

①

学 位 論 文

ヒト小腸アンギオテンシン変換酵素の精
製およびその性状について

早 狩 誠

弘前大学医学部法医学教室

(指導：村上 利教授)

本 文 5 7 枚

目 次

	page
I 緒言	1
II 材料および方法	
1. 試薬及び装置	3
2. 材料	5
3. ACE活性測定法	5
4. アミノ酸分析	7
5. ヒト組織ホモジネートの調製法	7
6. ヒト小腸ACEの細胞内分画法	7
7. ヒト小腸ACEの精製	
(1) 粗抽出法	9
(2) DEAE-Celluloseクロマトグラフ (バッチ法)	10
(3) Lisinopril-linked Sepharose 6Bカラムクロ マトグラフ法	10
(4) Sephacryl S-300 HRカラムクロマトグラフ法	11
8. ヒト腎臓ACEの精製	12
9. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法	12
10. 抗ヒト腎臓ACE抗体作成法	12
11. 吸収試験法	13
12. ウェスタンブロッティング法	14
13. タンパク質量の測定法	14

Ⅲ	結果	
1.	ACEの組織分布について	16
2.	各組織中ACEの細胞内分布	17
3.	ヒト小腸ACEの細胞内分布	18
4.	ヒト小腸ACEの精製	19
5.	至適pHの検討	20
6.	至適Cl ⁻ の検討	21
7.	人工および内在性基質並びにエンケファリン類の 分解能について	21
8.	カプトプリルによる阻害および阻害様式	23
9.	免疫化学的分析	24
10.	ヒト各組織抽出物のSephacryl S-300 HRカラム クロマトグラフィー	25
Ⅳ	考察	26
Ⅴ	結語	41
Ⅵ	文献	43

I. 緒言

アンギオテンシン変換酵素 (ACE, EC. 3. 4. 15. 1) は, レニン-アンギオテンシン系においてアンギオテンシン I より昇圧ペプチドであるアンギオテンシン II への変換を行うと同時に, 降圧ペプチドであるブラジキニン这不活化する酵素である¹⁾. また, ACE阻害剤は, 本態性及び腎障害性高血圧症に対し, 著明な血圧降下作用を示すこと^{2, 3)}から, ACEの血圧調節機構への関与の重要性が再認識され, 臨床上注目を浴びてきている. 従来, ACEはヒトの多くの組織および体液に広範囲に分布する^{4, 5)}ことが知られ, 多くの組織より単離精製され, その酵素化学的性状等についての検討がされてきたが, 各組織および体液中でのACEの生理的意義は未だ不明な点が多い. 肺は血管床の広いこと, そして, アンギオテンシン II が分解されにくいことなどから, アンギオテンシン II の産生およびブラジキニンの不活化を行い, レニン-アンギオテンシン系の血

圧調節機構に重要な役割を演じている組織と考えられてきた⁶⁾。一方、近年末梢血管系のレニン-アンギオテンシン系、特に、ACEが血圧調節機構に重要な役割をなしている^{7, 8)}ことが、ACEの特異的阻害剤を利用した研究から判明するなど、各組織中ACEも血圧調節機構に関与している可能性が示唆されている。更にACEは生理活性ペプチド（エンケファリン⁹⁾、サブスタンスP、ニューロテンシン¹⁰⁾、黄体成ホルモン放出ホルモン¹¹⁾等）の代謝への関与も報告されるなど、血圧調節以外の生理機能も注目を集めている。

著者は未だ十分な酵素化学的性状並びに生理機能の検討がなされていない小腸ACEの精製を行いその基礎的性状の検討を行った。

II. 材料および方法

1. 試薬および装置

本研究で用いた各試薬は、以下の各社より購入又は供与されたものを使用した。

Hippurylhistidylleucine, hippurylglycylglycine, アンギオテンシン I, アンギオテンシン II, ブラジキニン, [Met⁵]-エンケファリン, [Leu⁵]-エンケファリンはペプチド研究所株式会社（大阪）より, phenylalanyl-arginineは Bachem Feinchemikalein AG社（Bubendorff, スイス）より, トリトン X-100, 塩化シアヌル, ブルーデキストランおよびアセトニトリルは和光純薬株式会社（大阪）より, Sepharose 6B, および Sephacryl S-300 HRは Pharmacia社（Uppsala, スウェーデン）より, phenylmethyl-sulfonylfluoride および標準アミノ酸は Sigma社（St Louis, MO., U.S.A.）より, トリプシンは Difco Laboratories社（Detroit, MI., U.S.A.）より, DEAE-celluloseは生化学工業株式会社（東

京)よりそれぞれ購入した。カプトプリルは三共製薬株式会社(東京)より, lisinoprilはMerk社(Rahway, NJ., U.S.A.)より供与された。電気泳動用分子量測定用標準タンパクキットはベーリンガー・マンハイム山之内株式会社(東京)より購入したも用いた。その他の試薬はすべて特級を用いた。尚, Dabsyl-Clは同仁化学研究所株式会社(熊本)より購入し, アセトンにて再結晶したものを使用した。

HPLCは, 日立イナータートHPLCシステム(L-6210形 Intelligent Pump + L-4200形 UV-Vis 検出器, 東京)を用い, カラムはペプチド分析用としてAsahipak ODP-50(4.6 mm i.d. x 150 mm, 粒径 5 μ m, 旭化成工業株式会社, 東京)を, アミノ酸分析用としてInartsil ODS-2(4.6 mm i.d. x 250 mm, 粒径 5 μ m, ガスクロ工業社製, 東京)を使用し, 日立L-5020形カラムオーブンにて保温した。カラムからの溶出液は波長220 nm(ペプチド分析)および436 nm(アミノ酸分析)にて測定し,

クロマトグラムはSIC Intelligent Integrator Model 7000A(SIC System Instrument 株式会社製, 東京)にて記録した。

2. 材料

ヒト各組織は, 剖検時採取試料(死後24時間以内)を用い, 試料は使用まで-40℃に保存した。

ヒト血清, 精液, 尿, および唾液は健康成人より提供されたものを, また, 腔内液は妊婦検診時に採取したものをを用いた。尿は, 採取後20 mMリン酸カリウム緩衝液, pH 8.3 (Buffer A)に一晩透析後試料として用いた。各試料は, 使用まで-85℃に保存した。

3. ACE活性測定法

ACE活性の測定は, 人工基質 hippuryl-histidylleucine (HHL) を用い, 酵素反応にて産生される馬尿酸を塩化シアヌルにて発色後, 波長382 nmにて比色定量し酵素活性とす

る Hayakariらの方法¹²⁾にて行い, 37℃ 1 分間に 1 μ mol の馬尿酸を産生する酵素量を 1 単位 (U) とした。

その他の基質, hippurylglycylglycine (HGG), およびアンギオテンシン I に対する ACE 活性は, 酵素反応にて産生された馬尿酸, アンギオテンシン II を HPLC にて定量した。

HPLC の移動相は, 0.05% トリフルオロ酢酸 (TFA) 溶液およびアセトニトリル (CH_3CN) を用い, CH_3CN 濃度 (0%, 0-5 分; 0-45%, 5-35 分; 45%, 35-40 分) を変化させ, 流量 1.0 ml/min, カラム温度 35℃ にて行った。酵素反応液の 20 μ l を注入し, カラムからの溶出液の吸光度は波長 220 nm にて測定した。また, [Met⁵]-および [Leu⁵]-エンケファリンに対する活性は各分解産物を HPLC にて分取後, 各アミノ酸を定量し酵素活性とした。

4. アミノ酸分析

アミノ酸分析は試料を酸加水分解後，Dabsyl-Clにて誘導体化し，HPLCにて定量した¹³⁾。移動相は，25 mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH 6.5）およびCH₃CNを用い，CH₃CN濃度（0%，0-5分；0-75%，5-60分；75%，60-65分）を変化させ，流量1.0 ml/min，カラム温度50℃にて行った。反応液の10 μlを注入し，カラム溶出液の吸光度は波長436 nmにて測定した。

5. ヒト組織ホモジネートの調製法

各組織ホモジネートの調製は，各組織（約5 g）に4倍量（重量比）のBuffer Aを加え，ポリトロンホモジナイザーTMにてホモジナイズして得た溶液を試料とした。

6. ヒト小腸ACEの細胞分画法

ヒト小腸試料の調製は，Fig.1に示すような方法で行った。ヒト小腸（約20 g）に4倍量のBuffer B（1 mM phenylmethylsulfonyl-

fluoride, PMSF含有 Buffer A) を加え, ポリ
トロンホモジナイザーTMにてホモジナイズし
た. 得られた20%ホモジネートの一部(10 ml)
にトリトン X-100(最終濃度, 1.0%)を添加,
4℃にて45分間可溶化した試料を105,000xg
30分間遠心分離して得た上清をFraction Aと
した. また, ホモジネート(約 30 ml)を
35,000xg 30分間遠心分離して得た上清を
Fraction Bとし, その沈澱物をBuffer Bに懸
濁後, 再び35,000xg 30分間遠心分離し沈澱物
を得た. この操作を3回行った後, 得た沈澱物
をBuffer Bに懸濁しトリトン X-100(最終濃
度, 1.0%)を添加, 可溶化(4℃ 45分間)後,
105,000xg 30分間遠心分離して得た上清を
Fraction Cとした. 一方, Buffer Aにて調製
したヒト小腸の20%ホモジネート液およびその
35,000xg 遠心沈澱物再溶解液にトリプシン
(10 mg/g 組織)を添加, 可溶化(37℃, 1
時間)後, 105,000xg 30分間遠心分離して得
た上清をそれぞれFraction DおよびEとした.

各 Fraction は 0.05% トリトン X-100,
0.02% アジ化ナトリウム (NaN_3) および 0.3M
NaCl 含有 Buffer A (Buffer C) にて 4℃ 一夜透
析後, 105,000xg 30 分間遠心して得た上清を
Sephacryl S-300 HR カラム (2.2 x 100 cm)
で分離した。

7. ヒト小腸 ACE の精製

(1) 粗抽出

ヒト小腸小片 (約 650 g) をミートチョ
ッパーにて粉碎後, 4 倍量の Buffer B を加え,
ポリトロンホモジナイザーTM にて 30 分間ホモ
ジナイズした後, 13,500xg 60 分間遠心して得
た上清 (2,450 ml) について, 常法により硫
安分画 (33-65%) を行い得られた沈澱物を,
10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.2, 0.05%
トリトン X-100 および 0.02% NaN_3 含有, Buffer
D) に再溶解後, Buffer D, 15 l (5 l/回) に
て 4℃, 36 時間透析した。

(2) DEAE-Celluloseクロマトグラフィー

予め0.5N HClおよび0.5N NaOHにて活性化後,
Buffer Cにて平衡化したDEAE-cellulose (膨
潤容量, 約 1 l) に, 透析した粗ACE画分
(750 ml) を混合, 4℃にて一夜攪拌した。次
にブッフナー漏斗上, 5 lのBuffer Dにて十分
洗浄後, 1 lの1.0 M NaClにてACEを溶出した。

(3) Lisinopril-linked Sepharose 6Bカ
ラムクロマトグラフィー

上記溶出液 (1,050 ml) を20 mMリン酸カ
リウム緩衝液 (pH 8.3, 0.05%トリトン X-
100および0.02% NaN_3 含有) にて3倍に希釈後,
 KH_2PO_4 粉末にてpHを8.0-8.5に調整後, 予め
Buffer Cにて平衡化したlisinopril-linked
Sepharose 6Bカラム (4.6 x 60 cm) に乗せた。
同ゲルはBullらの方法¹⁴⁾にて調製した。試料
を乗せた後, 同ゲルをBuffer Cにて十分洗浄
後, 1.0 M NaClを含有4.0M尿素溶液 500 mlに

て溶出，ACE活性陽性画分（340 ml）を
Buffer C，10 l（5 l/回）にて一昼夜透析後，
20%Polyethylene glycol-6000（PEG-6000）/
Buffer Aにて約3-5 mlまで濃縮，再びBuffer
C，3 lに一夜透析した。

（4）Sephacryl S-300 HRカラムクロマト グラフィー

濃縮液（約 7.5 ml）を 35,000xg 30分間
遠心し，得られた上清（7.0 ml）をBuffer C
にて平衡化したSephacryl S-300 HRカラム
（2.6 x 100 cm）に付し（流量，12.0 ml/時），
ACE活性画分（P-I および P-II）を20%PEG-
6000溶液にて濃縮後，20 mMリン酸カリウム緩
衝液（pH 8.3，0.02%NaN₃含有）にて4℃一夜
透析し酵素標本（P-I：5.0 ml，P-II：6.0
ml）とした（Fig. 5）。

8. ヒト腎臓ACEの精製

ヒト腎臓ACEは腎臓の膜画分よりトリプシンにて可溶化を行い、ヒト小腸ACEの精製法と同様の方法にて行った。なお、この時得られたヒト腎臓ACEの比活性は152 U/mgであった（回収率：64%，精製度：2826.5倍）。

9. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）法は、Laemmliの方法¹⁵⁾に準拠して行った。アクリルアミドゲル濃度は、8.0%を用いた。

10. 抗ヒト腎臓ACE抗体作成法

ACE抗体は、ヒト腎臓より前記の方法で精製したACEを抗原とし、Knudsenの方法¹⁶⁾に準拠して作成した。すなわち、ACE溶液（ACEとして約50 μ g相当）をSDS-PAGEに付し、ニトロセルロース膜（NCM）に転写後、1%ファストグリーン溶液にて染色、脱色後染色された

ACE部分を切取り 0.5 ml の dimethylsulfoxide (DMSO) に溶解後、等量の Freund 完全アジュバンドを加え十分攪拌し、この溶液を一週間間隔にて4回、および Freund 完全アジュバンドを加えない ACE/DMSO 溶液、0.5 ml、1回の計5回、ウサギに免疫して抗 ACE 抗体を作製した。

得られたウサギ血清は 56℃ 30 分間非動化後、常法により硫酸分画を行った後、ヒト血清タンパクをリガンドとしたアフィニティークラム（ゲル容量 50 ml，血清 26 ml = 1.56 g タンパクとカップリング）に付し、非吸着分画から抗体画分を集め抗 ACE 抗体とした。

1 1. 吸収試験法

ヒト腎臓 ACE 抗体による吸収試験は、以下のごとく行った。各 ACE 溶液の活性値を 250 mU/ml に調整した酵素溶液 100 μ l に 10～10,000 倍に希釈した各抗体溶液 100 μ l を添加し、4℃ にて一晚反応させた後、4℃ 13,000 x g，5 分間遠心して得られた上清中の残存 ACE

活性を測定した。

12. ウェスタンブロッティング法

ウェスタンブロッティングは Towbinらの方法¹⁷⁾に準じて行った。各試料の10 μ lを、前項9の方法にて SDS-PAGE に付した後、セミドライ型転写装置 (AE-6670, アトー株式会社) を用いて、室温3時間、NCMに転写した。次に転写された NCM を一次抗体として前項10にて作製した2,500倍希釈抗ヒト腎臓 ACE 抗体液と、二次抗体としてペルオキシダーゼを標識した1,000倍希釈ヤギ抗ウサギ IgG 抗体液を用いて反応させた後、発色用基質として 0.025% diaminobenzidine (0.137 mM NaCl 含有 50 mM トリス緩衝液 pH 7.4 に溶解後、10 μ l の H₂O₂ の添加にて発色) 溶液を用いた。

13. タンパク質量の測定法

タンパク質量は、ウシ血清アルブミンを標準として用い、Bio-Rad Protein Assay Kit

を用いて測定した。トリトン X-100含有の試料については, fluorescamineを用いる Bohlenらの方法¹⁸⁾にて測定した。

Ⅲ．結果

1． ACEの組織分布について

ヒト組織（大脳，小脳，顎下腺，肺，心臓，肝臓，腎臓，脾臓，副腎，胃，十二指腸，空腸，回腸，大腸，精巣，精巣上体，前立腺，子宮，大動脈の19種），および体液（血清，精漿，尿，唾液および腔内液の5種）についてACE活性を測定したところ，各組織および体液のほとんどにACE活性が認められた（Fig.2）．

組織1g中のACE活性は，腎臓が 2485.6 ± 1259.0 mU/g組織（mean \pm SD）と，最も高い値を示し，以下，肺>精巣>精巣上体の順であった．また，消化管においは，小腸が最も高く，ついで大腸そして胃の順であった．更に，小腸の部位別では，空腸，十二指腸そして回腸の順であり，空腸は腎臓の約4分の1，肺の約2分の1の活性を示した．また，小腸中の総ACE活性は腎臓，肺についで多いと思われた．

大脳，および小脳では，約 52.6 ± 42.0

および 23.4 ± 14.9 mU/g組織と僅かではあるがACE活性が認められた。さらに，男性生殖器系の組織（精巣，精巣上体）および前立腺に比較的高いACE活性が認められたが，子宮では， 68.0 ± 24.6 mU/g組織と低い活性しか認められなかった。

ヒト体液中ACE活性は，精漿が 3114.7 ± 1020.6 mU/ml ($n = 42$) と最も高い値を示し，それは血清中の値 (41.9 ± 20.0 mU/ml, $n = 46$) の約80倍，腔内液 (1.0 ± 1.0 mU/sample, $n = 25$) の約3,000倍であった。また，他の体液中ACE活性値は，透析尿で 1.4 ± 1.0 mU/ml ($n = 13$)，唾液で 0.1 ± 0.1 mU/ml ($n = 14$) と非常に低い値を示した。

2. 各組織中ACEの細胞内分布

前項と同様に調整した試料を用い，遠心分画法 ($105,000 \times g$ 15分間) にて各組織におけるACEの細胞内分布の検討を行った。ヒト組織，18例中8例（大脳，小脳，肺，心臓，肝臓，

腎臓，精巣）で， $105,000\times g$ 30分間の遠心上清における残存活性は，10-30%であり，解剖時採取試料のこれらの組織中ACEは，膜結合性画分に存在していると考えられた。一方，前立腺，大動脈，小腸（十二指腸，空腸，回腸）および大腸等の組織の上清における残存活性は60-90%を示し，これらの組織では，ACEは可溶性画分に存在していると考えられた

（Table 1）。凍結保存をしないヒト小腸の新鮮試料（手術時採取）では，遠心上清における残存活性はほとんど認められず，従って，生体においては小腸ACEは膜結合性を示すものと考えられた（Table 1）。

3. ヒト小腸ACEの細胞内分布

ヒト小腸ホモジネートより得た各分画（Fraction: A-E）のSephacryl S-300 HRカラムにおける溶出挙動は，Fig. 3のような結果を示した。1%トリトン X-100で可溶化， $105,000\times g$ 遠心上清（Fraction A, Fig. 1）では，

ACE活性を示すピークが3種得られ、溶出位置によりそれぞれをPeak 1,2および3とした (Fig. 3:A). ホモジネートの35,000xg遠心上清 (Fraction B) では、Peak 2と3に一致した2種のピークが、膜画分からトリトン X-100で可溶化されたFraction Cでは、Peak 1と3の2種のピークが、トリプシンで可溶化したFraction Dでは、Peak 2と3の2種のピークが、そして膜画分からトリプシンで可溶化されたFraction Eでは、Peak 2と3の2種のピークが得られた。各FractionにおけるPeak 1, 2あるいは3のACE活性は、EDTA (2×10^{-2} M), カプトプリル (2×10^{-4} M) の添加およびCl⁻の除去により完全に阻害された。

4. ヒト小腸ACEの精製

ヒト小腸可溶性画分より硫酸分画, lisinopril-linked Sepharose 6Bカラムクロマトグラフィー法 (Fig. 4) および Sephacryl S-300 HRカラムクロマトグラフィー

一法により ACE の精製を行った。Sephacryl S-300 HR を用いたゲル濾過で ACE 活性は 2 種のピーク (P-I および II) に分離された (Fig. 5)。小腸 ACE の精製のステップを Table 2 にまとめた。P-I は, SDS-PAGE において, 分子量 180 kDa の位置に単一のバンドが得られ (Fig. 6, レーン 1), 比活性は, 156 U/mg であった。一方, P-II については, SDS-PAGE にて単一のバンドが得られず比活性等については不明であるが P-I と共に酵素化学的性状の検討を行った。なお, その時の P-I および II の各溶液は, 約 250 mU/ml の ACE 活性を示すように調整し, そのうちの 40 μ l を酵素溶液として用い, 反応時間 20 分間にて行った。

5. 至適 pH の検討

2.0 M NaCl を含む 250 mM のホウ酸緩衝液, (pH 7.0-10.0) を用い, pH の酵素反応への影響を検討した。P-I および II ^は いずれも pH 8.3-8.5 において最も高い活性値を示した

(Fig. 7) .

6. 至適 Cl^- の検討

ACEの活性発現に必須とされる Cl^- の至適濃度について 0-5.0 M の範囲で検討した。ホウ酸緩衝液の pH 値は 8.3 を用いた。その結果、P-I および II いずれも NaCl 濃度が上昇するに従い ACE 活性の上昇が認められ、P-I では NaCl 濃度、0.8 M、P-II では 0.6 M で最も高い活性値を示し、それ以上の濃度では活性値は低下した (Fig. 8) .

7. 人工および内在性基質ならびにエンケファリン類の分解能について

ACEの人工基質 HHL と HGG, 内在性基質 アンギオテンシン I とブラジキニン, そしてオピオイドペプチドである $[\text{Met}^5]$ -および $[\text{Leu}^5]$ -エンケファリンに対する ACE (P-I, $M_r = 180,000$) の分解能を検討した。ヒト小腸 ACE (P-I) と各基質とを反応後, 反応液

中の各基質並びに酵素反応による分解産物についてHPLCにより分析を行ったところ、各基質はACEにより分解を受け、遊離したペプチドは、ODP-50カラムにて完全に分離された。なお、それぞれのピークを分取し、アミノ酸分析を行ったところ、基質HHLおよびアンギオテンシンIよりヒスチジルロイシン(His-Leu)が、HGGよりグリシルグリシン(Gly-Gly)が、ブラジキニンよりフェニルアラニルアルギニン(Phe-Arg)が、[Met⁵]-エンケファリンよりフェニルアラニルメチオニン(Phe-Met)が、[Leu⁵]-エンケファリンよりフェニルアラニルロイシン(Phe-Leu)がそれぞれ確認された(Fig. 9)。各基質に対するK_m値は、HHL: 1.75 mM, HGG:7.5 mM, アンギオテンシンI: 39.5 mM, ブラジキニン:1.0 μM, [Met⁵]-エンケファリン:1.0 mMおよび[Leu⁵]-エンケファリン:1.0 mMであった。

8. カプトプリルによる阻害および阻害様式

ACEの特異的阻害剤カプトプリルによる阻害効果（最終濃度， $1 \times 10^{-9} \sim 2 \times 10^{-7} \text{M}$ ）を検討した。P-IおよびP-IIのいずれもカプトプリルの濃度に依存した阻害が認められ，かつそれぞれの阻害はほぼ同様の阻害曲線が得られた（Fig. 10）。なお，この時のカプトプリルによる50%阻害濃度（ IC_{50} ）は，P-Iで13 nM，P-IIで20 nMであった。

更に，人工基質HHLを用い，カプトプリルのACEに対する阻害様式について，Lineweaver-Burk plot法にて検討した。カプトプリルの最終濃度は， $3 \times 10^{-9} \sim 2 \times 10^{-8} \text{M}$ の各濃度を用いた。その結果，Fig. 11に示すように，P-IおよびIIのいずれもLineweaver-Burk plotはすべて直線を示し， V_{\max} 値は変化せず，双方とも拮抗阻害を示した。なお，この時得られた基質HHLに対する K_m 値は，P-I：1.75 mM，P-II：1.68 mMであった。