

氏名(本籍)	石 ^{いし} 田 ^だ 純 ^{じゆん} 治 ^じ (新潟県)		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	博甲第2,040号		
学位授与年月日	平成11年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
学位論文題目	Genetical analysis of angiotensin signaling in vivo and in vitro (アンジオテンシン情報伝達系の分子遺伝学的解析)		
主査	筑波大学教授	農業博士	村上和雄
副査	筑波大学教授	農業博士	宗像英雄
副査	筑波大学教授	獣医学博士	八神健一
副査	筑波大学助教授	農業博士	深水昭吉

論文の内容の要旨

レニン・アンジオテンシン系(RA系)は生体の血圧調節及び高血圧の発症・維持に重要な役割を担う酵素・ホルモン系である。本系の最終生理活性物質は、昇圧ホルモン・アンジオテンシンII(AII)であり、その生理作用として血管平滑筋の収縮、副腎皮質からのアルドステロン分泌促進などが知られている。著者は、RA系の個体レベル、また分子レベルの機能解明のため以下の研究を行った。

1) 外来性遺伝子導入による「つくば低血圧マウス」の機能回復

RA系の唯一の基質であるアンジオテンシノーゲン(Agt)遺伝子を欠損し、個体内にRA系が存在しないマウス「つくば低血圧マウス」においては、野生型マウスと比較し、著しい血圧の低下、離乳期までの生存率の減少、腎臓における組織障害の存在が観察される。これら異常所見が遺伝子に回復することが可能であるかを解析するため、著者は、マウスメタロチオネイン(MT)・プロモーターとマウスアンジオテンシノーゲンゲノムDNAとを接続させたMT-Agt融合遺伝子を構築し、さらにこの融合遺伝子が導入されたトランスジェニックマウス(MT-Agtマウス)を作製した。そして「つくば低血圧マウス」とMT-Agtマウス間との交配により、MT-Agt融合遺伝子を有する「つくば低血圧マウス」(MT-Agt-KOマウス)を作出し、このマウスにおける表現形質を検討した。結果、「つくば低血圧マウス」で見られた新生仔期の死亡、収縮血圧、腎臓における組織障害、およびレニン遺伝子の発現増強が正常レベルまで回復していることが示された。このことから、「つくば低血圧マウス」でみられた異常所見は、MT-Agt融合遺伝子の導入により正常化し、発現解析および組織学的解析により、循環中のみならず局所におけるRA系もこの正常化に参与している可能性が示唆された。

2) Hemagglutinin(HA)タグを組み込んだマウスAT1a受容体を安定に発現する細胞株の確立

AII受容体のサブタイプのうち、AT1受容体はAIIの生理作用の大部分を伝達すると考えられており、近年、遺伝子欠損マウスも作製されているが、マウスAT1受容体自体についての考察はほとんど成されていない。その原因としては内在性AT1受容体の発現量の問題や特異性の高い良い抗体が存在しないなどが挙げられる。そこで、著者は、アンジオテンシン情報伝達系の解析のための有用なツールとして、受容体のN末端にHAタグを組み込んだマウスAT1aを作製し、ヒト胎児腎臓由来の293-T細胞に安定に導入した。Bindingアッセイの結果、この細胞株に発現しているAT1受容体は、以前に報告されている内在性および外来性のAT1受容体と同等の結合親和性と細胞表面の結合サイト数を保持していることが明らかとなった。そこで、生化学的にこの受容体の機能を検討した。まず、細胞内カルシウムの流入を測定したところ、このAT1受容体はリガンド刺激による

濃度依存的な細胞内カルシウム流入が観察された。また、リガンド刺激によって誘導される extracellular signal-regulated kinase (Erk) の活性化も、リガンド濃度依存的に観察され、この AT1 受容体は正常な細胞内情報伝達能を保持していることが判明した。さらに、HA タグに対する抗対を用いた検討により、Immunoblot、および免疫沈降法にも利用できる抗体との特異的結合能を獲得していることが示された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

近年、胚性幹細胞の応用すなわち遺伝子欠損戦略を用いることにより、事実上いかなる遺伝子に対しても、遺伝子変異マウスを作り出すことが可能となってきた。この方法は、ある特定の遺伝子の生理的重要性を直接解析するのにより敵しているといえる。それ故に、現在までに数多くの変異マウスが作製され解析されてきており、この傾向は将来的にさらに強まると考えられる。一方、これらマウスを用いた数多くの新事実の解明に伴い、その解析と考察の複雑さもまた増してゆくことは避けられない。このような状況で、ゲノムに対して挿入、欠失、または置換するという形で変異を導入する場合、その効果が目的の遺伝子にだけでなく、その遺伝子の近傍、もしくは相補鎖にコードされている遺伝子などにもあらわれる可能性が指摘されている。このことは、遺伝子欠損実験の解釈を行う際には考慮に入れる必要があり、著者が本論文にて行っているような回復実験をできる限り行うことが求められている。

AII は RA 系の最終生理活性物質であり、数多くの広範囲にわたる生理活性を發揮し、高血圧の発症維持や心肥大、動脈硬化症などにも深く関わっていることが分かってきた。それ故に、AT1 受容体の生理機能の解明は重要であるといえる。しかし、以下で述べる理由によって解析はほとんど成されていない。まず、現時点において、AII 受容体を認識したり精製したりすることすら技術的に困難であり、もし受容体に対する特異的な良い抗体や標識方法が存在するならば、AT1 受容体の構造解析や機能制御に関する研究が飛躍的に進むものと考えられる。本論文において著者は、エピトープタグが組み込まれた AT1 受容体を安定に発現する細胞株の樹立に成功した。この細胞株に発現する受容体は、リガンドとの融合能やリガンド刺激によって誘起される応答を損なうことなく、タグに対する充分かつ有効な抗体反応性を獲得していることが判明した。最近、抗体を用いた様々な解析方法が開発されてきており、これら解析法は、ある特定の分子の生体外における特性を評価するうえで必要不可欠なものとなっている。さらに、AT1 受容体が抗体との特異的結合能を獲得したということは、現在まで困難であった受容体に直接相互作用する因子の同定と解析をも可能にする。このような事実を踏まえると、著者によって作製されたこの細胞株は、今後の AII 受容体研究の発展において大いに貢献するものと期待される。

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。