

氏名(本国籍)	A.H.M. Nurun Nabi (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418号
学位授与年月日	平成18年9月13日
学位授与の要件	学位規則第3条第1項該当
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物生産科学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学位論文題目	Biochemical Study on the Non-proteolytic Activation of Prorenin by its Receptor Binding (プロレニンの受容体結合による活性化についての 生化学的研究)
審査委員会	主査 岐阜大学 教授 鈴木 文 昭 副査 岐阜大学 助教授 岩 澤 淳 副査 静岡大学 教授 朴 龍 洙 副査 信州大学 教授 千 菊 夫

論文の内容の要旨

本博士論文において、プロレニンの(プロ)レニン受容体結合および活性化に関する生化学研究がおこなわれた。

まず、レニン反応における酵素と基質アンジオテンシノーゲンが連携した触媒機構を検討するために、アンジオテンシノーゲンのレニン切断配列付近のヒスチジン残基、His⁹(P2)とHis¹³(P3')に注目し、2種類の組換え変異型アンジオテンシノーゲン、H9QとH13Qを用いて検討した。その結果、ヒト成熟型レニンと3種類のアンジオテンシノーゲン(野生型、H9QおよびH13Q)とのpH反応性については、どの組合せにおいてもpH 6.5と8.5に2つのピークが観察されたが、それぞれのピークの高さは組合せで異なっていた。pH 6.5におけるH9QとH13Qの V_{max} は、それぞれ野生型のおよそ50と70%であった。また、pH 8.5におけるそれぞれの V_{max} は、野生型のおよそ50と100%であった。さらに、pH 6.5におけるH9QとH13Qの触媒能(V_{max}/K_m)については、それぞれ野生型の20および60%であった。また、pH 8.5においては、それぞれ野生型の10および70%だった。これらの結果は、P2およびP3'位におけるヒスチジン残基はおそらくレニン触媒反応において連携してアンジオテンシンI生成に貢献していることを示している。

次に、昆虫細胞中で発現させたラット・プロレニン受容体を用いてラット・プロレニンおよび成熟型ラット・レニンと受容体との結合性およびプロレニンの活性化について研究された。プロレニンと成熟型レニンの受容体に対する親和性は異なっていた。それぞれの K_d は8.0および20 nMであった。受容体に結合したプロレニンとレニンのアンジオテンシノーゲンに対する K_m はほぼ同じで3.3 μ Mであった。また、それぞれの V_{max} は10および1.7 $\text{nM}\cdot\text{h}^{-1}$ だった。受容体結合型レニンはプロレニンのそれよりも分子活性は著しく高かった。それぞれ、90 h^{-1} and 3 h^{-1} と推定された。これらの結果は、プロレニンと成熟型レニンは共通の受容体に結合してレニン活性を呈することが明らかにされた。

最後に、プロレニンの受容体への結合および活性化を細胞膜上での反応として解析できるように設定し、さらにプロレニン・プロセグメント配列(ハンドルペプチド: 11P-15P)のプロレニンの受容体結合における役割を明らかにすることを目的として研究が行なわれた。ラット・プロレニン受容体を動物細胞(COS-7)の細胞膜上で一過性に発現させる条件を検討した。この細胞膜上での発現は時間依存性があり、遺伝子導入後18時間が最も高かった。2.0 nMのプロレニンの90%がこの細胞培養系で結合した。このときの K_d はおよそ0.9 nMであった。同様な条件下で、合成したハンドル領域ペプチド($I^{P11}LLKK^{P15}$)を共存させると競争的にプロレニンの結合および活性化を阻害することをみいだした。この時の K_i は7 nMだった。さらにプロレニンは膜上の受容体と結合して非加水分解的に活性化した。その時の K_m は1.0 μ Mで遊離の成熟型レニンとほぼ同じだった。また V_{max} は遊離型成熟レニンの30%であった。これらの結果は、プロレニンは受容体と結合して活性することとプロレニンのプロセグメント領域の一部の配列がこの受容体結合に重要な役割を担っていることを示している。

本論文を通して、新規な生体機構である受容体随伴(連携)プロレニン機構(Receptor Associated Prorenin System, RAPS)が提案された。

審 査 結 果 の 要 旨

不活性型レニン前駆体であるプロレニンは成熟型レニンのN末端に43アミノ酸残基(プロセグメント)を結合した一次構造をもつ。腎臓のレニン顆粒中では、そのプロセグメントをレニン以外のプロテアーゼによって非可逆的に活性化され成熟型レニンへとプロセスされる。一方、これとは別の非酵素的活性化の場合は、プロセグメント部分が三次元的構造変化を起こすことにより、可逆的にレニン活性を呈するようになると考えられる。この可逆的活性化はpH変化、抗体や受容体分子とプロレニンとのタンパク・タンパク相互作用で生じる。受容体に結合したプロレニンやレニンおよび成熟型レニンの酵素化学的研究は、プロレニンと受容体のタンパク・タンパク相互作用の生化学的特徴を明らかにできると期待される。本博士論文において、A.H.M. Nurun Nabi氏はプロレニンの受容体結合に関する生化学的側面を研究した。

最初にA.H.M. Nurun Nabi氏は、レニン基質であるアンジオテンシノーゲンのレニン触媒反応における触媒補助作用について研究した。そして、アンジオテンシノーゲンのP2およびP3'位におけるヒスチジン残基は、レニン触媒反応において連携してアンジオテンシンI生成に貢献していることを示唆した。

二つ目として、彼は昆虫細胞中で発現させたプロレニン受容体を用いてラット・プロレニンおよび成熟型レニンとの結合性および活性化について研究した。プロレニンとレニンの受容体との親和性は異なっていた。それぞれの K_d は8.0および20 nMであった。受容体に結合したプロレニンとレニンのアンジオテンシノーゲンに対する K_m はほぼ同じで3.3 μ Mであった。また、それぞれの V_{max} は10および1.7 nM \cdot h⁻¹だった。受容体結合型レニンはプロレニンのそれよりも分子活性は著しく高かった。それぞれ、90 h⁻¹ and 3 h⁻¹と推定された。これらの結果より、プロレニンと成熟型レニンは共通の受容体に結合してレニン活性を呈することを明らかにした。

最後にA.H.M. Nurun Nabi氏は、プロレニンの受容体への結合および活性化におけるプロレニン・プロセグメント配列(ハンドルペプチド: 11P-15P)の役割を明らかにすることを目的とした。ラット・プロレニン受容体を動物細胞(COS-7)の細胞膜上で一過性に発現させた。この発現は時間依存性があり、遺伝子導入後18時間が最も発現量が高かった。2.0 nMのプロレニンの90%がこの系で結合した。この条件におけ

る K_d はおよそ 0.9 nM であった。同様な条件下で合成したハンドル領域ペプチド ($P^{11}LLKK^{15}$) を共存させると競争的にプロレニンの結合および活性化を阻害することを見いだした。この時の K_i は 7 nM だった。さらにプロレニンは膜上の受容体と結合して非加水分解的に活性化した。その時の K_m は 1.0 μ M で遊離の成熟型レニンとほぼ同じだった。また V_{max} は遊離型成熟レニンの 30% であった。これらの結果は、プロレニンは受容体と結合して活性することとプロレニンのプロセグメント領域の一部の配列がこの受容体結合に重要な役割を担っていることを示している。

学術論文を通して、また、本論文の結語として A.H.M. Nurun Nabi 氏は、新しい概念である、受容体随伴（連携）プロレニン機構 (Receptor Associated Prorenin System, RAPS) を提案している。このように、本博士論文は、今まで未知であったプロレニンの生理的役割を明らかにする基礎研究として高く評価できる。

以上について、審査委員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は以下のとおりである。

- Roles of His⁹ (P2 subsite) and His¹³ (P3' subsite) in angiotensinogen for catalytic reaction of renin. *Int J Mol Med.* 2005 16(1):103-107.
A.H.M. N. Nabi, Uddin M Nasir, T. Nakagawa, T. Orihashi, A. Ebihara, A. Iwasawa, Y. Nakamura, and F. Suzuki.
- Binding properties of rat prorenin and renin to the recombinant rat renin/prorenin receptor prepared by a baculovirus expression system. *Int J Mol Med.* 2006 18(3):483-488.
A.H.M. N. Nabi, A. Kageshima, Uddin M. Nasir, T. Nakagawa, E. Y. Park and F. Suzuki