



| | |
|--------------|--|
| Title | ヒト肺アンヂオテンシンⅠ変換酵素の精製及びその化学的性質に関する研究 |
| Author(s) | 西村, 一孝 |
| Citation | 大阪大学, 1978, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/31835 |
| 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。 |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

| | |
|---------|--|
| 氏名・(本籍) | 西 村 一 孝 |
| 学位の種類 | 医 学 博 士 |
| 学位記番号 | 第 4159 号 |
| 学位授与の日付 | 昭和53年2月22日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第5条第2項該当 |
| 学位論文題目 | ヒト肺アンヂオテンシンⅠ変換酵素の精製及びその化学的性質に関する研究 |
| 論文審査委員 | (主査) 教授 山村 雄一 (副査) 教授 熊原 雄一 教授 和田 博 |

論文内容の要旨

〔目的〕

アンヂオテンシンⅠ変換酵素は、アンヂオテンシンⅠを昇圧活性を有するアンヂオテンシンⅡに変換する酵素である。CushmanとCheungは、合成基質 *Hippurylhistidylleucine* を用いて各臓器組織中のアンヂオテンシンⅠ変換酵素活性を測定し、肺組織中より発見されたキニネースⅡと本酵素は、同一酵素であろうと考えられているが、いまだ明確な証拠に乏しい。本酵素の精製の仕事は、各種動物の肺、腎、血清等を用いて行なわれている。しかし本酵素は、膜成分に結合した酵素であるため組織中より精製する場合、膜から遊離させる所に問題があった。

CushmanとCheungは、アセトン処理により、又Sofferら及び大島らは、表面活性剤を用いて本酵素を遊出させようと試みている。しかし、これらの遊出法による回収率は悪く、均一な型で得られていない。私は、トリプシン処理により、いまだ報告されていないヒト肺組織中より本酵素を精製単離する事に成功し、本酵素がキニネースⅡと同一酵素である事を確認し、さらにその酵素化学的性質ならびに生理学的意義について検討したので報告します。

〔方法ならびに成績〕

(I) ヒト肺アンヂオテンシンⅠ変換酵素の精製

(1) 精製に関する実験：ヒト肺組織(360g)を細片し、20mMリン酸緩衝液pH7.8を加え、Waring blenderにて4分間ホモジネートした。ホモジネートを700×g、20分間遠心分離し、その上清を酢酸にてpH5.2に調整した後、15,000×g、30分間遠心分離した。生じた沈澱(酸処理分画)に10mMリン酸緩衝液pH7.8を加えた。この酸処理分画にトリプシン(1mg/500mg蛋白)を加え

120分間, 37°Cで反応させた。この溶液を再び酢酸にてpH 5.2に調整した後, 15,000×g, 30分間遠心分離し上清を得た。上清をDE-52セルロースカラム(0から0.5M食塩による直線勾配法にて溶出した), *Hydroxyapatite*カラム(1から30mMのリン酸緩衝液による直線勾配法にて溶出した), *Sephadex G-200*カラムにて精製した。

(1) 精製酵素の性質:(a) ディスクゲル電気泳動にて單一帯であった。(b) 精製した酵素が, アンヂオテンシンⅠをⅡに変換すると共に, ブラディキニンにも働きその作用を不活性化する事を薄層クロマトグラフィー及び*Bioassay*法により確認した。(c) 精製した酵素の比活性は, HHLを基質とした場合, 9.5 Units/mg蛋白であり, アンヂオテンシンⅠを基質とした場合, 0.665 μ mole/min/mg蛋白であった。(d) 本酵素の分子量は, ゲル沪過法にて29万と測定された。(e) 至適pHは, pH 8.3であった。

(II) アンヂオテンシンⅠ変換酵素の遊出に用いたトリプシン量の影響

加えたトリプシンの濃度を変化させて膜成分より本酵素が遊出される効果を検討した。

(1) トリプシン(1 mg/200mg蛋白)の場合:酸処理分画にトリプシン(1 mg/200mg蛋白)を加え反応させた後, 酢酸にてpH 5.2に調整した。15,000×g, 30分間遠心分離して上清を得た。上清を前述のごとくDE-52セルロースカラム, *Hydroxyapatite*カラム, *Sephadex G-200*カラムにて精製した。ゲル沪過法にて本酵素は, 分子量29万(*Peak I*), 18万(*Peak II*), 9万8千(*Peak III*)に分かれた。

(2) トリプシン(1 mg/10mg蛋白)場合:(1)と同様の方法で精製して*Peak II*, *Peak III*成分を得た。

(III) *Peak I*. *II*. *III*の酵素化学的性質:*Bradykinin Potentiator C*, *Arg-Pro-Pro*, EDTAによる阻害効果, 耐熱性, クロールイオン依存性, 至適pH, Km値について検討した。*Peak I*, *II*の酵素活性は, *Bradykinin Potentiator C*, *Arg-Pro-Pro*, EDTAにより阻害され, それぞれのI₅₀値は, 2×10⁻⁶M, 1.2×10⁻⁴M, 5×10⁻⁵Mであった。一方*Peak III*は, *Bradykinin Potentiator C*, *Arg-Pro-Pro*で阻害されなかった。またEDTAによるI₅₀値は, 2×10⁻³Mであった。*Peak I*と*Peak II*の酵素活性は, 10分間50°Cで加熱することにより加熱する前の活性に比べて10%に低下した。*Peak I*と*Peak II*の酵素活性は, クロールイオン非存在下においてみられなかった。しかし*Peak III*は, クロールイオン非存在下においても酵素活性に変化をみなかった。至適pH, Km値に関して*Peak I*, *II*, *III*共にそれぞれpH 8.3, 1.1mMであった。

[総括]

- (1) ヒト肺より酸処理, トリプシン処理, DE-52セルロースカラム, *Hydroxyapatite*カラム及び*Sephadex G-200*カラムを用いてアンヂオテンシンⅠ変換酵素を初めて精製単離することに成功した。
- (2) 精製した酵素がアンヂオテンシンⅠを加水分解してアンヂオテンシンⅡと*His-Leu*のみを生成する事を薄層クロマトグラフィーにて確認した。又ブラディキニンにも働きその作用を不活性化した。本酵素は, 肺循環を場として, レニン-アンヂオテンシン昇圧系とカリクレイン-キニン降圧系の両系の切点となって作用しており, 全身の血圧調節に関与しているものと推論され

る。

論文の審査結果の要旨

(1) ヒト肺より、トリプシン処理と云うユニークな方法を導入して初めてアンヂオテンシンⅠ変換酵素を精製単離する事に成功した。

(2) 精製した本酵素が、アンヂオテンシンⅠをアンヂオテンシンⅡに変換すると同時にブラディキニンにも作用する事を確認し、キニネースⅡと同一酵素である事を証明した。

従って、本研究は、活性ペプチドの生体内代謝に関し有用な知見を提供しているので学位論文と認める。