



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

ROLE OF TYROSINE-83 OF HUMAN RENIN IN
RENIN-ANGIOTENSINOGEN REACTION

メタデータ	言語: eng 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Mohammad Nasir Uddin メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2537

氏 名 (国籍)	Mohammad Nasir Uddin (バングラデシュ人民共和国)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農博甲第196号
学位授与年月日	平成12年3月14日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学位論文題目	ROLE OF TYROSINE-83 OF HUMAN RENIN IN RENIN-ANGIOTENSINOGEN REACTION
審査委員	主査 岐阜大学 教授 中村 征夫 副査 信州大学 教授 茅原 紘 副査 静岡大学 教授 杉山 公男 副査 岐阜大学 助教授 鈴木 文昭

論文の内容の要旨

レニン (EC 3.4.23.15) はアンギオテンシノーゲンのアミノ末端からアンギオテンシン I を切り離す。この反応は、血圧や電解質バランスの調節において重要な役割を担っているレニン-アンギオテンシン系の最初の、そして律速のステップである。レニンはアスパラギン酸エンドペプチダーゼの1つで、他のアスパラギン酸プロテアーゼと構造上は類似しているものの、基質特異性が高いことや至適pHが2~4単位高いことなど、特異な性質をもっている。本研究では、なぜレニンの至適pHが他のアスパラギン酸プロテアーゼより高いのか、またどのアミノ酸残基がレニン反応に関与するのかを明らかにすることを目的とした。

ヒトプロレニンcDNAおよびヒツジアンギオテンシノーゲンcDNAを各々組込んだCHO細胞の無血清培養上清から、組換え型ヒトプロレニンおよびヒツジアンギオテンシノーゲンを精製した。組換え型ヒトレニンとヒツジアンギオテンシノーゲンの K_m と V_{max} をさまざまなpHで求め、Dixon-Webbプロットで解析した。プロットはpH6.4と8.9に2つのピークを示し、現在レニンの活性中心と考えられている2つのアスパラギン酸以外に、少なくとも2つのアミノ酸残基がレニンの触媒機構に関与していることが示唆された。組換え型ヒトレニンと部分精製したヒト、ブタ、ラットの天然型アンギオテンシノーゲンの反応のpH依存性は、 K_m や k_{cat} は異なるものの、1つの肩をもつ類似した形を示し、近接する2つのピークが重なりあったものと考えられた。このことから、2ピーク型のpH依存性はヒツジアンギオテンシノーゲンに限ったものではなく、レニン-アンギオテンシノーゲン反応の一般的特徴であると結論された。

Suzukiらは、ラットレニンのTyr⁸³を改変すると活性が劇的に減少することを示した。またBlundellは、アスパラギン酸プロテアーゼのTyr⁷⁵（レニンではTyr⁸³に相当する）の水酸基が触媒反応の遷移状態を安定化させると考えた。我々や他のこれまでの研究結果から、Tyr⁸³がレニンの触媒反応に関与する3番目もしくは4番目のアミノ酸残基である可能性が示唆された。そこで、ヒトレニンのTyr⁸³をPhe、Ala、Hisに置換した3つの改変型レニンY83F、Y83A、Y83Hを作製し、影響を調べた。野生型レニンと組換え型ヒツジアンギオテンシノーゲンの反応のpH依存性はpH6.5と8.7に2つのピークを示した。一方、改変型レニンはpH6.5に1つのピークを示し、改変によってpH8.7のピークは消失した。pH6.5において、改変型レニンの K_m は野生型と同程度であったが、 k_{cat} 値が際だって減少した。改変型レニンの酸性pHでの k_{cat} 値の減少は、Blundellが述べているようにTyr⁸³の水酸基の消失による遷移状態の不安定化で説明される。しかし改変によって塩基性pHのピークが消失したことは、Tyr⁸³の水酸基が塩基性pHでのレニン反応に必須であることを示している。

レニンと遷移状態阻害剤との複合体の分子モデリングにおいて、切断されるペプチド結合のカルボニル炭素や酸素の中心から3 Å以内に、Asp³⁸とAsp²²⁶の他に活性中心となり得るアミノ酸残基が見出されなかったことから、酸性と塩基性pHの両方のピークがともにAsp³⁸とAsp²²⁶の協同作用によることが強く示唆された。活性中心のアスパラギン酸の1つ、おそらくAsp³⁸が塩基性pHで再プロトン化されるに違いない。

以上のことから、ヒトレニンのTyr⁸³は酸性pHでは遷移状態を安定化させる役割を果たしているが、塩基性pHではプロトンリレー系によってAsp³⁸の再プロトン化に関与していると考えられた。

審 査 結 果 の 要 旨

血圧調節において重要な役割を果たしているレニンはアスパラギン酸エンドペプチダーゼの一種であるが、他のアスパラギン酸エンドペプチダーゼの最適pHが酸性であるにもかかわらず、レニンだけが中性である点は長年の謎であり、この点はレニンの反応機構を理解する上でも重要であった。しかしレニンとその天然基質であるアンギオテンシノーゲンを純粋にかつ大量に入手することが困難であったため、そのpH依存性の反応速度論的解析は未だ行われていなかった。

本論文の第一番目に評価できる点は、本研究が精製された組換え型レニン及びアンギオテンシノーゲンを用いることによって、レニン-アンギオテンシノーゲン反応のpH依存性を反応速度論的に解析した最初の研究である点にある。第二番目に評価できる点は、レニン-アンギオテンシノーゲン反応のpH依存性には二相性があることを明らかにした点である。過去にもレニン反応の二相性を報告した論文はあったが、いずれも用いた酵素または基質標品中の不純物等に起因するとしており、レニン反応自身が二相性であることを明らかにしたのは本研究が最初である。第三番目に評価出来る点は、2つの活性ピークのうち、塩基性側の活性ピークが現れるためにはレニンの83番目のアミノ酸残基であるチロ

シンが不可欠であり、その役割は、プロトン・リレーシステムを介した活性中心アスパラギン酸残基の再プロトン化であることを明らかにした点である。

これらの結果から、長年の謎であったレニンの最適pHが中性付近にある理由も大筋において明らかになった。

本研究の不十分な点としては、塩基性になったときチロシン-83からアスパラギン酸-38（または 226）までプロトン・リレーシステムが作動しているという直接的証拠が示されていない点と、塩基性になるとチロシン-83がプロトン供与体となりうる理由を単に立体構造の変化によると推論している点である。レニンと基質類縁体の複合体の立体構造に関する情報は、酸性条件で作製された結晶のX線解析しかなく、塩基性条件での立体構造に関する情報が無い現時点ではやむを得ないことではあるが、これらの点については今後のさらなる解明が求められる。

以上について、審査委員は全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

1. Nasir, U.M., Takahashi, K., Nagai, T., Nakagawa, T., Suzuki, F., and Nakamura, Y. (1998). Two peaks in pH dependence of renin-angiotensinogen reaction. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 338-340.
2. Nasir, U.M., Suzuki, F., Nagai, T., Nakagawa, T., and Nakamura, Y. (1999). Tyrosine-83 of human renin contributes to biphasic pH dependence of the renin-angiotensinogen reaction. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63, 1143-1145.