

氏名(本籍)	桜井 武 (東京都)
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博甲第1129号
学位授与年月日	平成5年3月25日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor (非選択性エンドセリン受容体 cPNA のクローニング)
主査	筑波大学教授 医学博士 杉田 良 樹
副査	理化学研究所ライフサイエンス筑波研究センター 分子遺伝学研究室主任研究員 (筑波大学客員教授) 理学博士 石井 俊 輔
副査	筑波大学教授 医学博士 長谷川 鎮 雄
副査	筑波大学教授 医学博士 山下 亀 次 郎
副査	筑波大学助教授 医学博士 山 根 一 秀

論 文 の 要 旨

<目的>

エンドセリン-1 (endothelin-1; ET-1) は非常に強力かつ持続的な血管収縮活性を有する21残基のペプチドとして大動脈内皮細胞培養上清から精製・構造決定された。続いてET-1の構造をもとにしたオリゴヌクレオチドプローブによる遺伝子解析の結果、哺乳類に3つのアイソフォーム(ET-1, ET-2, ET-3)が存在することが明らかとなった。これらエンドセリンファミリーは各種血管に対する収縮活性のみならず、心臓、肺、腎臓、神経系などをはじめとする全身諸組織において様々な活性を持つこと、また産生部位についても、血管内皮細胞だけでなく種々の組織の実質細胞がエンドセリン産生能を有することが報告されている。

エンドセリン(ET)の薬理活性は、ET-1とET-2がET-3よりも高力価な系と、3者がほぼ同じ効力を示す系とに大別することができるため、この2つの系にたいする受容体サブタイプの存在が示唆されていた。本研究では、受容体の多様性を明確にすること、また生理的な役割および様々な病態生理との関連を解明するための重要なステップとしてエンドセリン受容体をコードするcDNAのクローニングを行った。

<対象と方法>

ラット肺より抽出した poly(A)⁺RNA を鋳型として哺乳動物細胞発現ベクター pCDM8 を用いた cDNA ライブラリーを作製した。これを細分化して COS-7 細胞にトランスフェクションした後、^[125I] ET-1 による結合実験によってスクリーニングした。結合活性陽性の cDNA サブライブラリーの細分化を繰り返すことにより、COS-7 細胞に特異的な ET-1 結合活性を与える単一の cDNA クローンを単離した。

〈結果と考察〉

cDNA の塩基配列から予測されたアミノ酸配列より、このエンドセリン受容体は、26残基のシグナルペプチドを含む441アミノ酸残基よりなり、最終的にはアミノ酸415残基からなると推定された。その推計分子量は、約47,000であった。疎水性解析から、G 蛋白質と相互作用する受容体に一般に見られる7つの膜貫通ドメインを有する構造を持っていると推定された。

このクローンを導入した COS-7 細胞および COP-5 細胞への^[125I]ET-1 の特異的結合は、非標識 ET-1, ET-2, ET-3 によってほぼ同等の効力で競合され、アイソペプチド間で見かけ上の親和性に差はなく、細胞内 Ca²⁺濃度の一過性上昇に関する用量-反応関係においても、ET-1, ET-2, ET-3 間で有意な差はなかった。

ラットの各組織の poly(A)⁺RNA を用いたノーザン解析で、この cDNA に対応する約5.0kb の mRNA が脳、肺、腎臓、心臓等の組織で検出されたが、大動脈中膜(内膜および外膜は注意深く取り除いたもの)や大動脈平滑筋由来の培養細胞株であるラット A-10 細胞では当該する mRNA は検出されなかった。

以上によりアイソペプチドに非選択的なエンドセリン受容体サブタイプが存在することを分子レベルで直接証明し、構造を決定した。さらにこの受容体が機能的であり G 蛋白質を介してホスホリパーゼ C を活性化することを証明した。この受容体は血管平滑筋(薬理学実験より ET-1=ET-2≫ET-3 という親和性序列を持つと考えられる)では検出できなかった。

この結果をもとに、ET-1=ET-2≫ET-3 の親和性をもつ受容体を ET_A受容体、ET-1=ET-2=ET-3 の親和性をもつ受容体を ET_B受容体と分類した。

審 査 の 要 旨

エンドセリンはその強力な血管収縮活性によるのみでなく、各種組織で生産されて種々の異なる活性を示すことにより広い研究領域で注目されている。エンドセリンには3種のサブタイプがあり、それぞれが異なる組織で異なる強さで活性を示すので、そのレセプターの性質の解明が重要であった。また、レセプターの構造およびその組織、細胞での分布の解明は、エンドセリンの生理的意義の解明に重要であるとともに、その活性発現の機構解明にも必須であった。本論文ではラット肺を用いて分子生物学的手法により動物細胞を使って cDNA のクローニングに成功し、レセプターのアミノ酸配列を明らかにした。また、発現させたレセプターの性質、および mRNA の種々の組織での発現を検討し、ET_B受容体と命名した。この名称は現在広く採用されている。以上、本論文のエンド

セリン・レセプター (ET_B) の構造, 性質, 発現の研究結果はエンドセリンの研究上, 高く評価されるものである。

よって, 著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。