

学 位 論 文 題 名

Studies on the physiological roles
of glandular kallikreins expressed in the mouse testis

(マウス精巣で発現するグランジュラーカリクレインの
生理機能に関する研究)

学位論文内容の要旨

哺乳類の精子形成は、体細胞分裂を行う精原細胞、減数分裂を行う精母細胞、劇的な形態変化の結果生じる精細胞といった細胞群を産生する、厳密に制御された周期的な過程によって成り立っている。この過程には、細胞間および細胞-細胞外マトリクス間の相互作用が重要である。最近、いくつかのセリンプロテアーゼが精巣から単離され、この相互作用を仲介していることが示唆されているが、精巣で発現するこれらセリンプロテアーゼの生理的機能はまったくわかっていない。申請者は、以前、マウスガン細胞から一本鎖 tissue-type plasminogen activator (tPA) 活性化酵素を探索する過程で、セリンプロテアーゼファミリーの一つであるグランジュラーカリクレイン (Klk) ファミリーに相同性の高い cDNA 断片を得た。ノーザン解析の結果から、この遺伝子が精巣に高発現していたことから、精巣 cDNA ライブラリをスクリーニングし、新規の Klk を含む 3 種類の全長 cDNA を単離した。本研究では、これら 3 種類の Klk の発現分布、発現調節機構、基質特異性などを解析し、その生理機能の解明にせまった。

第 1 章 ライディヒ細胞に発現し、キモトリプシン様活性を示す新規グランジュラーカリクレイン mKlk27 のクローニングと解析

新規 mKlk27 cDNA をマウス精巣 cDNA ライブラリからクローニングした。組織分布をノーザン解析によって調べたところ、mKlk27 遺伝子は精巣にのみ顕著な発現を示すことがわかった。また、精巣成熟段階に沿った mKlk27 mRNA 発現量を解析したところ、幼若な 2 週齢の精巣では mRNA 発現が検出されず、4 週齢から発現が顕著になり、その後次第に発現量は上昇した。In situ ハイブリダイゼーションの結果から成熟マウス精巣において mKlk27 はライディヒ細胞に特異的に発現していることが示された。リコンビナント mKlk27 タンパクを作製し、酵素としての性質を解析した。精製した活性型リコンビナント mKlk27 の N 末端アミノ酸配列は、Ile-Ile-Gly-Gly-Phe-Lys-X-Lys-Lys-Asn-Ser-Gln-Pro-Trp-His-Val-Ala-Val となっていた。活性型リコンビナント mKlk27 は、アルギニンやリジンを含むトリプシンタイプの酵素が切断するような 4-methylcoumaryl-7-amide (MCA) 基質に対してはまったく活性がなかったが、キモトリプシンタイプの酵素が切断するような MCA 基質に対しては活性を示した。リコンビナント mKlk27 の Gly²⁰⁹ を Asp に変異させると、トリプシンタ

イプの活性が出現し、キモトリプシンタイプの活性が消失した。カゼインやゼラチンを基質としたザイモグラフィを行ったところ、活性型リコンビナント mKlk27 は両方とも分解した。活性型リコンビナント mKlk27 と様々な基質タンパクを反応させたところ、細胞外マトリクスタンパクのひとつであるフィブロネクチンと、insulin-like growth factor (IGF)に結合しその活性を調節する結合タンパク(IGFBP-3)を分解することがわかった。以上の結果から、mKlk27 は成熟精巣のライディヒ細胞で主に発現する、キモトリプシンタイプ活性を持つセリンプロテアーゼで、生理的な基質としてフィブロネクチンや IGFBP-3 が考えられた。

第2章 マウス精巣ライディヒ細胞で発現し、フィブロネクチンと IGFBP-3 を切断するグランジュラーカリクレイン mKlk21

いままでゲノムの一部の配列しか知られていなかった mKlk21 遺伝子の全長 cDNA 配列をマウス精巣 cDNA ライブラリから単離した。mKlk21 は成熟マウスの腎臓、顎下腺、精巣で発現していた。精巣においては生後4週齢から mRNA が検出され、その後次第に増加していた。mKlk21 遺伝子は成熟精巣のライディヒ細胞でのみ発現していた。テストステロンの存在下で、2週齢のライディヒ細胞を培養すると、mKlk21 発現は有意に上昇した。また、reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)/シーケンスの結果から、Klk ファミリーの中では mKlk21 がもっとも多く精巣で発現していることがわかった。活性型リコンビナント mKlk21 は Arg-X 結合を好んで切断するトリプシン様活性を示し、この酵素活性は典型的なセリンプロテアーゼ阻害剤によって強く阻害された。活性型リコンビナント mKlk21 はカゼイン、ゼラチン、フィブロネクチン、IGFBP-3 を分解することができた。In situ ハイブリダイゼーションの結果から、ライディヒ細胞の一部は IGF-I と IGFBP-3 を発現していた。阻害剤効果の結果から、成熟マウス精巣から単離したライディヒ細胞の培養培地は、mKlk21 様の IGFBP-3 分解酵素を含んでいることがわかった。以上の結果から、mKlk21 はフィブロネクチンや IGFBP-3 などの分解を介して成熟精巣の機能の維持に関わると考えられた。

第3章 ライディヒ細胞が発現・分泌するグランジュラーカリクレイン mKlk24 は細胞外マトリクスタンパクや一本鎖 tPA を加水分解する

以前、マウスガン細胞 mRNA から縮退プライマーを用いた RT-PCR によって、一本鎖 tPA 変換酵素の候補遺伝子のひとつである mKlk24 遺伝子の断片を得た。本研究ではこの遺伝子の全長 cDNA 配列をマウス精巣 cDNA ライブラリから単離した。mKlk24 は成熟マウスの腎臓、顎下腺、卵巣、精巣上体、精巣で発現していた。ノーザン解析の結果から、mKlk24 遺伝子は、生後4週齢の精巣で発現が顕著になり、その後次第に発現量が増加することがわかった。成熟精巣においては、ライディヒ細胞に mKlk24 mRNA が局在していることが示された。テストステロンの存在下で、2週齢のライディヒ細胞を培養すると、mKlk24 発現は有意に上昇した。活性型リコンビナント mKlk24 は Arg-X 結合を好んで切断するトリプシン様活性を示し、この酵素活性は典型的なセリンプロテアーゼ阻害剤によって強く阻害された。活性型リコンビナント mKlk24 はカゼイン、ゼラチン、フィブロネクチン、ラミニン、一本鎖 tPA を加水分解することができた。免疫組織化学的な解析から、mKlk24 タンパクは精巣の間質組織のみならず、tPA タンパクが存在する精細管内にもあることが明らかになった。さらに、成熟マウス精巣から単離したライディヒ細胞の培養培地に、mKlk24 タンパ

クおよび、一本鎖 tPA 変換酵素活性を検出した。以上の結果から、mKlk24 は細胞外マトリクスタンパクの分解や一本鎖 tPA の変換を介して成熟精巣の組織の再構築に関わる Klk であることが示唆された。

以上、本研究によって、これまでほとんど調べられていなかった、精巣に発現するセリンプロテアーゼのタンパクレベルでの性質が明らかになったばかりでなく、精巣におけるセリンプロテアーゼの生理機能解明に大きな手がかりが得られた。本研究の成果は、生殖生物学研究の発展に大きく貢献するものである。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 高 橋 孝 行

副 査 教 授 鈴 木 範 男

副 査 教 授 山 下 正 兼

学 位 論 文 題 名

Studies on the physiological roles of glandular kallikreins expressed in the mouse testis

(マウス精巣で発現するグランジュラーカリクレインの
生理機能に関する研究)

哺乳類の精子形成は、精原細胞、精母細胞、精細胞といった細胞群を産生する、厳密に制御された周期的な過程によって成り立っている。この過程には、細胞間および細胞－細胞外マトリクス間の相互作用が重要である。最近、いくつかのセリンプロテアーゼが精巣から単離され、その役割が示唆されているが、実際の生理的機能は全くわかっていない。申請者は、マウス精巣から新規のグランジュラーカリクレイン (Klk) 3 種を発見した。本研究では、これら 3 種類の Klk の発現分布、発現調節機構、基質特異性等を解析し、その生理機能の解明に迫った。

第 1 章 ライディヒ細胞に発現し、キモトリプシン様活性を示す新規グランジュラーカリクレイン mKlk27 のクローニングと解析

新規 mKlk27cDNA をマウス精巣 cDNA ライブラリからクローニングした。mKlk27 遺伝子は精巣にのみ発現しており、精巣成熟過程では 4 週齢から発現が顕著になりその後次第に発現量は上昇した。成熟マウス精巣において mKlk27 はライディヒ細胞に特異的に発現していた。リコンビナント mKlk27 酵素の活性型は、キモトリプシン様の切断特異性を示した。mKlk27 はカゼインやゼラチンのみならずフィブロンекチンと、insulin-like growth factor (IGF) に結合しその活性を調節する結合タンパク (IGFBP-3) を分解した。以上の結果から、mKlk27 は成熟精巣のライディヒ細胞で主に発現する、キモトリプシンタイプ活性を持つセリンプロテアーゼであり、生理的な基質としてフィブロンекチンや IGFBP-3 が考えられた。

第 2 章 マウス精巣ライディヒ細胞で発現し、フィブロンекチンと IGFBP-3 を切断するグランジュラーカリクレイン mKlk21

mKlk21 遺伝子の全長 cDNA 配列をマウス精巣 cDNA ライブラリから単離した。mKlk21 は成熟マウスの腎臓、顎下腺、精巣で発現していた。精巣においては生後 4 週齢以降のライディヒ細胞に mRNA が検出された。mKlk21 発現は、2 週齢のマウス精巣

ライディヒ細胞をテストステロン処理することにより誘導された。Klk ファミリーの中では mKlk21 がもっとも多く精巣で発現していることがわかった。活性型リコンビナント mKlk21 は Arg-X 結合を好んで切断するトリプシン様活性を示した。mKlk21 はカゼイン、ゼラチン、フィブロネクチン、IGFBP-3 を分解することができた。In situ ハイブリダイゼーションの結果から、ライディヒ細胞の一部は IGF-I と IGFBP-3 を発現していた。阻害剤効果の結果から、成熟マウス精巣から単離したライディヒ細胞の培養培地は、mKlk21 様の IGFBP-3 分解酵素を含んでいることがわかった。以上の結果から、mKlk21 はフィブロネクチンや IGFBP-3 などの分解を介して成熟精巣の機能の維持に関わると考えられた。

第3章 ライディヒ細胞が発現・分泌するグランジュラーカリクレイン mKlk24 による細胞外マトリクスタンパクおよび一本鎖組織型プラスミノゲンアクチベータ (tPA) の加水分解

mKlk24 遺伝子の全長 cDNA 配列をマウス精巣 cDNA ライブラリから単離した。mKlk24 は成熟マウスの腎臓、顎下腺、卵巣、精巣上体、精巣で発現していた。mKlk24 遺伝子は、生後4週齢の精巣で発現が顕著になった。成熟精巣においては、ライディヒ細胞に mKlk24 mRNA が局在していた。テストステロンの存在下で、2週齢のライディヒ細胞を培養すると、mKlk24 発現は有意に上昇した。活性型リコンビナント mKlk24 はトリプシン様活性を示した。活性型リコンビナント mKlk24 はカゼイン、ゼラチン、フィブロネクチン、ラミニン、一本鎖 tPA を加水分解することができた。免疫組織化学的な解析から、mKlk24 タンパクは精巣の間質組織のみならず、tPA タンパクが存在する精細管内にもあることが明らかになった。さらに、成熟マウス精巣から単離したライディヒ細胞の培養培地に、mKlk24 タンパクおよび、一本鎖 tPA 変換酵素活性を検出した。以上の結果から、mKlk24 は細胞外マトリクスタンパクの分解や一本鎖 tPA の変換を介して成熟精巣の組織の再構築に関わる Klk であることが示唆された。

以上、本研究によって、精巣に発現するセリンプロテアーゼのタンパクレベルでの性質が明らかになったばかりでなく、精巣におけるセリンプロテアーゼの生理機能解明に大きな手がかりが得られた。これらの成果の大部分は、すでに国際的学術専門誌に公表されており、申請者の研究が世界的レベルで評価を受けていることは明らかである。

よって、申請者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。