

氏名(本籍)	小 <sup>お</sup> 澤 <sup>ざわ</sup> 泰 <sup>やす</sup> 裕 <sup>ひろ</sup> (福島県)		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	博甲第1,818号		
学位授与年月日	平成10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	農学研究科		
学位論文題目	Angiotensin II-induced Signal Transduction via Its Type 1 and Type 2 Receptors for Cell Proliferation (アンジオテンシン・タイプ1およびタイプ2受容体の細胞増殖に与える影響とその情報伝達機構の解析)		
主査	筑波大学教授	農学博士	村上和雄
副査	筑波大学教授	Ph. D. (理学)	多比良和誠
副査	筑波大学教授	農学博士	田仲可昌
副査	筑波大学助教授	農学博士	宮崎均

### 論文の内容の要旨

アンジオテンシンⅡ (AngⅡ) は、強力な血管収縮性ペプチドであり、種々の細胞でさまざまなホルモンやオータコイドの分泌を制御することにより血圧・体液量調節に重要な役割を果している。アンジオテンシンⅡの種々の生理作用は、細胞膜上に存在する特異的受容体を介して発現する。近年、2種類のアンジオテンシンⅡ受容体がクローニングされ、それぞれGタンパク質に共役する膜7回貫通受容体であることが明らかとなった。既知のアンジオテンシンⅡの生理作用の多くは、タイプ1受容体(AT1受容体)を介したものと考えられている。タイプ1受容体の細胞内シグナルの1つとして、Gqタンパク質を介したホスホリパーゼC活性化に続く、プロテインキナーゼC(PKC)の活性化および細胞内カルシウム濃度の上昇が知られているが、細胞増殖への情報伝達機構について不明な点が多い。一方、タイプ2受容体(AT2受容体)の生体内での役割については全く不明であり、その細胞応答および情報伝達経路についてもほとんど解明されていない。著者は、アンジオテンシンⅡ受容体(AT1受容体、AT2受容体)を介した細胞応答(細胞増殖、分化、細胞死)とその分子メカニズムを解明のため、各受容体を人工的に発現させたモデル細胞を作成し、細胞増殖促進(AT1受容体)および細胞増殖抑制(AT2受容体)の詳細な分子制御メカニズムを明らかとした。

1)組換え型ラットAT2受容体を導入したNIH3T3細胞において、トリチウム標識したチミジンの細胞核への取り込みを指標にしてAT2受容体を介する細胞増殖抑制作用及びその作用機構の解析を行った結果、AngⅡおよびAT2受容体特異的なリガンドであるCGP42112Aは濃度依存的に、血清及びEGF刺激による細胞増殖を抑制した。この作用は、AT2受容体特異的なアンタゴニストであるPD123319により阻害され、更に百日咳毒素(PTX)前処理においても完全に抑制されることにより、AT2受容体の増殖抑制作用にPTX感受性のGタンパク質が必須であることが初めて明らかとなった。

2)組み換え型ラットAT1受容体を導入したPC12細胞において、AT1受容体を介する細胞増殖機構を解析した。Condition Medium実験、時間依存性実験等の結果より、AT1受容体を介する細胞増殖はAngⅡの直接的な作用であることが明らかとなった。また、この増殖促進作用は、PTX、Calphostine C処理で影響されないことからGi及びPKC経路を介さない機構である。チロシンキナーゼ阻害剤Genistein及びEGF受容体特異的阻害剤AG

1478はそれぞれ100%, 30%, DNA合成を抑制することにより, AT1受容体を介する細胞増殖にはトロシキナーゼの活性化が必要であること, 更に, 一部受容体型チロシキナーゼ (EGF受容体) を介することが明らかとなった。

AT1受容体を介する細胞増殖機構をより詳細に解析するため細胞増殖の鍵酵素である mitogen-activated protein kinase (MAPK) の活性化機構を解析した結果, PTX処理で影響がないことから, AT1がカップルする Gq, Giのうち Gqを介すること, 更に Calphostine C及び PKC-down regulationにおいても MAPKの活性化は抑制されないことから, PKC非依存的経路を介することが明らかとなった。また, MAPKの活性化は細胞内カルシウムのキレーターである BAPTA-AMで完全に阻害されるが, カルモジュリン阻害剤 W-7, Calmidazoliumでは阻害されないことより, カルシウム依存的ではあるがカルモジュリンには依存しないことが明らかとなった。一方, Herbimycin A (チロシキナーゼ阻害剤) は完全に MAPKの活性化を抑制することから, AT1受容体を介する細胞増殖にはチロシキナーゼの活性化が必須である。また, カルシウムチャンネル・ブロッカーであるニッケル及び細胞外カルシウム・キレーター EGTAにより Ang IIの作用は抑制されるが, bFGFの作用は20%抑制されるにすぎないことから, AT1を介する経路は, bFGFとは異なり細胞外カルシウムに強く依存している。また, Ang IIで誘導される持続性の細胞内カルシウム上昇をチロシキナーゼの阻害剤が阻害することから, 一過性の細胞内カルシウム上昇により活性化されるチロシキナーゼが持続性の細胞内カルシウム濃度上昇を引き起こしている。つまり, カルシウム依存的なチロシキナーゼと細胞外カルシウム流入によるポジティブフィードバック機構により維持される持続性の細胞内カルシウム濃度上昇が MAPKの活性化に大きく関与していることを明らかとした。

## 審査の結果の要旨

近年, 数多くのホルモンがそれぞれ単一の機能のみを持つのではなく, 多様な場所や時期に, 様々な活性を発現し, 複数の受容体を介してバランスよく生体を制御しているという考え方が一般化してきた。今日では, このような生体制御分子の活性発現メカニズムを理解する上で, 個々の受容体を介する細胞応答及びその細胞内情報伝達機構の解明が重要視されている。このような状況の中, アンジオテンシン IIが血圧・体液量調節作用のみならず, 2つの異なる受容体 (AT1受容体, AT2受容体) を介して, 細胞増殖を正負 (促進, 抑制) に制御していることを明らかにしたことは非常に意味があることと思われる。

更に, その作用機序についての解析も行い, AT2受容体の細胞増殖抑制作用には百日咳毒素感受性 Gタンパク質が関与していることが明らかにし, また AT1受容体の細胞増殖促進作用にはカルシウムによって活性化されるチロシキナーゼ及び EGF受容体を介するトランスアクティベーション機構が重要な役割を担うことも明らかとなった。今後, 細胞増殖促進作用に関与するカルシウム依存的なチロシキナーゼを同定し, 活性化の機序を解明することにより, アンジオテンシン IIの情報伝達機構解明にとどまらず, 細胞増殖, 分化におけるカルシウム・シグナリングとチロシキナーゼ, チロシフォスファターゼの役割をより深く理解することにつながると期待される。

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。