

学位論文題名

Protein Related to DAN and Cerberus
Is a Bone Morphogenetic Protein Antagonist
That Participates in Ovarian Paracrine Regulation

(Protein related to DAN and cerberus の BMP アンタゴニスト作用と
卵巣におけるパラクライン作用に関する解析)

学位論文内容の要旨

【研究の背景】 Bone morphogenetic protein (BMP) は生物の形態形成において重要な役割をになっているのみならず、卵胞形成を制御する複雑な内分泌ネットワークの一環を形成している。BMP アンタゴニストは BMP の作用に拮抗することにより胎生期の発達と組織分化を制御していることが知られている。しかしながら哺乳類の卵巣における BMP の機能についてはいまだ不明な点が多い。Protein related to DAN and cerberus (PRDC) は gene trapping によりマウス ES 細胞で発見された cystine knot 構造をもつ分泌タンパクである。PRDC は BMP アンタゴニストとアミノ酸配列の相同性を示すが、その生物学的・生理的活性については十分に解析されていない。【目的】 今回われわれは、リコンビナント PRDC を作成し、PRDC が BMP タンパクの活性に与える影響を解明した。また PRDC mRNA の組織分布および局在、さらには卵巣における PRDC の生理機能に関する検討を行った。【方法】 1. ヒト PRDC cDNA を 293T 細胞で発現させ、リコンビナント PRDC を作成し、ウエスタンブロットを用いた解析を行った。PRDC の機能解析のコントロールとして、その paralog である BMP アンタゴニスト gremlin のリコンビナントタンパクも同時に作成した。2. リコンビナントタンパクを用いて、Luciferase レポーターアッセイにおいて BMP タンパクおよび他の TGF- β ファミリータンパクにより惹起されるシグナリングに対する PRDC の作用を検討した。3. リコンビナント PRDC と BMP タンパクとの相互作用を証明するため、co-precipitation を行った。4. マウス組織における PRDC の mRNA 発現パターンを RT-PCR にて確認した。5. PRDC の卵巣での局在とゴナドトロピンによる調節を解明するため、PMSG (pregnant mare serum gonadotropin) および hCG を投与されたマウス卵巣を用いて Northern blot および realtime quantitative PCR を行った。in situ hybridization を用いて、PRDC 転写産物の卵巣での局在を検討した。6. 卵巣における PRDC の生理学的作用を解明するため、25 日齢のラット顆粒膜細胞を用い、BMP4 によって惹起される progesterone 産生能に対する影響を検討した。【結果】 1. ヒト 293T 細胞により産生されたリコンビナント PRDC を抗 PRDC 抗体を用いたウエスタンブロットにて解析した。Reduced condition において PRDC は 23、19、18 および

16kDa のバンドとして検出された。Peptide N-glycosidase F による糖鎖切断により、23kDa のバンドは消失したため、PRDC は糖鎖修飾をうけているものと考えられた。抗 PRDC 抗体が non-reduced condition において PRDC を認識しないため、C-terminus に FLAG epitope を付加したリコンビナントタンパク (PRDC-CT) と抗 FLAG M2 antibody を用い、non-reduced condition でのウエスタンブロットを行ったところ、40kDa 付近にバンドを検出した。このことより PRDC は二量体を形成しているものと思われた。2. Luciferase レポーターアッセイにおいて、gremlin と同様にリコンビナント PRDC は BMP2 および BMP4 により惹起されるシグナリングに対し有意な抑制効果を示した。PRDC は gremlin とは異なり、BMP6 および BMP7 に対しても有意なシグナルの抑制を示した。しかしながら、GDF-9, activin, TGF- β に対する抑制効果は認められなかった。PRDC は BMP2 および BMP4 の惹起するシグナルを容量依存性に抑制することが確認された。3. co-precipitation を用い、PRDC と BMP2 および BMP4 が相互に結合しうることを証明した。PRDC-CT を BMP2 および BMP4 と co-incubate し、抗 FLAG 抗体ビーズを用いて immunoprecipitation を行った。ビーズからの溶出液を抗 BMP2/4 抗体を用いたウエスタンブロットで解析したところ、バンドが確認された。熱変性を加えた PRDC-CT で同様の実験を行ったが、溶出液中に BMP2 あるいは BMP4 を確認できなかった。4. マウス組織を用いた RT-PCR で PRDC の転写産物はさまざまな組織に発現しており、なかでも卵巣、脳、脾臓で発現レベルが高かった。5. Realtime quantitative PCR および Northern blot を用い、マウス卵巣における PRDC 産生がゴナドトロピン投与により調節されることを確認した。PRDC 転写レベルは PMSG 投与により増加することが確認された。マウス卵巣を用いた *in situ* ハイブリダイゼーションでは、PRDC 転写産物は顆粒膜細胞に発現していることが示された。6. ラット顆粒膜細胞において FSH 添加 (30 mIU/ml) により、progesterone 産生量が増加した。BMP4 (1nM) を添加すると、FSH で増加した progesterone 産生が抑制されたが、PRDC はこの BMP4 の作用に拮抗し、培養液中の progesterone 濃度を有意に上昇させた。リコンビナント gremlin も BMP4 による progesterone 産生抑制に拮抗した。【結論】 1. われわれはリコンビナント PRDC を初めて作成し、その解析を行った。ウエスタンブロットにて、PRDC は複数のバンドとして認識され、糖鎖修飾のみならず、proteolysis の影響を受けているものと考えられた。Non-reduced condition の結果から、PRDC は二量体を形成していると推測された。2. PRDC は Luciferase レポーターアッセイにおいて BMP2、4、6 および 7 の惹起するシグナルを有意に抑制した。しかしながら、GDF-9, activin, TGF- β に対する抑制効果は認められなかった。3. PRDC は BMP2 および BMP4 に直接結合することで BMP タンパクに対する拮抗作用を示すことが推測された。4. PRDC はマウスにおいて広い組織分布を示した。5. マウス卵巣では PRDC は顆粒膜細胞に局在し、ゴナドトロピンで発現量の調節を受けることが示された。6. PRDC は顆粒膜細胞において BMP4 による progesterone 産生抑制作用に拮抗した。【結語】 PRDC は広範な組織分布を示す強力な BMP アンタゴニストであると考えられた。卵巣においては顆粒膜細胞に発現し、ゴナドトロピンにより発現調節を受け、さらに莢膜細胞由来の BMP の作用に拮抗し、顆粒膜細胞での progesterone 産生を回復されることなどから、PRDC は卵胞発育、あるいは黄体化の促進など、卵巣パラクライン調節機構になんらかの役割を果たしているものと考えられた。

学位論文審査の要旨

主査 教授 櫻木 範明

副査 教授 水上 尚典

副査 教授 島山 鎮次

学位論文題名

Protein Related to DAN and Cerberus Is a Bone Morphogenetic Protein Antagonist That Participates in Ovarian Paracrine Regulation

(Protein related to DAN and cerberus の BMP アンタゴニスト作用と
卵巣におけるパラクライン作用に関する解析)

TGF- β スーパーファミリーに属する Bone morphogenetic protein (BMP) は生物の形態形成において重要な役割を担っているのみならず、卵胞形成を制御する複雑な内分泌ネットワークの一環を担っていると考えられている。BMP アンタゴニストは BMP の作用に拮抗することにより胎生期の発達と組織分化を制御していることが知られていたが、哺乳類の卵巣機能調節に果たす役割についてはいまだ不明な点が多い。Protein related to DAN and cerberus (PRDC) は cystine knot 構造をもつ分泌タンパクであり BMP アンタゴニストとアミノ酸配列の相同性を示す。本研究において申請者はまずヒト 293T 細胞を用いてリコンビナント human PRDC を作成し、リコンビナント human PRDC がリコンビナント human BMP の活性に与える影響について検討した。また、マウスにおける PRDC mRNA の組織分布および局在について、ならびに卵巣における PRDC の役割についてマウス卵巣とラット培養顆粒膜細胞を用いて検討した。その結果、リコンビナント PRDC は糖鎖修飾・proteolysis を受け、二量体を形成していると推測された。PRDC は Luciferase レポーターアッセイにおいて BMP2、4、6 および 7 による Smad が介在する転写活性を有意に抑制し、co-immunoprecipitation より BMP2・BMP4 に直接会合することが示された。RT-PCR でマウス PRDC は脳・卵巣で高い発現を認めた。マウス卵巣 PRDC はゴナドトロピンで発現調節をうけ、マウス PRDC cDNA probe を用いた *in situ* hybridization により顆粒膜細胞に局在することが示された。PRDC はラット顆粒膜細胞における BMP4 の progesterone 産生抑制作用に拮抗した。これらのことから PRDC は強力な BMP アンタゴニストであり、卵胞発育、黄体化の促進など、卵巣パラクライン調節機構になんらかの役割を果たしているものと考えられた。

発表終了後畠山教授より、PRDC の翻訳後修飾に関し、糖鎖修飾は N-linked のもののみであったのか、dibasic proteolytic processing point 細胞内のどのレベルで生じるのか、Luciferase-assay reporter にプロモーターは存在するのか、PRDC・gremlin が血中に分泌され endocrine factor として働く可能性などについての質問があった。水上教授から、BMP の卵巣での作用について、さらに莢膜細胞からは BMP7・BMP4 など同様の作用を示す物質が共存していることの意義に関して質問があった。最後に櫻木教授より、BMP と PRDC など BMP アンタゴニストと卵胞発育の停止との関連について polycystic ovary syndrome (PCO) の病態解明の観点から質問があった。これらの質問に対して申請者は自らの研究内容と文献を引用し概ね妥当な回答を行った。

本論文は卵巣をはじめとした諸々の生体組織における BMP と BMP アンタゴニストとの相互作用についての研究を展開するための基礎となるものと評価され、今後この知見が、排卵障害・黄体機能不全の病態解明に応用されることが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。