

氏 名(本 籍)	は た え と し ひ さ 波多江 利 久 (佐 賀 県)
学 位 の 種 類	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	博 甲 第 1158 号
学位授与年月日	平成 5 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	BIOCHEMICAL STUDIES ON RECOMBINANT HUMAN RENIN AND RECOMBINANT HUMAN ANGIOTENSINOGEN (組換え型ヒト・レニンおよび組換え型ヒト・アンジオテンシノーゲンの生化学 的研究)
主 査	筑波大学教授 農学博士 村 上 和 雄
副 査	筑波大学教授 農学博士 日 下 部 功
副 査	筑波大学教授 農学博士 田 仲 可 昌
副 査	筑波大学助教授 農学博士 祥 雲 弘 文

論 文 の 要 旨

生体の血圧調節に重要な役割を担う酵素レニン (renin) [EC 3.4.23.15] は、ホルモン前駆体アンジオテンシノーゲンを唯一の基質とし、これを特異的に限定分解して、デカペプチド・アンジオテンシン I (angiotensin I : A I) を遊離させる。A I は生理的に不活性であるが、おもに肺においてアンジオテンシン変換酵素 (angiotensin converting enzyme : ACE) [EC 3.4.15.1] の作用を受け、オクタペプチド・アンジオテンシン II (angiotensin II : A II) に変換される。この A II が、強力な末梢血管収縮作用を示すと同時に、副腎皮質に作用しアルドステロンの分泌を促進させ、循環血液量を増加させるなどして、血圧を上昇させる。これら一連の反応はレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系と呼ばれ、レニンとアンジオテンシノーゲンの反応がこの系の律速反応であり、系全体を制御している重要な反応とされている。

レニンは生体内含量が大変微量であるために、これまでのレニン研究は大変困難を極めた。ブタ腎レニンの精製には約180,000倍の精製が必要であり、ヒト正常腎についてはさらに微量で約480,000倍の精製が必要である。とくにヒト・レニンの研究においては、ヒトの組織を得ることが困難であることも原因となり、ヒトのレニン-アンジオテンシン系の酵素化学的な性質の解析は充分に行われておらず、多くの点が不明のままである。

本研究においては、まず、

- (1) ヒトのレニン-アンジオテンシン系の研究に充分な量の、純粋なヒト・レニンおよびヒト・ア

ンジオテンシノーゲンを得る系を確立した。

レニン研究に充分量のヒト・レニンを得るために、すでに大腸菌での発現が試みられているが、大腸菌では発現させたヒト・レニンは不溶性の封入体を形成するため好ましくない。そこで、本研究において、動物培養細胞（CHO細胞：チャイニーズハムスター卵巢由来の細胞）を宿主とするヒト・レニンの大量発現および大量精製のための系を確立し、以上の難点を解決した。ヒト・レニン前駆体（ヒト・プレプロレニン）cDNAを発現させるために作製したベクターを、リン酸カルシウム法にてCHO細胞dhfr（ジヒドロ葉酸還元酵素）遺伝子欠損株DXB-11に導入した。このベクターはpSV2dhfrを基本とし、ヒト・プレプロレニン発現ユニットの他に、マウスdhfr発現ユニットを同一ベクター上に有しており、dhfr欠損株であるDXB-11との組合せにより、外来遺伝子導入形質転換細胞株を選択することができる。さらにdhfrの阻害剤であるMTX（メソトレキセート、またはアメソプテリンとも呼ばれる）を培地中に添加し、耐性株をスクリーニングすることにより、ヒト・レニン前駆体高産生株を得ることができる構造を有している。本研究においては、600nM MTX処理を行うことにより、5倍から10倍の生産性の向上が可能だった。

この株を動物細胞培養用完全無血清培地を用いて培養した上清から、ヒト型レニン基質アナログをリガンドとしたアフィニティカラムクロマトグラフィによる一段階の精製のみで、82%の高収率でヒト・レニンを得ることができた。得られた組換え型ヒト・レニンは、分子量約42,000の電気泳動的に単一な蛋白質であり、レニン基質と反応して、反応液中に反応生成物であるA Iの生成が認められる等、ヒト腎レニンとほぼ同一の性質を示した。また、組換え型ヒト・レニンは、レニン基質に対する至適pH等において、ヒト腎レニンと同等の値を示し、組換え型ヒト・レニンはヒト腎レニンとほぼ等しい物理化学的性質を有していた。さらに、得られた組換え型ヒト・レニンは結晶化が可能であり、現在この結晶を用いてレニンのX線構造解析を行っている。

一般に、レニン基質としてはアミノ酸8残基から14残基の合成ペプチドが用いられているが、実際に生体中においては、分子量約60,000のアンジオテンシノーゲンが唯一のレニン基質として存在している。レニンとアンジオテンシノーゲンの反応は極めて厳密な基質特異性を有し、とくにヒト・アンジオテンシノーゲンの反応は種特異性も極めて高いことが知られている。しかし、これまでヒト・アンジオテンシノーゲンの反応の酵素化学的な性質の詳細については、充分明らかにされていなかった。また、ヒトのレニン-アンジオテンシン系の性質を明らかにするためには、ヒト・レニン本来の基質であるヒト・アンジオテンシノーゲンを用いて解析を行う必要がある。しかし、ヒト血中よりこれを得るためには、多くの精製ステップを必要とし、そのうえ収量も少ない。またヒトの血液を大量に扱う際の安全性の問題など、実験室レベルでヒトの血液からヒト・アンジオテンシノーゲンを充分量得ることは困難であった。

本研究では、動物培養細胞（CHO細胞）への遺伝子導入によりヒト・アンジオテンシノーゲン産生株を樹立し、この株を培養して得られた培養上清からヒト・アンジオテンシノーゲンを精製する系を確立した。樹立したヒト・アンジオテンシノーゲン高産生株を無血清培地で培養を行った上清より、DEAE-Toyopearlを用いた一段階のカラムクロマトグラフィにより、組換え型ヒト・アンジ

オテンシノーゲンを87%の高収率で、分子量約61,000の電気泳動的に単一な蛋白質として得ることができた。得られた組換え型ヒト・アンジオテンシノーゲンのN末端アミノ酸配列解析を行ったところ、N末から1～10残基にヒト型A Iの構造を有しており、レニンの作用を受けて反応液中にA Iを遊離することを確認した。さらに等電点、pH安定性、熱安定性などについて、血液中のヒト・アンジオテンシノーゲンとほぼ同等の性質を示すことを確認した。

本研究では、さらに、

(2) 得られた組換え型ヒト・レニンおよび組換え型ヒト・アンジオテンシノーゲンを用いることによって、ヒト・アンジオテンシノーゲンの反応の種特異性の厳密性が、従来考えられていたP 1—P 1'—P 2'の配列によるのではなく、ヒト・アンジオテンシノーゲンのN末端から14残基以降の構造が重要であることを明らかにした。

ヒト・アンジオテンシノーゲンにはレニンによる切断を受ける部分のアミノ酸配列に特徴があることが知られている。すなわち、P 1—P 1'—P 2'位がマウス、ラット、ブタのアンジオテンシノーゲンにおいて、それぞれLeu—Leu—Tyr, Leu—Leu—Try, Leu—Leu—Valであるのに対し、ヒト・アンジオテンシノーゲンはLeu—Val—Ileである。このため、この相違がヒト・アンジオテンシノーゲンの反応の種特異性の厳密性に影響を与えているものと考えられていた。また、新しいヒト高血圧症疾患モデル動物“つくば高血圧マウス”におけるヒト・レニンおよびヒト・アンジオテンシノーゲンの反応性や挙動を明らかにするためにも、レニン—アンジオテンシン系の種特異性を明らかにする必要がある。そこで今回精製した、組換え型ヒト・レニン、組換え型ヒト・アンジオテンシノーゲン、およびすでに精製したマウス・レニンと、ヒト・アンジオテンシノーゲンのN末端部分13残基を化学合成したヒト型合成トリデカペプチド基質を用いてそれぞれを反応させ、それぞれの酵素化学的性質を比較した。その結果、組換え型ヒト・アンジオテンシノーゲンを基質にした場合、ヒト・レニンとマウス・レニンのKm値、およびkcat値に顕著な差が認められたが、合成基質を用いた測定においては、このような差は認められなかった。この結果より、ヒト・アンジオテンシノーゲンの反応の種特異性は、レニンによる切断部位のアミノ酸配列の違いによるのではなく、アンジオテンシノーゲンの構造、とくにN末端側から14残基以降の構造が重要であると考えられた。

審 査 の 要 旨

レニンとアンジオテンシノーゲンの反応は、生体の血圧調節に関与するレニン—アンジオテンシン—アルドステロン系の律速反応であり、この系全体を制御している重要な反応である。また、高血圧症治療という立場からも最も注目されている段階のひとつである。とくにヒト・レニンおよびヒト・アンジオテンシノーゲンの構造と機能の相関についての研究は、ヒトのレニンおよびアンジオテンシノーゲンが充分量得ることが困難なため、ほとんど明らかにされていない。このような状況において、遺伝子工学的手法を用いて、充分量の純粋なヒト・レニンおよびヒト・アンジオテンシノーゲンを得る系を確立したこと、さらに、得られた組換え型ヒト・レニンおよび組換え型ヒ

ト・アンジオテンシノーゲンを用いることによって、ヒト・アンジオテンシノーゲンの反応の種特異性の高さが、従来考えられていたP 1－P 1'－P 2'の配列によるのではなく、ヒト・アンジオテンシノーゲンのN末端から14残基以降の構造が重要であることを明らかにしたことは、意義ある成果である。さらに、コンピューター・グラフィックスによるヒト・アンジオテンシノーゲンの3次元構造の推定に行っており、また今後、より詳細な3次元構造上の情報を得るためにはX線結晶解析によるヒト・アンジオテンシノーゲンの解析が必要となる。本研究で確立した組換え型ヒト・アンジオテンシノーゲンの発現系および精製系は、ヒト・アンジオテンシノーゲンの結晶化に道を拓くものであり、本研究の成果はヒトのレニン－アンジオテンシン系の酵素化学的性質、および構造機能相関の研究に大きく貢献するものと考えられる。

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。