

氏名(本籍)	いま	い	たか	し	(愛媛県)
	今	井	高	志	
学位の種類	農学博士				
学位記番号	博甲第365号				
学位授与年月日	昭和61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	Molecular Cloning of cDNA for Human Renin and Its Expression in Escherichia coli (ヒト・レニンcDNAのクローニングとその大腸菌での発現)				
主査	筑波大学教授	農学博士	村上	和雄	
副査	筑波大学教授	農学博士	田淵	武士	
副査	筑波大学教授	農学博士	新井	勇治	
副査	筑波大学教授	医学博士	熊田	衛	

論文の要旨

レニン-アンジオテンシン系は血圧調節や塩分と水分のバランス保持などに関与する重要な役割を持つ。レニンは腎臓より血液中に分泌され、アンジオテンシノーゲンに作用し10個のアミノ酸から成るアンジオテンシンIを遊離させる。アンジオテンシンIは転換酵素により切断されてアンジオテンシンIIとなるが、これは強い血管収縮作用を持ち、また副腎皮質に作用してアルドステロンの分泌を促す。レニンはこの系の引き金となるアスパラチルプロテアーゼであるが、その含量が低いことから、特にヒトにおいては、生化学的研究があまり進んでいなかった。またヒトレニンは分子量、等電点、抗原性などが、他の動物レニンと異なっている。そこで本研究ではヒトレニンcDNAのクローニングを行ない、これより全アミノ酸配列を決定した。次にこのcDNAを用いて、大腸菌におけるヒトレニンの生産系を開発した。

(I) ヒトレニンcDNAのクローニング

血中レニン活性が正常人の7倍以上であった腎血管性高血圧患者より摘出された腎臓からmRNAを摘出し、Okayama-Berg法を用いてcDNAライブラリーを作成した。すでにクローニングされていたマウス顎下線レニンcDNAをプローブとして、ヒト腎臓のcDNAライブラリーをスクリーニングした。24万個の大腸菌より35個のポジティブなクローンを得た。これらのクローンについて制限酵素切断地図を作成し、cDNA鎖がもっとも長かった2個のクローンについてMaxam-Gilbert

法により全塩基配列を決定した。

その結果、もっとも長いcDNAはpoly A部分を除いて1459塩基対であり、5'非翻訳領域42塩基対、3'非翻訳領域199塩基対、タンパク質をコードする領域は1218塩基で406個のアミノ酸に対応することが明らかとなった。翻訳開始部位にはA/G NNATGG、3'非翻訳領域にはpoly A付加位置より20塩基対上流にAA TAAAの共通配列が存在した。

レニン、主に肝臓でつくられるカテプシンDと相同性が高いことが示唆されていたがここでクローニングしたcDNAが確かにレニンmRNA由来であることを証明するため、得られたcDNAをプローブとして肝臓と腎臓のmRNAをNorthern法で解析した。その結果、このcDNAは腎臓由来のmRNAとしかハイブリダイズせずカテプシンDとは区別される配列をもつことが確かめられた。

cDNAの塩基配列から得られたレニン前駆体の一次構造より、レニンはN末端側にLeuクラスターなどの疎水性アミノ酸に富んだシグナルペプチドを持つことが明らかとなった。シグナルペプチドの切断は、N末端より20番目のCysのC末端側で起こると推定した。またプロレニンから活性型レニンへの変換は、プロレニンがトリプシン消化で活性化されること、及びマウス顎下線レニンのアミノ酸配列との比較より、N末端から65-66番目のLys-ArgのC末端側が切断されることにより起こると推定した。

プレプロレニンの分子量は45,057、活性型レニンの分子量は37,236であった。

ヒトレニンの一次構造を、すでに報告されていたマウス顎下線レニンの一次構造と比較した結果、2つの種の間で進化的に良く保存されている領域が明らかとなった。特に活性中心のAspを含む配列Phe-Asp-Thr-Gly-Ser (37-41)、Val-Asp-Thr-Gly (225-228)は完全に一致した。2つの種間のホモロジーはアミノ酸配列で68%、塩基配列で76%であった。

ヒトレニンはマウス顎下線レニンと異なり糖タンパク質であることが報告されていたが71-73番、141-143番にAsn-X-Thrの配列が存在し、2ヶ所の糖鎖結合サイトが存在することが確かめられた。

血液中のレニンはその大部分が不活性型であるが、それはプロレニンである可能性が示唆されている。本研究により、プロレニンの分子量、プロ領域のアミノ酸配列などが明らかになったことより、レニン活性化のメカニズムの解析がより容易になったと思われる。またレニンは、腎以外の組織、特に脳においても検出されており、これら腎以外のレニンの生合成の場を同定する上で、レニンcDNAは有効であろう。さらにレニン遺伝子の発現の解析においても、遺伝子クローニングのプローブとして役立つと思われる。

II プロレニンの大腸菌における発現

(I)で述べたようにヒトレニンの全アミノ酸配列は明らかになったが、さらに1)プロレニンの活性化のメカニズムを明らかにする、2)レニンに特異的なアクチベーターを検索する、3)プロレニンが血中カリクレイン、あるいはレニン自身により活性化されるかどうか明らかにする、4)プロレニンに特異的なモノクローナル抗体を得る、ことが必要である。そこでこれらの研究に必要な

量のプロレニンを得るため、大腸菌におけるヒトプロレニン発現系を作成した。

大腸菌トリプトファンオペロンのプロモーター、リーダー配列、trp E遺伝子の一部を含む配列と、プロレニンに対応するDNAフラグメントを連結し、プラスミドに挿入したこの結果、プロレニンはtrp E遺伝子産物との融合タンパク質として合成される。しかしその結合部位に、血液凝固因子Xaの切断配列を合成DNAを用いて導入し、発現後、融合タンパク質からプロレニンを切り出せるようにした。この発現プラスミド (pTR 501) を大腸菌HB 101株に導入し、インドールアクリル酸 (IAA) を用いて発現の誘導を行なった。

その結果、分子量 43,500 の融合タンパク質が、IAAによる誘導と共に大腸菌内に生産された。このタンパク質は、抗レニン抗体と特異的に反応することから、レニンの配列を持つことが確認された。大腸菌タンパク質のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による解析結果から、この融合タンパク質の発現量は、全菌体タンパク質の約 30%に達することが解った。しかしこのタンパク質は不溶性で菌体内に蓄積してinclusion bodyを作っていることが顕微鏡写真より明らかになった。そこで以下の方法によりタンパク質分子の再構成 (renaturation) を行なった。

この不溶性タンパク質は、菌破碎後、4200×gの低速遠心で特異的に沈澱として回収されるので、これを 6 M グアニジン塩酸を用いて可溶化し、ゲルろ過によりさらに精製した。融合タンパク質を含む画分を 8 M 尿素に対して解析した後、1 M NaClを加え、pHを 10 に合わせた。この後、pH10の緩衝液に対して透析し尿素を除いた。

このようにして可溶化した融合タンパク質から血液凝固因子Xaを用いて、分子量 42,500 のプロレニンを切り出し、トリプシン処理により活性型レニンを得た。

このレニンの比活性は約300ngAl/mg/hであった。この活性は、10 μMのペプスタチン、1 : 100希釈の抗レニン血清により完全に抑えられ、レニン特異的であることが確認された。

以上の方法により大腸菌で得られたヒトプロレニンは、その生化学的、免疫学的性質が生体由来のプロレニンと良く一致したことから、活性化のメカニズムの研究や、特異的な抗体の作成に十分有用であると思われる。

審 査 の 要 旨

本論文は、cDNAのクローニングと塩基配列の解析から、ヒトレニンの全一次構造を明らかにし、また、ヒトレニンを大腸菌に生産させ、その性質を明らかにしたものである。

ヒトレニンの精製は大変困難で、その一次構造を明らかにすることは、高血圧症の研究における大きな目標となっていた。ここにその配列が示され、多くの新しい知見が得られたことは、この分野に大きなインパクトを与えた。また大腸菌にヒトレニンを発現させることに成功したことは、有用物質の生産という点からも高く評価できる。

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。