

学 位 論 文 題 名

Biochemical analysis of follipsin, a novel serine
proteinase found in porcine ovarian follicular fluid

(ブタ卵巣濾胞液中に見いだされた
新規セリンプロテアーゼ follipsin の生化学的解析)

学位論文内容の要旨

哺乳類の卵細胞は、ホルモンのコントロールを受け、濾胞組織を形成して成長する。成熟した濾胞に見られる顕著な特徴は、濾胞液で満たされた濾胞腔の増大である。濾胞液は血漿からの浸出成分と濾胞細胞が分泌した成分から構成されている。近年この濾胞液中に、卵細胞の成長や排卵に不可欠な、様々な物質が含まれている事が明らかになってきた。

高橋ら(1992)はブタの卵巣濾胞液中に、アルギニンを含む合成ペプチドを特異的に切断し、濾胞の成熟と共に活性が増大するプロテアーゼを発見した。このプロテアーゼは、DFP、ロイペプチン、アンチバイン等の阻害剤によって強く阻害されることから、セリンプロテアーゼであると考えられる。このプロテアーゼの合成基質に対する基質特異性は、排卵直前の濾胞の濾胞液に存在することが知られているブラスミンとは明らかに異なっていた。

本学位論文の第1章は、この酵素の精製と生化学的特性の調査、及び組織内での分布について述べられている。この酵素はfollipsinと名付けられ、合成基質に対する活性を指標としてブタ濾胞液から精製された。40%硫酸沈殿、DE52カラム、CM52カラム、ペンザミジンセファロースカラム等の精製ステップを経て、約12,400倍まで精製した。SDS-PAGEで約85kDaの単一バンドが確認され、同バンドは還元条件では45kDaと32kDaの二本のバンドに分かれた。したがってfollipsinは、二本のポリペプチド鎖がS-S結合で連結した構造を持つタンパク質であると思われる。

この二本のポリペプチド鎖のアミノ末端側のアミノ酸配列を計32残基決定したと

ころ、両鎖ともヒト血漿カリクレインやヒト血液凝固因子XIaと高い相同性があった。また、follipsinは抗ヒト血液凝固因子XIa抗体とは反応しないが、抗ヒト血漿カリクレイン抗体とは若干反応すること、逆にマウス抗follipsin抗体もヒト血漿カリクレインと若干反応することから、follipsinはブタ血漿カリクレインである可能性が考えられた。しかし、ブタ血漿カリクレインを精製してfollipsinと比較してみたところ、精製時の数種のカラムに対する親和性が明らかに異なっていた。さらに15種類の合成基質を用いた基質特異性の比較からも、ブタ血漿カリクレイン、ヒト血液凝固因子XIa、follipsinの三者で明瞭な差が見られた。以上の結果から、follipsinは血漿カリクレインや血液凝固因子XIaと近縁の、未報告のプロテアーゼであると結論した。

次に血漿中のfollipsin活性の存否を知るために、ブタ血漿タンパク質をDE52カラムで分画し調べた。follipsinが溶出されるはずの塩濃度(0.04 M)では活性は全く認められなかったことから、少なくとも活性型follipsinは血漿中には存在しないと言える。

更に、ブタ卵巣皮質の切片を作成し、免疫組織化学的にfollipsinの分布を調べた。濾胞液、間質、血管内が強い陽性を示したが、顆粒層細胞や夾膜細胞は陰性であった。通常、濾胞液内に蓄積する物質は顆粒層および夾膜細胞で合成、分泌されることが多いが、この結果はfollipsinが間質細胞で合成され血流によって濾胞内に運ばれることを示唆している。また濾胞液以外の卵巣組織に存在するfollipsin活性は卵巣全体の10%以下であることや、血液中にfollipsin活性は検出されなかったことを考えると、間質あるいは血管内に存在するfollipsinは不活性型前駆体であり、濾胞液中に入ってから初めて活性化されると思われる。

follipsinは濾胞の増大と共に活性が高くなることから、濾胞成熟あるいは排卵に深く関わっていることが予想される。また、Arg-Xを選択的に切断することは、他のタンパク、例えば酵素や生理活性ペプチドのプロセッシングや分解を行う可能性を示唆している。

第2章では、follipsinの生理機能解明を目的として、その生理的基質を推定するための実験を行った。まず数種の市販のペプチドをfollipsinとインキュベートし、その産物をHPLCで分取し、アミノ酸組成を分析することにより、follipsinが分解の標的としやすいアミノ酸配列を調べた。その結果follipsinは、Arg-Xの前に疎水性アミノ酸があるときに、高い活性を示すことがわかった。濾胞液中に存在し、このようなアミノ酸配列をプロセッシングまたは活性化部位に持つ酵素として、組織プラスミノゲンア

クティペーター(tPA)前駆体がある。tPA前駆体は1本鎖型の不活性な酵素であり、活性化部位で切断を受けて2本鎖の活性型酵素になる。活性型tPAは不活性型プラスミノゲンを活性型のプラスミンに変換し、プラスミンは不活性プロコラゲナーゼを活性型のコラゲナーゼに変換する。プラスミンとコラゲナーゼは濾胞壁を分解し排卵を助長する。排卵時にこのようなプロテアーゼ活性化の連鎖反応(カスケード)が起こることは知られているが、tPA前駆体の活性化酵素は未だ同定されていない。この酵素がfollipsinではないかと考え、follipsinのtPA前駆体に対する作用を調べてみた。まずtPA前駆体の活性化部位を含む10残基のペプチドを合成し、これをfollipsinとインキュベートしたところ、活性化部位が正確に切断されることがわかった。次に1本鎖型のtPA前駆体をfollipsinとインキュベートし、その後にfollipsin活性を阻害剤によって抑えtPA活性のみを測定したところ、1時間のインキュベーションでtPA活性はプラトーに達し、6時間のインキュベーションの後でも活性は全く低下しなかった。コントロールとして用いたtrypsinは、同じく1時間でtPA前駆体を活性化したが、6時間ではtPA活性は最大時の5分の1程度にまで低下した。さらに1本鎖型のtPA前駆体をfollipsinとインキュベートし、2本鎖への分子変換を還元条件のSDS-PAGEで経時的に観察したところ、時間とともに1本鎖型tPA(分子量66,000)が減少し、分子量36,000と34,000の2本のバンドが増加するのが明らかであった。この2本のバンドは、既に報告されている、活性型tPAを構成する2本のポリペプチド鎖と同じ長さであった。

以上の実験結果は、follipsinがtPA前駆体の活性化に適した酵素であることを示している。さらに、上述の排卵カスケードの上流に、tPA前駆体の活性化酵素としてfollipsinが位置することを示唆している。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 高 橋 孝 行

副 査 教 授 堀 浩

副 査 教 授 鈴 木 範 男

学 位 論 文 題 名

Biochemical analysis of follipsin, a novel serine
proteinase found in porcine ovarian follicular fluid

(ブタ卵巣濾胞液に見いだされた

新規セリンプロテアーゼ follipsin の生化学的解析)

哺乳類の卵形成は、卵母細胞とそれを取り囲む多数の細胞からなる濾胞組織の中で進行する。これらの過程で共通に見られる現象の一つに、濾胞液と呼ばれる組織液の濾胞内蓄積がある。これまでの研究から、濾胞液の中には卵母細胞の成長や排卵に不可欠な、様々な物質が含まれていることが明らかにされつつあるが、物質の化学的同定や生物学的役割の解明について、分子レベルで詳細に研究された例は極めて少ない。本学位論文では、ブタ卵巣の濾胞液に含まれるタンパク質分子の同定とその生体内での役割を明らかにすることを目的に行った研究の成果として、新規プロテアーゼの発見、その酵素学的特性の詳細な検討、および生理機能解明の試みについて記述されている。得られた結果は次のごとく要約される。

(1) ブタ卵巣濾胞液から、Follipsinと名づけられた新しいプロテアーゼを、合成ペプチド基質Boc-Gln-Arg-Arg-MCA に対する活性を指標として精製した。40%硫酸沈澱、DE-52 およびCM-52ゲルを用いたイオン交換カラム、Benzamidine-Sepharoseゲルを用いたアフィニティーカラムにより、酵素の純化に成功した。

(2) Follipsin は 分子量が約 80,000のタンパク質で、45kDa と32kDaのポリペプチドがS-S結合した二本鎖酵素であることを示した。

(3) 本酵素がジイソプロピルフルオロリン酸、ベンザミジン、ロイペプチン、アンチパインにより強く阻害されることを示し、セリンプロテアーゼの一種であることを

明らかにした。また各種の合成ペプチド基質を用いた基質特異性の調査から、本酵素がArg-X 結合の加水分解のみに関わることを示した。濾胞 (Follicle) に存在するトリプシン様セリンプロテアーゼであることから、Follipsin と呼ぶことを提唱している。

(4) Follipsin がヒト血漿カリクレインや血液凝固因子XIaと、構造上、相同なタンパク質であることを明らかにした。

(5) 本酵素の卵巣内での分布を免疫組織化学的手法により検討し、卵巣の濾胞腔および間質細胞に陽性であることを示した。間質由来の組織抽出液が酵素活性を示さないという生化学的事実から、Follipsin は卵巣の間質において不活性前駆体タンパク質として合成され濾胞組織に輸送された後、濾胞腔内で活性化を受けるという考えを提出している。

(6) Follipsinの天然ペプチド基質に対する作用を調べ、切断部位近傍におけるアミノ酸配列と切断効率の関係を明らかにした。切断を受ける Arg残基のアミノ基側に疎水性残基 (特にPhe) が存在する時、本酵素は高い切断活性を示すことを見いだした。

(7) 不活性前駆体の一本鎖プラスミノゲンアクチベータ(sc-tPA)が、Follipsinの生体内における基質の候補として検討された。その結果、本酵素がsc-tPAを速やかに二本鎖の活性型プラスミノゲンアクチベータ(2c-tPA)に変換することを実証した。以上の実験結果に基づいて、哺乳類排卵における濾胞壁破壊の過程で作動するプロテアーゼカスケード (プラスミノゲンアクチベータ/プラスミン系) において、Follipsin がsc-tPAの活性化酵素としての役割を果たしていると提唱している。

以上の成果は、これまで全く報告されたことのない新知見であり、排卵過程の分子レベルでの理解に大きく貢献するものである。審査員一同は、申請者が博士 (理学) の学位を得るのに十分な資格があるものと認める。