

哺乳類の排卵機構に関する研究

Studies on the mechanism of ovulation in mammals

研究代表者 北海道大学大学院理学研究科生物科学専攻教授 高橋孝行
Prof., Division of Biological Sciences, Graduate School of Science,
Hokkaido University
Takayuki Takahashi

共同研究者 北海道大学大学院理学研究科生物科学専攻助手 大西淳之
Assistant, Division of Biological Sciences, Graduate School of Science,
Hokkaido University
Junji Ohnishi

Plasminogen activator, plasmin, and collagenases are generally thought to play a role in the follicle rupture during ovulation. We previously reported that the follicular fluids of human and porcine ovaries contain additional proteins which may be involved in the ovulatory process. One of such proteins is follipsin, which had been isolated from the porcine follicular fluid. Our attempts to search for an enzyme functionally homologous to porcine follipsin using the human fluid resulted in identification of plasma kallikrein. This finding prompted us to conduct the molecular cloning and structural studies of porcine follipsin. It was found that the protein is indeed plasma kallikrein. Plasma kallikrein activity in the follicular fluid is probably regulated through both proteolytic activation of its precursor protein by co-existing factor XIIa and inactivation by α_2 -macroglobulin. The porcine fluid contains high-molecular-weight kininogen, a well-known physiological substrate of plasma kallikrein, indicating that bradykinin could be produced in the follicles. Direct assays of (1-5)bradykinin using fluids from various sizes of porcine ovarian follicles revealed that small follicles contained the highest (1-5)bradykinin in the fluid.

研究目的

哺乳類の排卵は脳下垂体ホルモンの作用により誘起される複雑な生物現象の一つである。この過程は卵巣を包む固い外皮が消化（卵胞壁溶解）され成熟した卵母細胞が放出されることでクライマックス

を迎える。卵胞壁溶解には tPA/プラスミン系及びそれにより活性化を受ける数種のコラゲナーゼが関わると一般に考えられているが、これらのプロテアーゼが関わったカスケードの作動メカニズムについては未だ解明されていない。研究代

表者らは、ブタ卵巢の卵胞液から単離されたセリンプロテアーゼ「フォリプシン」が、試験管内で一本鎖の組織型プラスミノゲンアクチベータ (sctPA) をより強い活性を示す二本鎖のプラスミノゲンアクチベータ (tPA) へと変換できることを示した。従って、フォリプシンの生理的機能の一つは、sctPA の活性化により排卵時に作動するプロテアーゼカスケード反応の開始に役立っている可能性が考えられた。さらにこれまでの研究によって、フォリプシンが肝臓で合成された後、血流により卵巢へと運搬される可能性も示唆された。そこで本研究では、

- (1) フオリプシン遺伝子の肝臓における発現とその調節機構の解明
- (2) 肝臓で合成されたフォリプシンの卵巢への輸送機構の解明

の2点に取り組むことを目的とした。

研究経過

ブタ卵巢卵胞液から単離されたフォリプシンと相同の機能を有する分子が、他の哺乳類卵巢の卵胞にも存在するのか否かを検討するために、不妊症の治療を受けている患者由来の卵胞液からフォリプシン様酵素を単離した。詳しい解析を行った結果、ブタフォリプシンに相当する分子がプラズマカリクレインであることを明らかになった。ノーザン解析の結果から、プラズマカリクレイン遺伝子の発現が肝臓に限られていることが判明し、肝臓から循環系を介して卵巢の卵胞へと輸送されることが考えられた。

一方、ブタフォリプシンに関する発展的研究では、卵胞液中に不活性なフォリプ

シン前駆体分子が存在することを明らかにでき、その前駆体タンパク質の単離法を確立した。さらに、同じ卵胞液にフォリプシン前駆体分子を活性化できるフォリプシン活性化酵素が存在することも明らかにした。

ヒト卵巢卵胞ではフォリプシンに相当する分子がプラズマカリクレインであるという知見が得られたのを受けて、ブタフォリプシンの構造に着目した解析を行った。フォリプシンの cDNA クローニング及び部分一次構造解析から、フォリプシンがブタプラズマカリクレインであることを実証した。また、ヒトの場合と同様に、フォリプシン (プラズマカリクレイン) が肝臓で限定的に発現・合成されていることが確かめられた。さらに、上記のフォリプシン活性化酵素について構造解析を含めた詳しい解析の結果、それが血液凝固因子第12因子であることを明らかにした。

ブタ卵巢卵胞内に第12因子及びプラズマカリクレインが同定されたことから、哺乳類卵巢の卵胞にブラジキニン産生系が備わっている可能性について検討することにした。ブタ卵胞液から高分子量キニノーゲンが単離でき、これからプラズマカリクレインの作用によってブラジキニン (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) が産生されることを確認した。またブタ卵巢の卵胞成長と卵胞内ブラジキニン量の関係についての知見を得るために、異なるサイズの卵胞から採取した卵胞液中のブラジキニン量、実際は(1-5)ブラジキニン量、を定量した。その結果、

成長初期の卵胞内に高濃度で (1-5)ブラジキニンが検出された。

研究成果

本研究によって以下の知見が得られた。

- (1) ヒト卵胞液を用いてブタフォリプシンと相同な分子を探索したところ、プラズマカリクレインが同定された。ヒト卵胞液においては、プラズマカリクレインは free で存在する他、プロテアーゼ阻害活性を有する血漿タンパク質 α_2 -macroglobulin と複合体を形成している (Ohnishi et al., *Biomed. Res.*, 18:161-170, 1997)。またヒト卵胞液からプラズマカリクレインのアイソフォームが単離された (Kudo et al., *Biomed. Res.*, 18:369-374, 1997)。
- (2) ブタ卵巣の卵胞液からフォリプシンの前駆体分子が単離され、これを基質として用いる系によりフォリプシン活性化酵素の検出が可能になった (Kihara et al., *Eur. J. Biochem.*, 245:392-397, 1997)。
- (3) ブタ卵巣卵胞には、ヒトの場合と同様に、フォリプシン分子の一部は血漿タンパク質 α_2 -macroglobulin と複合体を形成して存在する (Kohyama et al., *J. Exp. Zool.*, 280:57-64, 1998)。
- (4) ブタフォリプシンの cDNA クローニングにより本タンパク質がプラズマカリクレインであることを明らかにした他、フォリプシンに優る tPA 活性化酵素が哺乳類

卵巣の卵胞中に存在することを示した (Takahashi et al., *Advances in Comparative Endocrinology*, 1463-1468, 1997)。

- (5) ブタ卵巣の卵胞に、プラズマカリクレイン、血液凝固因子である第 12 因子、高分子量キニノーゲンが存在することを明らかにし、卵胞内にブラジキニン産生系が備わっていることを証明した (論文準備中)。

今後の課題と発展

本研究助成によって、ブタ卵巣から単離されたフォリプシンがプラズマカリクレインであること、またその由来が肝臓であることが明らかにされた。卵巣の卵胞内にプラズマカリクレインが存在することが判明したことが契機となって、同じ卵胞液に、不活性前駆体のプレプラズマカリクレインを活性化できる酵素として第 12 因子があること、さらに活性化されたプラズマカリクレインの基質である高分子量キニノーゲンもあることが実証された。これらのコンポーネントからなるブラジキニン産生系が卵胞に備わっていることを示したのは本研究が初めてである。今後の課題は、(1) 卵胞内ブラジキニン産生系の生理的機能、(2) 本研究で新たに検出された tPA 活性化酵素の特性、の解明である。これらの問題の解決を通して、哺乳類における排卵現象の分子的背景が明らかになると考える。

発表論文リスト

1. Kihara, T., Ohnishi, J., Kohyama, K.,

- and Takahashi, T. "Identification and Activation of Profollipin, a Latent Precursor Form of Porcine Follipin" *Eur. J. Biochem.*, 245, 392-397 (1997)
2. Ohnishi, J., Murata, M., Kohyama, K., Yoshida, H., Wada, S., Makinoda, S., Fijimoto, S., and Takahashi, T. "Follicular Fluid from Human Ovaries Contains Plasma Kallikrein Complexed with α 2-Macroglobulin" *Biomed. Res.*, 18, 161-170 (1997)
 3. Kudo, T., Ohnishi, J., Murata, M., Wada, S., Yoshida, H., Fujimoto, S. and Takahashi, T. "An Isoform of Plasma Kallikrein Occurring in the Follicular Fluid of Human Ovaries", *Biomed. Res.*, 18, 369-374 (1997)
 4. Kohyama, K., Ohnishi, J., Murata, M., and Takahashi, T. "Presence of Follipin Complexed with α 2-Macroglobulin in Porcine Ovarian Follicular Fluid", *J. Exp. Zool.*, 280,57-64 (1998)
 5. Kimura, A., Ohnishi, J. and Takahashi, T. "Localization of Prolyl Endopeptidase mRNA in Small Growing Follicles of Porcine Ovary", *Mol. Reprod. Develop.*, 50,121-127 (1998)
 6. Takahashi, T., Matsui, H., Kihara, T., Kimura, A. and Ohnishi, J. "Identification and Partial Characterization of a Metallopeptidase from Porcine Ovaries". *J. Exp. Zool.*, 281,574-581 (1998)
 7. Matsui, H., Ohnishi, J., and Takahashi, T. "Proteolytic Activation of Tissue-type Plasminogen Activator by the Culture Media of Mouse Cancer Cells". *Zool. Sci.*, (in press)
 8. Takahashi, T., Ohnishi, J., Kihara, T. and Kimura, A. "Proteinases Involved in Follicle Rupture during Ovulation", *Advances in Comparative Endocrinology*, pp. 1463-1468, Monduzzi Editore, Italy (1997)
 9. Kihara, T., Kimura, A., Ohnishi, J. and Takahashi, T. "A Latent Precursor Form of Follipin and Its Activating Enzyme", *Advances in Comparative Endocrinology*, pp. 1545-1548, Monduzzi Editore, Italy (1997)
 10. Kimura, A., Ohnishi, J. and Takahashi, T. "Analysis of Prolyl Endopeptidase Activity and Expression during Follicular Maturation in Porcine Ovary", *Advances in Comparative Endocrinology*, pp. 1571-1575, Monduzzi Editore, Italy (1997)
- 上記の論文リストのうち、論文（2）～（10）は本研究助成金の活用により完成した業績である。