

学 位 論 文 題 名

Studies on the bradykinin-producing system
in porcine ovary

（ブタ卵巢におけるブラジキニン産生系に関する研究）

学位論文内容の要旨

ブラジキニンは9つのアミノ酸からなる生理活性ペプチドであり、循環器系において血管拡張、血管透過性の上昇及び血圧低下などを引き起こす。ブラジキニンはカリクレイン-キニン系と呼ばれる機構において、前駆体であるキノーゲンからカリクレインの加水分解により産生されることが知られている。本論文では、これまでに知られていなかったブラジキニン及びカリクレイン-キニン系の卵巢における新たな役割について記載する。

哺乳類の排卵において、卵胞壁分解の役割を担っている酵素はマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）であると考えられているが、多数見出されている MMP 分子のうち、どれが排卵 MMP であるかは明らかになっていない。MMP は一般に不活性な前駆体として合成・分泌された後に、活性化されると考えられ、この過程はプラスミノゲン-アクティベーター-プラスミン系の作動により引き起こされると言われている。しかしながら、プラスミノゲン-アクティベーター-プラスミン系を作動させるメカニズムについては未だ不明な点が多い。1994 年、ブタ卵巢卵胞液よりセリンプロテアーゼ（フォリプシン）が単離精製され、この酵素がプラスミノゲン-アクティベーター-プラスミン系の作動に関与するという考えが提唱された。本学位論文の研究は、フォリプシンの活性化機構の解析から始められた。

セリンプロテアーゼは不活性な前駆体として合成・分泌され、他のプロテアーゼによる限定分解を受けることによって活性化する。フォリプシンも同様のメカニズムによって活性化されると考えられたので、フォリプシンの活性化機構を解明するために、ブタ卵巢卵胞液における一本鎖のフォリプシン前駆体の同定を試みた。その結果、卵胞液中よりトリプシンによって活性化し得るフォリプシン前駆体（プロフォリプシン）を精製することができた。また卵胞液中にプロフォリプシンを活性化する酵素活性が検出されたことから、プロフォリプシンを基質として、ブタ卵巢卵胞液からプロフォリプシン活性化酵素を精製した。精製酵素の解析及びこれをコードする cDNA クローンの解析から、この活性化酵素は血液凝固第 12 因子 a であることが判明した。

また、フォリプシンについても全一次構造を決定した。その一次構造は既に報告されているヒトのプラスマカリクレインと 80%近い相同性があり、フォリプシンがブタのプラスマカリクレインであることが示

された。

プラスマカリクレインと血液凝固第 12 因子はカリクレイン-キニン系を構成している分子であり、卵胞内においてカリクレイン-キニン系が作動している可能性が考えられる。そこで、ブタ卵胞液にプラスマカリクレインの基質である高分子量キノーゲンが存在するか否かについて検討したところ、その存在を確認できた。さらにカリクレイン-キニン系の最終産物であるブラジキニンが卵胞内に存在することを明らかにできた。卵胞に存在するプラスマカリクレイン、血液凝固第 12 因子、高分子量キノーゲンの由来を明らかにするために、ブタ卵巣及び肝臓の RNA を用いてノーザンブロット解析を行った。いずれの分子も卵巣での発現は認められず、肝臓において発現が確認された。従って、これらの分子は肝臓で合成された後、血流に乗って卵巣に運ばれ、卵胞内に蓄積すると思われる。

卵胞液に含まれるブラジキニン及びブラジキニン代謝産物である (1-5) ブラジキニンの定量を行ったところ、小さい卵胞の卵胞液には、大きい卵胞と比べて 5~6 倍量のブラジキニンが検出された。(1-5) ブラジキニンについても同様の結果が得られた。これらの結果から、卵巣においてカリクレイン-キニン系は卵胞成熟初期に作動しているものと考えられる。

次に、ブラジキニンの卵巣内における受容体の発現について検討した。RNAse プロテクションアッセイによって卵巣にブラジキニン B2 受容体が発現していることが確認できたので、さらに *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて、受容体発現部位及び細胞の同定を試みた。B2 受容体は、莢膜細胞、間質細胞では全く発現が認められなかったが、B2 受容体は小さな卵胞内の顆粒膜細胞に強く発現しており、一方、大きい卵胞の顆粒膜細胞ではほとんどその発現は検出されなかった。この結果は、卵胞液を用いたブラジキニン定量実験の結果と一致した。

本論文によって、ブラジキニンが卵胞成熟初期において重要な役割を果たしていることが初めて示された。循環器系においては、ブラジキニンは血管透過性を上昇させることが知られているので、卵巣においても、同様に、卵巣内血管と卵胞との間の物質輸送調節にブラジキニンが関わっている可能性が考えられる。従来からブラジキニンが排卵を引き起こす因子の一つであることが知られている。このような生理的役割とは別に、本研究によってブラジキニンが卵胞成熟過程にも関与していることが示されたことから、この新しい知見が、今後の卵巣機能に関する研究の発展に貢献するものと期待される。

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 bradykinin-producing system in porcine ovary

(ブタ卵巢におけるブラジキニン産生系に関する研究)

ブラジキニンは9つのアミノ酸からなる生理活性ペプチドであり、循環器系において血管拡張、血管透過性の上昇及び血圧低下などを引き起こす。ブラジキニンはカリクレイン-キニン系と呼ばれる機構において、前駆体であるキノーゲンからカリクレインの加水分解により産生されることが知られている。本論文では、これまでに知られていなかったブラジキニン及びカリクレイン-キニン系の卵巢における役割について新知見を記載したものである。

哺乳類の排卵において、卵胞壁分解の役割を担っている酵素はマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) であると考えられているが、多数見出されている MMP 分子のうち、どれが排卵 MMP であるかは明らかになっていない。MMP は一般に不活性な前駆体として合成・分泌された後に、活性化されると考えられ、この過程はプラスミノゲン-アクティベータ/プラスミン系の作動により引き起こされると言われている。しかしながら、プラスミノゲン-アクティベータ/プラスミン系を作動させるメカニズムについては未だ不明な点が多い。1994 年、ブタ卵巢卵胞液よりセリプロテアーゼ (フォリプシン) が単離精製され、この酵素がプラスミノゲン-アクティベータ/プラスミン系の作動に関与するという考えが提唱された。本学位論文の研究は、フォリプシンの活性化機構の解析から始められた。

セリプロテアーゼは不活性な前駆体として合成・分泌され、他のプロテアーゼによる限定分解を受けることによって活性化する。フォリプシンも同様のメカニズムによって活性化されると考えられたので、フォリプシンの活性化機構を解明するために、ブタ卵巢卵胞液における一本鎖のフォリプシン前駆体の同定を試みた。その結果、卵胞液中よりトリプシンによって活性化し得るフォリプシン前駆体 (プロフォリプシン) を精製することができた。また卵胞液中にプロフォリプシンを活性化する酵素活性が検出されたことから、プロフォリプシンを基質として、ブタ卵巢卵胞液からプロフォリプシン活性化酵素を精製した。精製酵素の解析及びこれをコードする cDNA クローンの解析から、この活

性化酵素は血液凝固第 12 因子 a であることが判明した。

また、フォリプシンについても全一次構造を決定した。その一次構造は既に報告されているヒトのプラスマカリクレインと 80% 近い相同性があり、フォリプシンがブタのプラスマカリクレインであることが示された。

プラスマカリクレインと血液凝固第 12 因子はカリクレイン-キニン系を構成している分子であり、卵胞内においてカリクレイン-キニン系が作動している可能性が考えられる。そこで、ブタ卵胞液にプラスマカリクレインの基質である高分子量キノーゲンが存在するか否かについて検討したところ、その存在を確認できた。さらにカリクレイン-キニン系の最終産物であるブラジキニンが卵胞内に存在することを明らかにできた。卵胞に存在するプラスマカリクレイン、血液凝固第 12 因子、高分子量キノーゲンの由来を明らかにするために、ブタ卵巢及び肝臓の RNA を用いてノーザンブロット解析を行った。いずれの分子も卵巢での発現は認められず、肝臓において発現が確認された。従って、これらの分子は肝臓で合成された後、血流に乗って卵巢に運ばれ、卵胞内に蓄積すると思われる。

卵胞液に含まれるブラジキニン及びブラジキニン代謝産物である (1-5) ブラジキニンの定量を行ったところ、小さい卵胞の卵胞液には、大きい卵胞と比べて 5~6 倍量のブラジキニンが検出された。(1-5) ブラジキニンについても同様の結果が得られた。これらの結果から、卵巢においてカリクレイン-キニン系は卵胞成熟初期に作動しているものと考えられる。

次に、ブラジキニンの卵巢内における受容体の発現について検討した。RNAse プロテクションアッセイによって卵巢にブラジキニン B2 受容体が発現していることが確認できたので、さらに *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて、受容体発現部位及び細胞の同定を試みた。B2 受容体は、莢膜細胞、間質細胞では全く発現が認められなかったが、小さな卵胞内の顆粒膜細胞に強く発現しており、一方、大きい卵胞の顆粒膜細胞ではほとんどその発現は検出されなかった。この結果は、卵胞液を用いたブラジキニン定量実験の結果と一致した。

以上のように、本論文は、ブラジキニン産生系がブタ（おそらく全ての哺乳類）卵巢に備わっていることを、さらにこの系が実際に卵巢で動していることを初めて示したものである。この新しい知見は、今後の卵巢機能の研究の発展に大きく貢献するものと期待される。

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。