

氏名(本籍)	なが はま まさ み 長 浜 正 巳 (徳 島 県)		
学位の種類	博 士 (学 術)		
学位記番号	博 甲 第 930 号		
学位授与年月日	平 成 3 年 12 月 31 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 SECRETION AND PROTEOLYTIC PROCESSING OF PRORENINS (プロレニンの分泌とプロテアーゼによるプロセッシングに関する研究)		
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	山 根 國 男
副 査	筑波大学教授	Ph. D. 理学博士	柳 澤 嘉 一 郎
副 査	筑波大学助教授	農学博士	星 野 貴 行

論 文 の 要 旨

血圧の調節に重要な酵素であるレニンは、他の多くのペプチドホルモンの例と同様に細胞内でまず不活性型の前駆体(プロレニン)として合成される。これが細胞内移行の過程で、前駆体中に存在する塩基性アミノ酸対(Lys-Arg)の部位で切断されることにより、N末端プロペプチドが除去され(プロセッシング)、活性型レニンとなる。生成した活性型レニンは分泌顆粒中に貯留され、外部刺激に応じて細胞外に放出される(調節性分泌経路)。このような前駆体のプロセッシングや細胞内貯留はホルモンによる種々の生体調節にとって非常に重要な段階であるがその機構はほとんど明らかにされていない。そこで本論文では、前駆体のプロセッシングと分泌の機構を明らかにするために、プロレニンをモデルとして用い、cDNAの改変による種々の変異体を作成して細胞で発現させることにより、その分泌とプロセッシングを解析した。

(1) 前駆体のプロセッシングと分泌顆粒への貯留との関係について明らかにするために、プロレニンのプロセッシング部位に存在する塩基性アミノ酸対をLys-ArgからLys-Glnに改変した変異プロレニンcDNAを作成した。これを、外来遺伝子の導入により発現された様々なホルモン前駆体をプロセッシングして分泌顆粒中に貯留することが知られている、マウス下垂体由来AtT-20細胞で発現させた。培養上清中のレニン活性の測定及びSDS-PAGEによる解析の結果から、野生型プロレニンでは約30%がプロセッシングされて成熟レニンとして分泌されていた。一方、Lys-Gln変異体は全くプロセッシングされず、プロレニンのみが分泌されていることが示された。更に、分泌顆粒の放出促進剤である8-Br-cAMPの影響を検討した結果、変異型プロレニンはプロセッシングされないにもか

かわらず、分泌顆粒への移送は行われていることが示された。以上の結果より、AtT-20細胞において、ホルモン前駆体のプロセッシングと分泌顆粒への移送・貯蓄は必ずしも共役した現象ではないことが明らかとなった。

(2) プロセッシング部位のアミノ酸配列がプロセッシングの効率に及ぼす影響を調べるために、ヒト・プロレニンのプロセッシング部位 (Lys-Arg) をArg-Arg, Arg-Lys, Lys-Lysに改変してAtT-20細胞で発現させたところ、Arg-Arg変異体は野生型のおよそ半分の効率でプロセッシングされ、他の変異体は全くプロセッシングされなかった。また、プロセッシング部位の配列がLys-Lysである野生型ラット・プロレニンは全くプロセッシングされなかったが、そのLys-Arg変異体は効率よくプロセッシングされた。この結果は、AtT-20細胞におけるプロセッシングには、塩基性アミノ酸対のC末端側のArg残基の存在が必須であることを示唆していた。また、プロセッシング部位のLys-Argの直後がSer残基であるマウス顎下腺型プロレニン (Ren2) はプロセッシングされたが、この部位がProであるマウス腎臓型プロレニン (Ren1) は全くプロセッシングされなかった。更に、このProとSerを互いに置換した変異体ではプロセッシングの傾向が完全に入れ変わった。この結果より、AtT-20細胞ではArg-Pro結合はプロセッシングされないことが明らかとなった。

(3) プロペプチドのレニン分泌における機能を明らかにするために、ヒト・プロレニンのプロペプチド領域を完全に欠失した変異cDNAを作製した。これをAtT-20細胞及び調節性分泌経路を持たないCHO細胞に導入した結果、両細胞において分泌量の著しい減少が認められた。また、ノーザンブロット解体により、分泌量の減少が転写レベルでの減少に由来するものではないことが確かめられた。更に、8-Br-cAMPの影響を検討した結果、プロペプチド欠失変異体の場合にも、この薬剤による分泌の促進が認められたことから、分泌顆粒への移送・貯留の効率にはプロペプチドは関与していないことが明らかとなった。以上の結果より、ヒト・プロレニンのプロペプチドは、分泌の過程において重要な機能を担っているものの、レニンを分泌顆粒に貯留するための移送シグナルとしては機能しないことが明らかとなった。

(4) 増殖因子、血液凝固系プロテアーゼ、ウイルス・エンベロープタンパク質などの前駆体のプロセッシング部位には、多くの場合、塩基性アミノ酸対に加えて、更に切断部位の上流4番目の位置にもArg残基が存在する (Arg-X-Lys/Arg-Arg) ことに着目して、マウス・プロレニンの切断部位上流4番目の位置にArg残基を導入した変異cDNAを作製した。これを、構成的分泌経路しか持たず、本来プロレニンをプロセッシングしないCHO細胞にて発現させたところ、この細胞でもプロセッシングされるようになった。そこで、この構成的分泌経路におけるプロセッシングとAtT-20細胞の調節性分泌経路におけるプロセッシングとの性質を比較するために、小胞体-ゴルジ装置間の分泌阻害剤であるBrefeldin A, 弱塩基であるクロロキン, 微小管の重合阻害剤であるコルヒチン, Ca^{++} イオノフォアA23187による細胞内 Ca^{++} の欠乏, 及び α_1 -プロテアーゼ・インヒビターPittsburgh型ミュータントがこれらのプロセッシングに与える影響を検討した。その結果、構成的分泌経路には、従来から着目されてきた調節性分泌経路におけるプロセッシングとは異なるプロセッシング機構が存在し、プロセッシング部位にArg-X-Lys/Arg-Argの配列を持つ前駆体は、この機構によってプロセ

シングされることが示唆された。

審 査 の 要 旨

ペプチドホルモンは、生体の恒常性維持や種々の生理機能の調節に中心的役割を果たしている。したがって、その不活性前駆体のプロセッシングは、ホルモンによる生体調節にとって最も重要な段階の一つであると考えられる。プロセッシング機構の解明やこれに関与するプロテアーゼの単離・同定は、これまで多くの研究者らによって試みられてきたが、ほとんど進展がみられていない。このような状況において、遺伝子工学的手法を駆使することにより、前駆体のプロセッシングと分泌顆粒への移送との関係、プロセッシング酵素の基質特異性、及びプロペプチドの分泌過程における役割を明らかにしたことは、今後の前駆体プロセッシングの研究の発展に意味あることと思われる。また、これまで個別の分野で研究されてきたためにその関係が不明確であった、調節性分泌経路における塩基性アミノ酸対部位ではプロセッシングと、構成的分泌経路におけるArg-X-Lys/Arg-Arg部位でのプロセッシングの性質の違いを明確にしたことは特筆に値する成果であると思われる。

よって、筆者は博士（学術）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。