

論分内容の要旨

論文題目 新規アンジオテンシン変換酵素様遺伝子 ACE2 の単離とその性状解析

指導教官 花岡一雄教授

東京大学大学院医学系研究科
平成9年4月 進学

医学博士課程
外科学専攻
氏名 小松 孝美

【序文】循環動態の調節機構としてレニン-アンジオテンシン (RA) 系は非常に重要な系である。さらにアンジオテンシン変換酵素 (ACE) はその中心的な酵素の一つである。ACE はアンジオテンシン I を強い昇圧作用をもつ活性ペプチド、アンジオテンシン II に変換する。ACE はキニナーゼ II と同一の酵素であり、降圧ペプチド、ブラジキニンの不活性化も行う。ACE は他にも多種の基質に対してジペプチジルカルボキシペプチダーゼとして働く。このため、昇圧系の RA 系と降圧系のカリクレイン-キニン系を直接結びつける重要な酵素である。さらに交感神経系と共に高血圧の成因や病態に関与する重要な因子であると考えられている。近年では ACE 阻害薬の開発により新たに組織 RA 系として臓器障害の発症における役割についての研究が盛んに行われてきた。その結果、今日では RA 系は血圧調節だけではなく、左室肥大・血管肥厚などの心血管系のリモデリングや腎障害などの高血圧性臓器障害の進展に重要な役割をしていることが分かった。さらに遺伝子解析などを含めた研究により ACE の機能について新たな知見が増加している。しかし、哺乳類では ACE の相同遺伝子は最近まで同定されていなかった。

我々はヒト回腸粘膜において発現されている完全長の cDNA を分離する過程で新規の ACE 様遺伝子 (ACE2) のヒト cDNA を得た。本研究では、ヒトおよ

びマウスの ACE2 のクローニングの詳細およびそのアイソフォームの存在、酵素としての活性の可能性について示す。

【結果と考察】ヒト回腸粘膜において顕著な発現を示す膜タンパク質、特に分泌に関与する遺伝子の単離を行う目的で、ヒト回腸由来完全長 cDNA ライブラリーを用いて解析を行った。4800 個に及ぶ解析から 18 個の遺伝子候補が得られた。そのうちの 하나가 ACE に対して 33~41% と高い相同性を示した。この全長は 2599-bp で 805 アミノ酸 (aa) からなるタンパク質であった。N 末側よりシグナルペプチド (17aa)、5 アミノ酸からなる Zn を活性中心に持つ亜鉛メタロプロテアーゼモチーフ、膜貫通領域 (22aa) から構成されていた。この遺伝子をヒト ACE2 (hACE2) と名付けた。

ノーザンブロットより、hACE2 の発現は腎臓、睾丸で強く、心臓でも発現が強かった。さらに RT-PCR を用いた発現解析より胎盤、骨格筋、膵臓、甲状腺、前立腺、卵巣、小腸、大腸、白血球においても発現がみられた。脳、肺、脾臓では発現が見られなかった。hACE2 は腎臓、心臓という循環器系の臓器での発現が強く、ACE 同様循環に関与する可能性が示唆された。さらにゲノムシーケンスと比較したところ hACE2 は 18 のエキソンからなり ACE のエキソンと比較したところ 8 個のエキソンで共通性があった。このことから ACE2 が ACE と共通の遺伝子から進化したと思われた。

マウス ACE2 のクローニングを行うために hACE2 cDNA を用いたデータベース検索を行い、5' 端領域で約 90% の相同性を示すマウス EST (expressed sequence tag) を確認した。この EST cDNA は全長が hACE2 に比べ 600-bp 程短かった。そこでマウス腎臓 cDNA のライブラリーを作製し、全長 2394-bp で 798aa からなるマウス ACE2 (mACE2) を同定した。hACE2 と mACE2 はアミノ酸で 83% の相同性を示した。シグナルペプチド、亜鉛メタロプロテアーゼモチーフ、膜貫通領域も保存されていた。mACE2 ではアイソフォームが存在し、これは全長 1995-bp で 353aa からなり、mACE2-s と名付けた。mACE2-s と mACE2 はスプライシングバリエーションと思われた。mACE2-s では亜鉛メタロプロテアーゼモチーフは存在しなかった。

ノーザンブロットでは 2 つのアイソフォームが存在することが示され、ヒトとは異なり肺と腎臓での発現が見られた。マウスではヒトでは見られなかったアイソフォームが同定されたことと共に、今後他の哺乳類での ACE2 の同定が

なされることで、ACE2 の種間での差が明らかになると思われた。

進化上の類縁関係ではヒト、マウス ACE2 とヒト ACE の関係の方が *drosophila* ACE とヒト ACE の関係より近い関係であった。

ヒト ACE2 の染色体上における位置を FISH (fluorescence in situ hybridization) 法で決定した。ヒト X 染色体短腕 p22 にマッピングされた。一方マウスでは radiation hybrid mapping 法で決定した。PCR 解析より X 染色体 70.5cM の位置にマッピングされた。ヒト Xp22 とマウス X 70.5cM はシンタニーのある領域と報告されている。X 染色体は性染色体であり、ACE のノックアウトマウスでは血圧の変動、生殖能力の変化に雌雄差があるが、このことが ACE2 と関連性があるかは更に検討する必要があると思われた。

ACE2 の機能解析を行うため、hACE2 をチャイニーズハムスター卵巣組織から分離された繊維芽細胞 (CHO-K1) ヘリポフェクション法で一過性に導入し、強制発現させた。細胞形態には変化が見られなかった。これらの発現細胞において、hACE2 の C 末端の細胞内領域末端由来ペプチド (20aa) を基に作製した抗血清により約 110kDa のタンパク質を確認した。これは予想される分子量より約 20kDa 大きいのが、これは糖付加などの翻訳後修飾を受けたためと思われた。さらに細胞内の局在を同様に作製した抗血清を用いて、免疫染色によって確認したところ、小胞体内で hACE2 が確認された。

細胞培養液中に分泌されていると思われるタンパク質を濃縮して ACE 活性を、笠原法を用いて測定したが、ACE 活性はごくわずかしか認められなかった。また細胞抽出液で膜に結合しているアンカー部分を界面活性剤である CHAPS を用いて切断し、分泌型の ACE2 として同様に ACE 活性を求めたが、ごくわずかしか認められなかった。対象としてヒト体性型 ACE を同様に発現させたものではいずれも活性が認められた。

最近の知見によると hACE2 も ACE 同様に分泌型があると言われている。ACE2 も予測されるアミノ酸配列を考慮するとカルボキシル基末端側に膜にアンカーされると考えられる 22 個のアミノ酸配列が存在し、膜結合型がこのアンカー部で切断されて酵素として機能する分泌型になると思われる。この機構については未だ明らかにはされていない。

ACE2 にはジカルボキペプチダーゼとしての活性はなく、カルボキシペプチダーゼとしての活性しかないと言われている。ACE2 はアンジオテンシン I、ニューロテンシンなどの C 末端のアミノ酸 1 つのみを加水分解し、ブラ

ジキニン、黄体形成ホルモン刺激ホルモン (LH-RH) などは分解せず、ACE に比べ基質特異性が高いようである。さらに ACE2 は ACE 阻害薬では酵素活性を阻害されず、キレート剤である EDTA によって酵素活性が阻害されると言われている。ACE2 が他にどのような基質を分解するかは不明である。さらに ACE2 が ACE に対してどのような機能を示すのかも不明である。今後マウス ACE2 のノックアウトマウスの研究などが進むことに ACE2 の機能について明らかになってくると思われた。

【結語】 ヒト回腸粘膜において顕著な発現を示す膜タンパク質特に分泌タンパク質の cDNA を効率良く解析するためにオリゴキャッピング法を用いて、腎臓、睾丸、心臓で発現が高く、ACE に高い相同性を持つ新規 ACE 様遺伝子 ACE2 を得た。ヒトおよびマウスではアミノ酸レベルで 83% の相同性を示し、ほぼ同時期にクローニングされたヒトの ACE2、ACEH は本遺伝子と全く同一なものであった。マウスでは 2 つのアイソフォームを同定した。染色体上の位置はそれぞれ、Xp22 および X 70.5cM 領域で、シンタニーを示すものであった。ACE2 に対する抗体から、分子量は約 110kDa であり、細胞内小胞体に特異的に局在していた。ACE2 を CHO-K1 細胞に発現させたところ、ジカルボキペプチダーゼとしての ACE 活性は同様に発現させた体性型 ACE の約 1/20 しかなく、ほとんど活性はないと思われた。ACE2 の基質としては文献的にはアンジオテンシン I の他にニューロテンシンなどがあり、ブラジキニン、LH-RH などは加水分解されないようであった。今後さらに基質の解析、他の ACE 相同遺伝子が同定されることにより、ACE を始めとした ACE ファミリーの機能の解明が可能と思われる。