

ラットの排卵過程で機能するマトリックスメタロプロテアーゼの解析

Characterization of rat ovarian matrix metalloproteinases

研究代表者 北海道大学大学院理学研究科 助手 大西淳之
Instructor, Div. of Biological Sciences,
Hokkaido Univ., Junji OHNISHI

To study the role of matrix metalloproteinases (MMPs) in the process of mammalian ovulation, we cloned cDNAs for six different MMPs (collagenase 1, gelatinase A, stromelysin-1, matrilysin, macrophage-type metalloelastase and unidentified one) from PMSG/hCG-primed immature female rat ovaries by the reverse transcription-PCR and described here a novel MMP tentatively named MIFR (metalloproteinase in the female reproductive tracts). From the analysis of its predicted amino acid sequence suggested that the structure of MIFR was somewhat unique in comparison with other MMPs at several points: the first, MIFR does not contain the consensus region so called as cystein switch domain, the second, it lacks the hemopexin-like domain at the carboxyl terminal like matrilysin. Rat MIFR has 391 amino acids including a putative signal sequence of 39 residues. At the carboxyl-terminal end of the propeptide, rat MIFR has an RRRR motif, a putative cleavage site for intracellular activation by Kex-2-like proteinase furin. Northern blot analysis and the RNase protection assay reveals that its expression is exclusively limited to the female reproductive organs including ovary and uterus, MIFR mRNA is constantly expressed in the ovary during the ovulation processes although in uterus its expression is dramatically changed, suggesting that MIFR play an important roles in the female reproductive organs during the ovulating processes.

1. 研究目的

生体では、その発生段階や、いったん出来上がった組織において修復、再構成を必要とする局面がいくつもある。そのうち特に性周期に伴う卵巣や子宮での排卵過程や退縮現象での細胞外マトリックスの急激な変化に関わる細胞外プロテアーゼの役割について解析を進めている。未成熟ラットに妊馬血清性腺刺激ホルモン (PMSG) とヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) の組合せで過排卵を誘起させ、経時的に卵巣で発現してくる MMP 群を、RT-PCR により解析したところ、コラゲナーゼ 1、ゼラチナーゼ A、ストロメライシン 1、マトリライシン、メタロエラスターゼの 5 種類に加えて、新規な配列の MMP 様 cDNA が発現していることが明らかとなった。本研究では、この新規な MMP の構造および機能解析を行い、加えて女性生殖器官において、6 種類の MMP の関係を明らかにすることを目的とする。

2. 研究経過

方法

新規ラット MMP のクローニング

未成熟ラットに PMSG と hCG の組合せで過排卵を誘起した卵巣 RNA を用いて cDNA ライブラリーを作製した。RT-PCR 法によりラット卵巣の mRNA から得られた新規の MMP 様フラグメントをプローブにして、このライブラリーをスクリーニングした。

ノーザンプロット解析

先と同様に未成熟ラットを PMSG と hCG を用いて過排卵を誘導させ、経時的に卵巣と子宮を取りだし、それより total RNA を調製し、20 μ g を用いてノーザン

プロット解析を行った。また同時にその他の臓器からも total RNA を調製し、MIFR の発現する組織分布を解析した。

RNase プロテクションアッセイによる排卵過程での各種 MMP の発現調節

先の方法により卵巣の成熟から排卵とそれに続く黄体化までの過程で、経時的に採取した卵巣と子宮の total RNA を用いて、ラット MIFR、コラゲナーゼ 1、ゼラチナーゼ A、ストロメライシン 1、マトリライシン、メタロエラスターゼの各 mRNA の発現量を RNase プロテクションアッセイにより定量化した。

組換え体 MIFR の発現

ラット MIFR の活性型領域部分を pET30a(+) ベクター (Novagen) に組み込んで、大腸菌 BL21(DE3)pLysS で発現させた。組換え体ラット MIFR は不溶性画分に得られたので、変性剤 (6M グアニジン塩酸) を用いて可溶化し、透析操作により変性蛋白質の巻き戻しを行った。また、変性した組換え体 MIFR は、そのまま SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて分離した後、目的のバンドを切り出して抽出した。これを抗体作製用の抗原として、8 週齢の雌ウサギに免疫した。動物細胞を用いてのラット MIFR の発現実験として、ラット MIFR cDNA を発現ベクター pEF ベクターに組み込み、COS-1 および COS-7 細胞に導入した。培養培地を回収して、それを用いてゼラチンまたはカゼインを基質としたザイモグラフィを行うと同時に、精製した市販の細胞外基質蛋白質に対する分解活性の測定を試みた。

In situ ハイブリダイゼーション

過排卵を誘導させた幼弱ラットより、

経時的に卵巣と子宮を取り出し、液体窒素で急速凍結させた後、凍結切片を調製した。ジゴキシゲニン標識した各種 MMP の RNA プローブを用いてハイブリダイゼーションを行った。

3. 研究成果

(1)、ラット卵巣の cDNA ライブラリーより、全長の cDNA を単離した。卵巣と子宮で特異的に発現する新規の MMP のクローニングに成功し、MIFR (metalloproteinase in female reproductive tracts) と命名した。ラット MIFR の mRNA は 1.5 kb で、391 アミノ酸からなる新規の蛋白質である。N 末端に 39 アミノ酸残基のシグナル配列、40 残基のプロペプチド、および亜鉛イオンを含む 312 残基の触媒領域からなる触媒領域には、すべての MMP の活性中心で共通の HExGHxxGxxHS 配列が確認されたが、プロペプチド内にあるシステインスイッチと呼ばれる PRCG[V/N]PD 共通配列と、活性中心の C 末端側にヘモベキシン様領域が存在しない点で、非常にユニークな構造を持つマトリックスメタロプロテアーゼの初めての報告である。また、この MIFR のプロペプチドと触媒領域との間には、リン (Kex-2 様エンドプロテアーゼ) によるプロセシング配列である RRRR 配列が存在することから、細胞内で活性化されて分泌されるものと思われる。

(2) ラット MIFR の cDNA をプローブにして、ヒトの MIFR cDNA のクローニングを行ったところ、2 種類の mRNA が発現していることが判明し、ヒト MIFR-1 と MIFR-2 と命名した。ヒト MIFR-1 は 390 アミノ酸残基よりなり、ラットの MIFR と同様にシステインスイッチは存在

せず、プロフラグメントと触媒領域との間にはリン認識配列 RRRR が確認された。ラットとヒトの MIFR は全体の配列と触媒領域のアミノ酸レベルでの相同性は、それぞれ 83 % と 92 % であった。

市販のヒト子宮 cDNA (Clontech, Quick Clone cDNA) に RT-PCR 法を適応してヒト MIFR-2 を増幅し、その配列を解析したところ、ヒト MIFR-1 の翻訳領域中に 67 塩基からなる挿入配列がはいっていることが確認された。その結果、ヒト MIFR-1 のアミノ酸配列の途中から、全く異なる配列の異常蛋白質となり、亜鉛イオン結合領域が消失する。この 67 塩基の挿入部位の前後でプライマーを設計して、ヒトゲノムを用いて PCR を行ったところ、この 67 塩基はヒト MIFR 遺伝子のイントロンそのもので、ヒト MIFR-1 と MIFR-2 は同一遺伝子由来であり、ヒト MIFR-2 はスプライシング異常によるヒト MIFR の変異転写産物であることが確認された。

(3) ノーザンプロット解析の結果、ラットとヒトの MIFR はともに卵巣と子宮で特異的な発現が確認され、僅か心臓でその発現が確認された。どちらも精巣における発現が見られないことから、女性生殖器官に特異的な発現を示す蛋白質である。

4. 今後の課題と発展

動物細胞および大腸菌を用いて作製した組換え体 MIFR を用いて、既存の基質に対する酵素活性の検出を試みているが、いまのところ明確な活性は検出できていない。このことは、他の MMP と異なりその基質特異性が高い酵素であることが示唆される。従って、この新規の MIFR に対する特異的な基質の同定を、卵巣および子宮より試みる必要があり、それが明らかになった時にこの酵素の特性が明確になり、特に女性生

殖器官における機能の解明につながる。現在酵母の Two-hybrid system と Phage display library を利用した MIFR に特異的な基質または結合蛋白質の検索を試みている。

ラットおよびヒトの MIFR 組換え体に対する特異的な抗体の作製は進行中である。アミノ酸レベルでラットとヒトの MIFR は 90% 以上の相同性がみられることより、ウサギやマウスの MIFR とも相同性が高い可能性があり、抗体ができにくいものと思われる。今迄は抗体産生能の高い雌ウサギを用いていたが、MIFR が女性生殖器官に特異的に発現していることを考慮すると、雄ウサギや雄マウスを用いて免疫をすることで特異的な抗体の作製が期待される。特異的な抗体が作製できると、MIFR の卵巣や子宮での正確な分布場所が同定できるとともに、ヒトにおいては、アミノ酸配列が全く異なる MIFR-1 と MIFR-2 が発現していることから、それぞれの蛋白質の同一組織内での発現の分布が明らかにできる。と同時に、卵巣や子宮における病変部位において、正常蛋白質の MIFR-1 と異常蛋白質の MIFR-2 との分布様式が解明できる。その結果、ヒト MIFR のスプライシング異常と、女性生殖器官での病変との関連について言及できる可能性が出てくる。

In situ ハイブリダイゼーションによる MIFR の検出はジゴキシゲニン標識の RNA プローブでは明確にできなかったのので、現在は³³P 標識の RNA プローブを用いて検討中である。

5. 発表論文リスト

新規のメタロプロテアーゼ MIFR に関する論文は現在投稿準備中の段階であるた