

氏 名 (本 国 籍)	Kazal Boron Biswas (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 563 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 23 年 3 月 14 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	Binding Properties of Prorenin to (Pro)renin Receptor <i>in vitro</i> (プロレニンの (プロ) レニン受容体への <i>in vitro</i> における結合特性)
審 査 委 員 会	主査 岐阜大学 教授 早 川 享 志 副査 岐阜大学 教授 鈴 木 文 昭 副査 静岡大学 教授 杉 山 公 男 副査 岐阜大学 准教授 中 川 寅

論 文 の 内 容 の 要 旨

本博士論文において、Kazal 氏はプロレニンの (プロ) レニン受容体 ((P)RR) への結合特性について、生化学側面から研究した。

レニン・アンジオテンシン(RA)系は血圧および電解質バランスの調節を担っている。レニンはこの系の律速酵素である。2002 年フランス INSERM の G. Nguyen 博士らは、(プロ) レニン受容体 ((P)RR) を報告した。この事実は RA 系の研究者に高い関心事として注目視されている。しかしながら、プロレニンの活性化機構の詳細を含めて、その生理学的意義や血液循環の有無やその起源についても不明である。

そこで Kazal 氏は、ヒトおよびラット ((P)RR cDNA を導入した COS-7 細胞を使い、それぞれの細胞膜上の (P)RR に対してヒトおよびラットプロレニンの結合性についてまず検討した。添加したヒトおよびラットプロレニンの 60%がそれぞれの異種 (P)RR に対しても結合した。さらに BIAcore 分析では、ヒトおよびラットプロレニンの異種 (P)RR に対する K_D はそれぞれ 3.7 および 8.3 nM だった。また、プロレニンの活性化試験においては、ヒトおよびラットプロレニンは異種 (P)RR によって活性化されたが、ラットプロレニンの方がヒトプロレニンに比べて活性化度が低いことを明らかにした。

2つ目としては、レニン阻害剤アリスキレン (遊離レニンに対する K_i : 0.18 nM) のレニンおよびプロレニンと (P)RR の結合への影響について検討した。この阻害剤は遊離レニンに対しては勿論であるが、(P)RR に結合したプロレニン (K_D : 0.25)やレニン

(K_D : 0.46)にも同様な結合性で複合体を形成し、レニン活性を阻害した。それぞれの K_D は、0.15 および 0.14 nM だった。しかしながら、遊離レニンとアリスキレン複合体は(P)RR にはほとんど結合しないことを明らかにした。

3 つ目の実験としては、天然由来細胞 (HUVEC: (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)の培養系から分泌された (P)RR とプロレニンとの結合性について検討した。一定期間培養して得られた培地を(P)RR 標品として、特異的抗体を使ったウエスタンブロット分析を行い、分子量 30,000 の位置に(P)RR のバンドが検出された。これを s(P)RR と定義した。この培地中の s(P)RR 濃度を定量するために、(P)RR の ELISA (測定領域, 7.5 – 300 pM) を確立した。

上記 HUVEC 培地中の s(P)RR 濃度は 32 pM であり、ヒトプロレニンと結合し活性化させた (レニン活性: 0.55 ng Ang I/ml/h)。その K_D は 4.0 nM で、標準とした組換え(P)RR のその約 4 倍高いものだった。

以上の結果から、本研究において Kazal 氏は、1) プロレニンと(P)RR の結合性における種特異性はリガンドのアミノ酸配列に依存すること、2) レニン阻害剤は(P)RR に結合したプロレニン/レニンにも遊離レニンと同等の親和性で結合すること。そして遊離レニンとレニン阻害剤複合体は(P)RR との親和性が激減すること、および3) 細胞外へ放出された s(P)RR もプロレニンと結合し活性化することを明らかにした。

これらの新知見は今後行われる(P)RR 関する種々の in vivo 研究の基盤となり、RA 研究の進展に大きく貢献するものと期待される。

審 査 結 果 の 要 旨

レニン・アンジオテンシン(RA)系は血圧および電解質バランスの調節を担っている。レニンはこの系の律速酵素である。2002 年、(プロ)レニン受容体 ((P)RR) が報告された。このことは RA 系の研究者に高い関心事として注目視されている。しかしながら、プロレニンの活性化機構の詳細を含めて、その生理学的意義や血液循環の有無やその起源についても不明である。Kazal 氏は、これら課題の内、プロレニンの(P)RR 結合特性について、生化学側面から研究した。

最初にプロレニンの受容体結合におけるヒトとラット間での種特異性について検討した。

まずヒトおよびラット ((P)RR cDNA を導入した COS-7 細胞を使い、それぞれの細胞膜上の(P)RR に対してヒトおよびラットプロレニンの結合性について検討した。添加したヒトおよびラットプロレニンの 60%がそれぞれの異種(P)RR に対しても結合した。BIAcore を用いて、ヒトおよびラットプロレニンの異種(P)RR に対する K_D はそれぞれ 3.7 および 8.3 nM だった。また、プロレニンの活性化試験においては、ヒトおよびラットプロレニンは異種(P)RR によって活性化されたが、ラットプロレニンの方がヒトプロレニンに比べて活性化度が低いことが明らかにされた。

2 つ目としては、レニン阻害剤アリスキレン (遊離レニンに対する K_D : 0.18 nM) のレニンおよびプロレニンと(P)RR の結合への影響について検討した。この阻害剤は遊離レニンに対しては勿論であるが、(P)RR に結合したプロレニン(K_D : 0.25)やレニン(K_D : 0.46)にも同様な結合性で複合体を形成し、レニン活性を阻害した。それぞれの K_D は、0.15 および 0.14 nM だった。しかしながら、遊離レニンとアリスキレン

複合体は(P)RRにはほとんど結合しないことが明らかにされた。

3つ目の実験としては、天然由来細胞 (HUVEC: (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)の培養系から分泌された (P)RR とプロレニンとの結合性について検討した。一定期間培養して得られた培地を(P)RR 標品として、特異的抗体を使ったウエスタンブロット分析を行い、分子量 30,000 の位置に(P)RR のバンドが検出された。これを s(P)RR と定義した。この培地中の s(P)RR 濃度を定量するために、(P)RR の ELISA (測定領域, 7.5 – 300 pM) を確立した。

上記 HUVEC 培地中の s(P)RR 濃度は 32 pM であり、ヒトプロレニンと結合し活性化させた (レニン活性: 0.55 ng Ang I/ml/h)。その K_D は 4.0 nM で、標準とした組換え(P)RR のその約 4 倍高いものだった。

以上の結果から、本研究によって、1) プロレニンと(P)RR の結合性における種特異性はリガンドのアミノ酸配列に依存すること、2) レニン阻害剤は(P)RR に結合したプロレニン/レニンにも遊離レニンと同等の親和性で結合すること。そして遊離レニンとレニン阻害剤複合体は(P)RR との親和性が激減すること、および3) 細胞外へ放出された s(P)RR もプロレニンと結合し活性化することが明らかにされた。

これらの新知見は今後行われる(P)RR 関する種々の *in vivo* 研究の基盤となり、RA 研究の進展に大きく貢献するものと期待される。

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)

- Aliskiren binds to renin and prorenin bound to (pro)renin receptor *in vitro*:
Biswas K B, Nabi AHMN, Arai Y, Nakagawa T, Ebihara A, Ichihara A, Watanabe T, Inagami T, Suzuki F. *Hypertens Res.* 33(10) 1053-1059, 2010
- Qualitative and quantitative analyses of (pro)renin receptor in the medium of cultured human umbilical vein endothelial cells: Biswas K B, Nabi AHMN, Arai Y, Nakagawa T, Ebihara A, Ichihara A, Inagami T, Suzuki F. *Hypertens Res. in press*

(その他の学術論文)

- Species specificity of prorenin binding to the (pro)renin receptor *in vitro*:
Biswas K B, Nabi AHMN, Arai Y, Nakagawa T, Ebihara A, Suzuki F.
Frontiers in Bioscience E2, 1234-1240 June 1, 2010