薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
105 (5) 491-498 (1985)

ラット精巣に存在するアンジオテンシン I-変換酵素の酵素学的性質：
ラット肺酵素との比較検討

山口高正,* 関根雅恵,¹⁾ 池北雅彦, 木付和幸, 守屋 寛
東京理科大学薬学部, 生化学教室

Enzymological Properties of Rat Testicular Angiotensin I-Converting
Enzyme: Comparison with Rat Pulmonary Enzyme

TAKAMASA YAMAGUCHI,* MASAE SEKINE,¹⁾ MASAHICO IKEKITA,
KAZUYUKI KIZUKI and HIROSHI MORIYA

Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Science
University of Tokyo, 12 Ichigaya-Funakawara-machi,
Shinjuku-ku, Tokyo, 162, Japan

(Received January 16, 1985)

Some properties of angiotensin I-converting enzyme existed in rat testis (RT-ACE) were compared with those of angiotensin I-converting enzyme in rat lungs (RP-ACE).

In gel filtration through Sephadex G-200 column, distribution coefficient of RT-ACE (0.34) was higher than that of RP-ACE (0.27). Furthermore, RT-ACE migrated faster than RP-ACE on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The molecular weights of RT-ACE and RP-ACE were estimated to be 104 and 150 kilodaltons, respectively, on the SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

On the other hand, enzymo-chemical properties of both ACEs were very similar when they were assayed by using *N*^α-hippuryl-His-Leu-OH (HHL) as substrate. Namely, 1) HHL hydrolyzing activities of both ACEs were strongly activated by the addition of NaCl. And the effects of NaCl concentrations on the enzyme activities were similar between RT-ACE and RP-ACE. 2) The effects of various pH on the HHL hydrolyzing activities were also very similar between both ACEs under both conditions where NaCl was present or absent. 3) *K*_m values for HHL hydrolysis of RT-ACE and RP-ACE were estimated to be the same (2.5 mM) at pH 8.3, in the presence of 0.8 M NaCl. 4) The HHL hydrolyzing activity of RT-ACE was inhibited by the addition of captopril or MK-422, specific inhibitors of angiotensin I-converting enzyme, to similar extent to RP-ACE.

From these results, it was speculated that the portions of RT-ACE contributing to the appearance of enzyme activities would resemble those of RP-ACE although the molecule of RT-ACE is different from that of RP-ACE.

Keywords—angiotensin I-converting enzyme; kininase II; renin-angiotensin system; kallikrein-kinin system; testis; lung; male reproductive system

序 論

アンジオテンシン I-変換酵素 (EC 3.4.1.5.1. キニナーゼ II, 以下 ACE) は, 哺乳動物の諸臓器に広く分布する^{2,3)} Zn²⁺ を活性中心に有するエキソペプチダーゼである.^{4,5)} ACE は, そのジペプチジル カルボキシペプチダーゼ作用により, 生物学的に不活性なアンジオテンシン I を昇圧活性などを有するペプチド, アンジオテンシン II に変換する一方で, 降圧性ペプチド, キニン (カリジン, ブラジキニン) を水解不活性化する.⁴⁻⁶⁾ このことから, 哺乳動物の肺血管内皮や^{3,7,8)} 腎近位尿管細管上皮^{3,8)} に分布する ACE は, これらの生理活性ペプチドの代謝を介して血圧調節に関与していると考えられている.^{4,5)}

一方, 多くの哺乳動物の精巣に ACE が多量存在することが知られており,^{2,9,10)} 特にラットでは, 精巣中に肺や腎をはるかに上回る量の ACE が存在することが報告されている.²⁾ ラット精巣中の ACE 濃度が, ラットの性成熟度と平行して増加すること, 成熟後, 高い ACE 濃度が維持されること^{2,9,11)} などから, ACE が精巣の機

能において重要な意義を有していることが考えられる。しかし現在のところ ACE の生殖機能への関与については全く明らかではない。その一因として、ラット^{12,13)}をはじめ種々哺乳動物の肺に存在する ACE は、既に均一なタンパクとして単離され、その性質が分子レベルで明らかにされている^{4,5)}にもかかわらず、精巣中に存在する ACE については、酵素分子本体についても不明な点が多いことがあげられる。El-Dorry ら¹⁴⁾ は、ウサギの肺及び精巣より ACE を単離し、分子量や免疫化学的性質において、精巣 ACE が肺 ACE とは異なることを報告している。また Polsky-Cynkin ら¹⁵⁾ は、抗ラット肺 ACE ウサギ抗血清を用いた実験から、免疫化学的に肺 ACE と異なる ACE がラット精巣抽出物中に存在する可能性を指摘している。そこで、本研究では、精巣中における ACE の生理的意義を解明するためには、ラットについても精巣 ACE の酵素分子本体を明らかにすることが重要であると考え、ラット精巣から ACE (RT-ACE) の単離を試みた。そして RT-ACE の分子レベルでの性質を、同時に調製したラット肺の ACE と比較しながら詳細に調べた。

実 験 の 部

実験材料 N^{α} -Hippuryl-His-Leu-OH(HHL), H-His-Leu-OH, アンジオテンシン I, アンジオテンシン II 及びブラジキニン, (株)ペプチド研究所より, フルオレスカミンは日本ロシュ(株)より, DEAE-セファロース CL-6B, フェニル-セファロース CL-4B, セファデックス G-200 は, ファルマシア・ジャパン(株)より購入した。カプトプリルは三共(株)より, MK-422 は, 日本メルク萬有(株)より御供与頂いた。他の試薬はすべて特級のものをを用いた。

酵素活性測定法 ACE の酵素活性測定は, HHL を基質に用い, 酵素反応により生じた馬尿酸を Cushman らの方法¹⁶⁾に準じて定量することにより行った。但し, 酵素活性 1 単位 (U) は, 基質濃度 5 mM で, 0.8 M NaCl を含む 0.1 M ホウ酸-炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.3) 中で酵素反応を行ったとき, 37°C において 1 分間に 1 μ mol の HHL を水解する酵素量として定義した。

薄層クロマトグラフィー (TLC) RT-ACE 及び RP-ACE のアンジオテンシン I, アンジオテンシン II, ブラジキニンに対する水解機構をシリカゲル 60 プレート (メルク社製) を用いた薄層クロマトグラフィーにより分析した。各ペプチド 36 nmol を各精製酵素標品 (0.02 A₂₈₀) と 50 mM NaCl 含有 0.1 M カリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4) 250 μ l 中で 1 μ M のカプトプリルの存在下及び非存在下で 37°C にて 60 分間インキュベートした。各反応液に 250 μ l のフルオレスカミンのアセトン溶液 (0.5 mg/ml) をミキサーで激しく攪拌しながら添加し, ケイ光標識を行った。処理した溶液の一部をキャピラルでプレート上にスポットし, 展開溶媒に, ブタノール, 酢酸, 水の混合溶液 (4:1:2, v/v) と (50:1:50, v/v) をそれぞれ, アンジオテンシン (I 及び II), ブラジキニンを基質とした場合に用い, 展開後, 乾燥させたプレート上の物質を UV 照射 (365 nm) により検出した。

ACE の精製方法 ウィスター系雄ラット (体重 250—300 g) の精巣及び肺から, いずれも以下の操作により各 ACE を精製した。精製操作はすべて 4°C で行った。

ステップ 1 (デオキシコール酸抽出) 脱血死させたラットより直ちに摘出し凍結保存 (-20°C) しておいた精巣及び肺を 4°C で融解し, 精巣は白膜を除去してから, 肺はそのままハサミを用いて細片化した。各臓器 200 g に対し 400 ml の 5 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) (溶液 A) を加えポリロンホモジナイザー (Kinematica 社) を用いて 10 分間, 臓器を破碎した。ホモジネートをナイロンメッシュで濾過して得た懸濁液を 600×g で 15 分間遠心分離して上清を得た。沈殿には 500 ml の溶液 A を加え, 再懸濁後, 遠心分離した。上清を先の上清と合わせ, 最終濃度が, 0.25% (w/v) になるようにデオキシコール酸ナトリウムを加えた。3 時間攪拌した後, 7000×g で 30 分間遠心分離を行って得た上清を約 10 倍容量の溶液 A に対して 9 時間ずつ 2 回透析した。透析中に析出した物質を遠心分離で除き, 得られた上清を以後の精製操作の出発物質とした。

ステップ 2 (酸処理) ステップ 1 で得た溶液 (約 1 l) を 15 l の 20 mM 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.6) に対して 3 時間透析して pH 4.6 にした。透析中に生じた析出物を遠心分離 (7000×g, 30 分間) で除去した後, 上清をとり, 直ちに 10 分の 1 容量の 0.5 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) を加えて pH 8.0 に調整した。先に分離した沈殿を約 500 ml の 20 mM 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.6) に再懸濁した。遠心分離後, 得られた上清を pH 8.0 に調整し, 先に得られた上清と合わせて次の精製操作に用いた。

ステップ 3 (フェニル-セファロース CL-4B クロマトグラフィー) ステップ 2 で得た ACE 分画に固形硫酸アンモニウムを, 最終 75% 飽和になるように, 攪拌下徐々に加え, 添加終了後, 更に 1 時間攪拌した。析出した物質を遠心分離 (7000×g, 30 分間) により集め, 50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) に硫酸アンモニウムを最終 25% 飽和になるように溶解した溶液 (溶液 B) 500 ml に再懸濁した。不溶性物質を遠心分離 (7000×g, 30 分間) で

除去した後、上清を溶液 B で平衡化したフェニル-セファロース CL-4B カラム (2.5×40 cm) に直接添加した。約 800 ml の溶液 B を用いカラムを洗浄し非吸着物質を除いた後、溶液 B 750 ml と 50% (v/v) エチレングリコール含有 50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) 750 ml を用いて形成した直線濃度勾配 (硫酸アンモニウム; 25→0% 飽和, エチレングリコール; 0→50% (v/v)) により吸着物質を溶出した。

ステップ 4 (1st DEAE-セファロース CL-6B クロマトグラフィー) ステップ 3 で得た ACE 画分を 50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) に対し十分に透析後、同緩衝液で平衡化した DEAE-セファロース CL-6B カラム (2.5×40 cm) に添加した。約 800 ml の同緩衝液中で形成した NaCl の直線濃度勾配 (0→0.2 M, total 1.5 l) を用いて吸着物質を溶出した。

ステップ 5 (2nd DEAE-セファロース CL-6B クロマトグラフィー) ステップ 4 で得た ACE 画分を集め、0.1 M ホウ酸-NaOH 緩衝液 (pH 8.5) に対し十分に透析後、同緩衝液で平衡化した DEAE-セファロース CL-6B カラム (2.5×40 cm) に添加した。添加終了後、直ちに吸着物質をホウ酸-NaOH 緩衝液 (pH 8.5) の直線濃度勾配 (0.1→1 M, total 1.5 l) 溶出法により溶出した。

ステップ 6 (セファデックス G-200 ゲル濾過) ステップ 5 で得た ACE 画分を溶液 A に対し十分に透析後、溶液 A で平衡化した DEAE-セファロース CL-6B カラム (容量: 5 ml) に添加した。0.5 M NaCl を含有する溶液 A 10 ml で吸着物質を溶出した。溶出溶液約 10 ml を B-15 簡易濃縮器 (アミコン社) を用いて約 2 ml にまで濃縮した。この濃縮液を 0.1 M NaCl を含有する 25 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) で平衡化したセファデックス G-200 カラムに添加しゲル濾過で得られた高比活性 (U/A_{280}) 画分のうち比活性が一定な画分を集め、各 ACE 最終標品として、分析に用いるまで 4°C で保存した。

結 果 及 び 考 察

ラット精巣及び肺からの ACE の精製

ラット精巣 250 g, ラット肺 210 g を原料に用いて行った ACE 精製の結果をそれぞれ, Table I, Table II にまとめた。得られた各最終標品の比活性は, RT-ACE が 86.2 U/A_{280} , RP-ACE が 58.9 U/A_{280} であった。

Fig. 1 は、各 ACE 標品について行った SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) の結果である。

TABLE I. Purification of Rat Testicular Angiotensin I-Converting Enzyme
(from 250 g tissues)

Purification step	Activity (U)	Recovery (%)	Protein (A_{280})	U/A_{280}
1) Deoxycholate extraction	3003	100	a)	a)
2) Acidification (pH 4.6)	1819	60.6	3780	0.48
3) Phenyl-Sepharose CL-4B chromatography	1104	36.8	159	6.9
4) First DEAE-Sepharose CL-6B chromatography	570	19.0	33.9	16.8
5) Second DEAE-Sepharose CL-6B chromatography	486	16.2	9.2	52.8
6) Sephadex G-200 gel filtration	250	8.3	2.9	86.2

a) Exact value could not be determined due to slightly turbid solution.

TABLE II. Purification of Rat Pulmonary Angiotensin I-Converting Enzyme
(from 210 g tissue)

Purification step	Activity (U)	Recovery (%)	Protein (A_{280})	U/A_{280}
1) Deoxycholate extraction	1384	100	a)	a)
2) Acidification (pH 4.6)	1037	74.9	2333	0.44
3) Phenyl-Sepharose CL-4B chromatography	408	29.5	105	3.9
4) First DEAE-Sepharose CL-6B chromatography	294	21.2	19.8	14.8
5) Second DEAE-Sepharose CL-6B chromatography	180	13.0	5.3	34.0
6) Sephadex G-200 gel filtration	106	7.7	1.8	58.9

a) Exact value could not be determined due to slightly turbid solution.

Fig. 1. SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of RT- and RP-ACEs

(A) shows molecular weight protein standards (product of Bio-Rad Laboratories, U.S.). (B) and (C) are RP-ACE ($0.03A_{280}$) and RT-ACE ($0.05A_{280}$), respectively. Five % polyacrylamide gel was prepared according to the method of Weber *et al.*¹⁷⁾ Each ACE was boiled for 3 min in 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, in the presence of 0.1% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS) and applied to a gel. Electrophoresis was carried out for 5 h at a constant current of 8 mA per each tube using 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.1% (w/v) SDS. After electrophoresis, gels were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. Molecular weight protein standards consist of myosin (M.W., 200 kd), β -galactosidase (M.W., 116.3 kd), phosphorylase B (M.W., 92.5 kd), bovine serum albumin (M.W., 66.2 kd) and ovalbumin (M.W., 45 kd).

Fig. 2. Gel Filtration of the Final Preparations of RT- and RP-ACEs on a Sephadex G-200 Column

The final preparations of RT-ACE (11 ml) and RP-ACE (13 ml) were separately concentrated to 2 ml with Minicon B-15 concentrator. Then, 1.5 ml of the concentrated enzyme solutions (60 U of RT-ACE; ●—●, 40 U of RP-ACE; ○—○) were separately applied on a Sephadex G-200 column (2.5×90 cm) equilibrated with 25 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, containing 0.1 M NaCl (flow rate: 10 ml/h). The distribution coefficient (K_{av}) of each enzyme was given by the equation, $K_{av} = (V_e - V_0)/(V_t - V_0)$, in which V_e is the volume of buffer required to elute each ACE, V_0 is the void volume determined with blue dextran 2000 and V_t is the total volume of the column.

(B) にみられるように、RP-ACE 標品は、単一のタンパクバンドのみを示した。一方 (C) にみられるように、RT-ACE 標品には、メインタンパクバンド以外に、より低分子量側にわずかなバンドが認められた。結果には示さなかったが、RT-ACE 標品を $0.06 A_{280}$ に増してゲルにアプライしても他のタンパクバンドが検出されなかったことから、RP-ACE 標品は、RT-ACE 標品より純度が高いと考えられた。

RT- 及び RP-ACE の分子量

両酵素の分子量をゲル濾過 (Fig. 2) 及び SDS-PAGE (Fig. 1) により比較した。

Fig. 2 は、両酵素標品についてセファデックス G-200 カラムを用いて行ったゲル濾過の結果である。RT-ACE は、RP-ACE より遅れて溶出され K_{av} 値は、RT-ACE が 0.34, RP-ACE が 0.27 であった。また、Fig. 1(B) 及び (C) にみられるように、SDS-PAGE において、RT-ACE と RP-ACE の泳動位置は異なっており、RT-ACE は、RP-ACE よりも速く泳動された。このように、ゲル濾過、SDS-PAGE、いずれの分析方法においても、RT-ACE の分子量が、RP-ACE の分子量より小さいことを示す結果が得られ、RT-ACE はタンパク分子として RP-ACE と異なることが明らかとなった。SDS-PAGE により、同時に泳動した分子量スタンダード (A) の泳動位置より検量線を作成して求めた推定分子量は、RT-ACE が 104 ± 3 kd ($n=5$), RP-ACE が 150 ± 6 kd ($n=7$) であった。なお、本研究の一部は、既にキニン国際会議において発表した^{18a)}が、同会議において、Velletri ら^{18b)}もまた、ラット精巣より我々と全く異なる方法により ACE を精製し、その分子量が、ラット肺 ACE に比べ低分子量であることを報告した。このように精製方法が異なるにもかかわらず各々独自に同様な知見が得られたことから、ラット精巣中に、肺 ACE とは異なる低分子量の ACE が存在することは確実であると思われる。

図には示さなかったが、両 ACE 標品を 2% (v/v) 2-メルカプトエタノールで還元処理後、先と同様の SDS-PAGE を行ったが、いずれの ACE とも還元処理前とほぼ一致した位置に泳動された。このことから、両 ACE とも単一のポリペプチド鎖からなるタンパク分子であると推定された。

RT- 及び RP-ACE のアンジオテンシン I 及び II, ブラジキニンに対する作用

両 ACE のアンジオテンシン I 及び II, ブラジキニンに対する水解機構を薄層クロマトグラフィーを用いて分析した. 両 ACE とともにアンジオテンシン I を水解し, 新たに, 標準アンジオテンシン II 及び H-His-Leu-OH の *R_f* 値と一致する 2 種のペプチドフラグメントを生成した. ブラジキニンも両 ACE により水解され, 新たに 2 種のペプチド断片が薄層上に検出された (新たに生成したペプチド断片の同定は行わなかった) これら両酵素のアンジオテンシン I, ブラジキニン水解活性は, いずれも $1\ \mu\text{M}$ のカプトプリルの存在下, 完全に抑制された. 一方, アンジオテンシン II は, 全く両酵素の水解作用を受けなかった.

HHL 水解活性に及ぼす NaCl 濃度の影響

多くの哺乳動物起源の ACE の HHL 水解活性は塩素イオンの添加により著しく促進されることが知られている.^{2,16,19)} そこで, RT-ACE と RP-ACE の酵素化学的性質を比較する目的で, 最初に両 ACE の HHL 水解活性に及ぼす NaCl 濃度の影響を pH 8.3 において検討した (Fig. 3).

両酵素の活性は, NaCl の添加により著しく増強され両 ACE とともに $0.8\ \text{M}$ の NaCl 濃度において, 最大の HHL 水解活性が認められた. また Fig. 3 にみられるように, 各 NaCl 濃度における活性増強の割合は, 両酵素間で類似していた. すなわち, NaCl を添加しない場合, いずれの ACE も最大活性の数パーセントの HHL 水解活性しか認められなかったが, $0.2\ \text{M}$ の NaCl 濃度では, いずれの ACE 活性とも最大活性の約 50% まで増大され, $0.4\ \text{M}$ の NaCl 濃度では, 最大活性の 75–85% にまで増強された. また, これら RT-ACE 及び RP-ACE について得られた結果は, 海野¹⁹⁾が報告しているラット腎 ACE の HHL 水解活性に及ぼす NaCl 濃度の影響と非常に類似していた. したがって, ラット臓器由来の ACE は, 共通して pH 8.3 においては, 約 $0.8\ \text{M}$ の NaCl の存在下で最大の HHL 水解活性を示す性質を有していると考えられた. ウサギ肺,⁹⁾ 腎¹⁰⁾由来の ACE の HHL 水解活性が, 0.3 – $0.4\ \text{M}$ の NaCl の添加で最大活性を示すことを考え

合せると, ラットとウサギの ACE は, 最大 HHL 水解活性が得られる NaCl 濃度という点で相互に異なっていると考えられた. 一般にラット ACE の HHL 水解活性は, ウサギ肺 ACE を酵素試料に用いた Cushman らの原報¹⁶⁾に従い, $0.3\ \text{M}$ NaCl の存在下で測定されているが,^{2,12,15,20)} Fig. 3 にみられるように, ラット臓器起源の ACE は, $0.3\ \text{M}$ の NaCl 濃度では, 活性が低い上に, わずかな NaCl 濃度の変化により測定値が変動する可能性などが考えられる. そのため, ラット ACE の酵素活性測定においては, 最大活性が得られ酵素試料溶液などに由来する塩素イオンに影響を受けにくい $0.8\ \text{M}$ の NaCl 存在下で行うことが望ましいと考えられた.

HHL 水解活性に及ぼす pH の影響

Fig. 4 は, RT- 及び RP-ACE の HHL 水解活性に及ぼす pH の影響を, $0.8\ \text{M}$ NaCl の存在下で分析した結果である. RT-ACE は, pH の 9 から 7 への低下に伴い, RP-ACE と類似した酵素活性の変化を示し, 最大活性を示す pH は, RT-ACE が pH 8.1–8.3, RP-ACE が pH 8.3 と, 両酵素間で近似していた.

Fig. 5 は, 両酵素の活性に及ぼす pH の影響を酵素反応溶液及び酵素試料溶液からできる限り塩素イオンを除いた条件下で分析した結果である. Fig. 5 A 及び B にみられるように, RT- 及び RP-ACE, いずれの酵素の活性とも pH の 9 から 7 への低下に伴い, 著しく増大し, 両酵素ともこの pH 範囲内では, pH 7.0 において最大活性が認められた. 以上の分析は, $0.1\ \text{M}$ トリス-硫酸緩衝液を用いて行ったが, pH の調整は, トリス濃度を一定とし, $1.25\ \text{N}$ 硫酸を用いて行っている. したがって, 用いた緩衝液中の硫酸濃度は, pH が低いものほど高く,

Fig. 3. Effects of NaCl on the HHL Hydrolyzing Activities of RT- and RP-ACEs

The solutions of RT- and RP-ACEs were thoroughly dialyzed against 5 mM borate-NaOH buffer, pH 8.3, to remove chloride ion. HHL hydrolyzing activities of RT-ACE (●—●) and RP-ACE (○—○) were determined in 0.1 M borate-bicarbonate buffers, pH 8.3, containing various concentrations of NaCl as indicated in the figure. Each ACE of 3.3 mU was used for the analyses.

Fig. 4. Effects of Various pH on the HHL Hydrolyzing Activities of RT- and RP-ACEs in the Presence of 0.8 M NaCl

At first, the solutions of RT-ACE (●—●) and RP-ACE (○—○) were thoroughly dialyzed against 5 mM Tris-H₂SO₄ buffer, pH 8.0. Then, the activities of RT- and RP-ACEs were determined in 0.1 M Tris-H₂SO₄ buffers of various pH, containing 0.8 M NaCl.

Fig. 5. Effects of Various pH on the HHL Hydrolyzing Activities of RT- and RP-ACEs when NaCl was Almost Eliminated

At first, the solution of RT- and RP-ACEs were thoroughly dialyzed against 5 mM Tris-H₂SO₄ buffer, pH 8.0. Then, the enzyme activities of RT-ACE (A; ▲—▲) and RP-ACE (B; ○—○) were determined in 0.1 M Tris-H₂SO₄ buffers of various pH. The activity of RT-ACE (A; △—△) was also measured in 0.1 M Tris-H₂SO₄ buffers of various pH, containing constant concentration (13.5 mM) of sulfate at the pH range from 7 to 9.

Fig. 5 A 及び B でみられた両酵素の活性の上昇が、pH のみならず硫酸イオンの増加による可能性も考えられた。そこで、硫酸ナトリウムを添加し、いずれの pH の緩衝液についても硫酸の濃度が一定になるように調製した緩衝液を用いて同様の検討を行った。その結果、Fig. 5 A (△—△) にみられるように、硫酸イオン濃度を一定 (13.5 mM) にした条件下においても、先と同様の結果が得られ、活性の上昇が硫酸イオン濃度の増加によるよりむしろ、水素イオン濃度の増加によることが確められた。

以上の結果から、NaCl を 0.8 M 添加した場合、また NaCl を添加しない場合、いずれにおいても HHL 水解活性に及ぼす pH の影響は、両酵素間で酷似していることが明らかとなった。

いずれの ACE の活性も、pH 8.3 において NaCl を添加しない場合、非常に低かったが、NaCl の添加 (Fig. 3) あるいは、酵素反応系の pH をより低くする (Fig. 5) ことにより、著しく増強された。これら NaCl や pH の活性増強に及ぼす効果が両 ACE 間で酷似していたことから、NaCl 濃度の増加や水素イオン濃度の増加によって、RT-ACE 分子には RP-ACE 分子と類似した構造の変化が起こるものと推察された。

HHL 水解に対する K_m 値

0.8 M の NaCl 存在下、0.1 M ホウ酸-炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.3) を用いて 37°C にて酵素反応を行った後、Lineweaver-Burk プロットにより求めた HHL 水解に対する K_m 値は、RT-, RP- いずれの ACE とも 2.5 mM であった。このことから、基質の親和性の点においても両酵素は類似していると考えられた。

酵素活性に及ぼすカプトプリル及び MK-422 の影響

RT-ACE の酵素活性は、カプトプリル濃度に依存して抑制され、 10^{-8} M カプトプリルで約 50%、 10^{-6} M のカプトプリルで完全に阻害された (Fig. 6 A)。一方、RP-ACE の活性は、 10^{-8} M のカプトプリルで約 35%、 10^{-6} M で完全に阻害され、カプトプリルの低濃度領域 (10^{-9} — 10^{-7} M) では、RT-ACE に比べわずかに阻害されにくかったものの、ほぼ RT-ACE と同様の結果が得られた。

Fig. 6 B は、RT-ACE 及び RP-ACE の HHL 水解活性に及ぼす MK-422 の影響を検討した結果である。RT-ACE, RP-ACE とも 10^{-9} M の MK-422 で約 50%、 10^{-6} M の MK-422 で完全に阻害され、MK-422 の活性への影響は、両酵素間でよく一致していた。カプトプリル、²¹⁾ 及び MK-422²²⁾ は、ACE を特異的に阻害するよう高度にデザインされた化合物であるが、 10^{-6} — 10^{-9} M という低濃度において、RT-ACE を RP-ACE と同程

Fig. 6. Inhibition Effects of Captopril and MK-422 on the HHL Hydrolyzing Activities of RT- and RP-ACEs

HHL hydrolyzing activities of RT-ACE (●—●) and RP-ACE (○—○) were measured in the presence of captopril (A) and MK-422 (B). Enzyme reactions were initiated by the addition of each ACE solution (3.3 mU of enzyme in 50 μ l of 5 mM Tris-HCl buffer, pH 8.3) to 200 μ l of substrate solution (6.25 mM HHL in 0.125 M borate-bicarbonate buffer, pH 8.3, containing 1 M NaCl and each inhibitor). The concentrations of inhibitors described in this figure show the concentrations during the incubation.

度に抑制したことから、両酵素の活性中心近傍の構造は非常に類似していると考えられた。

以上の酵素化学的比較検討から、RT-ACE は、NaCl 濃度や pH の影響、基質に対する親和性、及びインヒビターに対する感受性の面において RP-ACE と酷似していることが明らかとなり、酵素分子としては、分子量的に小さいという点で RP-ACE とは異なっているものの、活性発現に参与する部位の構造は、RP-ACE と非常に類似しているものと推定された。

Polsky-Cynkin ら¹⁵⁾は、抗ラット肺 ACE ウサギ抗血清に対する反応性が、ラット肺 ACE とは異なる ACE が、ラット精巣の粗抽出物中に存在する可能性を指摘している。本研究では、両酵素の免疫化学的性質に関しては、検討を行わなかったが、RT-ACE と RP-ACE の分子量が異なることから、両 ACE が相互に異なった抗原決定基を有することが予想され、彼らがラット精巣抽出物中に検出した、肺 ACE とは異なる ACE 様物質と今回我々が精製した低分子量の ACE、すなわち RT-ACE とが同一の物質である可能性は十分に考えられる。

El-Dorrry ら¹⁴⁾は、ウサギ精巣から精製した ACE の分子量が 100000 と、ウサギ肺 ACE の分子量 140000 より小さいことを報告している。RT-ACE と RP-ACE の分子量の差は、46000 であり、この値は、ウサギ酵素間の差 40000 と近似している。このように異なった 2 種の動物に共通して、精巣 ACE と肺 ACE 間の類似した分子量差が認められたことから、他の哺乳動物についても同様な分子量差が精巣 ACE と肺 ACE の間に認められる可能性が考えられる。現在のところ精巣の ACE が肺 ACE と類似した酵素化学的性質を有した分子サイズの異なる酵素分子であることに関し、明確な生理的意義は見い出せないが、精巣 ACE、²⁰⁾ 肺 ACE¹²⁾ とともに膜結合性酵素であることから、活性中心近傍とは別の、膜結合ドメインなどの構造が、両酵素間で相互に異なっている可能性などが考えられる。

近年、ラット精巣間質の Leydig 細胞に、アンジオテンシノーゲンを水解してアンジオテンシン I を生成する酵素、レニンが局在することが、免疫組織化学的、²⁸⁾ 酵素化学的²⁴⁾に証明され、精巣中にレニン-アンジオテンシン系が存在する可能性が示された。しかし、Yotsumoto ら²⁵⁾は、抗ブタ肺 ACE 抗体を用いた免疫組織化学的手法により、また、Strittmatter ら²⁶⁾は、トリチウム標識化カプトプリルを用いたアフィニティーラベルの手法を用いたオートラジオグラフィーにより、それぞれ、ブタ精細管内、ラット精細管内に ACE の局在を証明しており、レニンと ACE とは、精細管の外側と内側に別々に局在していることが明らかとなっている。そのため、精巣間質でレニンの酵素作用により生じたアンジオテンシン I が、精細管の基底膜を通り、精細管内に存在する ACE の生体内基質に成りうるか否かは、今後検討されるべき重要な問題と考える。

謝辞 カプトプリルを御供与下さった三共(株), MK-422 を御供与下さった日本メルク萬有(株)に感謝いたします。

引用文献及び注

- 1) Present address: *Department of Hematologic Laboratory, Toranomon Hospital, 2-2-2, Toranomon, Minato-ku, 108, Japan.*
- 2) D. W. Cushman, H. S. Cheung, *Biochim. Biophys. Acta*, **250**, 261 (1971).
- 3) P. R. B. Caldwell, B. C. Seegel, K. C. Hsu, M. Das, R. L. Soffer, *Science*, **191**, 1050 (1976).
- 4) R. L. Soffer, *Annu. Rev. Biochem.*, **45**, 73 (1976).
- 5) E. G. Erdős, "Bradykinin, Kallidin and Kallikrein," *Handb. Exp. Pharm.*, Vol. XXV, ed. by E. G. Erdős, Springer-Verlag, Berlin, 1979, pp. 428—487.
- 6) H. Y. T. Yang, E. G. Erdős, Y. Levin, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **177**, 291 (1971).
- 7) U. S. Ryan, J. W. Ryan, C. Whitaker, A. Chiu, *Tissue & Cell*, **8**, 125 (1976).
- 8) Y. Takada, K. Hiwada, M. Unno, T. Kokubu, *Biomed. Res.*, **3**, 169 (1982).
- 9) D. W. Cushman, H. S. Cheung, "Hypertension," ed. by J. Genest and K. Koiv, Springer-Verlag, Berlin, 1972, pp. 532—541.
- 10) C. E. Ody, E. R. Hall, C. J. G. Robinson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **86**, 508 (1979).
- 11) S. Kaneko, C. Moriwaki, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **4**, 175 (1981); G. Hohlbrugger, H. Schweisfurth, H. Dahlheim, *J. Reprod. Fert.*, **65**, 97 (1982); A. K. Jaiswal, J. N. Panda, M. V. Kumar, L. N. Singh, *Andrologia*, **15**, 347 (1983).
- 12) J. J. Lanzillo, B. L. Fanburg, *J. Biol. Chem.*, **249**, 2312 (1974).
- 13) J. J. Lanzillo, B. L. Fanburg, *Biochim. Biophys. Acta*, **439**, 125 (1976).
- 14) H. A. El-Dorry, H. G. Bull, K. Iwata, N. A. Thornberry, E. H. Cordes, R. L. Soffer, *J. Biol. Chem.*, **257**, 14128 (1982).
- 15) R. Polsky-Cynkin, B. L. Fanburg, *Int. J. Biochem.*, **10**, 669 (1979).
- 16) D. W. Cushman, H. S. Cheung, *Biochem. Pharmacol.*, **20**, 1637 (1971).
- 17) K. Weber, M. Osborn, *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406 (1969).
- 18) a) T. Yamaguchi, M. Hiratsuka, M. Ikekita, K. Kizuki and H. Moriya, Abstracts of Papers, Kinin '84 Savannah International Congress, Savannah, Ga., U.S., Oct., 1984, p. 152; b) P. A. Velletri, M. Billingsley and W. Lovenberg, *ibid.*, p. 145.
- 19) 海野雅澄, 日腎誌, **25**, 163 (1983).
- 20) A. Jaiswal, P. Joshi, M. V. Kumar, J. N. Panda, L. N. Singh, *Andrologia*, **16**, 410 (1984).
- 21) M. A. Ondetti, B. Rubin, D. W. Cushman, *Science*, **196**, 441 (1977).
- 22) A. A. Patchett, E. Harris, E. W. Tristram, M. J. Wyvratt, M. T. Wu, D. Taub, E. R. Peterson, T. J. Ikeler, J. ten Broeke, L. G. Payne, D. L. Ondeyka, E. D. Thorsett, W. J. Greenlee, N. S. Lohr, R. D. Hoffsommer, H. Joshua, M. V. Ruyle, J. W. Rothrock, S. D. Aster, A. L. Maycock, F. M. Robinson, R. Hirschmann, C. S. Sweet, E. H. Uim, D. M. Gross, T. C. Vassil, C. A. Stone, *Nature (London)*, **288**, 280 (1980).
- 23) M. Parmentier, T. Inagami, R. Pochet, J. C. Descline, *Endocrinology*, **112**, 1318 (1983).
- 24) K. N. Pandey, K. S. Misono, T. Inagami, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **122**, 1337 (1984).
- 25) H. Yotsumoto, S. Sato, M. Shibuya, *Life Sci.*, **35**, 1257 (1984).
- 26) S. M. Strittmatter, S. H. Snyder, *Endocrinology*, **115**, 2332 (1984).