

学位論文題名

ヒト卵胞液における Plasma Kallikrein の分子動態と
卵胞内組織 Plasminogen Activator(tPA) 活性化機構

学位論文内容の要旨

緒言

組織 Plasminogen Activator (tPA)—plasminogen(以下 PLG)—plasmin系は、排卵に先立つ卵胞壁の脆弱化に重要な役割を担うと考えられている。このうち tPA は、前駆体の1本鎖型 (sc tPA) より2本鎖型 (2ctPA) への変換を受け活性化されることが知られているが、ヒト卵巣顆粒膜細胞で産生される tPA の卵胞内活性化機序は未だ解明されていない。この機序に関連して、本研究では、体外受精時に得られたヒト卵胞液を材料にヒト Plasma Kallikrein (hPK) の分離精製を行い、精製品を用いてヒト sc tPA 活性化能の有無について検討した。

研究材料および方法

1. 卵胞液 hPK の分離精製

1996年10月～12月の期間に、北海道大学医学部附属病院産婦人科において、体外受精の際に得られた卵胞液を材料とした(GnRH α -hMG-hCG過排卵刺激周期)。

卵胞液上清に6倍量PBSを加えて希釈し、40%硫酸塩析にて析出した分画を脱塩透析した。この分画をDEAE-cellulose(DE-52)陰イオン交換カラム(pH8.5)に通し、吸着成分を0～0.2 M NaCl連続濃度勾配にて溶出したところ、カラムに非吸着のThr.#1,吸着し0.05M,0.13M NaClにより溶出されたElt.#1,Elt.#2の3つのhPK分画が分離された。Thr.#1はCM-cellulose(CM-52)陽イオン交換カラム(pH8.0)に吸着し、NaCl連続濃度勾配により溶出された。この分画は更にbenzamidine-Sepharose 6Bカラムを用いて精製された。Elt.#1は、CM-52カラムをpH6.0に平衡化した以外はThr.#1と同じ方法で精製された。Elt.#2は、濃縮後Sephacryl S-300カラムを用いたゲルろ過およびheparin-Cellulofineカラムを用いて精製された。

hPK活性の測定には、合成MCA(4-methylcoumaryl-7-amide)基質を用いた。検体を基質とpH8.0,37°Cで30分間反応させた後、反応停止試薬(pH4.3)を加えて反応を停止した。分光光度計を用いて波長370nmで励起された波長460nmの蛍光強度を測定し、遊離した7-amino-4-methylcoumarin(AMC)濃度に換算し、1分間あたりの遊離AMC濃度をhPK活性とした。

2. 各分画の特性の検討

a)8種類のMCA基質を用いて3分画の基質特異性を、また、12種類の蛋白分解酵素阻害剤を添加して3分画の活性に対する阻害効果を比較検討した。

b)Thr.#1,Elt.#1に対しては、還元下、非還元下で10%polyacrylamide gelを用いてSDS-PAGEおよび銀染色を、また、ウサギ抗hPK抗体を用いたWestern blot法を行った。Elt.#2に対しては、2～15% gradient native PAGE gelを用いてnative PAGEおよびCoomassie Brilliant Blue(CBB)染色を、そしてウサギ抗hPK抗体およびヒツジ抗ヒト α 2-macroglobulin(以下 α 2-M)抗体を用いたWestern blot法を行った。また、Thr.#1,Elt.#1について、Sephacryl S-200カラムを用いてゲルろ過を行い、Elt.#2の精製過程におけるゲルろ過の結果も併せて分子量を推定した。

c)3分画の精製品とヒトsctPAおよび合成MCA基質を用いて,aprotinin存在下で選択的にtPA活性を測定し,3分画のsctPA活性化能の相違を検討した.

d)3分画の精製品に,種々の量のウサギ抗hPK抗体を加えて免疫沈降を行った.4°Cで17時間静置後10%Staphyrosorbを加え,軽く攪拌しながら更に4時間静置した後遠心分離し,上清の残存hPK活性を測定して対照と比較した.Elt.#2に対しては,ヒツジ抗 α 2-M抗体を用いた免疫沈降法をも行い,残存hPK活性に加えて残存sctPA活性化能についても検討した.

3. 単一卵胞の卵胞液総hPK活性の測定

1995年9月~1996年2月の期間に,1.に示した方法で卵胞ごとに採取,-80°Cで保存された卵胞液(270検体)の上清8 μ lを用いて,1.に準じて総hPK活性を測定し,卵胞液量との相関の有無を検討した.また,手術時に採取した自然排卵周期(LH surge前)の卵胞液(6検体)についても,同様にhPK活性を測定した.

卵胞液の採取にあたっては,対象患者から予め文書で本研究に対する同意を得た.

結 果

1. 精製

Thr.#1,Elt.#1,Elt.#2各々より,specific activity 63.2,54.4,11.8(nmol/min/mg protein),収率2.69,1.06,9.42(%),精製倍率341.85,294.00,48.76(倍)の最終精製品が得られた.

2. 各分画の特性

3分画の基質特異性には,peptide末端のArg-X結合を特異的に切断することなど血漿由来のhPKと共通の傾向が認められた.いずれも活性はDFP(diisopropylfluorophosphate),leupeptinに強く阻害されており,serine proteinase群に属すると考えられた.ただしpolypeptide性阻害剤のElt.#2に対する作用は弱かった.

非還元下SDS-PAGEではThr.#1は分子量87kDaの位置に,Elt.#1は90kDaの位置に単一のバンドとして検出された.これらのバンドはWestern blot法でも検出された.還元下では50kDaの位置に両者共通のバンドが認められた.Elt.#2はPAGEでは730kDaの位置に単一のバンドとして検出され,これは抗hPK抗体はもとより,抗 α 2-M抗体を用いたWestern blot法においても検出された.ゲルろ過により,Thr.#1,Elt.#1,#2の分子量は各々約80,89,725kDaと推測された.いずれも*in vitro*でsctPAを活性化し得たが,Elt.#2の活性化能が最も高かった.

Thr.#1,Elt.#1とも,免疫沈降法により残存したhPK活性は用量依存的に低下した.Elt.#2については抗hPK抗体,抗 α 2-M抗体のいずれを用いた場合も残存hPK活性は消失,あるいは著明に低下したが,残存sctPA活性化能については,抗 α 2-M抗体の添加により低下を認めたものの,抗hPK抗体を用いた場合は殆ど変化しなかった.

3. 卵胞液量と卵胞液総hPK活性との関連

個別保存された卵胞液270検体を用いて測定した総hPK活性は 11.56 ± 4.93 nmol/ml/min(m \pm SD)であり,活性は卵胞液量とは相関しなかった.自然排卵周期の卵胞液6検体の総hPK活性は 9.29 ± 3.18 nmol/ml/min(m \pm SD)であった.

考 察

本研究で分離精製された3分画は,酵素化学的,免疫学的にはいずれもhPKの性質を有する.このうちElt.#1はその推定分子量などからfree hPKであると,またThr.#1はhPKと分子量は異なるものの機能的には同一で,hPKのisomerであると考えられた.このisomerは,hPKとは荷電状態が異なる,極端に塩基性の分子であり,hPKのtranscate formであると思われる.このisomerが存在する生理的意義として,卵胞内のpH,荷電状態などが変動しても,常にsctPA活性化能を一定の水準以上に維持できるという点が挙げられる.

Elt.#2は,強力なproteinase inhibitorであるh α 2-MとhPKとの複合体である.この分画のsctPA活性化能は3分画で最も強力であったが,この分画より免疫沈降法でhPKを除去しても同程度のsctPA活性化能を認めたことより,hPKとは異なるtPA activating enzyme(以下TAE)の存在が示唆される.この酵素もまたh α 2-Mと複合体を形成していると考えられる. α 2-Mと結合してもなお活性を示す酵素はこれまでに報告されていない.ヒト卵胞内sctPA活性化を主導しているのは,このTAEであろう.

卵胞液総hPK活性が卵胞液量と無関係であったことは、卵胞液中hPKは血漿由来であるという見解に矛盾しない。

以上より、ヒト卵胞破裂に関与するproteinase cascadeの新しいモデルを作成した。即ち、卵胞発育とともに血漿中よりhPKおよびそのisomer(以下hPKs)、PLG、高分子kininogen(以下HMWK)が卵胞内へ移行し、TAEとともに蓄積する。scfPAはLH surgeに伴い卵胞内へ分泌されると、速やかにTAE、hPKsにより2ctPAに変換され、PLGを活性化する。生じたplasminは直接的に、あるいはmatrix metalloproteinasesを介し間接的に卵胞壁を脆弱化し、並行してhPKsはHMWKよりbradykininを遊離して周囲の血管透過性を亢進させ、血漿成分のさらなる流入により卵胞容量は増大し、卵胞破裂に至ると考察される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 藤 本 征 一 郎
副 査 教 授 西 信 三
副 査 教 授 石 橋 輝 雄

学 位 論 文 題 名

ヒト卵胞液における Plasma Kallikrein の分子動態と 卵胞内組織 Plasminogen Activator(tPA) 活性化機構

組織 Plasminogen Activator(tPA)-plasminogen-plasmin系は、排卵に先立つ卵胞壁の脆弱化に重要な役割を担う。tPAは、前駆体の1本鎖型(sctPA)より2本鎖型(2ctPA)への変換を受け活性化されるが、ヒト卵巣顆粒膜細胞で産生されるtPAの卵胞内活性化機序は未解明である。本研究では、ヒト卵胞液を材料にヒト Plasma Kallikrein (hPK)の分離精製を行い、ヒトsctPA活性化能について検討した。

卵胞液上清に6倍量PBSを加え、40%硫酸塩析にて析出した分画を脱塩透析した。この分画をDEAE-cellulose(DE-52)陰イオン交換カラム(pH8.5)に通し、吸着成分を0~0.2M NaCl連続濃度勾配にて溶出したところ、カラムに非吸着のThr.#1,吸着し0.05M,0.13M NaClにより溶出されたElt.#1,Elt.#2の3つのhPK分画が分離された。精製の結果、Thr.#1,Elt.#1,Elt.#2各々より、specific activity 63.2, 54.4, 9.0 (nmol/min/mg protein),収率2.69, 1.06, 9.42 (%) , 精製倍率341.85, 294.00, 48.76 (倍) の最終精製品が得られた。

hPK活性の測定には、合成MCA(4-methylcoumaryl-7-amide)基質を用いた。検体を基質とpH8.0,37°Cで30分間反応させた後、反応停止試薬(pH4.3)を加えて反応を停止した。波長370nmで励起された波長460nmの蛍光強度を測定し、遊離した7-amino-4-methyl-coumarin (AMC)濃度に換算し、1分間あたりの遊離AMC濃度をhPK活性とした。

8種類のMCA基質を用いて3分画の基質特異性を、また、12種類の蛋白分解酵素阻害剤を添加して3分画の活性に対する阻害効果を比較した結果、3分画の基質特異性には、peptide末端のArg-X結合を特異的に切断することなど血漿由来のhPKと共通の傾向が認められ、いずれも活性はDFP(diisopropyl fluorophosphate),leupeptinに強く阻害されており、serine proteinase群に属すると考えられた。ただしpolypeptide性阻害剤のElt.#2に対する作用は弱かった。

非還元下SDS-PAGEではThr.#1は分子量87kDa, Elt.#1は90kDaの位置に単一のバンドとして検出された。これらのバンドはWestern blot法でも検出された。還元下では50kDaの位置に両者共通のバンドが認められた。Elt.#2はPAGEでは730kDaの位置に単一のバンドとして検出され、これは抗hPK抗体はもとより、抗 α 2-M抗体を用いたWestern blot法においても検出された。ゲルろ過により、3分画の分子量は各々約80, 89, 725kDaと推測された。

3分画の精製品とヒトsctPAおよび合成MCA基質を用いて、aprotinin存在下で選択的にtPA活性化を測定し、3分画のsctPA活性化能の相違を検討したところ、いずれもin vitroでsctPAを活性化し得たが、Elt.#2の活性化能が最も高かった。

3分画の精製品に、ウサギ抗hPK抗体を加えて免疫沈降を行った。Elt.#2に対しては、ヒツジ抗 α 2-M抗体を用いた免疫沈降法をも行い、残存hPK活性に加えて残存sctPA活性化能についても検討した。その結果、Thr.#1, Elt.#1とも、免疫沈降法により残存したhPK活性は用量依存的に低下した。Elt.#2については抗hPK抗体、抗 α 2-M抗体のいずれを用いた場合も残存hPK活性は消失、あるいは著明に低下したが、残存sctPA活性化能については、抗 α 2-M抗体の添加により低下を認めたものの、抗hPK抗体を用いた場合は殆ど変化しなかった。

ヒト単一卵胞の卵胞液総hPKについて検討した結果、個別保存された卵胞液270検体を用いて測定した総hPK活性は $11.56 \pm 4.93 \text{ nmol/ml/min (m} \pm \text{SD)}$ であり、活性は卵胞液量とは相関しなかった。

分離精製された3分画は、酵素化学的、免疫学的にはいずれもhPKの性質を有し、Elt.#1は推定分子量などからfree hPKであると、またThr.#1はhPKと分子量は異なるものの機能的には同一で、hPKのisomerであると考えられた。

Elt.#2のsctPA活性化能は最も強力であったが、この分画より免疫沈降法でhPKを除去しても同程度のsctPA活性化能を認めたことより、hPKとは異なるtPA activating enzymeの存在が示唆された。

公開発表に際し、石橋教授から、Elt.#1とElt.#2でDEAE-セルロースの次に用いたカラムを変えた理由、Elt.#2の電気泳動にnative PAGEを用いて分子量を推定したことの問題点、卵胞液量とhPK活性との関係における卵胞ごとの蛋白濃度の差の影響、精製した3分画の純度などについて、また西教授からは、使用したヘパリンカラムの特異性、 α 2-MとhPKとTAEの三つがcomplexとなっている可能性について、そして藤本教授からは、卵胞内でhPPKがhPKに変化する機序、Hageman factorが卵胞液中に存在する可能性、MMPsとプラスミンの卵胞壁脆弱化能での相違、自然周期と過排卵周期の卵胞液量ごとのhPK活性の差違などについて質問があったが、申請者は何れに対しても実験結果と文献的見解とか