

氏名(本籍)	石塚保行(東京都)
学位の種類	農学博士
学位記番号	博甲第726号
学位授与年月日	平成2年3月23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 HUMAN PRORENIN (ヒト・プロレニンの生化学的研究)
主査	筑波大学教授 農学博士 村上和雄
副査	筑波大学教授 理学博士 新井勇治
副査	筑波大学助教授 農学博士 日下部功
副査	筑波大学助教授 医学博士 井柳堯

### 論 文 の 要 旨

レニン (EC 3, 4, 23, 15) は、血圧調節や電解質バランスに関与している aspartic proteinase である。プロレニンは不活性型のレニン前駆体であり、血中や生殖器官では活性型のレニンよりも高濃度で存在している。さらに、妊娠により、血中のプロレニン量は約10倍に、羊水中では約100倍にまで増加することから、レニンは血圧調節だけでなく、生殖に関与する生理作用もあると考えられる。

しかし、生体中のプロレニン含量は極めて低いうえ、プロテアーゼによって容易に分解されるため、これを真の形 (native prorenin) で研究することは非常に困難であった。そのために、プロレニンは今までほとんど完全精製されず、その構造や機能なども、ほとんど分かっていない。そこで、本論文ではプロレニンの生化学的性質を解明することを目的として、まず、プロレニンとレニンを完全に区別できるように、プロレニンに特異的な抗体を作製し、それを用いてヒト血中のプロレニンの分離を試みた。さらに、クローニングしたヒト・プロレニンの cDNA を動物細胞の系を用いて発現し、そのプロレニンをイムノアフィニティーカラムで精製し、性質を調べた。

#### (A) ヒト・プロレニンのプロフラグメントに対するモノクローナル抗体の性質

プロレニンはレニンよりもプロペプチド (43アミノ酸残基のプロフラグメント) 部分だけ大きい。このプロフラグメントを化学合成し、これを抗原としてモノクローナル抗体を作製した。得られた抗体は7種類で、これらの抗体の認識部位、アフィニティー、アイソタイプ、プロレニンとの結合性等の性質を調べた。特に、モノクローナル抗体 2-X-C 1 と 4-X-E 1 はヒト・プロレニンに強く結合し、レニンには全く結合しなかった。この2つの抗体は IgG<sub>1</sub> で、それぞれプロフラグメン

トの中央部分とC末端部分を認識し、プロフラグメントに対するアフィニティーは、それぞれ $7.6 \times 10^8 M^{-1}$ と $3.0 \times 10^7 M^{-1}$ であった。

#### (B) 抗体を用いたプラズマ中の活性型プロレニンの同定

ヒト・プラズマを50%硫酸で分画し、誘析後、レニンの基質アナログを用いたアフィニティーカラムで、レニン活性画分を集め、次にモノクローナル抗体(2-X-Clまたは4-X-EI)を用いたイムノアフィニティーカラムで、プロフラグメントを持つレニンを集めた。即ち、この2つのカラムで、活性があり、かつプロフラグメントを持つレニン(活性型プロレニン)を分離した。さらにこの活性型プロレニンの性質を検討した結果、部分活性型と完全活性型の2種類が存在することが明らかになった。即ち、部分活性型プロレニンは、大きな基質のアンジオテンシノーゲンよりも、小さな13残基の合成基質に対する比活性が高い。一方、完全活性型プロレニンは、基質の大きさにかかわらず同じ比活性を示した。これらの結果から、2つの型の活性中心は、それぞれ基質に対して部分的に、まず完全に露出していると推定した。

また、プラズマ・プロレニンに関して、抗体2-X-Clが認識するプロフラグメントの中央部分のアミノ酸配列を、ヒトと他のホ乳類で比較した場合、そのホモロジーが非常に高いことが明らかになった。しかも活性型プロレニンが殆んどすべての動物にも存在した。

#### (C) 組換え型ヒト・プロレニンのイムノアフィニティーカラムによる精製と性質

1) チャイニーズハムスターの卵巣(CHO)細胞に、ヒト・プロレニンのcDNAを導入し、無血清培地で培養した。ヒト・プロレニンはそれを含む培地から75%硫酸で分画し、透析後、作製したモノクローナル抗体を用いたイムノアフィニティーカラムで分離、精製した。2段階の精製で、39%の収率で100倍に精製でき、2ℓの培地から約1mgの精製プロレニンを得た。

2) 精製した組換え型プロレニンの分子量をHPLCのゲル濾過とSDS-PAGEによって求めたところ、46,000~47,000であった。

既に得られている組換え型レニンとの分子量差は、4,000~5,000で、この値は、プロフラグメントの分子量に相当した。また、このプロレニンは、抗ヒト・腎レニン抗体とも反応した。

3) 精製したプロレニンのN末端配列を調べ、プロレニンのcDNAから推定したアミノ酸配列と比較したところ、完全に一致した。またトリプシン処理(不活性型のプロレニンの活性化法)したプロレニンのN末端配列も天然の腎レニンの配列と一致した。

4) 精製したプロレニンは、わずかししかレニン活性を示さなかったが、トリプシン処理によって約100倍に活性が上昇した。

5) 精製したプロレニンの等電点電気泳動より、その等電点を求めたところ、5.6~6.4の範囲に複数存在した。各々のバンドを切り出し、トリプシン処理前後のレニン活性を測定し、それぞれプロレニンであることを確認した。即ち、組換え型プロレニンも天然のプロレニンと同様に、多形であることが明らかになった。

以上の結果より、組換え形ヒト・プロレニンは、天然のプロレニンとほぼ同一の特徴を備えていると考えられる。

## 審 査 の 要 旨

近年、レニン-アンジオテンシン系 (R-A系) に新しい概念が加えられつつある。これまでその働きが知られていたのは、腎臓の傍糸球体細胞由来のレニンが血中に遊離し、アンジオテンシノーゲンに作用することから始まる循環R-A系であった。ところが、この内分泌系としてのR-A系の他に、脳や卵巣、睾丸、血管壁などの組織にもR-A系が局在し、働いている可能性が高くなってきた。さらに、この組織レベルでのR-A系には、レニンよりもプロレニンが非常に多く存在していることも指摘されてきた。このように、今まで以上にプロレニンが注目を浴びているなかで、プロレニンとレニンの区別ができるモノクローナル抗体を作製し、それを用いて、プラズマ中で、初めて、プロレニンの中間体と考えられる2種類の活性型プロレニンを同定し、その性質を明らかにした。さらに、このモノクローナル抗体を用いた、組換え型プロレニンの精製法の確立、及び完全精製したプロレニンの種々の性質を調べたことは、これからのR-A系の発展に意味あることと思われる。

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。