから (Takahashi *et al.*, 2008), 組換え bPL の N 末端側の断片も同様に検出することが可能と考えられる。

これまで組換え bPL は大腸菌で作製されたものが知られていたが (Helman *et al.*, 1998), 今回作製した組換え bPL は HEK293 細胞で発現させたために糖鎖が付加され、より天然型 bPL に近い構造となっていると考えられる。しかし bPL は本来ウシ栄養膜二核細胞で発現するため、今回作製した組換え bPL の bPL cDNA 内に 1 箇所存在する N 型糖鎖修飾サイト及び多数の O 型糖鎖修飾サイト (Byatt *et al.*, 1990) への糖鎖修飾パターンは天然型 bPL のそれとは同一でない可能性がある。

しかし大腸菌で発現させた組換え bPL は天然型 bPL と同等のラクトジェニック活性をもつことと (Byatt *et al.*, 1990), Nb2 細胞によるバイオアッセイの結果から (図 5), 今回作製した組換え bPL は少なくとも *in vitro* において天然型 bPL に相当するラクトジェニック活性をもつと考えられる。

一般に栄養膜細胞で産生されるタンパク質は、高分子量の糖鎖が付加される例が多くみられる (Patel *et al.*, 2004). 糖鎖修飾はタンパク質の生体内半減期の遅延や免疫反応の回避に役立っていると思われることから、HEK293 細胞で発現させた組換え bPL はウシをはじめとする *in vivo* での実験にも利用できることが期待される。

IV. bPL の酵素切断

i. 序論

前回の実験から N 末端側に FLAG 及び His タグをもつ組換え bPL が作製されたことを受けて、次に各種酵素による bPL の N 末端側断片の生成を検証した。

bPL は bPRL と構造的・機能的によく似ており、アミノ酸配列相同性が 50% でラクトジェニック活性をもつ PRL のパラログタンパク質である (Byatt *et al.*, 1992)。ラット PRL は代謝酵素である CTS-D によって切断を受けて N 末端側断片を生じ、切断前の PRL とは異なる機能をもつようになることが報告されている (Struman *et al.*, 1999)。ヒト PRL は血管新生作用を示すが、妊娠中に CTS-D で切断されると抗血管新生作用を示す N 末端側 16 kDa 断片が生じ、これが出産後の母体の心筋梗塞の原因となる例が報告されている (Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2007)。また、bPL と同じウシ胎盤性 PRL ファミリータンパク質であるウシ PRL 関連タンパク質 1 (bovine prolactin-related protein-I ; bPRP-I) は機能不明の糖タンパク質であるが、CTS-D やマトリックスメタロプロテナーゼ (MMPs) によって N 末端側断片を生成し、これが血管内皮細胞増殖活性を示すことが報告されている (Ushizawa *et al.*, 2010)。これらの報告から、これらタンパク質のパラログである bPL も同様に CTS や MMPs 等の代謝酵素によって切断を受け、全長の bPL とは異なる生物活性を有する可能性が考えられる。

本実験では胎盤組織がもつ bPL 切断活性の検証と、それに続く各種代謝酵素による組換え bPL の切断実験を行った。

ii. 材料と方法

(1) 胎盤試料の採取と培養上清の回収

動物実験を行う場合には、動物実験委員会に動物実験計画書を提出し、審査及び承

認をされた後に実施している。

胎盤試料はペントバルビタールナトリウム（共立製薬，東京）により安楽死させた妊娠 130 日齢のホルスタイン及び妊娠満期の生体ホルスタインから採取した。

妊娠 130 日齢の胎盤は子宮小丘と絨毛叢に分離させ，絨毛叢組織を 16.6 g 得た。絨毛叢組織を外科刀で細切し，120 mL の DMEM/F12 培地に浮遊させ，5%炭酸ガス培養器内で 37°C で培養した。24 時間後培養上清を回収し，Stirred Cell 8400 で 70 mL になるまで濃縮した。得られた組織培養上清のタンパク質量は BSA をスタンダードとしたブラッドフォード法により定量した。

妊娠満期の胎盤は子宮小丘と絨毛叢に分離し，子宮小丘組織を 9.4 g，絨毛叢組織を 5 g 得た。上記の手法で各組織の培養上清を得て，タンパク質量を測定した。

(2) 絨毛叢組織培養上清中の bPL の検出

妊娠 130 日齢の絨毛叢組織培養上清（タンパク質量：4 μg ）について SDS-PAGE 及びウェスタンブロッティングを行った。ブロッティングは 100 mA で 8.5 時間行い，一次抗体は 1,000 倍に希釈したポリクローナル抗 bPL ウサギ抗体，二次抗体には 3,000 倍に希釈した抗ウサギ IgG 抗体アルカリホスファターゼ標識ヤギ抗体を用いた。

(3) 絨毛叢組織培養上清と組換え bPL の共培養

組換え bPL 1.69 μg と妊娠 130 日齢の絨毛叢組織培養上清（タンパク質量：19.4 μg ）を緩衝液中（全容積 20 μL ）で 37°C で 17 時間共培養した。緩衝液はクエン酸緩衝液 pH 3.4，クエン酸緩衝液 pH 5.4，及び TCNB 緩衝液（50 mM トリス，10 mM CaCl_2 ，150 mM NaCl，0.05% Brij 35，pH 7.5）を用いた。陰性対照として，絨毛叢組織培養上清を処理していない組換え bPL 677 ng を純水中でインキュベートした。

インキュベート後，組換え bPL 677 ng を抗 FLAG M2 マウスモノクローナル抗体及び抗マウス IgG 抗体アルカリホスファターゼ標識ヤギ抗体でウェスタンブロッティ

ングを行った。

(4) 酵素による組換え bPL の切断

組換え bPL と各種酵素を緩衝液中で 37°C でインキュベートした。酵素は CTS 及び MMP を用いた。CTS は CTS-B (cathepsin B from bovine spleen [Sigma]), CTS-D (cathepsin D from human liver [Sigma]) 及び CTS-L (Recombinant Human Cathepsin L [R&D systems, MN, USA]) を使用し、MMP は MMP-2 (Recombinant Human MMP-2 [R&D systems]), MMP-8 (Recombinant Human MMP-8 [R&D systems]), MMP-9 (Recombinant Human MMP-9 [R&D systems]) 及び MMP-13 (matrix metalloproteinase-13, proform [Sigma]) を使用した。緩衝液はクエン酸緩衝液 pH 3.4, クエン酸緩衝液 pH 5.4, 及び TCNB 緩衝液 pH 7.5 を用いた。

組換え bPL 847 ng と CTS-B 83.5 ng, または CTS-D 83.5 ng, または CTS-L 83.5 ng をクエン酸緩衝液 pH 3.4, またはクエン酸緩衝液 pH 5.4 中で 24 時間インキュベートした。インキュベート後, 抗 FLAG M2 マウスポリクローナル抗体及び抗マウス IgG 抗体アルカリホスファターゼ標識ヤギ抗体でウェスタンブロッティングを行った。

MMP-8 83.5 ng, または MMP-13 83.5 ng を TCNB 緩衝液または超純水中で 1 mM 酢酸 4-アミノフェニル水銀 (APMA) と共に 37°C で 2 時間インキュベートした。インキュベート後, 組換え bPL 847 ng を加えて 37°C で 21 時間インキュベートした。インキュベート後, 抗 FLAG M2 マウスポリクローナル抗体及び抗マウス IgG 抗体アルカリホスファターゼ標識ヤギ抗体でウェスタンブロッティングを行った。

MMP-2 1 ng, または MMP-9 1 ng を TCNB 緩衝液で 1 mM APMA と共に, MMP-2 溶液は 37°C で 1 時間, MMP-9 溶液は 37°C で 24 時間インキュベートした。インキュベート後, 溶液に MMP 阻害剤である GM6001 (chemicon, CA, USA) 100 ng または緩衝液を加え, さらに組換え bPL 100 ng を加えて 37°C で 20 時間インキュベートした。インキュベート後, 抗 FLAG M2 マウスポ

リクローナル抗体及び抗マウス IgG 抗体アルカリホスファターゼ標識ヤギ抗体でウェスタンブロッティングを行った。

(5) ザイモグラフィ

ゼラチンザイモグラフィは 0.06%ゼラチン (Difco, MI, USA) を添加した 10%アクリルアミド分離ゲルを用いた。妊娠満期の胎盤から得た子宮小丘組織培養上清 (タンパク質量 : 7.1 μg) 及び絨毛叢組織培養上清 (タンパク質量 : 7.34 μg) を 140 V で 80 分間泳動した。泳動後、ゲルを SDS 抽出緩衝液 (50 mM トリス, 5 mM CaCl_2 , 1 μM ZnCl_2 , 2.5% [w / v] Triton X-100 [Sigma], 0.02% NaN_3) に浸して 30 分間振盪し、その後超純水で洗浄した。洗浄後、インキュベーション緩衝液 (50 mM トリス, 5 mM CaCl_2 , 1 μM ZnCl_2 , 0.02% NaN_3) に浸して 24 時間振盪し、その後超純水で洗浄した。洗浄後、CBB で染色した。

カゼインザイモグラフィは、0.05%カゼイン (α -カゼイン [Sigma]) を添加した 10%分離ゲルを用いた。初めに 40 mA で 45 分間プレランを行い (Fernández-Resa *P et al.*, 1995), 10 分間クールダウンさせた後、妊娠満期の胎盤から得た子宮小丘組織培養上清 (タンパク質量 : 3.55 μg) 及び絨毛叢組織培養上清 (タンパク質量 : 3.67 μg) を 20 mA で 65 分間泳動した。泳動後、SDS 抽出緩衝液に浸して 30 分間洗浄し、その後超純水で洗浄した。洗浄後、インキュベーション緩衝液に浸して 24 時間振盪し、その後超純水で洗浄した。洗浄後、CBB で染色した。

(6) in situ ハイブリダイゼーション

プローブ作製に使用する胎盤試料は妊娠 120 日齢の黒毛和種から採取した。胎盤の子宮小丘組織から ISOGEN (ニッポン・ジーン, 富山) を用いて total RNA を抽出し、Super ScriptIII First Strand Synthesis System (Invitrogen, CA, USA) を用いて逆転写した。合成した cDNA をプライマー (表 2) 及び 2x Phusion Master Mix with HF Buffer

(Finnzymes, Vantaa, Finland) と共に PCR で増幅した (表 3)。

PCR 産物に 10×loading buffer (タカラバイオ) を加えて 1.5%アガロースゲル (GE Healthcare) を用いて 100V で 30 分間、電気泳動を行った (図 6)。泳動後のゲルをエチジウムブロマイド溶液に浸漬させ、バンドの検出には High Performance UV Transilluminator, VFM-20 (UVP, CA, USA) を用いた。

泳動したアガロースゲルからメスで目的のバンド部分を切り取った。切り取ったゲルから QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて DNA を精製した。

精製した DNA の 3' 末端に 1 塩基のオーバーハングを付加するため、DNA 抽出液と等量の Ampli Taq Gold (Applied biosystems, CA, USA) を加え、72°C で 20 分間インキュベーションした。インキュベーション後、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて DNA を精製した。

精製された DNA 191.4 ng 及びクローニングベクター (pGEM-T Easy Vector Systems [Promega]) 50 ng を混合し、4°C で 24 時間インキュベートした。

10 ng 相当のライゲーション産物と XL1-Blue Subcloning-Grade Competent Cells (Stratagene) 50 µL を混合し、氷上で 30 分間インキュベートした。その後 42°C で 45 秒間インキュベートし、更に氷上で 2 分間インキュベートした。そこへ SOC 培地 (2% トリプトン, 0.5% 酵母抽出物, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgSO₄, 10 mM MgCl₂, 20 mM グルコース) 500 µL を加えて室温で 2 時間振盪した。その後 LB 寒天培地に 100 mM イソプロピル - β - チオガラクトピラノシド及び 2 mg 5 - ブロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリル - β - D - ガラクトピラノシド及び 5 mg アンピシリンと共に菌液 5 µL, 50 µL または 500 µL を塗布し、37°C で 12 時間インキュベートした。形成されたコロニーを 1 個ずつ採取して、それぞれのコロニーを LB 液体培地 4 mL 中で 37°C で 15 時間振盪した。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを精製した。精製したプラスミド 1.67 µg は制限酵素処理を行い、DNA 断片のサイズによって目的のインサートであることを確認した (図 7)。制限酵素処理は *EcoRI*

(タカラバイオ) を使用し, 緩衝液は製品に付属の H 緩衝液を使用した. 反応液は 37°C で 5 時間反応させた.

精製したプラスミド 2 μg を *NcoI* (タカラバイオ) または *NdeI* (タカラバイオ) で 37°C で 41 時間インキュベートした. 緩衝液は製品に付属のものを使用し, *NcoI* には K 緩衝液及び 0.01% BSA, *NdeI* には H 緩衝液を使用した. その後, QIAquick PCR Purification Kit で精製し, 真空遠心機で約 15 μL まで濃縮した. 濃縮した DNA 溶液を DIG RNA labeling kit (Roche) で DIG ラベリングした. DNA 溶液 13 μL , 10 \times DIG labeling mix (10 mM ATP, CTP, GTP, 6.5 mM UTP, 3.5 mM DIG-11-UTP) 2 μL , 10 \times transcription buffer 2 μL , protector RNase inhibitor 1 μL , RNA polymerase 2 μL を混合し, 37°C で 2 時間インキュベートした. なお, *NcoI* 処理をした DNA 溶液には SP6 RNA ポリメラーゼを, *NdeI* 処理した DNA 溶液には T7 RNA ポリメラーゼをそれぞれ用いた. インキュベート後, DNaseI (RNase free) 2 μL 及び protector RNase inhibitor 1 μL を加え, 37°C で 15 分間インキュベートした. 0.5 M EDTA 1 μL を加え, DEPC 水で 10 倍に希釈した. SP6 RNA ポリメラーゼで合成された RNA をアンチセンス鎖プローブ, T7 RNA ポリメラーゼで合成された RNA をセンス鎖プローブとして *in situ* ハイブリダイゼーションに用いた.

パラフィン包埋切片の作製に使用する胎盤組織は妊娠 210 日齢の黒毛和種から採取した. 胎盤組織を 70% アルコールに 8 時間, 80% アルコールに 13 時間, 90% アルコールに 12 時間, 95% アルコールに 15 時間, 100% アルコールに 6 時間, 100% アルコールに 18 時間, アルコール - キシレン (1 : 1) 溶液に 5 時間, キシレンに 5 時間, キシレンに 11 時間, パラフィン - キシレン (1 : 1) に 1.5 時間を 3 回, パラフィンに 3 回の順に浸漬させて組織を包埋した. パラフィン包埋ブロックからマイクロトーム HM355 (Microm International GmbH, Walldorf, Germany) を使用して厚さ 7 μm の切片を切り出し, *in situ* ハイブリダイゼーションに用いた.

上記の組織切片を 1 枚ずつ乗せたスライドガラスを 17 枚作製し, ベンタナ XT シ

ステムディスクバリアー (Roche) を用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。プローブは MMP-13 mRNA のアンチセンス鎖プローブ及びセンス鎖プローブを用いた。各プローブは 10 ng または 50 ng 添加し、ハイブリダイゼーションは 57°C, 59°C, 61°C または 63°C で 6 時間行った。ハイブリダイゼーション後、対比染色としてヌクレオファストレッドを滴下して 10 分間静置後、水道水で洗浄して観察した。

iii. 結果

初めに胎盤試料の採取と培養上清の回収を行った。妊娠 130 日齢の絨毛叢組織培養上清からは 150.5 mg のタンパク質が得られた。妊娠満期の胎盤組織培養上清からは、それぞれ子宮小丘組織からは 58 mg, 絨毛叢組織からは 19 mg のタンパク質が得られた。

妊娠 130 日齢の絨毛叢組織培養上清について抗 bPL 抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った結果, 33 kDa 及び 31 kDa のメジャーバンドの他に 17-29 kDa の 5 本のバンドが認められた (図 8)。

組換え bPL と妊娠 130 日齢の絨毛叢組織培養上清を共に各緩衝液中でインキュベートしたところ, 組換え bPL が切断されて 17-32 kDa の N 末端側断片が生じることが示された (図 9)。組換え bPL の断片生成は pH 3.4 の実験区で特に顕著であり, pH 5.4 及び pH 7.4 の実験区では比較的少なかった。pH 3.4 の実験区で特に顕著に現れたバンドは 23 kDa 及び 21 kDa であった。

各種代謝酵素による組換え bPL の切断活性を検討するため, 組換え bPL を CTS (CTS-B, CTS-D, CTS-L), ゼラチナーゼ (MMP-2, MMP-9) 及びコラゲナーゼ (MMP-8, MMP-13) で消化した。CTS-B で消化した結果, 組換え bPL は切断されなかった (図 10-A)。CTS-D 及び CTS-L で消化した結果, 組換え bPL は切断されたがバンドは検出されなかった (図 10-B, C)。MMP-2 で消化した結果, 組換え bPL は切断されなかった (図 11-A)。MMP-9 で消化した結果, 組換え bPL は切断されて 25 kDa 付近にバン

ドを検出した (図 11-B). MMP-9 による bPL 切断活性は, MMP 阻害剤である GM6001 の添加によって完全に抑制された. MMP-8 で消化した結果, pH 7.5 の条件で組換え bPL は切断されて 25kDa 付近にバンドを検出した (図 12-A). MMP-13 で消化した結果, pH 7.5 の条件で組換え bPL は切断されて 25 kDa 付近にバンドを検出した (図 12-B). 切断されない bPL の残存量は MMP-13 の方が少なかった.

胎盤組織内のゼラチナーゼ活性及びコラゲナーゼ活性を検討するため, 妊娠満期の胎盤から得た胎盤組織培養上清を試料として, ゼラチンザイモグラフィ及びカゼインザイモグラフィを行った. ゼラチンザイモグラフィでは, 絨毛叢組織のレーンにおいて 72 kDa 及び 92 kDa のバンドが検出された (図 13-A). 子宮小丘組織のレーンにおいては 63 kDa, 67 kDa, 72 kDa 及び 92 kDa バンドが検出された. カゼインザイモグラフィでは絨毛叢組織及び子宮小丘組織のレーンにおいて 52 kDa, 56 kDa, 63 kDa のバンドが確認された (図 13-B).

妊娠 130 日齢の胎盤組織培養上清について抗 MMP-13 抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った結果, 絨毛叢組織培養上清で 65 kDa, 58 kDa 及び 54 kDa のバンドが確認された (図 14).

胎盤組織内における MMP-13 遺伝子の発現を検討するため, *in situ* ハイブリダイゼーションを行った. 始めに *in situ* ハイブリダイゼーションに使用するプローブの作製を行った. 子宮小丘試料から抽出された total RNA は 115 μ g であった. total RNA から逆転写と PCR を行ったプローブ配列 DNA を電気泳動し (図 6), ゲルから精製した. ゲルからは 2.76 μ g のプローブ配列 DNA が精製された. プローブ配列 DNA の両末端に 1 塩基を付加して発現ベクターにライゲーションした後, 大腸菌に導入して大量発現させ, 精製した. 精製した発現ベクターは 26.6 μ g 得られた. 発現ベクターからプローブを発現させたところ, アンチセンス鎖 16.5 μ g, センス鎖 15.6 μ g のプローブが得られた. 妊娠 210 日齢のウシ胎盤から得たパラフィン包埋切片及び MMP-13 mRNA のアンチセンス鎖プローブ及びセンス鎖プローブを用いた *in situ* ハイブリダイ

ゼーションの結果, アンチセンス鎖プローブ 50 ng を用いて 63°C でハイブリダイズさせた実験区において栄養膜細胞に染色が認められたが, 子宮内膜細胞では染色が認められなかった (図 15-A). センス鎖プローブを用いた実験区では染色は認められなかった (図 15-B).

iv. 考察

本実験では, ウシ胎盤組織がもつ bPL 切断活性の検証と代謝酵素による組換え bPL の切断実験を行った.

妊娠中期のウシ胎盤には既報にみられるような 31 kDa 及び 33 kDa の bPL の他に, 17 kDa, 20 kDa, 23 kDa, 26 kDa, 29 kDa の bPL とみられるタンパク質が存在している (図 8). 31 kDa 及び 33 kDa に相当する bPL は, 分子量から完全長の bPL であると考えられる ((Eakle *et al.*, 1982 ; Murthy *et al.*, 1982 ; Arima and Bremel, 1983 ; Shimomura and Bremel, 1989) ; Patel *et al.*, 1996). 17-29 kDa に相当する bPL は選択的スプライシングによるアイソフォームや (Kessler and Schuler, 1991), 糖鎖修飾パターンの違いによる bPL である可能性も考えられる. しかし bPL cDNA から予想される分子量は 23.5 kDa であるため (Schuler *et al.*, 1988), 17 kDa 及び 20 kDa の bPL は完全長 bPL が何らかの原因によって断片化されて生成された可能性が考えられる. また, 構造的・機能的に bPL とよく似た PRL は代謝酵素である CTS-D によって抗血管新生作用をもつ断片を生じることがわかっている (Struman *et al.*, 1999). さらに bPL と同じウシ胎盤性 PRL ファミリータンパク質である bPRP-I は CTS-D や MMPs によって血管内皮細胞増殖活性を示す断片を生成することがわかっている (Ushizawa *et al.*, 2010). このことからウシ胎盤内の 17-29 kDa bPL は, 完全長 bPL が代謝酵素による切断を受けて断片化されたものを含んでいることが予想された.

組換え bPL を胎盤組織培養上清と共にインキュベートすると, pH 3.4 の条件で 17-32 kDa の N 末端側 bPL 断片が生成されることがわかった (図 9). ウシ胎盤では CTS 活

性が検出されることから (Canderle *et al.*, 1991), 胎盤組織に存在する酸性条件で効率的に作用する CTS 等のアスパラギン酸プロテアーゼが組換え bPL を切断している可能性が示唆された. 21 kDa 及び 23 kDa の組換え bPL 断片が多く検出されたことは, これらの断片が天然型 bPL と同じ部分が切断されて生成されている可能性が考えられる.

次いで組換え bPL を CTSs や MMPs で消化したところ, 予想に反して組換え bPL は中性 pH 付近ではたらく MMPs によって断片化された. この結果はウシ胎盤性 PRL ファミリーの bPRP-I が CTS-D, CTS-B 以外にも MMP-3, MMP-8, MMP-13 によって N 末端側断片が生じること (Ushizawa *et al.*, 2010) とよく似ている. 組換え bPL が pH 3.4 で胎盤培養上清によって断片化され, CTS-B, CTS-D 及び CTS-L で切断されなかったことは (図 9), 胎盤培養上清中には今回実験に供した CTS 以外の CTS 類が含まれており, この酵素によって組換え bPL が断片化された可能性が考えられる.

ゼラチンザイモグラフィでは 63 kDa, 67 kDa, 72 kDa 及び 92 kDa のバンドが確認されたが (図 13-A), MMP-2 の分子量は 72 kDa (潜在型) 及び 66 kDa (活性型), MMP-9 の分子量は 92 kDa (潜在型), 83 kDa (活性型) であるため (Kubota *et al.*, 1998), これらのバンドは MMP-2 及び MMP-9 に相当すると考えられ, 胎盤ではこれらの酵素が発現していると考えられる. MMP-8 及び MMP-13 はコラゲナーゼ活性をもつ酵素であるため, カゼインザイモグラフィで検出される (Snoek-van Beurden and Von den Hoff, 2005). カゼインザイモグラフィでは 52 kDa, 56 kDa 及び 63 kDa のバンドが確認された (図 13-B). 胎盤組織培養上清と市販の MMP-13 を抗ヒト MMP-13 抗体でウェスタンブロッティングしたところ, 絨毛叢組織では 54 kDa, 58 kDa 及び 65 kDa のバンドが検出された (図 14). MMP-8 の分子量は 85 kDa (潜在型) 及び 65 kDa (活性型) (Woessner, 1991), MMP-13 の分子量は 65 kDa (潜在型) 及び 55 kDa (活性型) (Chapman *et al.*, 2003 ; Kennedy *et al.*, 2005) であることから, カゼインザイモグラフィで検出されたバンドは MMP-8 または MMP-13 であると考えられる. すな

わち胎盤組織では *MMP-13* が発現していることが示唆された。一方で市販の *MMP-13* の分子量が天然型ウシ *MMP-13* と異なっているのは、市販の *MMP-13* はヒト由来の組換えタンパク質であることに由来しているのかもしれない。

胎盤組織で発現する *MMP-13* の発現を *in situ* ハイブリダイゼーションで確認したところ、主に栄養膜細胞で発現していることが示された（図 15-A）栄養膜は胎児側の胎盤組織である。bPL は栄養膜細胞のうち核内倍加で生じた二核細胞にのみ発現することから（Wimsatt, 1951 ; Björkman, 1968 ; Wooding and Wathes, 1980 ; Wooding 1982), bPL と *MMP-13* の両タンパク質は胎盤の同じ組織から分泌されることが示された。すなわち少なくとも妊娠中期においては二核細胞から分泌された bPL は、その場で *MMP-13* による作用を受けて断片化される可能性がある。

V. bPL 断片の生物活性

i. 序論

前章までの実験から組換え bPL は CTS や MMPs 等の酵素によって切断されて N 末端側の断片を生じること, 及び胎盤組織では MMP-13 が発現していることが示唆された。

bPL は PRL と同等のラクトジェニック活性をもつ糖タンパク質であるが (Schellenberg and Friesen, 1982), ウシ生体内における生理的な役割は分かっていない。しかし血管新生作用をもつ 23 kDa の PRL は, 酵素的に切断されて N 末端側 16 kDa の断片を生じ, これが完全長 PRL とは逆に抗血管新生作用を示すことが報告されている (Struman *et al.*, 1999)。このことから構造的・機能的に PRL と似ている bPL は, 酵素的に切断されて生じた N 末端側断片がラクトジェニック活性とは異なる生物活性をもつようになる可能性が考えられた。

本実験では前回の実験で切断活性が特に顕著であった MMP-13 によって断片化された組換え bPL を用いて, 組換え bPL 断片が各種細胞の増殖能力に及ぼす影響を評価した。実験には PRL 依存的に増殖するラットリンパ腫由来細胞株である Nb2 細胞とウシ大脳毛細血管内皮細胞である BBMC の細胞培養系を用いた。

ii. 材料と方法

(1) 組換え bPL の MMP-13 処理

Nb2 細胞バイオアッセイに用いた組換え bPL 断片は, 組換え bPL 1.693 μg 及び MMP-13 1.67 μg を TCNB 緩衝液 pH 7.5 (全容積 200 μL) 中で 238 時間インキュベートして調製した。

BBMC バイオアッセイに用いた組換え bPL 断片は, MMP-13 1.547 μg を TCNB 緩衝液 pH 7.5 (全容積 199 μL) 中で 1 mM APMA と共に 37°C で 2 時間インキュベートし,

その後組換え bPL 1.693 μg を加えて 72 時間インキュベートすることで調製した.

(2) 組換え bPL 断片の精製

Nb2 細胞バイオアッセイに用いた組換え bPL 断片は以下の手法で精製した. MMP-13 処理した組換え bPL 溶液 182 μL に 10 \times 結合緩衝液 (1 M リン酸緩衝液 [pH 8.0], 1 M NaCl, 0.1 M イミダゾール, pH 7.9) 18.2 μL を混合した. エコノカラム内で 1 \times 結合緩衝液で洗浄したゲル担体 (Ni Sepharose 6 Fast Flow) 200 μL を組換え bPL - 10 \times 結合緩衝液混合液に加え, 4 $^{\circ}\text{C}$ で 29 時間インキュベートした. ゲルスラリーをエコノカラムに入れ, 1 \times 結合緩衝液で洗浄後, 溶出緩衝液 (0.1 M リン酸緩衝液 [pH 8.0], 0.1 M NaCl, 0.5 M イミダゾール, pH 7.5) 25 mL で 10 回に分けて溶出した. 溶出液に BSA 1 mg を加えた. エコノカラム内でトリス緩衝生理食塩水で洗浄した Sephadex G-25 Medium (GE healthcare) 10 mL に溶出液を加え, 緩衝液交換を行った. 緩衝液交換後, Amicon Ultra-15 遠心式フィルターユニット (Ultracel-10 メンブレン装着) (Millipore, カットオフ 10 kDa) で濃縮した. 濃縮後, 組換え bPL の段階希釈液をスタンダードとしてタンパク質量を測定した.

BBMC バイオアッセイに用いた組換え bPL 断片は以下の手法で精製した. MMP-13 処理した組換え bPL 溶液 190 μL を anti-FLAG M2 Affinity Gel 2 μL と混合し, 4 $^{\circ}\text{C}$ で 24 時間インキュベートした. ゲルスラリーをエコノカラムに入れ, 1 \times TBS で洗浄後, 溶出緩衝液 (FLAG Peptide, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 1.8 mL を 9 回に分けて溶出した.

(3) 細胞の培養

細胞株は Nb2 細胞及び BBMC (正常ウシ脳血管内皮細胞) (DS ファーマバイオメディカル, 大阪) を使用した. Nb2 細胞は Nb2 用増殖培地 (DMEM / F12, 10% ウシ胎仔血清, 1% Penicillin-Streptomycin) 及び T-75 フラスコを用いて 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% 炭酸ガス培養器内で培養した. BBMC は BBMC 用増殖培地 (RPMI1640 [Invitrogen], 10% ウシ胎仔血清, 1% Penicillin-Streptomycin) 及び I 型コラーゲンでコラーゲンコートした

T-25 フラスコ（培養面積 25 cm², BD Falcon）を用いて 37°C, 5%炭酸ガス培養器内で培養した。

(4) Nb2 細胞バイオアッセイ

フラスコの側面を叩いて細胞を剥離させ、Nb2 細胞を Nb2 アッセイ培地（DMEM / F12, 10%ウマ血清, 0.1 mM 2 -メルカプトエタノール, 1%ペニシリン - ストレプトマイシン）に懸濁し, そのうち細胞 1.5×10^7 個を Nb2 アッセイ培地で 28 時間培養した。

培養後, 24 ウェルマイクロプレートに細胞 2.0×10^5 個と被験物質を添加して 37°C で 71 時間培養した。被験物質は oPRL-19, 組換え bPL または組換え bPL 断片を各ウェル 10 ng/mL, 1 ng/mL, 100 pg/mL, 10 pg/mL, 1 pg/mL となるように添加した。培養後, TC10 セルカウンターで細胞数を測定した。

(5) BBMC バイオアッセイ

BBMC を PBS(-)で洗浄後, BBMC アッセイ培地（RPMI1640, 10%, 1%ペニシリン - ストレプトマイシン）に懸濁し, I 型コラーゲンで一晩コラーゲンコートした 96 ウェルマイクロプレートに細胞 3,000 個と被験物質を添加して 37°C で 69 時間培養した。被験物質は組換え bPL または組換え bPL 断片を各ウェル 100 ng/mL, 10 ng/mL, 1 ng/mL となるように添加した。培養後, Cell proliferation ELISA, BrdU(chemiluminescent) (Roche) を用いて BBMC の増殖活性を測定した。

(6) 統計処理

バイオアッセイにおける細胞増殖の有意差を t 検定で検定した。

iii. 結果

初めに本実験で使用する組換え bPL 断片の精製を行った。組換え bPL を MMP-13

で処理した結果，図 16 のような組換え bPL 断片が生成された．Nb2 細胞バイオアッセイに用いる組換え bPL 断片は 61 ng，BBMC バイオアッセイに用いる組換え bPL 断片は 780 ng 回収された．精製後に残存している完全長 bPL は BBMC バイオアッセイに用いる組換え bPL 断片溶液のほうが多かった（図 16-B）．

Nb2 細胞バイオアッセイの結果，組換え bPL は陽性対照として用いたヒツジ PRL と同等のラクトジェニック活性が認められた．一方で，MMP-13 で切断された組換え bPL 断片は Nb2 細胞を増殖させる活性が著しく低下していた（図 17）．組換え bPL 断片を 10 ng/mL 添加した実験区の細胞増殖促進効果は，ヒツジ PRL や完全長組換え bPL の 100 pg/mL 添加区にほぼ等しかった．

BBMC バイオアッセイの結果，組換え bPL 断片 100 ng/mL 添加区で 1% 有意水準の t 検定で有意差が認められた（図 18）．組換え bPL 断片 1 ng/mL 添加区及び 10 ng/mL 添加区では有意差が認められなかった．完全長組換え bPL 添加区ではいずれも血管内皮細胞増殖活性に対する影響は認められなかった．

iv. 考察

本実験では組換え bPL 断片の生物活性を評価するため，Nb2 細胞及び BBMC を用いたバイオアッセイを行った．

組換え bPL 断片は完全長 bPL と比べて Nb2 細胞増殖活性が著しく低下したことから，ラクトジェニック活性を喪失していることが示された（図 17）．組換え bPL 断片を 10 ng/mL 添加した実験区の細胞増殖促進効果は，完全長 bPL を 100 pg/mL 添加した実験区にほぼ等しかったことから，bPL 断片のラクトジェニック活性は切断前の約 1/100 に低下していることが示唆される．組換え bPL 断片の添加量を多くした場合に細胞数の増加がみられたのは，添加した組換え bPL 断片溶液の中の未切断の組換え bPL が影響している可能性が考えられる（図 16-A）．

一方 BBMC を用いたバイオアッセイでは，組換え bPL 断片を 100 ng/mL 添加した

実験区で BBMC の増殖速度が有意に増加した (図 18). このことから組換え bPL N 末端側断片は血管内皮細胞の増殖を促進し, 血管新生作用を示す可能性が示唆された. 一方で組換え bPL 断片 1 ng/mL 及び 10 ng/mL 添加区では増殖活性の有意の増加がみられなかった. このことから組換え bPL 断片は低濃度では増殖活性へ影響を及ぼさないと考えられるが, BBMC バイオアッセイに用いた組換え bPL 断片溶液には未切断の組換え bPL が比較的多く含まれていたことから (図 16-B), 全体の組換え bPL 断片の割合が少なかったため増殖活性が少なかった可能性も考えられる. 未切断の組換え bPL が完全に除去された場合, 1 ng/mL 及び 10 ng/mL 添加実験区でも増殖速度が有意に増加する可能性がある.

組換え bPL はラクトジェニック活性をもつタンパク質であるが (Schellenberg and Friesen, 1982), 酵素切断によって断片化された場合, ラクトジェニック活性に代わり血管内皮細胞増殖活性を有する可能性が示された. このことは, bPL は栄養膜二核細胞から分泌されたときにはラクトジェニック活性をもつがその時点では生理的な役割をもたず, 同じく栄養膜から分泌される MMP-13 によって断片化されて初めて血管内皮細胞増殖等の生理的な活性をもつようになるメカニズムが考えられる. 本研究の BBMC バイオアッセイの結果より, 完全長の bPL は BBMC の増殖に影響を与えなかったことから, bPRP-I (Ushizawa *et al.*, 2010) と同様に N 末端側断片のみが血管内皮細胞増殖活性を有していることが示された.

VI. 総合考察

本研究では bPL の生理的役割を解明する端緒として、*in vitro* における bPL の新しい生物活性の探索を行った。

本研究で用いた bPL は bPL cDNA の N 末端側にタグを付加した組換えタンパク質として作製した。この組換え bPL は糖鎖修飾パターンが天然型 bPL とは異なっていると考えられるが (Eakle *et al.*, 1982 ; Murthy *et al.*, 1982 ; Arima and Bremel, 1983 ; Shimomura and Bremel, 1989, 図 4), 天然型 bPL と同程度のラクトジェニック活性をもつことから (Schellenberg and Friesen, 1982), 天然型 bPL の代替として実験に供することが可能であると考えられた。

実験から、本研究では bPL の新しい生物活性の可能性が示唆された。bPL は胎仔由来胎盤組織の栄養膜二核細胞から分泌されるが、MMP-13 も同じく栄養膜細胞で発現している可能性が示された。すなわち二核細胞から分泌された bPL は MMP-13 によって切断を受け、断片を生じると考えられる。bPL 断片の血中濃度は完全長 bPL に比べて著しく低いものと推定されることから (Andries *et al.*, 1992), 生じた bPL 断片はパラクライン的に作用し胎盤に局所的に作用するものと考えられる (図 20)。胎盤組織の形成は組織の破壊と形成が同調して行われることから、MMP-13 によって破壊された組織を再構築する際、bPL 断片が血管内皮細胞分裂作用により血管新生を促して組織構築を促進しているのかもしれない。すなわち bPL の N 末端側断片はウシ胎盤における血管ネットワーク形成の調節因子のひとつとして機能していることが推察される。bPL は胎仔側胎盤の二核細胞からのみ分泌され、形成メカニズムは分かっていないが二核細胞は栄養膜にのみ存在する (Wooding and Wathes, 1980)。bPL が分泌細胞の近傍で N 末端断片を生じ、血管新生を通じて胎盤形成に促進的に作用することが、ウシ胎盤の胎盤がスポット状に多数形成されることと関連があるのかもしれない。

一方で bPL と bPRL は、全長のアミノ酸配列で 50% (Byatt *et al.*, 1992), CTS-D によって切断されて生じる PRL N 末端側断片とそれに相当する bPL の N 末端側配列とで 48% の相同性を持ち、どちらもラクトジェニック活性をもつが、ヒトやラットの PRL N 末端側断片は bPL 断片とは逆に抗血管新生作用を示す (Struman *et al.*, 1999). この乖離のメカニズムは現時点では明らかになっていない。しかし bPRP-I は機能不明のウシ胎盤性 PRL ファミリータンパク質であるが、CTS や MMPs で生成された N 末端側断片は bPL 断片と同様に血管新生作用をもつようになる (Ushizawa *et al.*, 2010). このことは断片化された PRL パラログタンパク質の生物活性は、PRL 様生物活性の有無とは独立していることを示しているのかもしれない。

マウスのプロリフェリン (PLF) は、胎盤以外で作用を示す胎盤性 PRL ファミリーとして初めて発見されたタンパク質であるが、この PLF は BBMC 増殖活性をもつ (Jackson *et al.*, 1994). 一方で同じ胎盤性 PRL ファミリーである PLF 関連タンパク質 (PLF-RP) は抗血管新生作用をもつ (Jackson *et al.*, 1994). つまりウシにおける bPL と PRL の場合も両者が異なる作用を示すことも考えられる。

本研究の成績から、bPL はノンクラシカルメンバーの他の胎盤性 PRL ファミリータンパク質と同様に、ラクトジェニック活性以外の作用をもつ分子として進化し、妊娠維持や胎仔の発育に重要な役割を果たしていることが推察された。分泌直後の bPL はラクトジェニック活性をもっているが、その活性は分子進化の過程で未だ喪失していない生物活性であり、bPL は切断されて断片化されることで成熟タンパク質として機能するように進化してきた可能性がある。ウシ胎盤性 PRL ファミリーには多くの機能不明のタンパク質が含まれているが (Schuler and Hurley, 1987; Kessler *et al.*, 1989; Yamakawa *et al.*, 1990; Tanaka *et al.*, 1991; Schuler *et al.*, 1991; Ushizawa *et al.*, 2005), これらタンパク質も分泌後に切断等の修飾を受けることで成熟タンパク質として機能していることが推察された。

VII. 謝辞

本研究を進めるにあたり、熱心な御指導と御高配を賜りました東京大学大学院新領域創成科学研究科応用生物資源学分野准教授 兼 農業生物資源研究所動物科学研究領域動物生産生理機能研究ユニット上級研究員である高橋透博士に厚く御礼申し上げます。

研究や発表に際し、懇切丁寧に御指導を頂いた農業生物資源研究所職員の作本亮介様並びに林憲悟様、細江実佐様に御礼申し上げます。至らぬ点が多々ある中で皆様から多くの時間を割いて頂き、丁寧な御指導、御鞭撻を頂いたことを心から感謝致します。

日々の実験等において相談に乗って頂いた農業生物資源研究所の秋山美佐子様に深く感謝の意を表します。

最後に研究生生活を支援し続けて頂いた家族、共に研究に勤しみ、励ましの言葉を掛けて下さいました新領域創成科学研究科の先輩、同輩の皆様にも心より御礼申し上げます。

VIII. 参考文献

- Andries M, Tilemans D, Deneef C. 1992. Isolation of cleaved prolactin variants that stimulate DNA synthesis in specific cell types in rat pituitary cell aggregates in culture. *Biochemical Journal* 281, 393-400.
- Arima Y, Bremel RD. 1983. Purification and characterization of bovine placental lactogen. *Endocrinology* 113, 2186-2194.
- Baldocchi RA, Tan L, King DS, Nicoll CS. 1993. Mass spectrometric analysis of the fragments produced by cleavage and reduction of rat prolactin: evidence that the cleaving enzyme is cathepsin D. *Endocrinology* 133, 935-938.
- Björkman NH. 1968. Fine structure of cryptal and trophoblastic giant cells in the bovine placentome. *Journal of Ultrastructure Research* 24, 249-258.
- Buttle HL, Forsyth IA. 1976. Placental lactogen in the cow. *Journal of Endocrinology* 68, 141-146.
- Byatt JC, Staten NR, Schmuke JJ, Buonomo FC, Galosy SS, Curran DF, Krivi GG, Collier RJ. 1991. Stimulation of body weight gain of the mature fetal rat by bovine GH and bovine placental lactogen. *Journal of Endocrinology* 130, 11-19.
- Byatt JC, Warren WC, Eppard PJ, Staten NR, Krivi GG, Collier RJ. 1992. Ruminant placental lactogens: structure and biology. *Journal of Animal Science* 70, 2911-2923.
- Byatt JC, Welply JK, Leimgruber RM, Collier RJ. 1990. Characterization of glycosylated bovine placental lactogen and the effect of enzymatic deglycosylation on receptor binding and biological activity. *Endocrinology* 127, 1041-1049.
- Canderle J, Kummer V, Zralý Z. 1991. Enzymatic activity in the placenta in cows in relation to the course of parturition. *Veterinarni Medicina* 36, 21-28.
- Chapman RE, Scott AA, Deschamps AM, Lowry AS, Stroud RE, Ikonomidis JS, Spinale

- FG. 2003. Matrix metalloproteinase abundance in human myocardial fibroblasts: effects of sustained pharmacologic metalloproteinase inhibition.
- Colosi P, Ogren L, Thordarson G, Ralamantes F. 1987. Purification and partial characterization of two prolactin-like glycoprotein hormone complexes from the midpregnant mouse conceptus. *Endocrinology* 120, 2500-2511.
- Colosi P, Swiergiel JJ, Wider EL, Oviedo A, Linzer DIH. 1988. Characterization of proliferin-related protein. *Molecular Endocrinology* 2, 579-586.
- Colosi P, Talamantes F, Linzer DI. 1987. Molecular cloning and expression of mouse placental lactogen I complementary deoxyribonucleic acid. *Molecular Endocrinology* 1, 767-776.
- Deb S, Faria TN, Roby KF, Larsen D, Kwok SC, Talamantes F, Soares MJ. 1991. Identification and characterization of a new member of the prolactin family, placental lactogen-I variant. *J Biol Chem* 266, 1605-1610.
- Deb S, Roby KF, Faria TN, Larsen D, Soares MJ. 1991. Identification and immunochemical characterization of a major placental secretory protein related to the prolactin-growth hormone family, prolactin-like protein-C. *Endocrinology* 128, 3066-3072.
- Deb S, Roby KF, Faria TN, Szpirer C, Levan G, Kwok SCM, Soares MJ. 1991. Molecular cloning and characterization of prolactin-like protein C complementary deoxyribonucleic acid. *J Biol Chem* 266, 23027-23032.
- Duckworth ML, Kirk KL, Friesen HG. 1986. Isolation and identification of a cDNA clone of rat placental lactogen II. *J Biol Chem* 261, 10871-10878
- Duckworth ML, Peden LM, Friesen HG. 1986. Isolation of a novel prolactin-like cDNA clone from developing rat placenta. *J Biol Chem* 261, 10879-10884.
- Duckworth ML, Peden LM, Friesen HG. 1988. A third prolactin-like protein expression by the developing placenta: complementary deoxyribonucleic acid sequence and partial

- structure of the gene. *Molecular Endocrinology* 2, 912-920.
- Eakle KA, Arima Y, Swanson P, Grimek H, Bremel RD. 1982. A 32 000-molecular weight protein from bovine placenta with placental lactogen-like activity in radioreceptor assays. *Endocrinology* 110, 1758-1765.
- Fernández-Resa P, Mira E, Quesada AR. 1995. Enhanced detection of casein zymography of matrix metalloproteinases. *Analytical Biochemistry* 224, 434-435.
- Forsyth IA. 1986. Variation among species in the endocrine control of mammary growth and function: the roles of prolactin, growth hormone, and placental lactogen. *Journal of Dairy Science* 69, 886-903.
- Freemark M, Comer M, Korner G, Handwerger S. 1987. A unique placental lactogen receptor: implications for fetal growth. *Endocrinology* 120, 1865-1872.
- Friesin H. 1965. Purification of a placental factor with immunological and chemical similarity to human growth hormone¹. *Endocrinology* 76, 369.
- García-Ispuerto I, Noqareda C, Yániz JL, Almería S, Martínez-Bello D, de Sousa NM, Beckers JF, López-Gatius F. 2010. *Neospora caninum* and *coxiella burnetii* seropositivity are related to endocrine pattern changes during gestation in lactating dairy cows. *Theriogenology* 74, 212-220.
- Goffin V, Shiverick KT, Kelly PA, Martial JA. 1996. Sequence-function relationships within the expanding family of prolactin, growth hormone, placental lactogen and related proteins in mammals. *Endocrine Reviews* 17 (4) , 385-410.
- Grattan DR, Averill RL. 1990. Effect of ovarian steroids on a nocturnal surge of prolactin secretion that precedes parturition in the rat. *Endocrinology* 126, 1199-1205.
- Helman D, Staten NR, Grosclaude J, Daniel N, Nespoulous C, Djiane J, Gertler A. 1998. Novel recombinant analogues of bovine placental lactogen. G133K and G133R provide a tool to understand the difference between the action of prolactin and growth hormone receptors. *Journal of Biological Chemistry* 273, 16067-16074.
- Hilfiker-Kleiner D, Kaminski K, Podewski E, Bonda T, Schaefer A, Skiwa K, Quint A,

- Landmesser U, Doerries C, Luchtefeld M, Poli V, Schneide MD, Balligand JL, Desjardins F, Ansari A, Struman I, Nguyen NQ, Zschemisch NH, Klein G, Heusch G, Schulz R, Hilfiker A, Drexler H. 2007. A cathepsin D-cleaved 16 kDa form of prolactin mediates postpartum cardiomyopathy. *Cell* 128, 589-600.
- Jackson D, Volpert OV, Bouck N, Linzer DI. 1994. Stimulation and inhibition of angiogenesis by placental proliferin and proliferin-related protein. *Science* 266, 1581-1584.
- Josimovich JB, MacLaren JA. 1962. Presence in the human placenta and term serum of a highly lactogenic substance immunologically related to pituitary growth hormone. *Endocrinology* 71, 209-220.
- Kennedy AM, Inada M, Krane SM, Christie PT, Harding B, López-Otín C, Sánchez LM, Pannett AA, Dearlove A, Hartley C, Byrne MH, Reed AA, Nesbit MA, Whyte MP, Thakker RV. 2005. MMP13 mutation spondyloepimetaphyseal dysplasia, Missouri type (SEMD(MO)). *J Clin Invest* 115, 2832-2842.
- Kessler MA, Milosavljevic M, Zieler CG, Schuler LA. 1989. A subfamily of bovine prolactin-related transcripts distinct from placental lactogen in the fetal placenta. *Biochemistry* 28, 5154-5161.
- Kessler MA, Schuler LA. 1991. Structure of the bovine placental lactogen gene and alternative splicing of transcripts. *DNA and Cell Biology* 10, 93-104.
- Kohmoto K, Bern HA. 1970. Demonstration of mammatropic activity of the mouse placenta in organ culture and by transplantation. *Journal of Endocrinology* 48, 99-107.
- Kubota T, Kubota E, Matsumoto A, Saito H, Mikuni-Takagaki Y, Sato S. 1998. Identification of matrix metalloproteinases (MMPs) in synovial fluid from patients with temporomandibular disorder. *European Journal of Oral* 106, 992-998.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

- Linzer DIH, Lee SJ, Ogren L, Talamantes F, Nathans D. 1985. Identification of proliferin mRNA and protein in mouse placenta. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 4356-4359.
- Linzer DIH, Nathans D. 1985. A new member of the prolactin-growth hormone gene family expressed in mouse placenta. *EMBO J* 4, 1419-1423.
- Miller WL, Eberhardt NL. 1983. Structure and evolution of the growth hormone gene family. *Endocrine Reviews* 4, 97-130.
- Morikawa H, Mochizuki M, Tojo S. 1971. Purification of human placental lactogen and its clinical application by single radial immunodiffusion. *Endocrinol Jan* 18, 417-426.
- Murthy GS, Schellenberg C, Friesen HG. 1982. Purification and characterization of bovine placental lactogen. *Endocrinology* 111, 2117-2124.
- Nakano H, Takahashi T, Imai K, Hashizume K. 2001. Expression of placental lactogen and cytokeratin in bovine placental binucleate cells in culture. *Cell and Tissue Research* 303, 263-270.
- Patel OV, Hirako M, Takahashi T, Sasaki N, Domeki I. 1996. Plasma bovine placental lactogen concentration throughout pregnancy in the cow ; relationship to stage of pregnancy, fetal mass, number and postpartum milk yield. *Domestic Animal Endocrinology* 13, 351-359.
- Patel OV, Takahashi T, Imai K, Hashizume K. 2004. Characterization of native and recombinant bovine pregnancy-associated glycoproteins. *Research in Veterinary Science* 77, 203-210.
- Prior RL, Laster DB. 1979. Development of the bovine fetus. *Journal of Animal Science* 48, 1546-1553.
- Riggi SJ, Boshart CR, Bell PH, Ringler I. 1966. Some effects of purified placental protein (human) on lipid and carbohydrate metabolism. *Endocrinology* 79, 709.
- Schellenberg C, Friesen HG. 1982. The bioassay of bovine placental lactogen. *Endocrinology*

111, 2125-2128.

- Schuler LA, Hurley WL. 1987. Molecular cloning of a prolactin-related mRNA expressed in bovine placenta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 5650-5654.
- Schuler LA, Kessler MA, Tanaka M, Nakashima K. 1991. Nomenclature clarification for the bovine placental prolactin-related hormones. *Endocrinology* 126, 2057.
- Schuler LA, Shimomura K, Kessler MA, Zieler CG, Bremel RD. 1988. Bovine placental lactogen: molecular cloning and protein structure. *Biochemistry* 27, 8443-8448.
- Shimomura K, Bremel RD. 1989. Characterization of bovine placental lactogen as a glycoprotein with N-linked and O-linked carbohydrate side chains. *Molecular Endocrinology* 2, 853-856.
- Snoek-van Beurden PA, Von den Hoff JW. 2005. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Bio Techniques* 38, 73-83.
- Soares MJ, Konno T, Alam SM. 2007. The prolactin family: effectors of pregnancy-dependent adaptations. *Trends in Endocrinology Metabolism* 18, 114-121.
- Soares MJ, Muller H, Orwig KE, Peters TJ, Dai G. 1998. The uteroplacental prolactin family and pregnancy. *Biology of Reproduction* 58, 273-284.
- Struman I, Bentzien F, Lee H, Mainfroid V, D'Angelo G, Goffin V, Weiner RI, Martial JA. 1999. Opposing actions of intact and N-terminal fragments of the human prolactin/growth hormone family members on angiogenesis: an efficient mechanism for the regulation of angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 1246-1251.
- Takahashi T. 2006. Biology of the prolactin family in bovine placenta. I. Bovine placental lactogen: Expression, structure and proposed roles. *Animal Science Journal* 77, 10-17.
- Takahashi T, Yamada O, Soares M, Hashizume K. 2008. Bovine prolactin-related protein-I

- is anchored to the extracellular matrix through interactions with type IV collagen. *Journal of Endocrinology* 196, 225-234.
- Tanaka M, Minoura H, Ushiro H, Nakashima K. 1991. A novel cDNA clone encoding a prolactin-like protein that lacks the two C-terminal cysteine residues isolated from bovine placenta. *Biochim Biophys Acta* 1088, 385-389.
- Tanaka T, Shiu RP, Gout PW, Beer CT, Noble RL, Friesen HG. 1980. A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormones: measurement of prolactin and growth hormone in human serum. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 51, 1058-1063.
- Tomogane H, Arboqast LA, Soares ML, Robertson MC, Voogt JL. 1993. A factor(s) from a rat trophoblast cell line inhibits vivo. *Biology of Reproduction* 48, 325-332.
- Tomogane H, Mistry AM, Voogt JL. 1992. Late pregnancy and rat choriocarcinoma cells inhibit nocturnal prolactin surges and serotonin-induced prolactin release. *Endocrinology* 130, 23-28.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76, 4350-4354.
- Ushizawa K, Kaneyama K, Takahashi T, Tokunaga T, Tsunoda Y, Hashizume K. 2005. Cloning and expression of a new member of prolactin-related protein in bovine placenta: bovine prolactin-related protein-VII. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 326, 435-441.
- Ushizawa K, Takahashi T, Hosoe M, Kizaki K, Abe Y, Sasada H, Sato E, Hashizume K. 2007. Gene expression profile of novel caprine placental prolactin-related proteins similar to bovine placental prolactin-related proteins. *BioMed Central* 7, 16.
- Ushizawa K, Takahashi T, Hosoe M, Kizaki K, Hashizume K. 2010. Cleaved bovine

- prolactin-related protein-I stimulates vascular endothelial cell proliferation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 323, 277-281.
- Wallis M. 1992. The expanding growth hormone / prolactin family. *Journal of Molecular Endocrinology* 9, 185-188.
- Wimsatt WA. 1951. Observation on the morphogenesis, cytochemistry, and significance of the binucleate giant cells of the placenta of ruminants. *American Journal of Anatomy* 89, 233-281.
- Woessner JF Jr. 1991. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *The FASEB Journal* 5, 2145-2154.
- Wooding FB. 1982. The role of the binucleate cell in ruminant placental structure . *Journal of Reproduction and Fertility* 31, 31-39.
- Wooding FB, Wathes DC. 1980. Binucleate cell migration in the bovine placentome. *J Reprod Fertil* 59, 425-430.
- Yamada O, Todoroki J, Kizaki K, Takahashi T, Imai K, Patel OV, Schuler LA, Hashizume K. 2002. Expression of prolactin-related protein I at the fetomaternal interface during the implantation period in cow. *Reproduction* 124, 427-437.
- Yamakawa M, Tanaka M, Koyama M, Kagesato Y, Watahiki M, Yamamoto M, Nakashima K. 1990. Expression of new members of the prolactin growth hormone gene family in bovine placenta. Isolation and characterization of two prolactin-like cDNA clones. *J Biol Chem* 265, 8915-8920.

IX. 図表

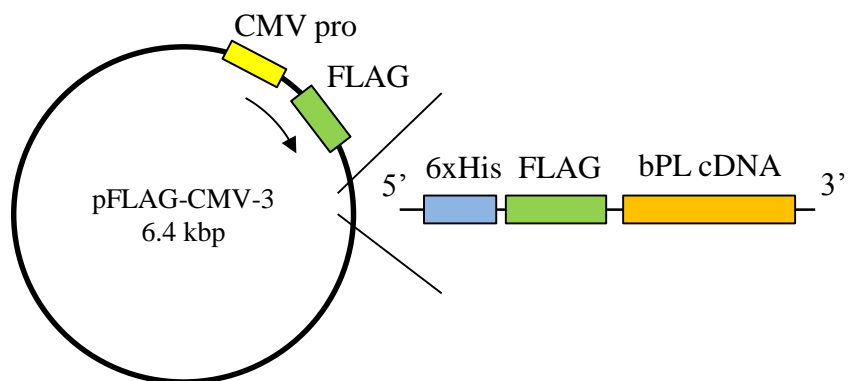


図 1. 組換え bPL 発現ベクターの作製

pFLAG-CMV-3 ベクターに 6 個の His タグ及び 1 個の FLAG タグを組み込み、更にタグ配列の 3' 末端に bPL cDNA を組み込んだ。

配列 (5'-3')	
Forward	TCGACTA <u>AAGCTT</u> GC GGAGGATTATGCACCATACTGTAA
Reverse	GCTGATG <u>GATCCT</u> AATTGTGGGCTTAGCATGGGGTGAA

表 1. bPL プライマー

bPL の成熟タンパク質領域をコードする配列を増幅するプライマーを用いた。下線は *Hind* III 認識配列、点線は *Bam*HI 認識配列を表す。

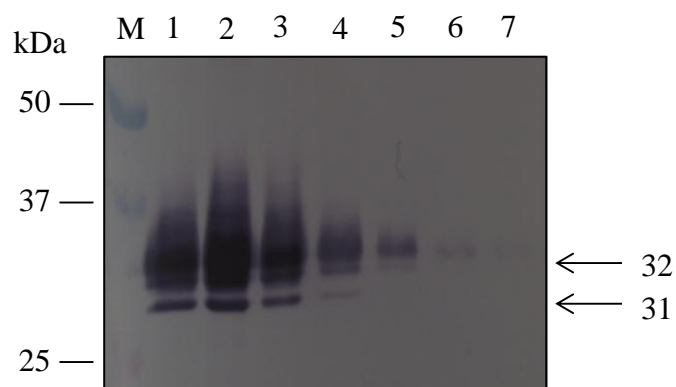


図2. 抗 FLAG 抗体を用いたウェスタンブロッティングによる組換え bPL の検出

His タグについて Ni Sepharose 6 Fast Flow で精製した組換え bPL を SDS-PAGE し, 抗 FLAG 抗体によるウェスタンブロッティングで解析した. 矢印は各バンドの位置と分子量を示す. 各レーン上部の番号は, M : precision plus dual standard (Bio-Rad), 1~7 : 溶出番号を表す.

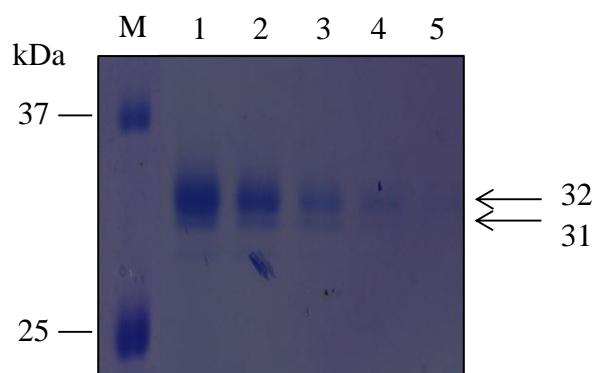


図3. CBB 染色による組換え bPL の検出

FLAG タグについて anti-FLAG M2 Affinity Gel で精製した組換え bPL を SDS-PAGE で解析した. 矢印は各バンドの位置と分子量を示す. 各レーン上部の番号は, M : precision plus dual standard, 1~5 : 溶出番号を表す.

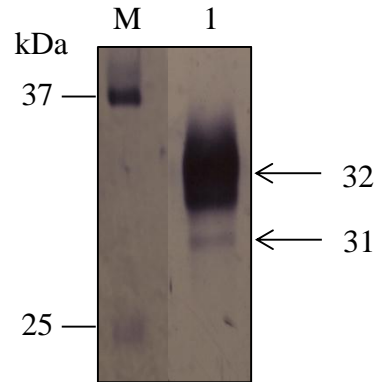


図4. 抗 bPL 抗体を用いたウェスタンブロッティングによる組換え bPL の検出
 精製した組換え bPL を SDS-PAGE し、抗 bPL 抗体によるウェスタンブロッティング
 で解析した. 矢印はバンドの位置と分子量を示す. 各レーン上部の番号は, M: precision
 plus dual standard, 1: 精製した組換え bPL を表す.

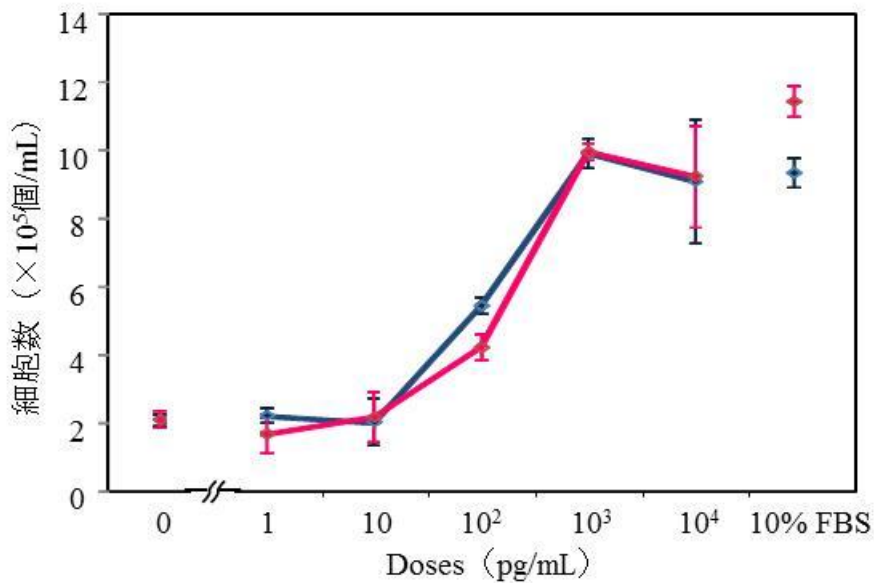


図5. Nb2 細胞を用いた組換え bPL のバイオアッセイ
 Nb2 細胞を用いて組換え bPL の PRL 様生物活性を検証した. 赤線は組換え bPL, 青
 線は oPRL-19 を表す. oPRL-19 は陽性対象として用いた.

配列 (5'-3')	
Forward	TGTTGCTGCCCATGAGTTTG
Reverse	TCTGCTTCAACCTGCTGAGGA

表 2. ウシ MMP-13 プライマー

ウシ MMP-13 領域をコードする配列を増幅するプライマーを用いた.

98°C	30 秒	1 サイクル
98°C	10 秒	
60°C	30 秒	35 サイクル
72°C	5 秒	
72°C	10 分	1 サイクル
12°C	∞	

表 3. ウシ MMP-13 プライマーを用いた PCR サイクル

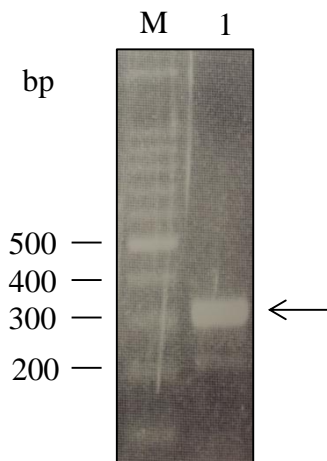


図 6. プローブ配列の増幅

PCR によって増幅されたプローブ配列 DNA の電気泳動図. 予想 DNA サイズは 303 bp である. M : 100 bp DNA ladder (Takara), 1 : PCR 産物を示す.

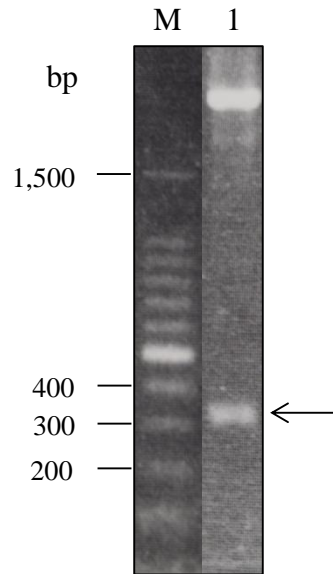


図 7. 精製されたプローブ配列の確認

コンピテントセルから精製したプラスミドの制限酵素処理後の電気泳動図. 制限酵素は *EcoRI* を用いた. 予想 DNA 断片サイズは 321 bp 及び 2,997 bp である. M : 100 bp DNA ladder, 1 : 制限酵素処理をしたプラスミドを示す.

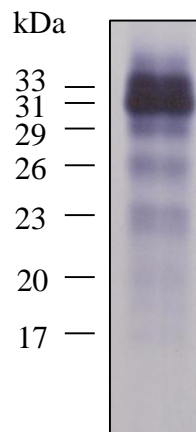


図 8. 絨毛叢組織培養上清中の bPL の検出

妊娠 130 日齢の絨毛叢組織培養上清中の bPL を抗 bPL 抗体によるウェスタンブロッティングによって検出した.

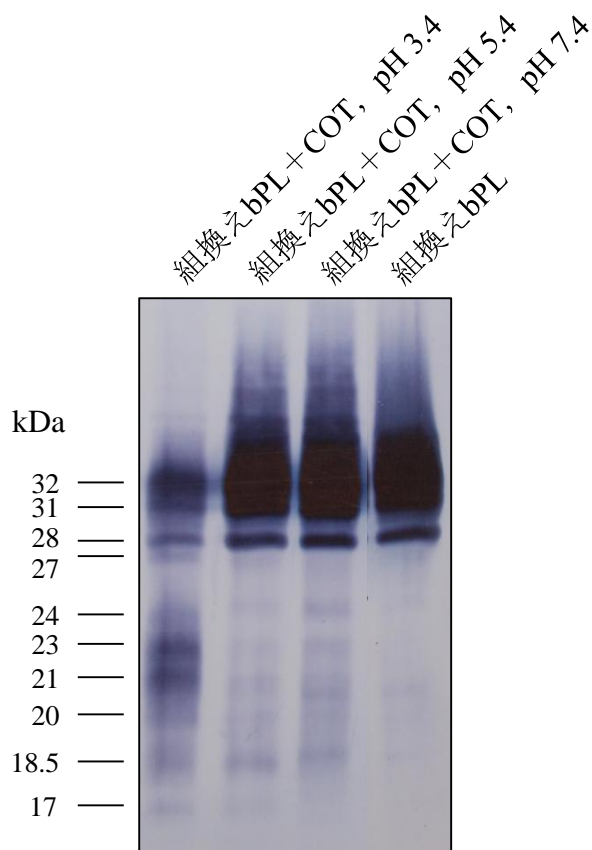


図 9. 絨毛叢組織培養上清と組換え bPL の共培養

組換え bPL と妊娠 130 日齢の絨毛叢組織培養上清 (COT) を、緩衝液 pH 3.4 または pH 5.4 または pH 7.4 中でインキュベートした。生じた bPL 断片は抗 FLAG 抗体によるウェスタンブロッティングで解析した。右端レーンは陰性対照として組換え bPL を共培養することなく用いた。

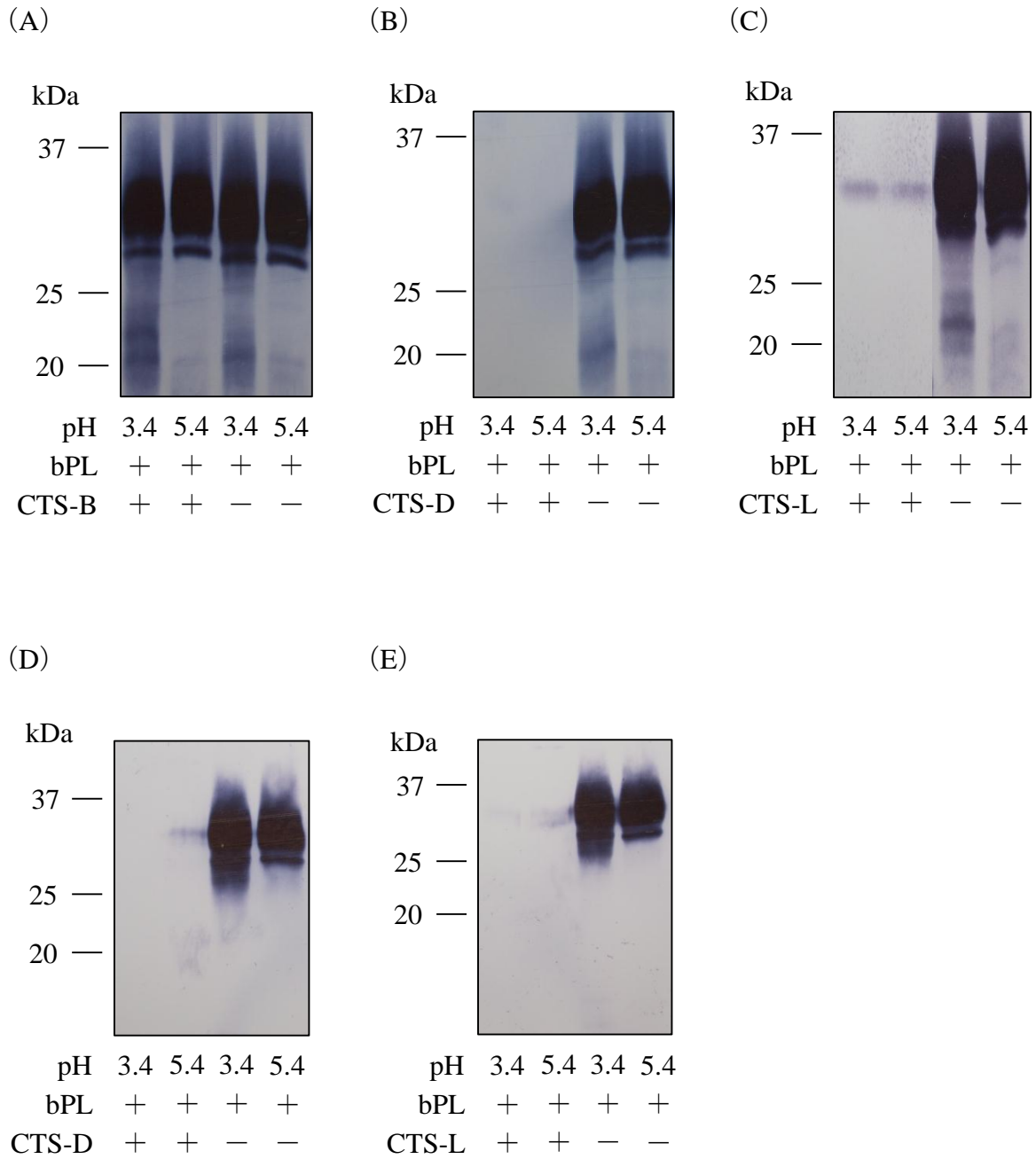


図 10. CTS による組換え bPL の切断

組換え bPL を (A) CTS-B, (B) CTS-D, (C) CTS-L で消化した. インキュベーションの pH 条件は 3.4 及び 5.4 で行った. 生じた bPL 断片は抗 FLAG 抗体によるウェスタンブロッティングで解析した. (D) (E) CTS-D 及び CTS-L で消化後, 抗 bPL 抗体によるウェスタンブロッティングで解析した.

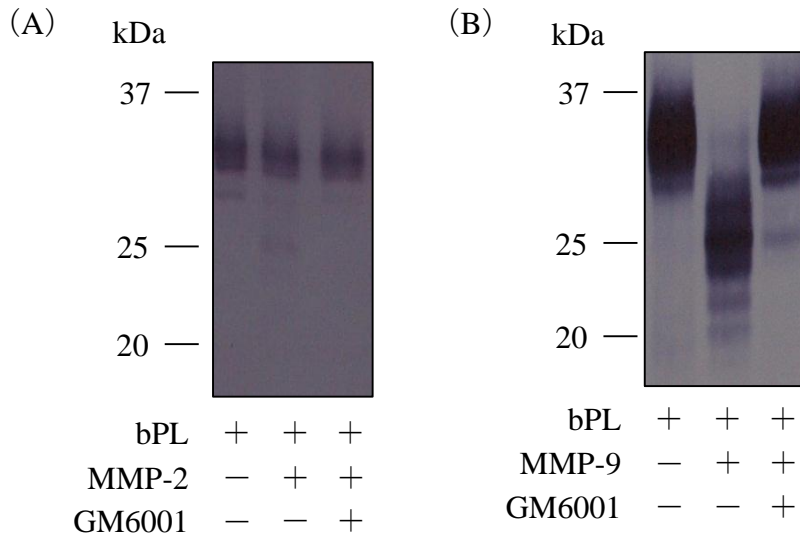


図 11. ゼラチナーゼによる組換え bPL の切断

組換え bPL を (A) MMP-2, (B) MMP-9 で消化した. 生じた bPL 断片は抗 FLAG 抗体によるウェスタンブロッティングで解析した. 右端のレーンには MMP 阻害剤である GM6001 を添加した.

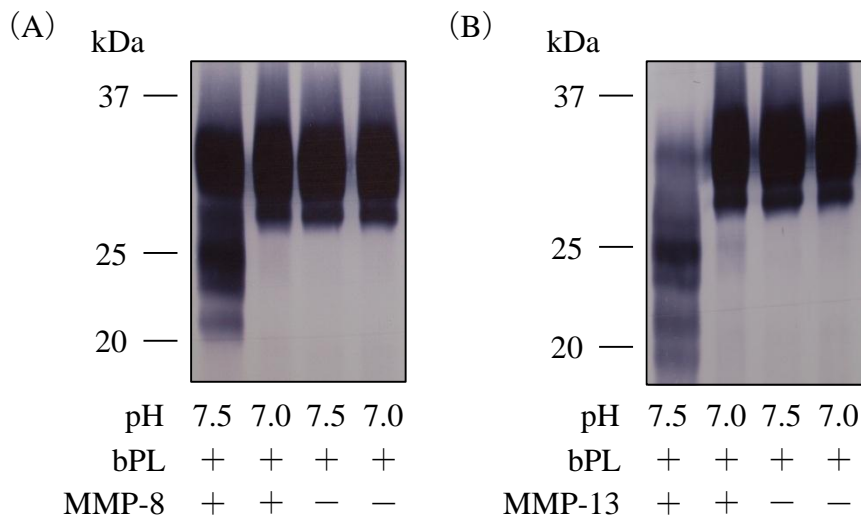


図 12. コラゲナーゼによる組換え bPL の切断

組換え bPL を (A) MMP-8, (B) MMP-13 で消化した. 生じた bPL 断片は抗 FLAG 抗体によるウェスタンブロッティングで解析した. インキュベーションの pH 条件は 7.0 及び 7.5 で行った.

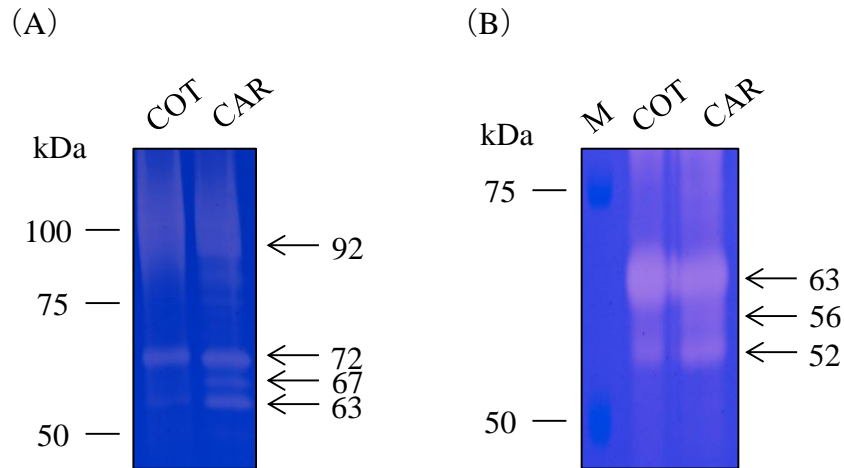


図 13. ザイモグラフィによる MMP 活性の検出

絨毛叢組織培養上清 (COT) 及び子宮小丘組織培養上清 (CAR) についてザイモグラフィを行った。矢印はバンドの位置と分子量を示す。(A) ゼラチンザイモグラフィ。(B) カゼインザイモグラフィ。M : precision plus dual standard を示す。

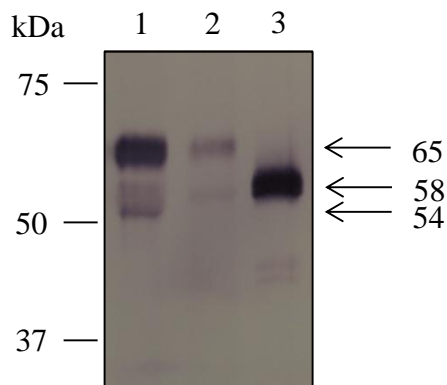


図 14. 胎盤培養上清中の MMP-13 の検出

絨毛叢組織培養上清中の MMP-13 を抗ヒト MMP-13 抗体によるウェスタンブロッティングで解析した。1 : 絨毛叢組織培養上清, 2 : 子宮小丘組織培養上清, 3 : ヒト MMP-13 を示す。

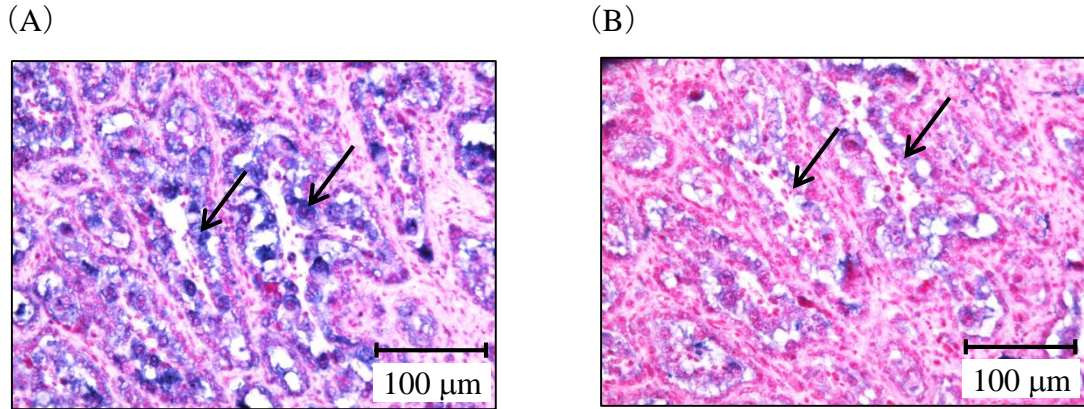


図 15. MMP-13 mRNA の in situ ハイブリダイゼーション

MMP-13 mRNA を認識するプローブを用いて胎盤組織について in situ ハイブリダイゼーションを行った. 矢印は栄養膜細胞を示す. (A) アンチセンス鎖プローブ 50 ng. (B) センス鎖プローブ 50 ng. ハイブリダイゼーション温度は 63°C である.

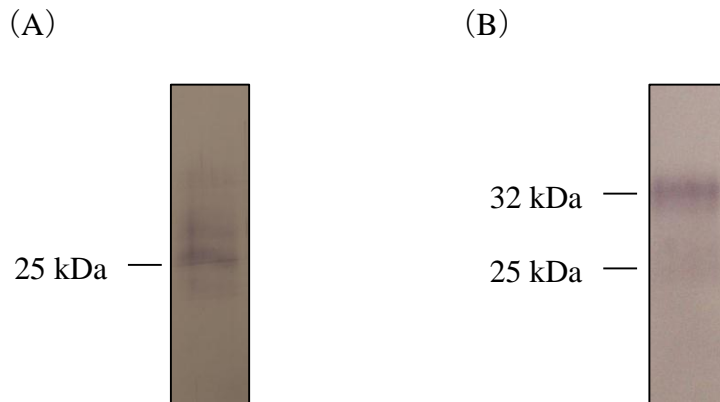


図 16. 組換え bPL 断片

MMP-13 で処理した組換え bPL を抗 FLAG 抗体によるウェスタンブロッティングで解析した. (A) Nb2 バイオアッセイに用いる組換え bPL 断片. (B) BBMC バイオアッセイに用いる組換え bPL 断片.

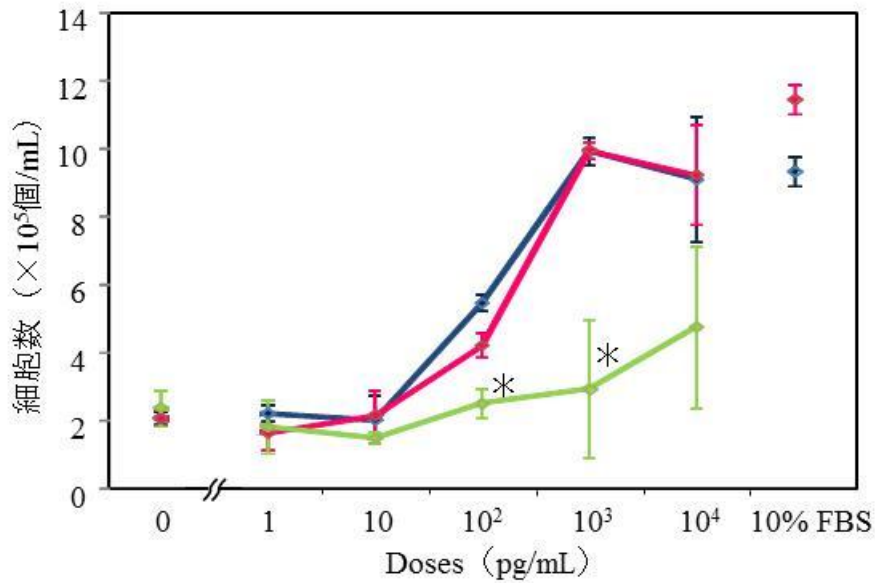


図 17. Nb2 細胞を用いた組換え bPL 断片のバイオアッセイ

Nb2 細胞を用いて組換え bPL 断片の PRL 様生物活性を検証した. 赤線は組換え bPL, 青線は oPRL-19, 緑線は組換え bPL 断片添加実験区を表す. oPRL-19 は陽性対象として用いた. * : 組換え bPL と組換え bPL 断片の間で $p < 0.05$, t 検定.

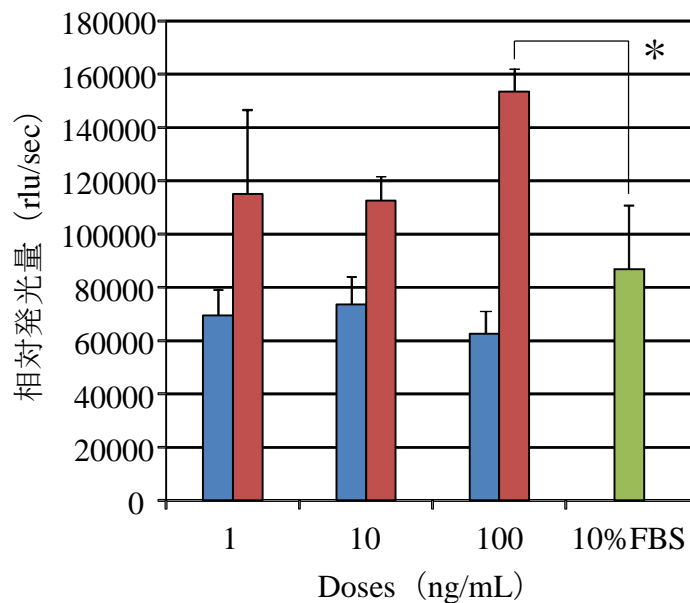


図 18. BBMC を用いた組換え bPL 断片のバイオアッセイ

BBMC を用いて組換え bPL 断片の血管内皮細胞増殖活性を検証した. 青バーは組換え bPL (完全長) 添加区, 赤バーは組換え bPL 断片 (MMP-13 処理) 添加区, 緑バーは無添加実験区を表す. * : $p < 0.01$, t 検定.

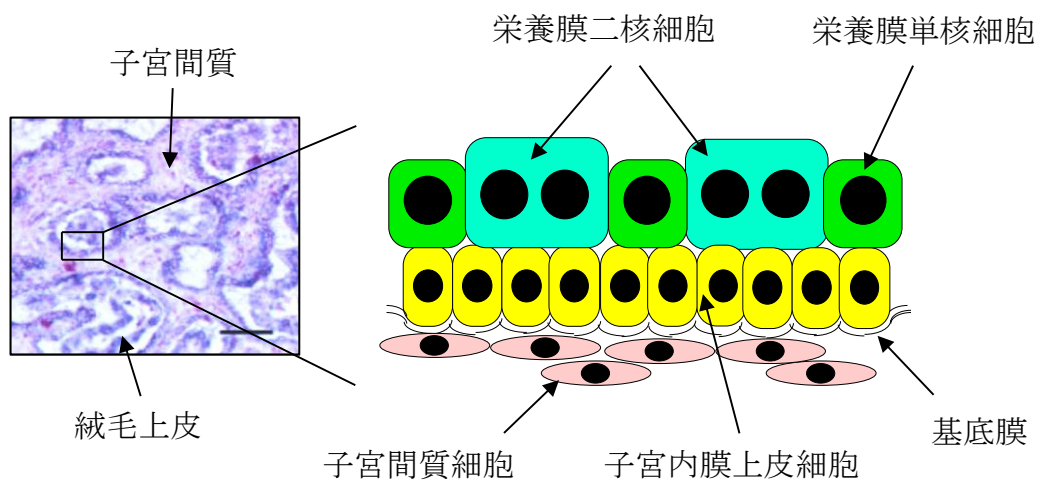


図 19. 胎盤組織の模式図

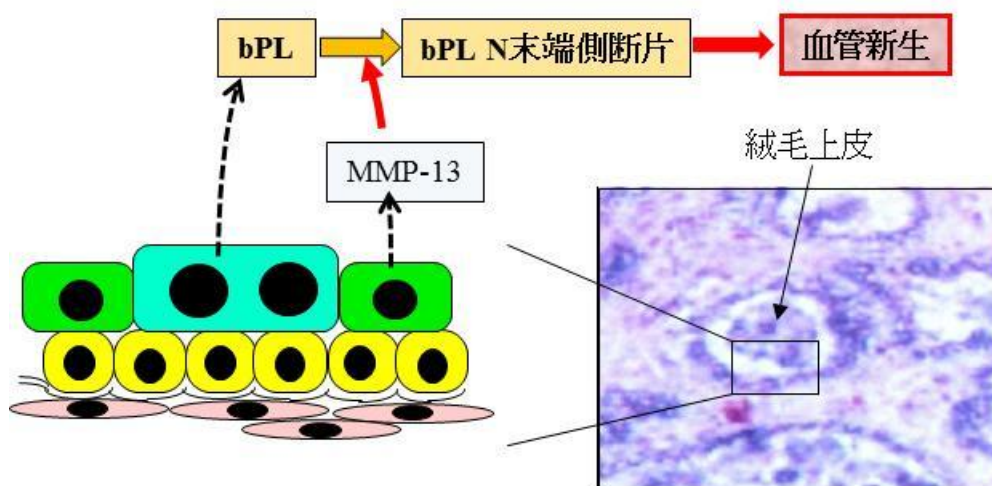


図 20. bPL 断片の作用機構モデル

栄養膜二核細胞から分泌された bPL は栄養膜細胞から分泌された MMP-13 によって切断されて近傍の血管内皮細胞を増殖させる。