

氏名(本籍)	あ べ よういちろう (愛知県)		
学位の種類	博 士 (医 学)		
学位記番号	博 甲 第 1,734 号		
学位授与年月日	平成 9 年 3 月 24 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	医 学 研 究 科		
学位論文題目	The Signal Transduction System of Endothelin Receptors (エンドセリン受容体を介する情報伝達系)		
主査	筑波大学教授	医学博士	濱 口 秀 夫
副査	筑波大学教授	医学博士	大 川 治 夫
副査	筑波大学教授	医学博士	杉 下 靖 郎
副査	筑波大学教授	医学博士	三 輪 正 直
副査	筑波大学助教授	理学博士	石 井 哲 郎

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的)

エンドセリンの2種類の受容体(エンドセリンA受容体及びB受容体)は、少なくとも4種類のGタンパク質(G_q , G_{11} , G_s , G_{12})と共役している。また、細胞の増殖・分化に重要な役割を演じている extracellular-signal-regulated protein kinase 2 (Erk 2) を活性化することが知られている。一方マウスで、エンドセリンB受容体やそのリガンドのエンドセリン-3の遺伝子が欠損すると、腸壁内神経節細胞が欠如し、巨大結腸症が起こることが観察されている。ヒトではHirschsprung病のかなりの家族性症例及び散発性症例の発生に*c-ret proto-oncogene*の突然変異が関わっているとみなされているが、最近、一部のHirschsprung病患者でエンドセリンB受容体遺伝子の突然変異が同定された。したがってエンドセリンB受容体を介したシグナル伝達が、腸壁内神経節細胞の増殖、移動、分化に重要な役割を果たしていると考えられる。本研究は、2種類のエンドセリン受容体刺激によるErk 2活性化経路を明らかにすること、及びHirschsprung病患者で検出されたエンドセリンB受容体遺伝子のミスセンス変異がシグナル伝達に及ぼす影響を明らかにすることを目的として行われた。

(方法)

エンドセリンA受容体またはB受容体を発現されたCHO細胞株を樹立し、シグナル伝達系の分析に用いた。ヒトHa-Ras cDNAやその変異、 α -adrenergic receptor cDNAs、及びbovine transducin cDNAを組み込んだプラスミドDNAを調製または入手し、CHO細胞に導入した。Erk 2の活性化はin-gel kinase detection assay法より分析した。活性化されたタンパク質の同定はWesternプロット法で行った。

Hirschsprung病患者で検出された7種類のミスセンス変異型エンドセリンB受容体遺伝子、G 57 S, A 183 G, T 244 M, W 276 C, R 319 W, M 374 I, P 383 Lをオリゴヌクレオチド特異的突然変異作製法で調製し、培養細胞株COS-7, HEK 293, Ltk⁻, 及びCHO-K1に導入して発現させた。リガンドとの結合は競合結合実験により、Gタンパク質共役受容体を介するシグナル伝達系の検出はHEK 293細胞を用いたCRE/ β -galactosidaseアッセイにより分析した。

(結果と考察)

COH 細胞のエンドセリン A 受容体及び B 受容体をエンドセリン-1 で刺激したところ、どちらの受容体刺激も Erk 2 を活性化した。これらの Erk 2 活性化は、フォルボールエステルの長時間処理及び百日咳毒素処理によっても抑制された。また、変異 Ha-Ras である S17N-Ras を導入してエンドセリン受容体と共に発現させたところ、Erk 2 活性化が抑制された。さらに、どちらのエンドセリン受容体刺激でも、Ras のグアニンヌクレオチド交換が促進されたが、この反応は百日咳毒素処理で阻害された。これらの結果は、エンドセリン A 受容体及び B 受容体による Erk 2 活性化は、百日咳毒素感受性の G タンパク質と共役した Ras 活性化を介する経路、及びプロテインキナーゼ C 活性化を介する経路の、2 種類の経路によって起こることを示している。

エンドセリン B 受容体の変異の機能に関しては、いずれの変異体においてもエンドセリン-1 及び-3 との結合親和性の低下は認められなかった。しかし、A 183 G, W 276 C, P 383 L では細胞膜上に発現している受容体量が減少していた。また、G タンパク質共役を介するシグナル伝達経路の応答は、A 183 G, R 319 W, W 276 C で野生型の60-70%に減少し、M 374 I と P 383 L ではほとんど消失していた。M 374 I と P 383 L では細胞内カルシウム濃度の一過性上昇、Erk 2 の活性化、細胞内 cAMP の上昇のいずれにおいても障害が認められた。W 276 C でも Erk 2 の活性の減弱が観察された。これに対して、G 57 S と T 244 M では機能に野生型との差が認められなかったが、両変異とも受容体の細胞外ドメインにアミノ酸置換が存在し、一般集団で多型として検出できるとい報告もあることから、この変異遺伝子は発症とは無関係である可能性が高い。

以上の結果は、エンドセリン B 受容体のシグナル伝達機能の低下が Hirschsprung 病の原因となっていることを示唆している。

審 査 の 結 果 の 要 旨

エンドセリンとその受容体の生体機能及び病態における役割の研究が進展し、これらの物質の医学・生物学分野における重要性が益々認識されるようになってきている。本研究で著者は、エンドセリン A 及び B 受容体刺激によるシグナル伝達経路を分析し、いずれの受容体も、百日咳毒素感受性の G タンパク質と共役した Ras 活性化を介する経路と、プロテインキナーゼ C 活性化を介する経路の、2 種類の経路によって Erk 2 (p 42 MAP キナーゼ) を活性化することを示した。さらに、Hirschsprung 病患者で報告されている 7 種類のミスセンス変異型エンドセリン B 受容体遺伝子のシグナル伝達に及ぼす影響を詳細に分析し、エンドセリン B 受容体を介したシグナル伝達機能の低下が Hirschsprung 病の原因となりうることを強く示唆する結果を得た。これらの研究成果は、エンドセリン A 受容体及び B 受容体の機能発現機序、及び Hirschsprung 病発生の分子遺伝学的機序に新知見を加えるものであり、高く評価できる。

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。