

氏 名 (本 籍)	上 野 直 人 (東京都)
学 位 の 種 類	農 学 博 士
学 位 記 番 号	博 甲 第 257 号
学 位 授 与 年 月 日	昭 和 59 年 3 月 24 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
審 査 研 究 科	農学研究科 応用生物化学専攻
学 位 論 文 題 目	Biochemical Studies on Renin-binding Protein (レニン結合タンパク質に関する生化学的研究)
主 査	筑波大学教授 農学博士 村 上 和 雄
副 査	筑波大学教授 農学博士 安 井 恒 男
副 査	筑波大学教授 農学博士 山 中 啓
副 査	筑波大学教授 医学博士 熊 田 衛

論 文 の 要 旨

レニンは血圧調節に重要な役割を演じている分子量約 4 万の酵素である。レニンの主な産生場所は腎臓の傍糸球体細胞 (JC cell) であるが、腎臓の抽出液中には分子量 4 万のレニンの他に分子量約 6 万の高分子型レニンが存在することがゲル濾過法による分析によって知られていた。この高分子型レニンは分子量 4 万のレニンとレニンに特異的に結合するタンパク質との複合体であることが示唆されていた。しかしながら、このレニン結合タンパク質 (RBP) の生化学的な性質、あるいはレニンとの結合のメカニズムについては不明な点が多い。本論文では RBP とレニンとの結合を生化学手法を用いて解析し、得られた生化学的性質をもとに RBP の精製を行っている。

第 II 章ではレニンと RBP との結合を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いたゲル濾過法によって、レニンの分子量転換を指標として解析している。従来の低温下 (4℃) でゲル濾過法では分子量 4 万から 6 万へのレニンの分子量転換、つまりレニンと RBP の結合を確認するためにはテトラチオン酸などの SH 基の酸化剤の存在が不可欠であったが、室温で HPLC を駆使することによって SH 基の修飾剤の非存在下でもレニンと RBP の結合を確認できることを明らかにした。これによって生理的な条件下での高分子型レニンの存在が強く示唆され、RBP が生体内でレニンと結合することによって重要な役割を担っていると考えられるようになった。また HPLC によるゲル濾過法を用いたことによって、レニンと RBP の結合を約 40 分という短時間で分析することが可能になった。この分析方法を用いた一連の実験によって、レニンと RBP の結合は温度に依存していること、高濃度 (4

M) のNaCl存在下ではレニンとRBPの複合体は解離しやすいこと、pH 3.0の酸処理でRBPはレニンとの結合能を失うことなどが明らかになった。またこれらのレニンの分子量転換を総レニン活性に対する高分子型レニン活性の比率で表わすことによって、RBPのレニン結合性を半定量的に数値化することを確立した。これは後述のRBPの生化学的性質の解明や精製への発展を可能にした点で重要である。

レニンがRBPと結合することによって認められる分子量の変化は約2万であるが、実際のRBPの分子量は5万以上であるという報告もあり、その値は報告者によって様々であった。第III章ではゲル濾過法に代わる分子量の測定法として、Airfugeという小型の遠心機を用いた沈降平衡法によってレニンおよびレニンとRBPの複合体の分子量の解析を行っている。その結果、レニンの分子量はゲル濾過法によって得られた値とほぼ一致していたが、複合体の分子量はHPLCによるゲル濾過法で得られた値が約6万～7万であるのに対して沈降平衡法では113,000であれことが明らかになった。さらに、HPLCによって分離された分子量約6万の高分子型レニン（レニン—RBP複合体）画分を再びHPLCで分析すると、分子量約4万のレニンになることやHPLCの流速を遅くして分析することによって見かけ上、分子量が小さくなることから、レニンと複合体との間には速い平衡関係が存在し、この平衡はレニンとRBPの濃度およびゲル濾過の分析時間に依存することから、レニンとRBPの複合体の分子量はゲル濾過法では正確に測定できないと考えられた。

一方、レニンはその特異的阻害剤であるペプスタチンをリガンドとしたアフィニティーカラムに吸着するがRBPは吸着しないことを利用し、ブタ腎臓中のRBPをレニンと分離した。このRBPをUltrogel AcA 44によるゲル濾過法によって分画し、第II章で確立したRBPのレニン結合活性の測定によってRBPの分子量は約56,000であることを明らかにした。この結果によって、Airfugeを用いた沈降平衡法によって複合体の分子量がゲル濾過法によって得られた値よりかなり大きい約11万と得られたことが説明できる。さらに、レニンから分離されたRBP画分を試料として等電点電気泳動を行ったところ、RBPの等電点は4.9であった。

レニンは腎臓のJG cell内のレニン顆粒内に局在していることが知られている。本研究では、ショ糖密度勾配遠心法によるブタ腎臓の細胞分画によってレニン結合活性が可溶性画分に回収されたことから、RBPは細胞質に存在していると考えられた。これらの結果から、RBPは何らかの原因で顆粒外に放出されたレニンと細胞質内で結合するものと推測される。

第IV章ではRBPがレニンと結合して複合体を形成するとペプスタチンアミノヘキシルアガロースカラムに吸着することを利用して、RBP含量が高いことが知られているウサギの腎臓よりRBPの精製を行っている。あらかじめテトラチオン酸などのSH基の修飾剤を含む緩衝液で抽出し、レニンとRBPの複合体を形成しておき、DEAE—バッチ法、硫酸分画、ペプスタチンアファニティークロマトグラフィー、Ultrogel KcA 44によるゲル濾過を用いて抽出液よりレニン—RBP複合体を約4倍に精製した。この複合体の標品をSDSポリアクリルアミド電気泳動で分析したところ、分子量約43,500, 42,000, 37,000の3本のタンパク質のバンドが確認された。これらのタンパク質をポリアクリルアミドゲルからニトロセルロース膜に電気泳動的に転写し、レニン抗体を用いたPAP法によって

染色したところ分子量約 37,000 のタンパク質はレニンであることが確認され、これにより分子量約 43,500 および 42,000 のタンパク質がレニンと複合体を形成しているものと考えられた。そこで SDS-ポリアクリルアミドゲルよりこの 2 つのタンパク質のバンドを切り出し、電気泳動的に抽出、濃縮した。この方法によってレニンから分離された試料をモルモットに免疫して得られた抗体は、ウサギ腎臓中の複合体の形成を阻害したことから、この 2 つのタンパク質の少なくとも一方は RBP であると考えられる。

第 V 章ではヒトの傍糸球体細胞腫瘍 (Juxta glomerular cell tumor) の組織中にレニンおよび RBP の含量を検討している。この腫瘍は組織中のレニン含量が正常な腎臓に比べて 1 万倍以上であり、電顕的にも腫瘍細胞がレニン顆粒に富んでいることが観察されたことからレニン産生腫瘍であると考えられた。この腫瘍組織中のレニンの分子量を Ultrogel AcA 44 による低温下でのゲル濾過法で測定したところ、約 4 万であり正常な腎臓中のレニンの分子量と一致した。しかし、このレニン活性のピークのフラクションを 37°C で 15 分間インキュベートしたのちに HPLC を用い室温で分析したところ、分子量 4 万のレニンはすべて複合体を形成し高分子型レニンに転換していることが確認された。また同様の方法で、この患者の血漿を HPLC で分析したところ高分子型レニンが認められたことから、RBP の血中への放出と腎臓の疾患に何らかの因果関係があることが強く示唆された。さらに、血液の RBP と腫瘍組織中のレニンが結合することから血中の RBP は腎臓由来であることが推測される。また同時に、RBP は傍糸球体細胞で生合成され、その遺伝子の発現はレニン遺伝子の発現と非常に密接している可能性が強い。

これらの研究結果から、高分子型レニンはレニンとタンパク質の複合体であることが明らかになった。また、正常な細胞中でレニンと RBP が結合することは考えにくく、腎臓の疾患と何らかの関係があるという示唆を得た。

審 査 の 要 旨

レニンは体内の血圧調節に重要な役割を演じている酵素である。そのレニンに特異的に結合する Renin-Binding Protein (RBP) の存在は約 10 年前に示唆されていたが、その後の実験系が粗抽出液を用いたものであったため結合の機構、あるいは生理的役割は現在まで不明のままである。従って RBP の正体解明には、その第一段階として純品を得ることが不可欠である。本論文ではアフィニティークロマトグラフィーなどを巧みに駆使し、RBP を純化することに成功している。精製方法が確立されたことにより、今後大量調製を行えば、レニンと RBP の結合の詳細な機構、レニン・アンジオテンシン系における RBP の働きの解明、さらには臨床への応用も可能になる。このように将来さらに発展すると思われる RBP の研究において、本論文はその基盤を築いたと言え、非常に高く評価できるものである。

よって、著者は農学博士を受けるに十分な資格を有するものと認める。