

氏名(本籍)	沢村達也(滋賀県)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第1014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-1前駆体ビッグエンドセリン-1の特性およびビッグエンドセリン-1からのエンドセリン-1の産生機構についての研究(Dissertation形式)		
主査	筑波大学教授	医学博士	山下 亀次郎
副査	筑波大学教授	医学博士	阿部 帥
副査	筑波大学教授	医学博士	工藤 典雄
副査	筑波大学教授	医学博士	嶋本 喬
副査	筑波大学助教授	医学博士	山北 宜由

論 文 の 要 旨

<目 的>

エンドセリン-1は内皮細胞の培養上清中から発見された強力な血管収縮物質として世界的に注目されてきた。これ迄の研究から、エンドセリン-1の産生過程としては最初の前駆体としてプレプロエンドセリン-1がつくられ、これが特異的エンドペプチターゼにより切断され中間体であるビッグエンドセリン-1が先ず産生されると考えられる。その後、ビッグエンドセリン-1のTrp-Val結合を特異的に切断するエンドペプチターゼによりさらに切断されエンドセリン-1が産生されると考えられたが、まだ実証されていない。本研究は、ビッグエンドセリン-1からエンドセリン-1が実際に産生されるか否か、またこの変換が生理的意義を有するか否かを検討し、更にこの過程に働くエンドセリン変換酵素の精製を試み、その特性を検討した。

<方 法>

1)ブタ大動脈内皮細胞培養上清中のエンドセリン-1に関連するペプチドを逆相HPLC等により分離・解析した。2)エンドセリン変換酵素活性はビッグエンドセリン-1を基質として酵素により生じたエンドセリン-1をラジオイムノアッセイにより測定した。3)内皮細胞の培養液に種々のプロテアーゼ阻害剤を加え、ビッグエンドセリン-1からエンドセリン-1への変換に与える影響を検討した。また肺膜分画から金属プロテアーゼ阻害剤phosphoramidon感受性エンドセリン変換酵素を精製し、その特性を検討した。

〈結果と考察〉

1) 内皮細胞培養上清中からビッグエンドセリンとともにその切断によって生じたエンドセリン-1 および残りのC末端側のペプチドを単離した。

2) ウシ副腎クロム親和性顆粒からエンドセリン変換酵素活性の高い酵素を精製し、本酵素はカテプシンDに極めてよく似た性質を有していた。また内皮細胞にもカテプシンDが見出されたが、生理的作用を有するか否かを検討した結果、カテプシンDはビッグエンドセリン-1のTrp-Valだけでなく、Asp-Ile結合も切断することが明らかとなった。一方、培養上清中にはAsp-Ileの結合の切断による産物は検出されず、カテプシンDは生理的なエンドセリン変換酵素ではないと考えられた。

3) 生理的なエンドセリン変換酵素を探る目的で内皮細胞培養液にプロテアーゼ阻害剤を加えた結果、金属プロテアーゼ阻害剤であるphosphoramidonがエンドセリン-1の産生を抑制するとともにビッグエンドセリン量を増加させた。これによりエンドセリン変換酵素は金属プロテアーゼの1種と考えられた。肺膜分画から精製したphosphoramidon感受性エンドセリン変換酵素は分子量約30万、至適pH6.5~7.0、phosphoramidonによる阻害の IC_{50} が 10^{-6} Mの糖蛋白であった。この酵素はビッグエンドセリン-1をエンドセリン-1に変換するが、同様の産生経路が想定されるエンドセリン-1のイソペプチドの中間体ビッグエンドセリン-2、-3はエンドセリン-2、-3に変換しなかった。従って、ビッグエンドセリン-2、-3を変換する他の酵素の存在が示唆された。

〈結 論〉

1) ブタ大動脈内皮細胞培養上清中にはビッグエンドセリン-1とともにその切断により生じたエンドセリン-1 および残りのC末端のペプチドが単離された。

2) 内皮細胞にカテプシンDが見出されたが、ビッグエンドセリン-1に対する切断様式から生理的役割は否定的であった。

3) 内皮細胞の培養液中に金属プロテアーゼ阻害剤phosphoramidonを添加するとエンドセリン-1の産生が抑制され、エンドセリン変換酵素は金属プロテアーゼの1種と考えられた。本酵素を肺膜分画から精製し、特性解析により分子量約30万の糖蛋白であることを認めた。

審 査 の 要 旨

内皮細胞においてビッグエンドセリン-1からエンドセリン-1に変換されることを証明し、その過程に働くエンドセリン変換酵素について、その生理的意義と特性の一端を明らかにしたところに意義がある。今後、内皮細胞における本酵素の精製と構造決定を行えば、特異的拮抗剤等の開発につながると考えられる。それにより、エンドセリン-1の生理的役割と各種疾患におけるエンドセリン-1の意義が一層明らかになることが期待される。

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。