

氏名(本籍)	新 ^{しん} 條 ^{じょう} 正 ^{まさ} 志 ^し (東京都)		
学位の種類	博士 (農学)		
学位記番号	博乙第 829 号		
学位授与年月日	平成 5 年 1 月 31 日		
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当		
審査研究科	農学研究科		
学位論文題目	BIOCHEMICAL STUDIES ON ATRIAL NATRIURETIC PEPTIDE RECEPTOR (ANPリセプターの生化学的研究)		
主査	筑波大学教授	農学博士	村上 和 雄
副査	筑波大学教授	農学博士	田 仲 可 昌
副査	筑波大学教授	農学博士	日下部 功
副査	筑波大学教授	理学博士	宗 像 英 輔

論 文 の 要 旨

心房性ナトリウム利尿ホルモン (atrial natriuretic peptide, ANP) は、1980年代になって明らかにされたアミノ酸28個から成るペプチド・ホルモンである。心房線維細胞から分泌されたANPは、昇圧系であるレニン・アンジオテンシン系に拮抗して、腎臓におけるナトリウム・イオンの排泄を促進し、副腎皮質におけるアルドステロンの分泌を抑制し、また血管平滑筋を弛緩させること等により、強力に血圧を降下させる。このため、ANPは血圧調節ひいては生体の体液ホメオスタシスにおいて非常に重要な役割を演じている可能性が高い。ANPの各標的器官に対する最初の作用点がそれぞれの細胞膜に存在すると考えられるANPリセプターであり、ANPの作用の発現メカニズムを解明するためには、そのリセプターの解析が不可欠である。リセプターの存在は、腎臓、副腎皮質、血管平滑筋、血管内皮、脳、肝臓等で確認されていたが、その構造は不明であった。本研究はANPリセプターの構造と機能を生化学的方法によって明らかにすることを目標として行われた。

リセプターの単離へのステップとして、初めに、ANP結合活性のあるリセプターの標的器官の細胞膜からの可溶化、アッセイ系の確立、可溶化リセプターの生化学的性質の解析を行った。次に、異なった器官及び異種間におけるリセプターの構造を比較した。さらに、生体における機能の解明を目指して、まず、ローカルなレニン・アンジオテンシン系の拮抗系のモデルとして、卵巣の機能とANPリセプターとの関係について、また、体液ホメオスタシスにおける普遍的ホルモン系のモデルとして、眼房水をコントロールする眼の各組織のANPリセプターの分布について調べた。

ANPリセプターを抽出するための膜分画は、屠殺場で入手した新鮮なウシ副腎皮質を凍結乾燥したものから得た。膜分画からのリセプターの可溶化は、1980年に開発されたコール酸のスルフォベ

タイン誘導体である両イオン性界面活性剤 3 - [(3 - cholamidopropyl) dimethylammonio] - 1 - propanesulfonate (CHAPS) によって行った。ANPとANPリセプターとの結合が比較的安定であったため、よう素¹²⁵Iで標識をしたANP (¹²⁵I - ANP) を可溶化リセプターに反応させ、その溶液をゲルろ過すると、¹²⁵I - ANP・可溶化リセプター複合体とフリーの¹²⁵I - ANPとを分離することができた。このため可溶化リセプターのANP結合活性測定は、ゲルろ過によって行った。CHAPSによる膜分画からのリセプターの可溶化は、CHAPSの終濃度が1%の時、最も効果的であった。¹²⁵I - ANPのリセプターへの結合は2時間で平衡に達した。また、¹²⁵I - ANPのリセプターへの結合は、非標識ANPによって競争的に阻害されたことから、特異的であることが確認された。競争阻害実験のスキッチャード解析によると、可溶化ANPリセプターの解離定数(K_d)は1.8 nMであり、結合部位数(B_{max})は2.5pM/mgタンパク質であった。

CHAPS抽出液と¹²⁵I - ANPとの混合液体をゲルろ過HPLCに掛けるとヴォイド・ボリュームを示す部分と分子量14万の部分に¹²⁵I - ANP・可溶化リセプター複合体が溶出された。ヴォイド・ヴォリュームを示す部分に溶出された活性はリセプターの複合体を、分子量14万の部分に溶出された活性は1個のリセプターを示していると考えられた。二価性架橋剤disuccinimidyl suberate (DSS) を用いて、可溶化リセプターを¹²⁵I - ANPで共有結合的に標識(アフィニティ・ラベリング)し、これをSDS-ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動に掛け、オートラジオグラフィを行うと、分子量13万の部分に放射活性が検出された。還元剤2-メルカプトエタノール(2-ME)存在下で同様の実験を行うと放射活性は分子量7万の部分に検出された。これらの結果から、ANPリセプターは分子量7万のANP結合サブユニットをS-S結合によって持つ分子量13~14万の分子と推定された。

ウシ副腎皮質、ラット大動脈平滑筋細胞、ウシ頸動脈内皮細胞の各膜分画のアフィニティ・ラベリングを行った結果、いずれの場合も、2-ME非存在下で分子量13万と分子量7万の部分に、また、2-ME存在下で分子量7万の部分に放射活性が検出された。これによりANPリセプターは異なった器官及び異種間において構造的によく保存された分子であることがわかった。したがって、血管平滑筋細胞と血管内皮細胞におけるANP結合能の差異が既に報告されていたが、この差異は分子種の差異のためではなく、同一分子の異なった修飾によるものと考えられる。非還元状態における分子量13万と分子量7万の分子の比は各器官で異なっていたが、これが生体において意味を持つものかどうか、また、この分子量7万の分子が細胞膜上でどのような存在形態を示すのかは、不明であるが興味深い問題である。

ヒト卵巣の膜分画の競争阻害実験のスキッチャード解析から、卵巣におけるANPリセプターの存在量はANPの主要標的器官である腎臓における存在量より多いこと、大きな卵胞を含む膜分画ほど多くのリセプターが存在すること(直径18mmの排卵直前の卵胞を含む膜分画の B_{max} は18pM/mgタンパク質であり、直径7mmの卵胞を含む膜分画の B_{max} 2.5pM/mgタンパク質の7.2倍であった)、そして K_d は閉経後の膜分画を除いてほとんど変化しないことが示された。また、アフィニティ・ラベリングによって、卵巣のANPリセプターも他の器官と同様に分子量7万のANP結合サブユニットをS-S結合によって持つ分子量13万の分子と推定された。さらに、ブタ卵巣・子宮・精巣の膜分画

からも大量のリセプターが検出された。すでにラット卵巣におけるレニン・アンジオテンシン系の存在は著者らによって報告されていたが、以上の実験より、その拮抗系のホルモンであるANPが卵巣の卵胞の発達に関与すること、さらに、生殖器官全般において、ANPが古典的な性ホルモンの作用を修飾または補完するホルモンであることが推定された。

ブタ眼の各組織の膜分画の競争阻害実験のスキッチャード解析から、脈絡膜と毛様体にANPリセプターが存在すること、 K_d が45~73pMのハイ・アフィニティ型0.8~1.2nMのロー・アフィニティ型の2種類のリセプターが存在することが示された。さらに、アフィニティ・ラベリングによって、非還元状態で、脈絡膜では分子量13万の高分子量型が、また、毛様体では7万の低分子量型が主なリセプターであることが示された。これにより、脈絡膜と毛様体におけるANPの機能に差異のあることが示唆された。ハイ・アフィニティ型とロー・アフィニティ型、高分子量型と低分子量型それぞれの関係は不明だが興味深い問題である。ANPリセプターの存在が血圧を調節している器官以外の生殖器官や眼の組織で確認されたことは、ANPが血圧調節にとどまらず、広く体液のホメオスタシスに関与していることを示唆している。

現在ANPリセプターは既に精製・遺伝子のクローニングが成されているが、これに先がけて行われた本研究はそれらの基礎作りとして少なからず貢献したものと考えられる。また、本研究によって示唆された生殖器官や眼の組織におけるANPの機能に関しては未だ解明されていない重要な課題である。

審 査 の 要 旨

心房性ナトリウム利尿ホルモン (ANP) は血圧調節に重要な役割を果たしているホルモンであるが、本論文はそのリセプター (ANPリセプター) の生化学的性質を明らかにする先駆的な研究成果であり、後にANPリセプターの遺伝子が解明されるがその基礎として貢献している。

本論文で評価される点は、ANPリセプターの細胞膜からの可溶化に成功し、アフィニティ・ラベリングにより分子量とサブユニット構造を推定したことに加えて、卵巣と眼の組織におけるANPリセプターを解析することによりANPの新しい機能を示唆しているところである。特に、ANPの主要標的組織と考えられる腎臓や副腎などよりはるかに多量のANPリセプターが卵巣に存在しているという発見は注目されるところで、生殖器官でのANPの役割の解明という興味深い問題を提示している。

以上のように、本論文はANPリセプターの生化学的な姿を明らかにしたことにとどまらず、ANPの新たな機能の研究に踏み込んでいるという点で意義のあるものである。

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