

氏名(本籍)	はしもと やす み (新潟県) 橋本泰美(新潟県)		
学位の種類	博士(生物工学)		
学位記番号	博甲第4349号		
学位授与年月日	平成19年3月23日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Physiological Functions of APJ <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> (APJの細胞生理機能に関する研究)		
主査	筑波大学教授	農学博士	深水昭吉
副査	筑波大学教授	農学博士	馬場忠
副査	筑波大学教授	博士(薬学)	柳澤純
副査	筑波大学助教授	博士(農学)	谷本啓司

論文の内容の要旨

生活習慣病の主な要因として挙げられる高血圧には、病態改善を起点とした新たな治療法の開発が望まれているが、基礎研究においては、動物個体での検証が先行し、分子メカニズムに基づいた解析は立ち遅れている現状にある。そこで著者は、病態の分子基盤に根ざした新たな突破口が必要であると考え、生活習慣病との関連が示唆されており、高血圧の作用点として知られているアンジオテンシン IIIa 型受容体 (AT1a) と高いホモロジーを持つ7回膜貫通型受容体・APJ 受容体について、個体・細胞を用いた体系的な生理機能解析を行うことを本研究の目的とした。

APJ 受容体の生理機能を解明するため、先ず始めに著者は、血管内皮細胞特異的に稼働する Tie2 プロモーターを接続した APJ 受容体遺伝子を過剰発現させたトランスジェニックマウスを作製した。血管を摘出し、内在性 APJ と外来性 (導入) APJ 遺伝子の発現を検定したところ、トランスジェニックマウスでは、数倍の発現増加が観察された。そこで、野生型マウスに、リカンドであるアペリンペプチドを投与した結果、有意な血圧降下作用が観察された。次いで、同様にトランスジェニックマウスにアペリンペプチドを投与してみると、血管内皮細胞による血圧降下機能、野生型マウスに比べて有意に亢進していることが明らかになった。一方、APJ 遺伝子を完全に欠損しているノックアウトマウスでは、アペリンによる血圧降下作用が完全に消失していることを見出した。これらの結果より、アペリンが APJ 受容体を介して血圧降下を引き起こす新たな血圧制御系であり、血圧降下には血管内皮細胞の APJ 受容体が重要であることが、受容体の“増強 (トランスジェニックマウス) - 通常 (野生型マウス) - 消失 (ノックアウトマウス)”状態を解析することによって証明された。

マウスを用いた解析より、アペリンの血圧降下作用は一酸化窒素 (NO) 合成阻害剤 (L-NAME) によって濃度依存的に抑制されることが分かったが、この結果を検証し、さらに応用するためには分子基盤の解明が必須である。しかし、APJ 受容体に関しては、細胞内シグナル伝達経路を含め、そのほとんどが明らかにされていなかった。この状況を打破するためには効果的な解析ツールの開発が必要不可欠であると考え、著者はマウスの血管内皮細胞を単離し、初代細胞の培養を試みた。その結果、野生型マウスより単離した血管内皮細胞にアペリン刺激を行うと、内皮細胞に発現している NO 合成酵素 (e-NOS) の活性が増強してい

ることを見出した。一方、ノックアウトマウス由来の血管内皮細胞では、アペリン刺激を行っても e-NOS の活性化は認められなかったため、アペリンは APJ 受容体を介して e-NOS 活性化を引き起こしていることを明らかにされた。また著者は、e-NOS 活性化を引き起こすキナーゼ (Akt) はアペリン刺激によって活性化するのか、更に eNOS の活性化は一酸化窒素 (NO) 放出の惹起につながるのか、初代血管内皮細胞を用いて確かめた。その結果、アペリンは APJ 受容体を介して、Akt を活性化し、NO 放出を引き起こしていることを証明することができた。著者はこれら解析を通して、新規血圧制御系であるアペリン-APJ 受容体系が NO を介し、血圧降下を引き起こすことを *in vivo*, *in vitro* において初めて明らかにした。

審 査 の 結 果 の 要 旨

生体にとって恒常性の維持は必須であり、特に APJ 受容体が高発現している心血管系は、個体の運命を左右する重要な組織である。そして現在、複雑化した生命現象を理解するためには、分子基盤の解明と個体レベルでの検証が必要不可欠である。本論文は、機能未知であった 7 回膜貫通型 APJ 受容体が、NO を介した新たな血圧制御系であることを分子・個体レベルにおいて証明した初めての報告であり、APJ 受容体の新しい生理作用の解明に弾みを付けるだけでなく、膜貫通型受容体ファミリーの個体機能研究に大きく貢献するものと期待される。

以上のように、著者は 7 回膜貫通型受容体 APJ の血管内皮特異的なトランスジェニックマウスの作成を行うと共に、このマウスがリガンド応答性の血圧降下作用が増強されていること、また、内皮細胞を単離し、血圧降下作用が NO を介して行われるということを明らかにした独創的な研究を行い、かつ、創薬といった分野に応用可能な知見を開拓したと判断される。

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