

氏名(本籍)	宮崎均 (神奈川県)
学位の種類	農学博士
学位記番号	博甲第273号
学位授与年月日	昭和60年3月25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	Isolation and Characterization of the Human Renin RenIn Gene (ヒトレニン遺伝子の単離と性質決定)
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 田淵武士
副査	筑波大学教授 理学博士 原田宏
副査	筑波大学助教授 理学博士 広瀬茂久

## 論 文 の 要 旨

血圧調節に重要な役割を演じる酵素レニンは、主に腎臓の傍糸球体細胞で作られるが、含量が極めて低いため最近までその一次構造の決定が困難であった。しかし、遺伝子工学の導入により、1982年にマウス顎下腺レニンの全アミノ酸配列が、翌1983年には著者らによりヒトレニンの一次構造がcDNAより決定された。本研究では、このヒトレニンcDNAを用いて、ヒト染色体上のレニン遺伝子の単離及び構造解析を行った。

ヒト染色体DNAのライブラリーから約40万個のファージを、ブラク・ハイブリダイゼーション法によりスクリーニングした結果、7個のポジティブなクローンを得た。このうち2個をサザンプロテイング法などを用いて解析したところ、2個合せて16.7kbのヒト染色体DNAをカバーし、レニン遺伝子の両末端を含んでいることがわかった。そこで、サブクロニング、制限酵素地図作製、サザンプロテイングを行い、それに基づき、エクソン・イントロン境界領域、5'側非転写領域500ベース、3'側非転写領域20ベースの塩基配列を決定した。その結果、ヒトレニン遺伝子は11.7kbの長さを持ち、10個のエクソン、9個のイントロンより構成されていることが判明した。また他の真核生物の構造遺伝子と同様に、すべてのイントロンはGTで始まりAGで終る規則に従っていた。転写開始及び転写効率に関与するTATAボックス(Goldberg-Hognessbox)、CAATボックスは各々、転写開始点より29ベース、51ベース上流に存在した。TATAボックス上流は数個の回文構造が見出されたが、現在のところの役割については不明である。またポリアデニルレーションのシグナルと考えられているAATAAAの配列は、終止コドンから180ベース下流に存在し

た。興味深いことに、転写開始点から上流450ベース付近と190ベース付近に TGTTCT, TGTCCCT という最近グルココルチコイドレセプターの結合部位として同定された配列及びその類似配列が見出された。現在まで、腎レニンの生合成がステロイドホルモンにより制御されているという報告はない。しかしこの配列の存在は、グルココルチコイドによるレニン生合成誘導の可能性を示唆したと言える。またマウスとヒトのレニンのアミノ酸配列を比較した時、ヒトで165番目から167番目(ヒト活性型レニンのアミノ末端を1番目とする。)の3つのアミノ酸がマウスに対して余分に存在しているが、この3つのアミノ酸がわずかに9個のヌクレオチドから成るエクソン6と完全に対応していることがわかった。

ある種のマウスでは染色体上にレニン遺伝子が2個存在し、一方は主に腎臓で、他方は主に顎下腺で発現されている事実が証明されている。そこでヒトに関しても、染色体上にいくつかのレニン遺伝子が存在するかを調べてみた。染色体 cDNA と単離したレニン遺伝子を制限酵素 KpnI で切断し、電気泳動後、プロットハイブリダイゼーションを行い、ヒトレニン cDNA とハイブリダイズする DNA 断片を比較した。その結果、両者の結果は完全に一致し、ヒト染色体上にはレニン遺伝子は1個のみ存在することが証明された。

1978年、Tang らにより、アスパラチルプロテアーゼファミリーは1つの共通の祖先遺伝子から進化し、その祖先遺伝子はさらに半分の大きさを持つ遺伝子の重複と融合によって生じた、という仮説が提唱された。レニンやペプシンもアスパラチルプロテアーゼの一種であり、最近、マウスレニン、ヒトペプシン遺伝子の構造決定が行われたので、本研究で決定したヒモレニン遺伝子とこれらを相互に比較することにより、この仮説について検討を加えた。ヒトレニン遺伝子が、他とくらべて1つ余分なエクソン(エクソン6)を持つことを除外すれば、これら3者の間で以下の類似点が見られた。①遺伝子が9個のエクソンと8個のイントロンから構成されている。②エクソン、イントロンの長さや位置関係が酷似している。③タンパク一次配列中で、イントロンがコドンとコドンの間を分断するか、あるいはコドン中を分断するかが3者で完全に一致する。④アミノ酸配列の相同性が高い。特に活性中心近傍は酷似している。以上の事実は、アスパラチルプロテアーゼが共通の祖先遺伝子に由来するという仮説を強く支持している。次に、この祖先遺伝子が、半分の大きさから成る遺伝子の重複と融合によって生じたかどうかについて検討した。ヒトレニン遺伝子に関して、エクソン6を除外すれば、①構造上、エクソン2から5、エクソン7から10の2つのクラスターに分けられる。②アスパラチルプロテアーゼは2つのアスパラギン酸が活性発現に必須であるが、この2つのアスパラギン酸が各々クラスターの同等の位置(エクソン3とエクソン8)に存在する。これらの事は上記の仮説、すなわち、エクソン2から5を含む遺伝子から重複によって7から10を含む遺伝子が生じ、その後融合したとする考えを支持している。そして、マウスには存在しない9個のヌクレオチドから成るエクソンがヒトで存在する点に関しては、遺伝子の重複後、この短いエクソンを含む DNA 断片が挿入されたと解釈するのが妥当であろう。

最近 Craik らは、タンパクファミリーの長さのポリモルフィズムは、エクソン・イントロンの境界部位の移動(スライティング)に起因し、これが同じファミリー内での性質のわずかな相違につな

がるという仮説を唱えている。この仮説は、エクソン・イントロン境界部位がタンパクの立体構造上表面に出る傾向があるという規則と、同じファミリー内のタンパク同士のアミノ酸の欠損、挿入がエクソン・イントロンの境界部位とよく一致するという規則を根拠としている。これらの知見は、セリンプロテアーゼやジハイドロフォレートリダクターゼのアミノ酸配列、遺伝子構造、タンパク立体構造を比較することで得られている。アスパラチルプロテアーゼもタンパク一次構造、立体構造がよく調べられ、特にヒトレニンに関しては、遺伝子構造が今回決定され、さらに立体構造模型も作製済みであるので、これを利用してアスパラチルプロテアーゼがこれら2つの規則に従っているか否かの検討を行った。その結果、活性型レニンに存在する8個のスプライシング接合部位のうち、7個がアミノ酸欠損あるいは挿入部位と一致し、またこの8個のスプライシング接合部位は、タンパクの表面あるいは表面近くに位置することがわかった。このように、アスパラチルプロテアーゼについても Craik らの発見した規則性は当てはまり、彼らの仮説の一般性が支持された。

本研究ではヒトレニン遺伝子を単離し、エクソン、イントロンの構成、発現効率に重要な役割を果す転写開始点上流について詳しい解析を行った。一般にタンパクの生合成の調節は転写レベルで行われていることが多く、遺伝子を解析することはタンパク生合成の制御を知る上で不可欠と言える。レニンに関してもグルココルチコイドレセプターの結合配列が見出された。レニンが実際にグルココルチコイドの制御を受けているか否かはさらに検討が必要であるが、この配列の存在は、今後のレニンの生合成の研究に1つの問題を提起したと言える。また、今回ヒトレニン遺伝子の構造を解析することにより、アスパラチルプロテアーゼの進化及びタンパクファミリーの長さのポリモルフィズムの原因についての仮説に検討を加えることができる。そしていずれの仮説についても、その正当性を支持する結果が得られた。特に前者の進化の仮説では、今まではアミノ酸配列やタンパク立体構造の比較が根拠となっており、本研究で遺伝子レベル解析を加えたことは重要な意味を持つと言える。

## 審 査 の 要 旨

酵素レニンは末梢血管系での昇圧作用以外に、最近、中枢神経系を介しての働き、神経伝達物質生成への関与など、他の働きが注目されている。レニンの真の生理的意義の解明には、その生合成制御の理解が不可欠と考えられるが、本研究では、遺伝子工学の手法を導入し、遺伝子レベルでレニンの発現調節を知る試みがなされている。ヒトレニン cDNA を用いてヒト染色体上からレニン遺伝子を単離し構造解析を行った結果、転写調節部位にグルココルチコイドレセプターの結合配列が見出され、レニン生合成が、ステロイドホルモンであるグルココルチコイドの制御を受けている可能性が示唆された。現在、レニン生合成の調節因子として多くの物質が考えられているが、還元した組織を用いた実験が多く、決定的な証拠を欠いている。この状況下で、最も基礎的な遺伝子レベルからのアプローチは大きなインパクトを与えたと言える。また、ヒトレニン遺伝子の構造解析

は、レニンの属するカルボキシプロテアーゼの進化の仮説に、遺伝子レベルからの根拠を与えるなど、他の分野にも大きな影響を及ぼす価値のあるものであった。

よって、著者は農学博士の学位を受けるに十分な資格を有するものとみとめる。