

氏名(本籍)	柴 玲 子 (茨城県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第1015号
学位授与年月日	平成4年3月25日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	エンドセリン-3 (ET-3) に関する分子生物学的解析 (Dissertation形式)
主査	筑波大学教授 理学博士 坂内 四郎
副査	筑波大学教授 医学博士 内藤 裕史
副査	筑波大学教授 医学博士 長谷川 鎮雄
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 医学博士 吉澤 靖之

論 文 の 要 旨

<目 的>

エンドセリン (ET) は1988年に発見された生理活動ペプチドで、その強力な血管収縮および昇圧活性が注目を集めた結果、この3年半あまりの間に多くの研究が行われてきた。その過程で、ETには3種のアイソペプチドが存在すること、循環系以外でも多くの生理作用を持つことが明らかになった。この3種のアイソペプチドのうちET-3は、血管収縮活性および昇圧活性が他の2種より低いため、当初はそれほど注目を集めず、その構造、変換、生理活性などで、不明の点が多く残されている。しかし、ET-3が主に作用すると考えられるET_B受容体が中枢神経系を始めとする生体内の各組織で発現していることが明らかとなり、ET-3がこれらの組織において生理作用を持つ可能性が考えられるにいたった。本研究の目的は、ラットのET-3前駆体であるプレプロET-3のcDNAをクローニングし、ET-3前駆体の構造、変換機構、およびmRNAの組織での発現を明らかにすることにより、ET-3の生理作用解明に資することである。

<対象および方法>

I. ラットプレプロET-3cDNAのクローニング

ラットET-3ゲノムプローブ及び合成DNAのプローブを用い、ラット眼球より精製したPoly(A)⁺RNAを鋳型として作製したラムダgt10cDNAライブラリーを、プラークハイブリダイゼーション法にてスクリーニングした。

II. COS-7細胞におけるラットプレプロET-3cDNAの発現とフォスフォラミドンの作用

ラットプレプロET-3cDNAを発現ベクターpCDS-2のSR α プロモーターの下流に組み込み、DEAE-デキストラン法にてCOS-7細胞にトランスフェクションした後、フォスフォラミドン存在下及び非存在下にて培養し、その上清中のET-3の濃度をエンザイムイムノアッセイ法にて測定した。

III. ラット各組織におけるラットプレプロET-3mRNAの発現

ラット各組織のPoly(A)⁺RNAを精製し、10 μ gずつホルマリン-アガロースゲルにて電気泳動し、ナイロン膜に転写した後、ラットプレプロET-3cDNAをプローブとしてノーザンブロットの分析を行なった。

IV. 眼球におけるET_B受容体の存在と分布

ホルマリン系の固定液にて灌流固定したラットから眼球を摘出し、厚さ10 μ mの凍結切片を作製した。抗ET_B受容体血清を用いて免疫組織化学的にET_B受容体の存在を調べた。

〈結果および考察〉

I. ラットプレプロET-3cDNAのクローニング

ラットプレプロET-3をコードする約1.7kbのクローンを得た。推測されるラットプレプロET-3は167残基のアミノ酸からなるペプチドで、ラットビッグET-3は41残基でC末端がアミド化されており、ヒトプレプロET-3と2残基配列が異なっていた。

II. COS-7細胞におけるラットプレプロET-3cDNAの発現とフォスフォラミドンの作用

COS-7細胞にラットプレプロET-3cDNAを一過性発現させることにより、培養上清中に約30 fmol/mlのET-3が測定された。また、このET-3産生はフォスフォラミドンにより約6 fmol/mlに抑制されることから、COS-7細胞におけるラットビッグET-3の変換は、その一部がET-1と同様の機構を介していると考えられた。

III. ラット各組織におけるラットプレプロET-3mRNAの発現

ラットプレプロET-3-mRNAは、眼球で最も多く発現していた。又、顎下腺、脳、小腸、腎臓で比較的多くの、胃、脾臓でもわずかながら発現が観察された。これらの組織において、ラットET_B受容体mRNAの発現も比較的多く見られることから、ET-3がローカルメディエーターとして働いている可能性が示唆された。また、これらの組織は、ラットプレプロET-1mRNAの発現が多い組織とは全く異なっていることから、生体内においてET-3とET-1の機能的役割分担が存在すると考えられた。

IV. 眼球におけるET_B受容体の存在と分布

ラット眼球網膜のガングリオン細胞にET_B受容体様の免疫活性が存在した。この神経細胞は視覚情報を脳内に伝える線維の起始細胞であることから、ET-3がこの細胞を作用点として視覚系に作用している可能性が示唆された。

審 査 の 要 旨

ラットのET-3前駆体であるプレプロET-3のcDNAのクローニングに成功し、プレプロET-3のアミノ酸全配列を決定した。また、プレプロET-3からET-3へと変換するプロセッシングの過程を調べ、さらに、眼球でプレプロET-3の発現が最も顕著であることを発見している。一方、眼球網膜のガングリオン細胞にはET-3の受容体と想定されているものが高密度に分布していることも明らかにした。これらのことは、ET-3に関する最も基礎的な知見であり、かつ、ET-3の本来の生理作用を解明する上で重要な示唆を与えるものである。これにより本論文は博士（医学）論文として十分に評価しうると考える。

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。