

(研究題目) 卵胞の成長過程で卵胞液に蓄積するプロテアーゼの役割  
Role of a proteinase that accumulates in extracellular spaces  
within growing ovarian follicles

(代表研究者) 高橋 孝行 北海道大学理学研究科 教授  
Takayuki Takahashi, Professor, Hokkaido Univ., Graduate school of science  
(協同研究者) 高橋 健治 東京大学理学部 教授  
Kenji Takahashi, Professor, Faculty of science, The Univ. of Tokyo  
守 隆夫 東京大学理学部 教授  
Takao Mori, Professor, Faculty of science, The Univ. of Tokyo  
川島 誠一郎 東京大学理学部 教授  
Seiichiro Kawashima, Professor, Faculty of science, The Univ. of Tokyo

### 3. 英文サマリー

We purified a novel serine proteinase (follipsin) from the fluid of porcine ovarian follicles, and characterized its properties in detail. Follipsin was shown to share several features with human plasma kallikrein and factor XIa, but the clear distinction was demonstrated. Follipsin is localized in follicular fluid as well as in stroma cells of porcine ovaries.

### 4. 邦文本文

#### 4-1. 研究目的

プロテアーゼはタンパク質の分解に関わる一群の酵素である。これらはタンパク質の生合成の速度と巧妙なバランスを保ちながら作用するので、生体内でのタンパク質レベルは大きく変化することなく、ほぼ一定に保たれる。また、プロテアーゼのあるものは、発生や分化などで見られるような劇的な組織学的変化を伴う生命現象にも深く関わっている。我々は、これまで、ほ乳類のプロリン特異的プロテアーゼの数種につき、卵巢や子宮などで特に高い発現が認められることに注目して、生化学的アプローチの他に、細胞学的、組織学的手法により生殖器官における役割の解明を目指してきた。その過程で、こらとは別に、卵胞の成熟に伴って卵胞液に蓄積される新しいタイプのプロテアーゼ活性があることを見いだした。未熟な卵胞と比較して、排卵直前の卵胞では4-5倍にも達する高い活性を示すことから、卵胞の成長から排卵までのプロセスで重要な役割を担っていると予想される。

本研究においては、この卵胞液プロテアーゼについて、

(1) 卵胞液に蓄積されるプロテアーゼの酵素学的特性および分子性状の検討

- (2) 卵胞内に蓄積される機構の解明
  - (3) 卵胞液プロテアーゼの生理的役割の検討
- を行うことを目的とした。

#### 4-2. 研究経過および成果

- (1) 卵胞液に蓄積されるプロテアーゼの酵素学的特性および分子性状の検討

本プロテアーゼの生物学的役割を明らかにするためには、プロテアーゼとしての性状を詳細に検討することが不可欠であるので、ブタ卵巣の卵胞液から本酵素の精製を試みた。約40頭の雌ブタの卵巣から採取した卵胞液を、硫酸分画した後、DE-52、CM-52の順にイオン交換カラムクロマトグラフィーを行い、さらにトリプシン様プロテアーゼに有効なアフィニティーカラムであるベンザミジンセファロースを用いたクロマトグラフィーにより精製酵素を得た。この精製標品を用いて本酵素の特性を調べた。SDS-PAGEでは、非還元条件下においては分子量8万のポリペプチドが、また還元条件下においては分子量が4.5万と3.2万の二つのポリペプチドが、それぞれ観察された。ゲル濾過カラムでは分子量8~8.5万の位置に活性が溶出されるので、本酵素は上記の異なるサイズのポリペプチドがジスルフィド結合によって結合したタンパク質であると考えられる。この酵素活性はDFP、アンチパイン、ロイペプチンにより強く阻害されることから、本プロテアーゼはArg-X結合を特異的に切断するセリンプロテアーゼの一種であると思われる。

この卵胞液由来のプロテアーゼの諸性質は血液凝固系の血漿カリクレインや第XIIa因子のそれらに類似していたが、各種合成基質に対する特異性、カラムクロマトグラフィーでの挙動、および部分アミノ酸配列は異なっていたので、この卵胞液セリンプロテアーゼは新規の分子であると結論できた。そこで、この新しいプロテアーゼをFollipsinと命名した。

- (2) 卵胞内に蓄積される機構の解明

卵胞液を構成するタンパク質成分は、卵胞内（か粒細胞またはきょう膜細胞）で生合成されたものか卵胞外（多くの場合肝細胞）で生合成されたものと考えられている。Follipsinの由来を明らかにするために、得られた

精製酵素に対する特異的抗体をマウスで作製して、卵巣における本酵素の分布を免疫組織化学的に調べた。ブタ卵巣では、ほとんど全ての卵胞の卵胞液がFollipsin抗体で陽性となった。この結果は生化学的な知見とも一致する。その他に、卵巣皮質の間質が強く染色された。これらの結果から、Follipsinの主たる合成の場は間質であり、それが分泌されて卵胞腔に達するものと考えられる。事実、間質には生体分子の合成および分泌活性を有する細胞が存在することが知られている。

### (3) 卵胞液プロテアーゼの生理学的役割の検討

本研究では、卵胞液に蓄積するFollipsinの生物学的役割の一つと考えられる重要な知見が得られた。それは、Follipsinが組織型プラスミノゲンアクチベータ(tPA)の不活性な前駆体を活性型に容易に変換できるという発見であり、ヒトを含めた哺乳類の排卵過程におけるFollipsinの関与が強く示唆された。

哺乳類での排卵とプロテアーゼの関係は古くから示唆されてきた。tPAとプラスミンが卵胞壁の分解に関わるプロテアーゼであるという Beersら(1975年)の知見は、その後、多くの研究により支持を受けて今日に至っている。しかしながら、最近になってtPAは不活性な前駆体(一本鎖)として生合成され、他のプロテアーゼによる限定分解を受けて活性をもつ成熟型(二本鎖)になることが示唆された。前駆体tPAの活性化に関わるプロテアーゼの同定が待たれていたが、本研究によって、Follipsin が前駆体tPAの活性化酵素である可能性が示された。

### 4-3. 発表論文リスト

1. Hamabata, T., Okimura, H., Yokoyama, N., Takahashi, T., and Takahashi, K. "Purification, Characterization, and Localization of follipsin, a Novel Serine Protease from the Fluid of Porcine Ovarian Follicles" *J. Biol. Chem.* 269:17899-17904 (1994)
2. 高橋孝行 "卵巣の濾胞成熟とプロテアーゼ" *生化学* 65:1425-1429 (1993)