

氏名(本籍)	ひびのとしこ (神奈川県) 日比野 敏 子				
学位の種類	医 学 博 士				
学位記番号	博 乙 第 696 号				
学位授与年月日	平成 3 年 4 月 30 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	医 学 研 究 科				
学位論文題目	心房性ナトリウム利尿ペプチドの分解を主とした中性メタロエンドペプチダーゼに関する研究 (Dissertation 形式)				
主 査	筑波大学教授	薬学博士	後 藤	勝 年	
副 査	筑波大学教授	医学博士	大 野	忠 雄	
副 査	筑波大学教授	医学博士	小 磯	謙 吉	
副 査	筑波大学教授	医学博士	杉 下	靖 郎	
副 査	筑波大学教授	理学博士	坂 内	四 郎	

## 論 文 の 要 旨

### <目 的>

心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) の代謝・分解はクリアランスレセプターと中性エンドペプチダーゼ (NEP) の両面より研究されているが、まだ明確な結論は得られていない。本研究は ANP の分解を酵素学的に詳しく検討して生体内における ANP の代謝経路を明らかにすることを目的とし、代謝に最も重要と思われる腎臓に着目してその尿細管および糸球体に局在する 2 種類の NEP が実際に ANP を分解するか否か、そしてそれぞれの酵素に対する抗血清が ANP 分解活性に如何に影響するかを調べた。又、腎臓以外の様々な臓器に在存する NEP の ANP 分解活性についても検討を加えた。

### <方 法>

(腎臓内科) 研究室で精製したヒト尿細管の Suc-(Ala)<sub>3</sub>-pNA を分解する酵素 (T 酵素) およびブタ糸球体の Suc-(Ala)<sub>3</sub>-pNA を分解する酵素 (G 酵素) を精製酵素標本として用いた。各種臓器における NEP 活性の検討は、Wistar 系雄ラットの腎・肺・心・肝・脳およびブタの腎 (尿細管と糸球体に分離)・肺・大動脈を用いて行った。それぞれの組織に 2 倍湿重量の 50mM tris-HCl buffer と 0.15 M NaCl を加えポリトロンでホモジェナイズしてから 3,000rpm で 10 分間遠心し、その上清を 12,000 rpm で更に 5 分間遠心して得た上清に、1% Triton X-100 を含む 50mM tris-HCl buffer (pH 8.0) を加えて酵素を可溶化した。更に、30,000rpm で 60 分間遠心して得られた上清をセルロース膜で透析し、部分精製酵素画分として実験に供した。 $\alpha$ -hANP の分解活性を調べる際には、50mM tris-HCl

buffer (pH8.0) に酵素もしくは酵素画分 $10\mu\text{l}$ を加え、これに $\alpha$ -hANP (最終濃度 $20\mu\text{M}$ ) を添加して全量 $100\mu\text{l}$ とし、精製酵素の場合には $37^\circ\text{C}$ で60分間、酵素画分の場合には20分間インキュベーションをしてから100%の酢酸 $10\mu\text{l}$ を加えて反応を停止させた。50mM tris-HCl buffer (pH7.4) にSuc-(Ala)<sub>3</sub>-pNA $10\mu\text{mol}$ と酵素または酵素画分 $20\mu\text{l}$ を加えて全量 $230\mu\text{l}$ とし、 $37^\circ\text{C}$ で10分間インキュベーション後、60%TCAにより反応を停止させた。酵素の $\alpha$ -hANPおよびSuc-(Ala)<sub>3</sub>-pNA分解活性は、逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により残存する基質を分離・定量することにより測定した。

#### <結果>

TおよびGの2種類の精製酵素は $\alpha$ -hANPを分解し、その分解活性はmetalloendopeptidase阻害薬であるphosphoramidon (最終濃度 $0.1\text{mM}$ ) で完全に抑制された。ブタ腎臓の尿管、糸球体画分はいずれも高い $\alpha$ -hANP分解活性を示し、肺や大動脈にも弱いながら活性が認められた。一方、ラットの各種臓器では、その全てにおいて $\alpha$ -hANP分解活性が認められ、活性は腎が最も高く、次いで脳・肺・肝・心の順であった。ラット腎の酵素画分の $\alpha$ -hANP分解活性の至適pHは7~8であった。(中性ペプチダーゼ)。熱安定性については、 $37^\circ\text{C}$ で最大活性を示し、 $40^\circ\text{C}$ 以上では速やかに失活した。この酵素活性はdiisopropyl fluorophosphate(セリンプロテアーゼ阻害薬)、amastatin(アミノペプチダーゼA阻害薬)、elastatinal(エラスターゼ阻害薬)等では抑制されず、phosphoramidonでほぼ完全に抑制された。

各種臓器のSuc-(Ala)<sub>3</sub>-pNA分解活性と $\alpha$ -hANP分解活性とを比較したが、両者には必ずしも相関は認められなかった。各種臓器の $\alpha$ -hANP分解活性はphosphoramidonで完全に抑制されたが、T酵素およびG酵素に対する抗血清による抑制はまちまちであった。即ち、T酵素およびG酵素は各々の抗血清によりそれぞれ95%前後、腎の酵素活性は約35%抑制されたが、他の臓器の酵素活性は殆ど抑制されなかった。種特異性の因子を取り除いた場合でも同様で、ブタG酵素に対する抗血清により、ブタ糸球体酵素活性は30%抑制され、尿管画分では、47.4%抑制されたが、肺の酵素活性は7.8%抑制されただけであった。

#### <考察>

従来、腎臓のNEP活性は尿管にのみ局在するという見解が主流を占めていたが、本研究では、糸球体に於いて $\alpha$ -hANPを分解する活性のあることを初めて酵素学的に証明した。この酵素はphosphoramidon感受性をもつmetalloendopeptidaseであり、糸球体に於いても $\alpha$ -hANPが分解され得ることを示すものである。各種臓器にも $\alpha$ -hANP分解活性のあることを見いだしたが、これらの多くはやはりphosphoramidon感受性であるが、尿管から精製した酵素に対する抗血清にほとんど影響されていないことから、ANP分解酵素には多様性(例えばアイソフォーム)のあることが示唆される。血中のNEP活性が、慢性腎不全の患者で減少し、ネフローゼ症候群患者で上昇していることも見いだしており、腎疾患に於ける本酵素の変動やその病態生理的意義は今後の興味ある研究課題であると考えられる。

## 審 査 の 要 旨

本研究では、腎臓に於けるナトリウム利尿ペプチド (ANP) の分解に与る中性エンドペプチダーゼ (NEP) の性質を詳細に検討したもので、特に糸球体に存在するNEPの酵素学的解析は初めての試みであり、高く評価される。又、腎臓以外の臓器にも幾分phosphoramidon感受性のNEP活性が認められ、ANPの分解にも一部関与している可能性が考えられる。免疫学的手法を用いた解析から、各臓器のNEPは腎臓の酵素とは必ずしも同一のものではなく、NEPアイソフォームの存在することが示唆されたが、これらはそれぞれの部位に於いて異なった役割 (他のペプチドの変換や分解) を担っている可能性もあり、きわめて興味深いものである。血中のNEP活性が腎疾患により変動することも示され、本研究は一部腎疾患の実体に迫るのみでなく、新しい診断法の開発にもつながるもので、価値の高いものである。

よって、著者は医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。