



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

## ラット血漿中におけるプロレニンの存在

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2022-06-07 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 鈴木, 文昭, 高橋, 昭彦, 山下, 晋司, 永田, 幸雄, 中村, 征夫 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/5640">http://hdl.handle.net/20.500.12099/5640</a>

## ラット血漿中におけるプロレニンの存在

鈴木文昭・高橋昭彦・山下晋司・永田幸雄<sup>1)</sup>・中村征夫

生物機能工学講座  
(1990年7月31日受理)

## Existence of Prorenin in Rat Plasma

Fumiaki SUZUKI, Akihiko TAKAHASHI, Shinji YAMASHITA, Yukio NAGATA, and Yukio NAKAMURA

Department of Biotechnology  
(Received July 31, 1990)

### SUMMARY

Prorenin is an inactive precursor of renin, a key enzyme in the renin-angiotensin system, and is activated *in vitro* by trypsin action. We investigated whether prorenin circulated in the bloodstream of rats using rat prorenin-prosegment-ELISA and a Blue-Toyopearl column. This ELISA system can quantify prorenin at the range of 6 fmole to 6 pmole. The rat plasma was applied on the column to separate prorenin from active renin. Prorenin was measurable by the ELISA system in the fractions eluted with 2 M KCl. From the amounts of active renin and prorenin eluted from the column, their concentrations in plasma were estimated to be 2.2 and 24fmole/ml, respectively. It was, therefore, concluded that prorenin as well as active renin existed in the rat plasma.

Res. Bull. Fac. Agr. Gifu Univ. (55) : 201-207, 1990.

### 要 約

プロレニンはレニンのプロセッシング過程で生じる不活性なレニン前駆体であり、*in vitro* でトリプシンによって活性化されることが知られている。本研究では、ラット血漿中にプロレニンが存在するかどうかをラット・プロレニン・プロセグメント-ELISA 法とブルー・トヨパールカラムクロマトグラフィーとを組み合わせて検討した。本研究で開発した ELISA 法は、6 fmole から6 pmole のプロレニンを定量することができた。ラット血漿をブルー・トヨパールカラムに供することによって、プロレニン画分を活性型レニン画分から分離することができた。2 M KCl によるプロレニンのカラムからの溶出は、今回開発した ELISA 法で確認できた。そして、ラット血漿中の活性型レニンとプロレニンの濃度は、それぞれ2.2 fmole/ml と24 fmole/ml と推定された。以上の結果より、ラット血漿中には活性型レニンばかりでなくプロレニンも存在していることが明らかとなった。

### 結 言

レニン [EC 3.4.23.15] はカルボキシルプロテアーゼであり、Fig.1で示すように血液中でアンギオテン

1) 東海女子短期大学, 岐阜大学名誉教授

略号: Ang I; angiotensin I, BSA; bovine serum albumin, EDTA; ethylenediaminetetraacetic acid; PBS; Phosphate buffered saline, MBS; N-(m-maleimidobenzoyloxy) succinimide

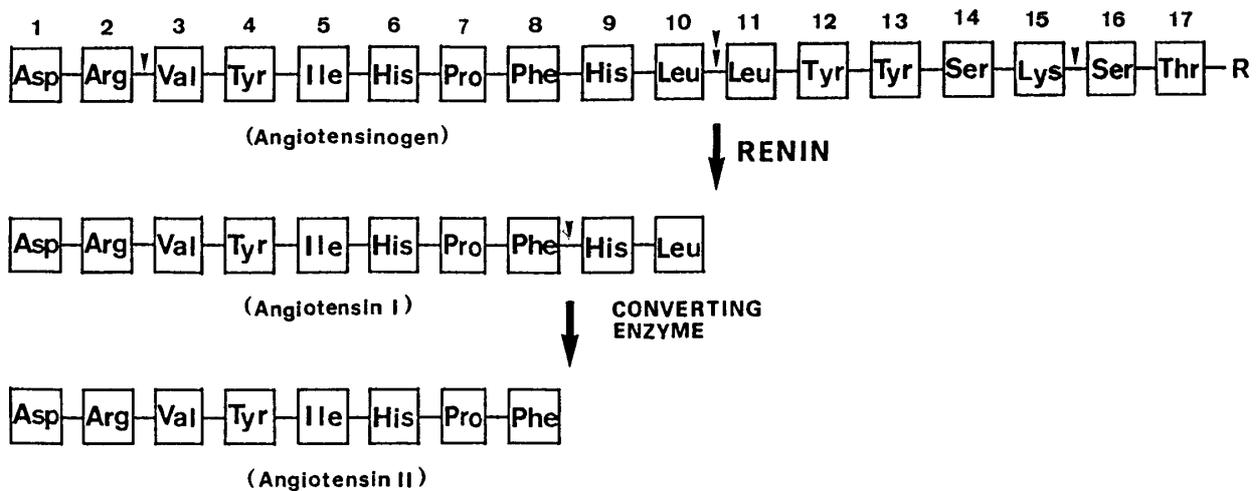


Fig. 1. Renin-angiotensin system. Rat angiotensinogen<sup>1)</sup> is shown as a model precursor of angiotensins.

シノーゲンに作用してアミノ酸10残基からなるアンギオテンシン(Ang) Iを生成する。Ang Iは変換酵素の作用で8残基からなるAng IIとなり、血管平滑筋に作用して血圧を調節したり、副腎に作用してアルドステロンの分泌を促すことにより電解質のバランスを調節している。この一連のアンギオテンシン生成系はレニン・アオギオテンシン系(RAS)と呼ばれ、レニンはその系で重要な役割を担っている。

腎臓の傍糸球体細胞でプレプロレニンとして生合成されたレニンは、その細胞中でシグナルペプチダーゼの作用を受けて不活性なプロレニンに変換され、直ちにゴルジ装置を通してレニン顆粒に入り、その顆粒中でそのほとんどは活性型へ変換され、そして血液中に分泌されていると考えられてきた<sup>1)</sup>。しかし、ここ10数年間に、トリプシンで活性化される不活性なレニンがヒトやラットの血液中<sup>3),4)</sup>で観察され、活性型レニンばかりでなくレニン生合成過程における中間体であるプロレニンも血液中に分泌されている可能性が示唆されるようになってきた。従って、現在その不活性型レニンの生理的意義の解明にRAS研究者達の興味が注がれている。

最近、ラットのレニンやアンギオテンシノーゲン mRNA に対する cDNAs がそれぞれクローニングされ、これらの塩基配列からプロレニン<sup>5)</sup>とアンギオテンシノーゲン<sup>1)</sup>のアミノ酸配列が決定された。それらの結果は、プロレニンの活性化に従来からトリプシンの触媒作用が利用されてきたこと<sup>6-8)</sup>や、プロレニンの活性型レニンからの分離にアフィゲルブルーカラムが用いられたこと<sup>9),10),11)</sup>の妥当性を、プロレニンと活性型レニンのみが存在する純粋な系においては説明できるものであった。しかし同時にそれらの結果は、アンギオテンシノーゲンが混在する血漿などにおけるプロレニンの研究にトリプシンを使用した場合、アンギオテンシノーゲンにはN末端から2番目には Arg 残基が、そして15番目には Lys 残基が存在する(Fig.1)ので、トリプシンはプロレニンとアンギオテンシノーゲンに作用して、活性型レニンばかりでなく Ang I 配列のほとんどを含んだ13または15残基から成るペプチドも生成することを示唆している。事実、トリプシン処理で生じるそのようなペプチドが血中プロレニンの研究遂行上の妨げになっており、その存在を考慮して実験計画を立案すべきであることが最近提言されている<sup>12),13)</sup>。

本研究で私達は、ラット血中に活性型レニンばかりでなくプロレニンも存在しているかどうかを、ラット・プロレニン・プロセグメント ELISA 法とブルー・トヨパールカラムを用いて検討した。

### 材料および方法

ラット・プロレニン・プロセグメント (48-62, GVDMTRISA EWGEFI) は、ペプチド研究所にその合成を依頼して得た。ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ, 3,3', 5,5'-テトラメチルベンチジンは、ペーリンガー・マンハイム社から購入した。トリプシン (III型), 大豆トリプシン・インヒビター, BSA (フラクション V), カゼインはシグマ社, MBS はピアス社からそれぞれ購入した。ブルー・トヨパールカラムはトーソーから購入した。96穴のマイクロプレートは、グライナー社製を用いた。その他の試薬はすべて

特級相当のものを使用した。

### レニン活性の測定法

レニン活性は、既に報告した Ang I—ELISA 法で測定した<sup>14)</sup>。その概略は、活性型レニン画分(100 $\mu$ l)を部分精製して得たラット・アンギオテンシノーゲン標品(900ng ang I 当量)に対して、5 mM EDTA と 5 mM diisopropylfluorophosphate 存在下で37 $^{\circ}$ C、30分間作用させ、生じた Ang I をその ELISA で定量した。そしてレニン活性はこの条件下で1時間当たり生成した Ang I 量で表わした。

### トリプシン処理法によるプロレニン量の測定

基本的には Barret らの方法<sup>11)</sup>に準拠している。その概略は、プロレニン画分(90 $\mu$ l)に対して、50mg/ml のトリプシン溶液10 $\mu$ l を加えて、氷水中で15分間反応させ、添加したトリプシンの2倍量の大豆トリプシン・インヒビターを加えて反応を停止させ、先に示した条件下でレニン活性を測定した。そしてプロレニン量は、トリプシン処理後のレニン活性から処理前の活性を差し引いたレニン活性で表わした。尚、このトリプシン処理の条件を標準条件と定義して以下に示した。

### ラット・プロレニン・プロセグメント ELISA 法によるプロレニン量の測定

#### 1) 抗血清の調製

ラット・プロレニン・プロセグメント (Fig.2, 48—62, GVDMTRISA EWGEFI, 10mg) の N 末端を 6 M 尿素と 0.1MM EDTA で変性させた BSA (10mg) へ MBS 法<sup>15)</sup>で結合してプロセグメント—BSA 複合体溶液(2 ml)を得た。その溶液を等量のプロイント完全アジュバントと混合して、日本白色ウサギ(雌)の背皮内に注射した。その免疫は一週間毎にプロセグメントとして 1mg ずつ行い、初回注射から 6 週後の抗血清を本実験に使用した。

#### 2) 酵素標識プロセグメントの調製

ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ 5 mg を室温で pH 7.4 下、1.7% のグルタルアルデヒド(1.5 ml) と激しく振とうながしながら 1 時間反応させた。未反応のグルタルアルデヒドをゲルろ過で除き、酵素画分を 0.2 ml まで濃縮し 100 $\mu$ g のプロセグメントと 30 $^{\circ}$ C で 2 時間反応させた。その後、0.2M リジンを 100 $\mu$ l 添加して反応を停止させ、ゲルろ過によって酵素標識プロセグメント画分を得た。その画分に BSA (0.1%) を添加し使用時まで -80 $^{\circ}$ C で貯蔵した。

#### 3) プロセグメント ELISA 法

抗血清を 50mM 炭酸緩衝液(pH9.6)で 100 倍に希釈後、96 穴マイクロプレートに 100 $\mu$ l ずつ分注し、4 $^{\circ}$ C で 16 時間静置した。その後、プレート内壁への蛋白質等の非特異的吸着を防ぐ為に、200 $\mu$ l ずつのブロッキング緩衝液(PBS, 10mg/ml カゼイン, 200mg/ml NaN<sub>3</sub>)を添加した。そして、各ウエルの溶液を捨て、新たに 300 $\mu$ l のブロッキング緩衝液を添加し、4 $^{\circ}$ C で 16 時間以上静置したものを固相プレートとして使用した。

固相プレート中のブロッキング緩衝液を完全に除去し、氷上で 100 $\mu$ l のプロレニン画分または標準プロセグメント溶液と 100 $\mu$ l の酵素標識プロセグメント(3,000 倍希釈液)を加えて、4 $^{\circ}$ C で 2 時間反応させた。その後、300 $\mu$ l の 0.5ml/l Tween 20 を含む PBS で各ウエルを 5 回ずつ洗浄した。その後、内液を除去した各ウエルに基質として 150 $\mu$ l の 3,3', 5,5'-テトラメチルベンチジンと 100mg/ml の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を 50 $\mu$ l 加えて、37 $^{\circ}$ C で 30 分間酵素反応させ、2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を 100 $\mu$ l 添加して反応を停止させ、マイクロプレートリーダー(MPR—A4, トーソー)を使って、反応生成物の 450nm の吸光度を測定した。

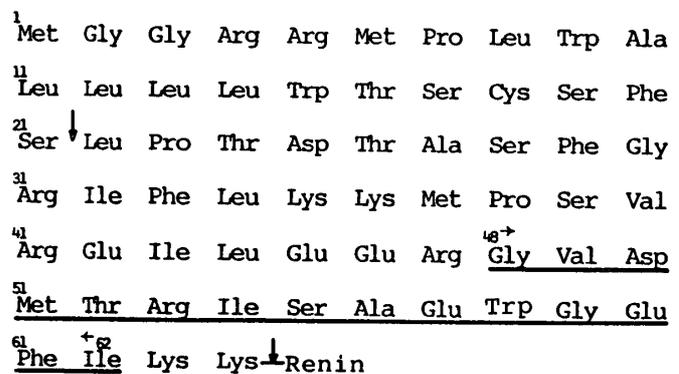


Fig. 2. Amino acid sequences of prepro- and pro-segments for rat renin.

The sequences at amino acid positions 1-21 and 22-64 correspond to prepro- and pro-segment parts in the renin molecule, respectively.

The amino acid sequence indicated by a single underline was used as a prorenin prosegment.

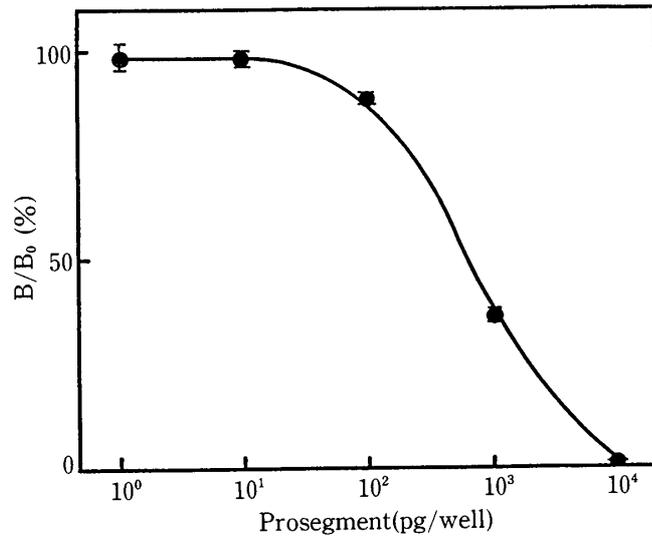


Fig. 3. A standard curve for prorenin prosegment by the present ELISA.

Percent binding of peroxidase-prosegment conjugate is represented in the presence of various amounts of free prorenin prosegment (48-62, GVDMTISA EWGEFI, peptide Inst. Inc.) under the assay conditions as described as follows. The prosegment antibodies (100  $\mu$ l, 1 : 100 dilution), which were raised against the rat prorenin prosegment-BSA conjugate were adsorbed in the 96 wells of a microplate (Greiner). Each well was incubated for 1h at 37°C with 100  $\mu$ l of various amounts of the authentic prosegment and 100  $\mu$ l of the prosegment-peroxidase conjugate obtained by glutaraldehyde treatment, washed 5 times with 300  $\mu$ l of PBS, containing 0.05% Tween 20, and then incubated with 150  $\mu$ l of 55 mM 3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine and 50  $\mu$ l of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 15 min. The peroxidase reaction was stopped with 100  $\mu$ l of 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The products were measured at 450nm by a microplate reader (MPR-A4, Tosoh). Absorbance of 100% binding, which was obtained under this procedure in the absence of the free prosegment, was  $0.783 \pm 0.04$  (n = 12).

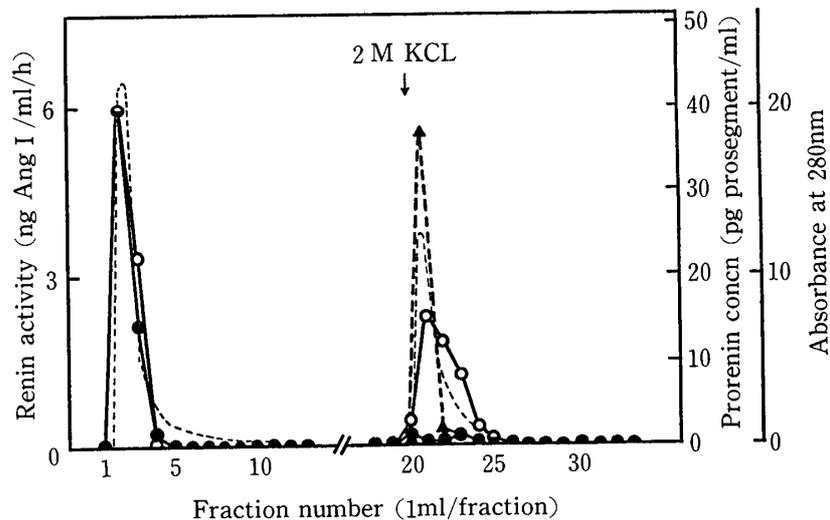


Fig. 4. Blue Toyopearl column chromatography of rat plasma prorenin.

Rat plasma (1ml) was applied on a Blue Toyopearl column (7.5x 75mm) and prorenin was eluted by 0.01M phosphate, pH7.4, including 2M KCl at a 1ml/min of the flow rate controlled by Tosoh HPLC system. The amount of prorenin (-▲-) at each fraction was measured by the ELISA method proposed in this report, after each fraction was concentrated into 100  $\mu$ l by a membrane ultrafiltration (UFP1 TGL, Millipore). Renin activity before and after trypsin treatment is presented as -●- and -○-, respectively. Absorbance at 280nm is represented as ---.

### プロレニンのアフィニティクロマトグラフィー

ラット血漿 1 ml を、0.01Mリン酸緩衝液 (pH7.4)、平衡化したブルー・トヨパールカラム (7.5x 75mm, Cibacron Blue をリガンドとしたカラム) に供し、非吸着画分を洗浄後、2 M KCl を含んだ同緩衝液でプロレニンを溶出した。尚、溶出液は 1 ml ずつ分画し、流速はトローソーの HPLC システムで 1 ml/min に制御した。

## 結 果

ラット血漿を標準条件下でトリプシン処理したところ、レニン活性は7.8から28.6ng Ang I /ml/h まで約3倍上昇した。

本研究で開発したラット・プロレニン・プロセグメント ELISA 法の典型的な標準曲線を Fig.3に示した。本分析系では、10pg から10ng の合成プロセグメントの定量が可能であった。尚、結合率100%のときの450nm の吸光度は、 $0.783 \pm 0.040$  ( $n=12$ ) であった。

ラット血漿100 $\mu$ l をブルー・トヨパールカラムに供したところ、Fig.4に示されているように、ほとんどの活性型レニンは非吸着画分に溶出した。カラムに吸着したタンパク質の内、2 M KCl 溶出画分をプロレニン・プロセグメント ELISA 法で分析したところ、プロレニンの溶出を観察した。その画分にはレニン活性は検出されず、トリプシン処理によって初めてレニン活性が出現した。

## 考 察

プロレニンの研究には、従来から簡便法としてトリプシン処理法が使用されてきた<sup>6,12</sup>)。本研究において、ラット血漿を標準条件下でトリプシン処理したところ、レニン活性の有意な上昇を観察した。しかし、トリプシンの濃度や処理温度を変化させると、上昇値が変化することも観察した (データは示していない)。そこで、より定量性の高いプロレニンの分析方法を得ようと、ラット・プロレニン・プロセグメント ELISA 法を確立した。本法の測定可能領域はプロレニンとして 6 fmole から 6 pmole (実験系に用いたプロセグメントの分子量：1709) であった (Fig.1)。測定感度はそれ程高くないが、血中プロレニンの測定に適用できる分析システムである (Fig.3)。

ラット・プロレニン・プロセグメントには Fig.2に示されているように塩基性アミノ酸残基 (4 Lys 残基と 3 Arg 残基) が比較的多く含まれており、プロレニンがブルー・トヨパールカラムに吸着することは予想される。本研究で私達は、ラット血漿をそのカラムに供し、活性型レニンをプロレニンから分離し、2 M KCl でプロレニンを溶出した (Fig.2)。その溶出は、プロセグメント ELISA 法で観察し、ラット血漿中のプロレニン濃度は24fmole/ml と算出された。一方、カラムの非吸着画分に溶出した活性型レニン濃度は、その比活性を100mg Ang I /mg/h (Suzuki, F. et al. 未発表データ, および文献番号16)、分子量を38,000とすると、2.2fmole/ml と推定される。従って、ラット血液中のプロレニンと活性型レニンの濃度比は、ほぼ10 : 1といえる。以上の結果より、私達はラット血漿中には活性型レニンばかりでなくプロレニンも存在している結論づけた。

血中プロレニン研究におけるトリプシン処理法の妥当性を検討するために、私達はブルー・トヨパールカラムのプロレニン溶出画分を標準条件下でトリプシン処理した (Fig.2)。この処理によって、プロレニンは確かに活性化されているようであるが、その程度はプロセグメント ELISA 法で測定された値から予想値の約 1/20であった。トリプシン処理によるプロレニン定量の概念は、まずトリプシン作用で Fig.2 の64番目の Lys 残基からプロセグメント部分を切り離してレニンを活性化させ、そしてその混液中のレニン活性量でプロレニン量を表わそうとするものである。ラットレニンのトリプシンによる切断部位は上記部位だけでなくレニンの C 末端側にも数ヶ所存在しており<sup>9</sup>)、どんな条件下でもレニンはトリプシンによって失活しないという保証はない。また、全てのプロレニンがトリプシンによって活性化されているという保証もないし、分析の度毎にそれを確認することは非常に困難なことである。これらのことは、トリプシン処理の条件によって試料中のプロレニン量は異なった測定値を与えることを意味しており、ラットの血中プロレニン量が研究者によって異なっていること<sup>8),12),13),17)</sup>を裏付けている。従って、トリプシン処理法では

ロレニンの相対的变化量を半定量的に求めることは可能であるが、プロレニンの真の濃度に近い値を求めることは非常に困難な事と考えられる。

レニンの分泌機序については傍糸球体細胞中にレニン顆粒が確認されて以来<sup>18)19)</sup>, その顆粒を介して活性型ばかりでなくプロレニンも分泌されるものとみなされてきた。しかし最近のラット腎臓に関する組織化学的研究において、ほとんどのレニン顆粒中にはプロレニンは存在せず、活性型レニンばかりであることが示された<sup>20)</sup>。腎臓からはプロレニンは分泌されないのであろうか? Pratt らは腎臓スライス系で次のような興味ある知見を得ている<sup>21)</sup>。生合成されたほとんどのプロレニンは直ちに放出され、その残りが顆粒に入り貯蔵されることを、パルス・ラベル法で観察したのである。個体レベルでの結果を待たねばならないが、かれらのデータは、血中プロレニンの有力な起源の1つに腎臓が挙げられることを強く示唆している。もしそうだとしたら、プロレニンは、Dzau らが提唱している Constitutive Pathway<sup>22)</sup>を介して腎臓から分泌されているのかもしれない。

以上、本研究において私達は、ラット血中に活性型ばかりでなくプロレニンも存在し、その濃度は活性型レニンの約10倍高いことを、プロレニン・プロセグメント ELISA 法とブルー・トヨパールカラムを使って明らかにした。これら2つの道具は、今後のプロレニン研究において有力な手段として使われるものと期待される。

## 謝 辞

本研究の一部は平成元年度文部省科学研究費(01760065)および秩父セメント株式会社からの奨学寄付金で行なわれた。ここに記して謝意を表す。

## 文 献

- 1) Ohkubo, H., Kageyama, R., Ujiyama, M., Inayama, S. & Nakanishi, S. : Cloning and sequence analysis of cDNA of rat angiotensinogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80** : 2196—2200, 1983
- 2) Fray, J. C. S., Lush, D. J., & Valentine, A. N. D. : Cellular mechanism of renin secretion. *Fed. Proc. Am. Soc. Exper. Biol.* **42** : 3150—3154, 1983
- 3) Inagami, T. & Murakami, K. : Prorenin. *Biomedical Res.* **1** : 456—475, 1980
- 4) Sealey, J. E., Atlas, S. A. & Laragh, J. H. : Prorenin and other large molecular weight forms of renin. *Endocrinol. Rev.* **1** : 365—391, 1980
- 5) Tada, M., Fukamizu, A., Seo, M. — S., Takahashi, S. & Murakami, K. : Nucleotide sequence of rat renin cDNA. *Nucl. Acid Res.* **16** : 8, 1988
- 6) Hirose, S., Kim, S. — J., Miyazaki, H., Park, Y. — S. & Murakami, K. : In vitro biosynthesis of human renin and identification of plasma inactive renin as an activation intermediate., *J. Biol. Chem.* **260** : 16400—16405, 1985
- 7) Miyazaki, S., Sakanaka, A., Chimori, K., Kosaka, J., Goi, R., Dodo, S., Miura, K. & Suzuki, F. : Reno-submandibular axis controls release of extrarenal inactive renin. *J. Hypertension* **6** : 33—40, 1988
- 8) Suzuki, S., Miyazaki, S., Uozumi, M., Okamoto, N., Yamashita, S., Murakami, K. & Nakamura, Y. : Proteinic prorenin-releasing-stimulator (PRS) in the rat submandibular gland. *FEBS Lett.* **256** : 47—50, 1989
- 9) Murakami, K., Takahashi, S. & Hirose, S. : Renin precursor in hog kidney. Occurrence and partial characterization. *Biomedical Res.* **1** : 216—222, 1980
- 10) Kim, S. — J., Hirose, S., Miyazaki, H., Ueno, N., Higashimori, K., Morinaga, S., Kimura, T., Sakakibara, S. & Murakami, K. : Identification of plasma inactive renin as prorenin with site-directed antibody. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **126** : 641—645, 1985
- 11) Takii, Y., Figueiredo, A. F. S. & Inagami, T. : Application of immunochemical methods to the identification and characterization of rat kidney inactive renin. *Hypertension* **7** : 236—243, 1985
- 12) Barrett, J. D. & Eggena, P. : Effects of trypsin on the measurement of inactive renin in rat plasma by radioimmunoassay : decrease in inactive renin following nephrectomy. *J. Hypertension* **6** : 49—55, 1988

- 13) Johannessen, A., Nielsen, A. H. & Poulsen, K. : Measurement of inactive renin in rat plasma : effect of nephrectomy and sialoadenectomy on the plasma concentration. *J. Hypertension* **8** : 345—349, 1990
- 14) Suzuki, F., Yamashita, S., Takahashi, A., Ito, M., Miyazaki, S., Nagata, Y. & Nakamura, Y. : Highly sensitive microplate-ELISA for angiotensin I using 3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine. *Clin. Exper. Hyper. A12* : 83—95, 1990
- 15) Kitagawa, T., Fujiwara, K., Tomonoh, S., Takahashi, K. & Koida, M. : Enzyme immunoassay of Kanamycin group antibiotics with high sensitivities using antikanamycin as a common antiserum : reasoning and selection of heterologous enzyme label. *J. Biochem.* **94** : 1165—1172, 1983
- 16) Kim, S., Hiruma, M., Ikemoto, & Yamamoto K. : Importance of glycosylation for hepatic clearance of renal renin. *Am. J. Physiol.* **255** : E642—E651, 1988
- 17) Barrett, J. P., Eggena, P. & Sambhi, M. P. : Activation of rat plasma renin. *Endocrinol.* **108** : 778—785, 1981
- 18) Morimoto, S., Yamamoto. K. & Ueda, J. : Isolation of renin granules from the dog kidney cortex. *J. Appl. Physiol.* **33** : 306—311, 1972
- 19) Taugner, C. H., Poulsen, K., Hackenthal, E. & Taugner, R. : Immunocytochemical localization of renin in mouse kidney. *Histochem.* **62** : 19—27, 1979
- 20) Matsuba, H., Watanabe, T., Watanabe, M., Ishii, Y., Waguri, S. & Uchiyama, Y. : Immuno-cytochemical localization of prorenin, renin, and cathepsins B, H, and L in juxtaglomerular cell. *J. Histochem. Cytochem.* **37** : 1689—1697, 1989
- 21) Pratt, R. E., Carleton, J. E., Richie, J. P., Heusser, C. & Dzau, V. J. : Human renin biosynthesis and secretion in normal and ischemic kidneys. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84** : 7837—7840, 1987
- 22) Dzau, V. J., Burt, D. W. & Pratt, P. E. : Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Am. J. Physiol.* **255** : F563—F573, 1988