

氏名(本籍)	た だ まさ ずみ 多 田 正 純 (広島県)		
学位の種類	農 学 博 士		
学位記番号	博 乙 第 558 号		
学位授与年月日	平成元年12月31日		
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当		
審査研究科	農 学 研 究 科		
学位論文題目	Sequence and Tissue-Specific Expression of Rat Renin mRNA (ラットレニンメッセンジャー RNA の配列と組織特異的発現)		
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	薬学博士	岡 田 典 弘
副査	筑波大学助教授	薬学博士	井 柳 堯

論 文 の 要 旨

典型的な内分泌系のひとつとして、レニン・アンジオテンシン系がある。腎臓で生合成されたレニンは、血中に放出され、肝臓より放出されたアンジオテンシノーゲンからアンジオテンシンⅠを切断する反応を触媒する。さらに、アンジオテンシンⅠは主として肺に存在する変換酵素により、生理活性を持つアンジオテンシンⅡに変換される。このアンジオテンシンⅡは、血管平滑筋に作用し、血管収縮を引き起こすとともに、副腎に作用し、アルドステロンの分泌を促進する。このように、レニン・アンジオテンシン系は、血圧調節や水分・塩分の調節に重要な役割を担っている内分泌系である。

近年、分子生物学の進歩に伴い、他のホルモン同様、レニン・アンジオテンシン系もまた、局所的に存在することが知られてきた。レニン・アンジオテンシン系において律速段階を触媒するレニンは、主要な生合成組織として知られてきた腎臓以外に、副腎・脳・下垂体・精巣・卵巣などにおいても存在することが、Northern blotting 法により明らかにされてきた。しかしながら、そのアクセシの時使用したプローブに問題があったため検出感度が低く、レニンを微量にしか発現していない組織において、その組織特異的な発現調節を調べることは困難であった。

そこで本研究では、局所的に存在する組織レニン・アンジオテンシン系の生理的な意義を解明するための第一歩として、高血圧のモデル動物として最もよく用いられているラットから、レニン cDNA を、単離し、その構造決定を行った。そして、レニンメッセンジャー RNA (mRNA) の発現量の少ない組織においてレニン mRNA を検出するために、高感度の RNase Protection Analysis を用

いて、レニン mRNA の組織分布を調べた。さらに、レニン mRNA の組織特異的発現を検討するために、このアッセイ系を用いて、低ナトリウム食とカプトプリルに対するレニン mRNA の組織特異的な変動を調べた。

I. ラットレニン cDNA のクローニング

血圧調節に関与するレニン・アンジオテンシン系の研究において、最もよく用いられているモデル動物はラットである。そのラット腎臓より、レニン cDNA を単離することを試みた。レニン mRNA 含量は、その主要発現組織として知られている腎臓でさえ、全 mRNA の0.01%以下と非常に低い。そこで、まず、腎臓レニン mRNA の誘導を行った。腎臓レニン mRNA 含量は、低ナトリウム食とカプトプリルの併用投与を長期間行うことにより、非投与に比べ、約15倍増加した。

このように、レニン mRNA を豊富に含んだ RNA より cDNA ライブラリーを作製し、マウスレニン cDNA をプローブとし、スクリーニングを行った。30万個の組み換え体をスクリーニングした結果、6個のポジティブなクローンが得られた。そのうち、最も長いクローンの全塩基配列を決定したところ、ラットレニン cDNA は1433塩基対から成り、アミノ酸402個の前駆体をコードしていることが明らかになった。

塩基配列より推定されたラットレニンは、マウスレニン1（腎臓型）と85%、レニン2（顎下腺型）と82%、そしてヒトレニンと68%の相同性を有していた。Asp を含む2つの活性中心近傍のアミノ酸配列は、レニンばかりでなく、他のアスパルチルプロテアーゼとも完全に一致した。また、Asn-X-Thr の推定される糖鎖結合部位はラットでは3ヶ所あり、マウスレニン1の部位とよく一致した。この cDNA をプローブとし、Northern blotting により、種々の組織におけるレニン mRNA の発現を調べたところ、腎臓では、1.6kbのバンドが検出されたが、他の組織においては全く検出されなかった。このことから、レニン mRNA の組織特異的発現を調べるためには、Northern blotting より感度の高いアッセイ系が必要であることが示唆された。

II. レニン mRNA の組織特異的発現

レニン mRNA の組織特異的発現を調べるために、Northern blotting よりさらに感度の高い RNase Protection Analysis を用い、どの組織でレニン mRNA が発現しているかを調べた。その結果、腎臓以外に、副腎・脳・肺・睾丸・下垂体・肝臓において、レニン mRNA が検出された。

次に、ここで同定された mRNA 腎臓で発現しているものと同じものかどうかを推定するために、5'側の mRNA 同定できるプローブを用い、RNase Protection Analysis を行った。その結果、腎臓と肝臓では同じ長さのバンドが検出された。ラットレニン遺伝子は全ゲノム中、1コピーしか存在しないことも考慮すると、腎臓と他の組織で発現されているレニン mRNA は、同じものであることが予想される。

腎臓においては、低ナトリウム食、あるいはアンジオテンシン変換酵素の阻害剤であるカプトプリルを長期間投与することにより、レニン mRNA が著しく増加することが知られている。そこで、同様の生理的条件下における、レニン mRNA の組織特異的発現を調べた。低ナトリウム食の投与に対し、レニン mRNA 量は、腎臓と同様に肝臓では増加したが、脳では変動しなかった。さらに、低

ナトリウム食に加えてカプトプリルを投与したところ、レニン mRNA 量は、脳では腎臓と逆に減少したのに対し、肝臓では変動しなかった。これらのことは、脳におけるレニン mRNA の発現調節機構が、脳以外の組織では異なることを示唆しており、局所的に存在するレニン・アンジオテンジン系の生理的意義を考える上でも興味深い。

さらに、局所的な組織レニン・アンジオテンジン系の役割を追求するために、レニン・アンジオテンシノーゲン、アンジオテンシン変換酵素がどの細胞に局在しているかを *In Situ* hybridization 等を用いて、検討を行っていかなければならない。

審 査 の 要 旨

本論文は、実験動物としてもっとも良く使われるラットを用いて、そのレニン cDNA をクローニングし、その塩基配列とレニン前駆体アミノ酸配列を明らかにした。さらに、このラットレニンの cDNA と高感度測定法を用いて、ラットレニン mRNA の発現が組織によって異なることを明らかにした。その際、レニンの組織特異的発現を支配する因子が組織によって異なることを明らかにしたことは、非常に高く評価できる。

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。