

氏 名 (本 籍)	え び はら あき お 海老原 章 郎 (茨 城 県)
学 位 の 種 類	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	博 甲 第 2556 号
学位授与年月日	平成 13 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審 査 研 究 科	農学研究科
学 位 論 文 題 目	Molecular Properties of Recombinant Ovine Angiotensinogen (組換え型ヒツジ・アンギオテンシノーゲンの分子特性)
主 査	筑波大学教授 農学博士 祥 雲 弘 文
副 査	筑波大学教授 農学博士 馬 場 忠
副 査	筑波大学教授 農学博士 深 水 昭 吉
副 査	筑波大学教授 農学博士 田 仲 可 昌

論 文 の 内 容 の 要 旨

アンギオテンシノーゲンは、生体の血圧調節および電解質バランスの維持に重要な生理活性ペプチド、アンギオテンシンの前駆体タンパク質であり、酵素レニンの基質である。最近報告されたアンギオテンシノーゲン遺伝子欠損マウスとレニン遺伝子欠損マウスの解析からそれぞれ、アンギオテンシンが正常血圧の維持に必須であること、そして血中アンギオテンシンの産生はレニンによる特異的な切断に依存していることが示された。このような生体内でのアンギオテンシノーゲンの機能を理解する基礎的な側面として、著者はチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞で発現、精製した組換え型ヒツジ・アンギオテンシノーゲンを用い、その分子特性を (1) 生化学的側面、(2) 保存としての側面、(3) X 線結晶学的な側面の三つの観点から調べた。

(1) 生化学的側面

ヒツジ・アンギオテンシノーゲンは、二つの糖鎖付加部位 (Asn²⁷¹ と Asn³³⁸) と二つのシステイン残基 (Cys¹⁸ と Cys¹³⁷) を持つ。動的光散乱の結果、ヒツジ・アンギオテンシノーゲンは溶液中に単量体で存在することが分かった。エルマン法の結果、ヒツジ・アンギオテンシノーゲンには遊離のシステイン残基がほとんど存在しないことから、Cys¹⁸ と Cys¹³⁷ が分子内でジスルフィド結合していることが分かった。またノイラミニダーゼ処理の結果、等電点の異なる五つのアイソフォームは、糖鎖末端に付加されるシアル酸が主要因となって生ずることが分かった。さらにヒト・レニンとの酵素速度定数を測定した結果、シアル酸の有無に関わらず、ヒツジ・アンギオテンシノーゲンは同じ反応性を示すことが分かった。続いて、アスパラギン結合糖鎖の分解酵素、グリコペプチダーゼ F による切断実験、および Pro³⁴¹ により Asn³³⁸ には糖鎖付加が極めて起きにくいと考えられることから、Asn²⁷¹ が唯一の糖鎖付加部位であることが示唆された。さらに糖鎖を除去してもヒツジ・アンギオテンシノーゲンの安定性およびレニンとの反応性は保持されることが分かった。次に、ホモロジーモデリング法を用いて、ヒツジ・アンギオテンシノーゲンの立体構造モデル (Ala⁷⁰-Leu⁴⁴⁹) を作った。糖鎖がレニンとの反応性に影響せず、Cys¹⁸ と Cys¹³⁷ がジスルフィド結合していることから、この糖造モデル上でレニンによる切断部位 (Leu¹⁰-Leu¹¹) は、糖鎖が付加される Asn²⁷¹ から離れているが Cys¹³⁷ に近いところに位置していることが示唆された。

(2) 保存としての側面

ヒツジ・アンギオテンシノーゲンはヒト・レニンとの親和性が極めて高く、ヒト・レニンの代用基質として臨床実験で使われている。その実験を再現性良く行うには基質アンギオテンシノーゲンを適切に保存することが重

要であると考えられる。そこで著者は凍結保存がヒツジ・アンギオテンシノーゲンに与える影響を調べた。精製直後の標品と比較すると、4℃で2週間保存した標品はヒト・レニンに対して K_m の上昇とともに V_{max} の低下を示した。一方、-80℃で保存した標品は、 V_{max} の低下を示したものの、 K_m は精製直後のものと同じ値を保った。また、-80℃で保存した標品は精製直後の標品と同じCDスペクトルを示した。以上から、凍結がヒツジ・アンギオテンシノーゲンの保存に有効であることが示された。

(3) X線結晶学的側面

酵素レニンによる基質アンギオテンシノーゲンの特異的な切断反応は、血中アンギオテンシン濃度調節の律速段階である。この切断反応には、基質の切断部位付近のみならず基質の全体構造がレニンとの親和性の上昇に重要であることが知られている。この機構を明らかにするにはアンギオテンシノーゲンの立体構造決定が必須である。そこで著者はヒツジ・アンギオテンシノーゲンの結晶化を行った。クロマトフォーカシングを用いて等電点電気泳動上で均一な標品を調製し、蒸気拡散法によって結晶化条件を検索した。その結果、硫酸リチウムを沈殿剤とした条件で結晶を得た。得られた結晶はX線の損傷を受けやすいため、100Kにて放射光（高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所）を使ってX線回折データを収集した。データ処理の結果、分解能は3.7 Å、格子定数は $a = b = 121.3$ Å, $c = 329.5$ Åの正方晶系で、空間群は $I4_{22}$ または $I4_122$ であることが分かった。現在、著者は(1)で調製した脱シアル化および脱糖鎖標品を用いて分解能の向上を目指すとともに、得られたデータを使い分子置換法によってヒツジ・アンギオテンシノーゲンの結晶構造を決定している。

審 査 の 結 果 の 要 旨

アンギオテンシノーゲンは、生体の血圧調節および電解質バランスの維持に重要な生理活性ペプチド、アンギオテンシンの前駆体タンパク質である。このアンギオテンシノーゲン分子の機能を理解する基礎的な側面として、著者は組換え型ヒツジ・アンギオテンシノーゲンを用い、その分子特性を様々な視点から調べた。その結果、組換え型ヒツジ・アンギオテンシノーゲンに一本のジスルフィド結合が存在すること、付加されている糖鎖の数やその働きなどの生化学的な諸性質を明らかにした。これらの知見は生体内でのアンギオテンシノーゲン分子の機能を理解する上で重要な基礎になると考えられる。並びに著者は、凍結が組換え型ヒツジ・アンギオテンシノーゲンの有効な保存方法であることを示し、このタンパク質を用いた臨床実験における凍結保存の有用性を示した点は評価できる。さらに著者は組換え型ヒツジ・アンギオテンシノーゲンの結晶化に成功し、結晶構造の決定に必要なX線回折データを得ていることは特筆に値する。現在のところアンギオテンシノーゲンの結晶化および結晶構造は報告されていない。近い将来、著者の世界に先駆けてのアンギオテンシノーゲン立体構造解析の成功によって、血中アンギオテンシン産生機構が構造生物学的観点から詳細に明らかにされ、新たな高血圧症治療薬創製への道しるべを提案できるものと期待できる。

よって、著者は博士（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。