

【22】

氏 名 (本 籍)	きむ	せい	じん	鎮 (韓国)
学 位 の 種 類	農	学	博	士
学 位 記 番 号	博	甲	第	4 2 5 号
学 位 授 与 年 月 日	昭	和	62 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			
学 位 論 文 題 目	PROCESSING OF HUMAN RENIN PRECURSOR AND PURIFICATION OF PLASMA PRORENIN ヒト・レニン前駆体のプロセッシングとプラズマプロレニンの精製			
主 査	筑波大学教授	農学博士	村	上 和 雄
副 査	筑波大学教授	理学博士	新	井 勇 治
副 査	筑波大学助教授	農学博士	日	下 部 功
副 査	筑波大学助教授	医学博士	井	柳 堯

論 文 の 要 旨

腎臓から血中に分泌される酵素レニンは、血圧調節に重要な役割を演じている。レニンの主な産出場所は腎臓の傍糸球体細胞 (JGC Cell) で、生合成された後、血中に放出される。ヒトレニンはペプスタチン-アフィニティークロマトグラフィーを導入して、ブタ腎臓から精製に成功してから、この手法を用いてヒトを含む数種の腎レニンが精製された。微量のため、構造の解析が不可能であったレニンは遺伝子工学的手法の導入によってマウス・レニンとヒト・レニンの全塩基配列とアミノ酸配列が決定された。ヒトレニンのプロセッシングの過程は、遺伝子工学的に決定されたアミノ酸配列より推定されているが、その詳細、真偽は不明である。そして、純化したヒトレニンの分子量はゲル濾過法では40,000~43,000、SDS 電気泳動法では36,000~40,000であるが、この活性型レニン以外に活性を持たない分子量50,000~58,000の不活性型レニンの存在も知られている。この不活性型レニンは、特にヒトの血中では総レニン量の7~8割を占めている。このトリプシンによって活性化し得る不活性型レニンは生合成の前駆体であるプロレニンなのか、あるいは役目を終えたレニンが不活性化された代謝産物なのかは不明である。現在、この不活性型レニンの実体の解明、及びレニンが腎臓で生合成されてから血中に分泌されるまでの機序の解明は、レニンの基礎的研究においては不可欠である。そこで本論文では、無細胞タンパク

質合成系，ラジオシーケンス，ヒトレニンプロフラグメントの部分特異的抗体を駆使して，ヒトレニンのプロセッシングに関して検討を行った。また，血中の不活性レニンの実体を明らかにするために，プロフラグメントの部分特異的抗体をリガンドとする免疫親和性カラムを用いて，ヒト血中から不活性型レニン（プロレニン）の精製を行った。

第Ⅰ章では，レニン産生腫瘍から調製したポリ（A⁺）RNAを用い，無細胞タンパク質合成系でヒトレニン前駆体の生合成と糖の付加，加水分解酵素によるプロセッシングなどを含む翻訳後修飾に関して検討を行った。調製したポリ（A⁺）RNAを用いて小胞体膜の存在，非存在下でウサギ網状赤血球ライセートの無細胞タンパク質を合成し，SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った後，³⁵S 標識されたレニンの前駆体をフルオログラフティーで分析した。その結果，レニンはまず，Mr = 45,000として生合成され，小胞体で糖鎖が結合し Mr = 47,000になることが分った。タンパク質に糖鎖の付加を阻害する抗生物質であるツニカマイシンの存在下では，小胞体膜を通過したレニンの分子量は43,000であるので，糖鎖の分子量は4,000と推定される。ヒトレニンは小胞体膜を通過する際，アミノ末端からアミノ酸20個のシグナルペプチドが切断されてプロレニンとなると推定された。しかし，シグナルペプチダーゼによって切断される場所を明確にするために，小胞体膜の存在下でタンパク質の合成を行い，HPLC,あるいはSDS-PAGEにより³⁵Sと³Hで標識されたプロレニンを精製し，ラジオシーケンス法より，シグナルペプチドとプロフラグメントは，各々アミノ酸23個，43個から構成されることが判明した。これらの翻訳後修飾を生細胞で検討するために，アフリカツメガエルの卵母細胞を使って mRNA を注入する技術（micro-injection technique）によって細胞内に注入し，合成されたタンパク質の修飾を調べた。その結果，medium中に分子量47,000のプロレニンが，検出された。ツニカマイシンの存在下では分子量が，43,000になることから，糖鎖の分子量は約4,000であることが明らかになった。そして，糖鎖を持っていない Mr = 43,000のプロレニンをトリプシンで処理した時，分子量は，36,000に変化した。これは糖鎖を持っていない活性型レニンと考えられる。これらの結果からレニンが生合成されてから分泌されるまでに至る各段階での分子量と修飾を受ける細胞内での場所が明らかになった。しかし，ヒト血中の不活性型レニンの性状については不明の点が多いため，プロ部分特異的抗体を用い，不活性型レニンの同定を行った。まず，レニン前駆体のプロ部分の46個のアミノ酸の全領域をカバーするように4種類のペプチドを合成しN末端寄りのものから順にPro 1, Pro 2 A, Pro 2 B, Pro 3と名づけた。これらのペプチドをKLH（Keyhole Limpet Hemocyanin）にカップリングさせ，ウサギに免疫し，抗体を作成した。抗体はいずれも腎の傍糸球体細胞を特異的に染色することから実際にレニン前駆体と反応することが確かめられた。血中の不活性型レニンのトリプシンによる活性化はPro 1抗体，Pro 2 A抗体，Pro 2 B抗体によっては何ら影響されなかったが，Pro 3抗体により完全におさえられた。また，それぞれの抗体をリガンドとして作成した免疫親和性カラムのクロマトグラフィーによってもPro 3の抗体の親和性ゲルのみプロレニンと結合したので，血中の不活

性型レニンとは短いプロフラグメントを持つレニンの前駆体であるという結果を得た。しかし、レニンは生合成後、小胞体膜を通過する際シグナルペプチドが切断され分子量が47,000のプロレニンになるが、血中のプロレニンはプロフラグメントの一部しか持っていないため、小胞体膜を通過し、Golgi 体で修飾を受け、分泌顆粒になるまでプロ部分の大部分が切断されると考えられる。そこで、ヒト腎臓の連続切片を作成し、プロ部分特異的抗体を用いて免疫組織染色を行った。原顆粒 (Proto granule) は Pro 2 A 抗体と Pro 3 抗体によって特異的に染色されるが、Pro 1 の抗体に対する染色は検出されなかった。Pro 1 の配列は顆粒球形成過程に入る直前に Golgi 体で切断されると考えられる。また、中間顆粒 (intermediate granule) では、Pro 3 の抗体によってのみ染色されるので Pro 2 A の配列は顆粒球形成の最初の段階で切断される。そして、成熟顆粒 (mature granule) では Pro 3 の抗体による染色はみられず、レニンの抗体による染色しか検出されなかった。これらのことから、Pro 3 の配列は顆粒球形成過程の中間段階で切断されると考えられる。以上の研究結果から、ヒト血中のプロレニンは顆粒球形成過程の中間段階のものが血中に分泌されると考えられるので、細胞からレニンが血中に放出される機構には活性型レニンの分泌経路 (成熟顆粒球のエキサイトーシスによる) と不活性型レニンの分泌経路 (中間顆粒数のエキソサイトーシスによる) との2つの機構が存在すると考えられる。

第Ⅱ章では、ヒト血中のプロレニンがプロフラグメント特異的抗体である Pro 3 の抗体と反応することを利用して、ヒト血中のプロレニンの精製を行った。血中のプロレニンは精製の段階でしばしば活性化されることから、完全精製は困難とされるため、血中のプロレニンの同定と性状はいまだに明らかではない。そこで、Pro 3 抗体の免疫親和性クロマトグラフィーを含んだ精製法を利用して、血中のプロレニンの精製を行った。まず、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過法、そして、Affi-Gel blue Sepharose カラムクロマトグラフィーによって、活性型レニンと不活性型レニンを分離し、Pro 3 抗体をリガンドとする免疫親和性クロマトグラフィーを行った。その後、分取用 HPLC カラムを用いたゲル濾過法によって純粋なプロレニンを得ることができた。この方法により、460,000倍の精製倍率まであげることができた。この方法により血中から簡単にプロレニンの精製ができ、今後プロレニンの性状が明らかにされるだろう。

審 査 の 要 旨

本論文は、ヒトレニン前駆体のプロセシングの過程を無細胞タンパク質合成系、ラジオシーケンス、レニンプロフラグメントの部分特異的抗体を駆使して調べたものである。ヒトの血液中には活性型レニンと不活性型レニンが存在するが、この不活性型レニンの性状は明らかではなかった。それゆえに、この、不活性型レニンの実体の解明、及びレニン腎臓で生合成されてから血中に分泌されるまでの機序の解明は、レニンの基礎研究において不可欠である。その意味で本

研究でレニン前駆体のプロセシングの解明と不活性型レニンの性質を明らかにしたことは高く評価される。不活性型レニンはある病的状態で量の変化が知られており、または、腎以外の組織でも存在が知られているので、本研究は、今後のレニンの研究の基礎的な研究にも役立つものである。

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認める。