

氏 名 (本 籍)	竹 内 圭 介 (岡山県)
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 第 5 3 8 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 1 9 年 3 月 2 6 日
学 位 論 文 題 目	Porcine germinal angiotensin I-converting enzyme: Isolation, characterization and molecular cloning  (ブタ精巢型アンギオテンシンⅠ変換酵素：その精製、生化学的諸 性質の解析およびクローニング)
審 査 委 員	主 査 教 授 柏 木 厚 典 副 査 教 授 木 村 博 副 査 教 授 岡 田 裕 作

## 論文内容要旨

※整理番号	543	(ふりがな) 氏名	たけうち けいすけ 竹内 圭介
学位論文題目	Porcine germinal angiotensin I-converting enzyme: Isolation, characterization and molecular cloning (ブタ精巢型アンギオテンシン I 変換酵素：その精製、生化学的諸性質の解析およびクローニング)		
<p><b>【目的】</b></p> <p>Angiotensin I-converting enzyme (ACE)は、タンパク質やペプチドの C 末端側の二残基 (ジペプチド) のアミノ酸を遊離する酵素である。ACE には、体細胞型 ACE (sACE) と精巢型 ACE (gACE) が存在し、それらは同一遺伝子からのスプライシングの違いにより生じる。sACE が angiotensin I や bradykinin の C 末端側のジペプチドを遊離することにより、血圧調節に関与していることはよく知られている。gACE は精巣にのみ発現することが確認されている。近年、ACE ノックアウトマウスの解析結果より、精子頭部に存在する GPI-anchored protein を gACE が遊離することにより、精子の受精能獲得に重要な役割を果たすことが示唆されている。申請者は、gACE の生化学的な特性を知る目的で、ブタ精漿より本酵素を単離精製し、その生化学的諸性質の解析および内部アミノ酸配列の決定を、またポリクローナル抗体を作成し、免疫免疫組織染色による組織局在の解析を行った。さらに、ブタ精巣より新たに cDNA ライブラリーを作成、gACE の cDNA 配列を解析し、全一次アミノ酸配列を推定、さらに動物種間での gACE のアミノ酸配列の比較も行った。</p> <p><b>【方法】</b></p> <p>ブタ精漿の gACE の精製には、Q-Sepharose、Matrex Red A、Zinc-Chelate、Superdex 200、Resource Phe カラムを用いた。酵素活性は、従来より用いられている基質 (Hip-His-Leu) の他、蛍光基質である Z-Val-Lys-Met-MCA を用いた。単離された酵素を用いて、内部アミノ酸配列、基質特異性、至適 pH、至適温度、温度安定性、反応速度論的パラメータ、各種酵素阻害剤や二価金属による酵素阻害の影響を検討した。また、17 種類の生理活性ペプチドに対する gACE の作用も検討した。</p> <p>精製酵素をもとに抗体を作成し、ABC 法を用いて gACE の免疫組織学的局在を検討した。次に、ブタ精巣より cDNA ライブラリーを作成し、gACE の cDNA をスクリーニングし、得られたヌクレオチド配列から全一次アミノ酸配列を推定した。</p> <p><b>【結果】</b></p> <p>(1)ブタ精漿 (~500 ml) より gACE は精製倍率 2,767 倍、回収率 12.4%で精製され、SDS-PAGE 上で単一バンドを示した。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

- (2) ブタ gACE の分子量は、SDS-PAGE で約 94,000、非変性条件の PAGE では 182,000 の二量体であった。
- (3) gACE の基質特異性では、種々の蛍光基質の中で Z-Val-Lys-Met-MCA にのみ活性を示した。合成ペプチドでは、Hip-His-Leu の他、angiotensin I や bradykinin などの 8 種類の生理活性ペプチド分解活性を確認した。本酵素は EDTA や 1,10-phenanthroline および ACE の特異的阻害剤である captopril、lisinopril に強く活性が阻害された。
- (4) gACE に対するポリクローナル抗体を用いて免疫組織染色を行った結果、精巣においては精子細胞が、また遊出精子の頭部および頸部の細胞膜が、さらには精子細胞由来の遺残小体が特に強く染色された。精漿中の精子では頸部および尾部が軽度に染色されていた。
- (5) ブタ精巣より cDNA ライブラリーを作成し、gACE のクローニングを行った結果、2,235 bp のコード領域を含む全長 2,508 bp の cDNA が得られた。金属酵素の活性中心である H<sup>427</sup>EXXH-(23)-H<sup>455</sup>、chloride-binding site (Arg<sup>566</sup>)、cysteine 残基の位置など他の種の gACE 同様保存されていた。
- (6) ブタ gACE は、cDNA レベルではヒトと 84.9%、ヒツジと 86.5%、マウスと 80.4%、アミノ酸レベルではヒトと 80.1%、ヒツジと 82.8%、マウスと 76.8% の相同性があった。

#### 【考察】

gACE は本来 II 型の膜酵素として知られているが、本研究によって、ブタ精漿中に soluble type の gACE が二量体で存在することが明らかとなった。sACE が合成基質である Z-Vla-Lys-Met-MCA を切断することが報告されていたが、本研究において gACE もまた同基質を切断することを確認した。sACE 活性は特異的阻害剤である captopril や lisinopril により阻害されるが、gACE の場合は captopril に比べ lisinopril により 10 倍強く阻害されたことから、lisinopril は ACE の C ドメインにより特異的な阻害剤であることを確認した。種々の生理活性ペプチドを用いて gACE の基質特異性を調べた結果、8 種類のペプチドの分解が確認でき、gACE は sACE 同様、多くの生理活性ペプチドの C 末端のジペプチドを遊離し、proline を除く多くのアミノ酸の後ろのペプチド結合を切断し、酵素的機能には差がないことが示唆された。免疫組織学的染色の結果から gACE は精巣内の精子の頭部や頸部、特に遺残小体に強く発現していることが確認され、その後精巣上体を経て、精子成熟の過程で、遺残小体を失うが、精漿中の soluble type gACE はこの小体由来であることが示唆された。ACE の knockout mouse では、オスの受精能低下が報告されており、その原因として精子アクロソーム膜に存在し精子の透明体結合および通過に関与すると言われている GPI アンカー型タンパク質が gACE によって遊離されないことが推定されている。しかしながら、実際に soluble type gACE が GPI アンカー型タンパク質遊離の際に、新しい活性としての mannosidase 活性を示しているか否かは不明であり、その反応機構を明らかにすることや、さらには gACE を soluble 化する sheddase を同定することなどが今後の課題である。

#### 【結論】

gACE をブタ精漿より単一標品にまで精製し、ACE としての生化学的諸性質の解析を決定した。また、精製酵素の部分アミノ酸配列の決定と gACE の cDNA 構造の解析を行い、全一次構造を推定した。これらの結果から、gACE が金属酵素であり、さらにヒトやラットを含む種間でのアミノ酸配列の相同性を比較したところジスルフィド結合の位置、活性中心や亜鉛結合部位、NaCl 結合部位、さらには sheddase 切断部位などがよく保たれていることが明らかとなった。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	543	氏名	たけうち 竹内 けいすけ 圭介
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>アンギオテンシン I 変換酵素 (ACE) には、体細胞型 (sACE) と精巢型 ACE (gACE) が存在する。gACE は精巢のみに局在し、そのノックアウトマウスの解析にて、GPI アンカー型蛋白を膜から遊離することにより、精子の受精能の獲得に重要な役割をすることが報告された。本研究の結果、単一バンドに精製されたブタ gACE の分子量は 94kDa で、二量体で存在し、各種生理活性ペプチドの分解活性を示した。ポリクロナール抗体を用いた免疫組織染色にて精子細胞、遊出精子の頭部、頸部の細胞膜や遺残小体が強く染色された。クローニングにより得られた gACE の cDNA は、全長 2,508 塩基で、アミノ酸配列は 745 残基から構成され、亜鉛結合部位や NaCl 結合部位が保存され、膜貫通ドメインが存在した。更に、ブタ gACE の塩基配列は、ヒト、ラットを含む動物種間でよく保存されていた。</p> <p>本研究は、研究が進んでいない gACE の構造、機能の解析に有用な情報を提供し、博士 (医学) の学位を授与することに値すると評価された。</p>			
(平成 19 年 2 月 1 日)			