

氏 名(本 籍)	^{きむ} 金	^{うおん} 元	^{しん} 信 (韓 国)
学 位 の 種 類	博	士	(農 学)
学 位 記 番 号	博	甲	第 976 号
学位授与年月日	平	成	4 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	Studies on prorenin converting enzyme of mouse submandibular gland (マウス顎下腺のプロレニン変換酵素に関する研究)		
主 査	筑波大学教授	農学博士	村 上 和 雄
副 査	筑波大学教授	理学博士	新 井 勇 治
副 査	筑波大学助教授	農学博士	祥 雲 弘 文
副 査	筑波大学教授	農学博士	田 仲 可 昌

論 文 の 要 旨

レニン¹は高等動物の腎臓²でもおもに合成されたのち血液中に分泌され、血圧調整や体液の電解質平衡の維持に重要な役割を果たすアスパルチルプロテアーゼである。ただしマウスにおいては、2つの別個の遺伝子 (Ren 1 および Ren 2 と命名されている) に由来するレニンの存在が知られており、Ren 1 レニンはおもに腎臓で、Ren 2 レニンはおもに顎下腺で産生される。レニンは細胞内の粗面小胞体でまず分子量の大きな不活性型前駆体 (プロレニン) として合成され、ゴルジ装置を通して分泌顆粒に移行するまでの過程で、塩基性アミノ酸対 (Lys-Arg) 部位で限定切断を受け活性型のレニンとなる。この限定切断を行う酵素 (プロレニン変換酵素) の実体は、基質となるプロレニンを十分量得るのが難しく良いアッセイ法がないために、全く不明であった。そこで本研究ではまずアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて作製したプロレニンを基質として用いてプロレニン変換酵素活性のアッセイ法を確立し、マウス顎下腺より本酵素を純品にまで精製し、その酵素学的性質を明らかにした。次に本酵素のcDNAをクローニングすることにより全一次構造を解明し、その機能に関する検討を行った。

〔I〕プロレニン変換酵素の精製

まずマウス Ren 2 プロレニンcDNAを鋳型としてインビトロでmRNAを合成し、このmRNAをアフリカツメガエル卵母細胞に微量注入した。この卵細胞を〔³⁵S〕メチオニンを含む培地中でインキュベートすることにより、標識プロレニンを得た。このプロレニンがレニンへと変換される際の分子量変化を指標としてマウスの各組織中のプロレニン変換活性を測定したところ、顎下腺においてのみ活性が検出された。またレニン産生量の高いオスのほうがメスよりもプロレニン変換活性は

高かった。

そこで、オスICRマウスの顎下腺よりプロレニン変換酵素の精製を行った。硫酸分画と3種類のカラムクロマトグラフィーを組合せることにより、顎下腺の細胞のタンパク約320mgより約2mgの本酵素が純品にまで精製され、以下の性質が明らかになった。

1) 本酵素の至適pHは7.5から8.5であった。2) 本酵素はゲル濾過およびSDS電気泳動の結果から分子量17kDaと10kDaの2つのポリペプチド鎖からなることが明らかになった。3) 本酵素はロイペプチン、アンチパイン、ベンザミジンで完全に阻害されることからセリンプロテアーゼであると考えられた。4) 本酵素は顎下腺型のマウスRen2プロレニンを特異的に切断し、腎臓型のマウスRen1プロレニンやヒトのプロレニンは切断しないことが明らかになった。5) プロセシング産物のN末端アミノ酸配列を決定することにより本酵素はマウス顎下腺型のRen2プロレニンをLys-Arg部位のC末端側で正確に切断することが明らかになった。

〔II〕プロレニン変換酵素の基質特異性

腎臓型マウスRen1プロレニンと顎下腺型のマウスRen2プロレニンはホモロジーが約95%であるにもかかわらず本酵素により顎下腺型のマウスRen2プロレニンは切断され、腎臓型のマウスRen1プロレニンは切断されない。この厳密な基質特異性を調べるため、両者の間の高い相同性を利用し、切断部位を含む39個のアミノ酸が入れ換わったキメラプロレニン、すなわちRen2型の切断部位をもったRen1プロレニンであるM1DKM2およびRen1型の切断部位をもったRen2プロレニンであるM2DKM1を作製し、本酵素による切断を調べた。その結果、本酵素はRen2型の切断部位をもつ野性型Ren2プロレニン及びM1DKM2キメラプロレニンを切断し、Ren1型切断部位をもつ野性型Ren1プロレニンおよびM2DKM1キメラプロレニンを切断しないことが明らかになった。このことからキメラプロレニンを作成した際に顎下腺型Ren2プロレニンと腎臓型Ren1プロレニンの間で入れ換えた切断部位周辺のアミノ酸39個が本酵素の切断に深く係わっていることが示唆された。両者で入れ換えた切断部位周辺の39個のアミノ酸では5カ所のアミノ酸が異なっている。その5カ所の置換のうち切断部位直後の置換に着目した。顎下腺型のマウスRen2プロレニンはSerであるのに対し腎臓型マウスRen1プロレニンはProである。一般に、Arg残基の後を切断するプロテアーゼ、例えば、トリプシンはArg-Pro結合を切断できないことが知られている。本酵素もこの性質をもつため腎臓型のRen1プロレニンを切断出来ない可能性が考えられた。そこで、一般にある特異的なアミノ酸の機能を解析するためによく用いられている部位特異的変異法を用いて顎下腺型Ren2プロレニンの切断部位直後のSerをProに置換したM2Pおよび腎臓型Ren1プロレニンの切断部位直後のProをSerに置換したM1Sの改変型プロレニンを作製し、本酵素による切断を調べた。本酵素は、切断部位直後にSerをもつ野性型Ren2プロレニン及びM1Sを切断し、切断部位直後にProをもつ野性型Ren1プロレニン及びM2Pを切断しないことが明らかになった。このことから本酵素もトリプシンと同様にArg-Pro結合を切断出来ないために腎臓型Ren1プロレニンを切断しないことが明らかになった。

次に、部位特異的変異法を用いてマウス顎下腺型のマウスRen2プロレニンの切断部位の塩基性

アミノ酸対にアミノ酸置換を導入し、本酵素による切断における塩基性アミノ酸対の役割を調べた。用いた改変型プロレニンでは野生型のRen 2 プロレニンの切断部位がLys-Argであるのに対して、Arg-ArgとしたM 2 RR, Lys-LysとしたM2KK, Arg-LysとしたM 2 RK, そして一つの塩基性アミノ酸をもったものとしてN末側の塩基性アミノ酸を塩基性アミノ酸でないGln-ArgとしたM2QR及びC末側の塩基性アミノ酸を塩基性アミノ酸でないLys-GlnとしたM2KQである。その結果、塩基性アミノ酸対のC末側の塩基性アミノ酸を塩基性アミノ酸でないGlnに置換したM2KQを除く全ての改変型プロレニンが本酵素により切断された。しかし、その切断の効率は異なっていることが分かった。そこで、各プロレニンの切断効率を見るために切断経時変化を調べた結果、塩基性アミノ酸対のC末側の塩基性アミノ酸がArgである野生型Ren 2 プロレニン、M2RR及びシングルArgであるM2QRは、すばやく切断されたのに対し、Lys-LysのM 2 KKは非常にゆっくりとした切断を受け、Arg-LysのM2RKはその中間的な速さで切断された。この結果から本酵素によるRen 2 プロレニンの切断にはLys-Argの塩基性アミノ酸対C末側の塩基性のアミノ酸が必須であり、N末側の塩基性アミノ酸は切断には必須でないことが明らかになった。また、そのC末側の塩基性アミノ酸はLysよりもArgの場合の方がより効率的に切断されることも明らかになった。

〔III〕プロレニン変換酵素の構造と機能

次に、精製した本酵素の一次構造の情報を得るためにN-末アミノ酸配列をそれぞれ、17kDaのポリペプチド鎖は20残基、10kDaのポリペプチド鎖は25残基について決定したところ、17kDaのポリペプチド鎖はVVGGFNXKKNSQPWQVAVYY, 10kDaのポリペプチド鎖はWQKPDDLQXVFIT-LLPNENXAKVYLであることが明らかになった。この配列はデータベース検索によりマウス顎下腺で上皮細胞成長因子 (EGF) の成熟に関与することが知られているEGF結合蛋白タイプBと同じものである可能性が示唆された。そのcDNAをマウス顎下腺ライブラリーから単離し解析したところ、本酵素はEGF結合蛋白と同一で、マウスの腺性カリクレインファミリーの一種であることが明らかになった。また、このcDNAをCHO細胞 ((チャイニーズハムスター卵巣細胞) に導入し発現させたところ、その培養液中に分泌された本酵素はマウス顎下腺型のRen 2 プロレニンを正確にプロセンシングすることが明らかになった。これらの結果から本酵素はマウスの顎下腺で産生される2つの生理活性ポリペプチド、すなわちレニンと上皮細胞成長因子の成熟に関与していることが明らかになった。

審 査 の 要 旨

本論文は、これまで全く実体の不明であったプロレニン変換酵素を精製し、その酵素学的性質、構造および機能を解明した点が高く評価できる。

よって、著者は博士 (農学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。