Osaka University Knowledge Archive

Title	赤血球アンジオテンシネースの精製
Author(s)	阿久津, 弘
Citation	大阪大学, 1969, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/29663
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【1】

氏名・(本籍)	阿久津　弘（あくつ　ひろし）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 1620 号
学位授与の日付	昭和44年3月28日
学位授与の要件	医学研究科病理系 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**赤血球アンジオテンシネースの精製**
論文審査委員	(主査) 教授 堀　三津夫 (副査) 教授 山村　雄一　教授 須田　正己

論文内容の要旨

〔目　　的〕

強い昇圧活性ペプチド，アンジオテンシンⅡ（以下ATⅡと略す。）は，腎の傍糸球体細胞より分泌される酵素レニンが，血漿中の α_2-クロブリン分画のレニン基質に作用し，更に変換酵素が作用してつくられるとされている。ヒトのATⅡの構造は Asp-Arg-Val-Tyr-Ileu-His-Pro-Phe と報告されている。臨床ならび実験的に腎性高血圧症の初期および悪性高血圧症では，血漿中にATⅡが増加していると報告されている。このATⅡを不活性化する酵素はアンジオテンシネース（以下ATaseと略す。）と総称されている。ATase は各種臓器に存在することが報告されており，腎，肝等の臓器抽出物や血漿によるATⅡの不活性化実験も種々行なわれているが，いずれも粗な材料で行なわれている現状である。従って，ATⅡがどの臓器で主に分解をうけているのか，ATⅡを不活性化する特異的な酵素の有無等は，未だ解明されていない。赤血球中に強い ATase 活性の存在を証明したので，家兎赤血球より，この酵素の抽出，精製を行ない，その酵素学的性質およびATⅡの不活性化の機構を検討した。

〔方法ならびに成績〕

1）ATase の活性の測定

ATⅡの昇圧活性は，体重約 200g のラット（ネンブタール麻酔，迷走神経切断，交感神経節遮断剤の投与を行なったもの）にATⅡを静注し，頸動脈より直接法により血圧測定する bioassay によった。ATase 活性は，合成 ATⅡを基質とし，酵素材料と反応させた後，その反応混合物を，上記と同様な処置を行なったラットに静注し，その昇圧活性の減少を ATⅡの ng で表わし，ATase 活性とした。

2）ATase の抽出，精製

家兎のヘパリン添加血液から遠心分離により赤血球を得た。この赤血球に蒸溜水を加えて10倍容とし，溶血させた。溶血液を固形硫安で塩析すると，30%～70%飽和画分に ATase が認められた。この活性画分を濃縮し 1/100M 燐酸緩衝液で平衡化した DEAE-セルローズカラムで，食塩濃度勾配法によりクロマトグラフィーを行なった。酵素活性は食塩濃度 0.1M から 0.3M の間に溶出された。次にこの画分を 1/100M 燐酸緩衝液で，Sephadex G-200 カラムでゲル沪過を行なった。酵素活性は hold されたかなり後の部分に溶出された。この精製段階で，ATase の比活性は約8000倍であった。以下の実験はこの精製段階の酵素材料を用いた。

3）酵素学的性質の検討

作用至適 pH, 安定至適 pH はともに6.8であった。また本酵素の活性は，EDTA 10^{-3}M の添加で完全に阻害されたが，Ca^{++}, Co^{++}, Mn^{++}, Mg^{++}, Zn^{++} など金属を添加しても，酵素活性の復活は認められなかった。DFP 10^{-3} M の添加によっても酵素活性は完全に阻害された。種々の合成基質を用いて，ペプチデース活性について検討した成績を，表1に示す。

表 1

基　　質	素活性酵 (μg/mg of protein/hr)
α-L-Asp[1]-Val[5]-Angiotensin II	265.5
ν-L-Asn[1]-Val[5]-Angiotensin II	515.5
L-Leucyl-β-Naphthylamide	1400
L-Glutamyl-β-Naphthylamide	0
L-Asparatyl-β-Naphthylamide	0
L-Leucyl-Glycine	1.7
D.L-Glutamyl-Glycine	0
L-Arginyl-Alanine	8.7
L-Leucine Amide	2.8
L-Leucyl-Glycyl-Glycine	363
cbz-Glycyl-L-Phenylalanine	2.3
cbz-Glycyl-L-Arginine	0
casein	0
Tosyl-L-Arginine Methylester	0
Acetyl-L-Tyrosine Ethlester	0

表1の如く Sephadex G-200 のゲル沪過までの段階では，ATase 活性の他に，arylamidase 活性と，tripeptidase 活性が認められた。両酵素活性の Sephadex G-200 による溶出曲線は ATase 活性の溶出曲線とほぼ同じであった。

4）本酵素による ATII の分解

合成 α-L-Asp[1]-Ileu[5]-AT II と酵素材料を反応させ，反応混合物をアミノ酸分析すると，遊離のアミノ酸としては，N末端から5番目の Ileu のみが検出された。その他の遊離のアミノ酸は極くわずかしか検出されなかった。その他の ATIIの分解産物を同定するため，シリカゲル薄層クロマトグラフィーで反応混合物を展開した。ニンヒドリン陽性物質は5点認められた。高圧沪紙電気泳動で反応混合物を分離すると，ニンヒドリン陽性物質は6点認められた。各部分を抽出し，それぞれの1部を

再びシリカゲル薄層クロマトグラフイーで展開し単一性を調べた。一点と認められた部分は，塩酸水解しアミノ酸分析を行なった。また一点でなかった部分は，その部分をペーパークロマトグラフイーで分離し，アミノ酸分析を行なった。それぞれのニンヒドリン陽性物質は，Ileu, Val-Tyr, Asp-Arg, AT-II, Ileu-His-Pro-Phe, His-Pro-Phe であった。

〔総　　括〕

1）家兎赤血球より ATase を硫安塩析，DEAE-セルローズカラムクロマトグラフイー，Sephadex G-200 によるゲル沪過による分離，精製を行ない比活性8000倍とした。

2）この精製段階までは，ATase 活性の他に，arylamidase 活性，tripeptidase 活性が並行して認められた。

3）本酵素材料で AT II の分解を検討したところ，Arg-Val, Tyr-Ileu, Ileu-His 鎖を水解した。

反応混合物をアミノ酸分解すると，遊離の Ileu が先ず認められるので，Tyr-Ileu 鎖が先ず水解され次いで Ileu-His 鎖が水解を受けることが想定された。従って，私が抽出した赤血球中の ATase は Fndepeptidase と考えられた。

論文の審査結果の要旨

現在，アンジオテンシン (AT) 分解酵素，いわゆるアンジオテンシネースの本態は明らかでない。本研究は家兎赤血球から本酵素を抽出し比活性8000倍にまで精製した。しかもヒトの AT 中のチロシン—イソロイシン鎖を水解する比較的 AT に特有な endopeptidase であることを証明した。以上の新知見は生体内の AT 代謝，あるいは他のペプチド代謝を追求するのに寄与するところが大きい。