
栄養膜細胞から分泌される ホスホリパーゼ阻害タンパク質の機能解析

東海大学総合農学研究所・特任助教 松野 雄太

■ 目的

近年、様々な研究から、着床を誘導する未知の因子の存在が示唆されているが、その実態は明らかとなっていない。申請者らは、2020年度旗影会研究助成において、ヒツジ栄養膜細胞における着床直前の時期特異的に高発現する数百種類の機能未知遺伝子の中から、ホスホリパーゼ阻害活性配列を有す分泌型タンパク質をコードする遺伝子を同定した。これまで、ホスホリパーゼ阻害タンパク質が着床に及ぼす影響の報告はどの動物種でも全くなく、子宮内膜におけるホスホリパーゼ活性の時期特異的な阻害が着床を誘導する制御機構である可能性がある。

そこで本研究は、申請者らがクローニングしたホスホリパーゼ活性阻害遺伝子が子宮内膜細胞のホスホリパーゼ A によって制御されるシグナル伝達とホルモン分泌に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

■ 方法

クローニングした遺伝子の配列について、コドン最適化を実施し、分泌型の His タグ融合タンパク質の哺乳細胞発現用プラスミドベクターを作製した。293 細胞の用い、トランスフェクション法に一過性発現によって目的の組換えタンパク質を作製し、His タグ精製した。

組換えタンパク質をウシ子宮内膜細胞に添加培養し、ELISA 法と Western blot 法を用いて子宮内膜細胞におけるプロスタグランジン F2 α (PGF2 α) 分泌と mTOR シグナル伝達経路に及ぼす影響を解析した。さらに、5 型ホスホリパーゼ A2 酵素活性に及ぼす影響を酵素阻害アッセイ解析した。

■ 結果および考察

上記方法により、100mm 細胞培養ディッシュ 1 枚あたり数百 ng の収量の組換えタンパク質が作製・精製されることを確認した。

ELISA 法と Western blot 法による解析の結果、作製した組換えタンパク質の添加によって、ウシ子宮内膜上皮細胞における PGF2 α 分泌量、及び mTOR タンパク質のリン酸化に及ぼす影響は確認されなかった。また、作製した組換えタンパク質について 5 型ホスホリパーゼ A2 酵素活性に及ぼす影響は観察されなかった。

■ 結語

本研究により、申請者らがクローニングしたホスホリパーゼ阻害遺伝子は、少なくとも今回実施した培養条件では子宮内膜細胞 PGF2 α 分泌量と mTOR タンパク質のリン酸化に影響を及ぼさないことが明らかになった。また、5 型ホスホリパーゼ A2 酵素活性を阻害しないことが明らかとなった。ホスホリパーゼは触媒する反応の種類により A, B, C, D の 4 種に大きく分類される。今後、ホスホリパーゼ A2 以外についても着目し、着床直前期に高発現するホスホリパーゼ阻害遺伝子の着床における機能の解明や、反芻動物の受胎率の向上へ貢献が可能か検討したい。

本研究に対して助成頂いた一般財団法人旗影会の関係者の方々、審査頂いた先生方、また、DNA サンガーシーケンスを実施頂いた東海大学生命科学統合支援センターの方々に深く感謝申し上げます。