

氏名(本籍)	新見修 (宮崎県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第1,269号
学位授与年月日	平成6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-2の産生機構とその変換酵素の解析
主査	筑波大学教授 医学博士 林 英 生
副査	筑波大学教授 医学博士 小 山 哲 夫
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 鎖 雄
副査	工業技術院電子技術 工学博士 山 根 茂
	総合研究所情報科学部 脳機能研究室長 (筑波大学併任教授)

## 論 文 の 要 旨

### <目的>

ヒトのエンドセリン(ET)にはゲノムDNAの解析から3種類あることが明らかにされている。いずれも21アミノ酸からなるペプチドであるが、それぞれのアミノ酸組成と配列は異なり(イソペプチドを形成)、作用機構にもそれぞれ特異性がある。そのうち、エンドセリン-1(ET-1)についてはその産生、作用機構について詳細な研究がされているが、エンドセリン-2(ET-2)についてはその産生機構についてなお不明な点が多い。本研究ではET-2の産生機構と生理活性の特性を明らかにするために、ET-2を産生する培養細胞系をもちいて、ET-2産生の中間体としてのbig ET-2の構造を同定し、その産生に関与するET-2変換酵素(ECE-2)の活性の特性を解析し、さらにその部分精製を試みた。

### <材料および方法>

ヒト腎腺腫瘍由来の株化細胞であり、ET-2を産生するACHN細胞を実験に供した。細胞培養液上清を逆相系C18カラム-HPLCにより分画し、ET-2関連ペプチドを3種類の抗体、すなわち：ET-1(15-21)を認識するAS-ETC、ET-2(1-21)のペプチドの中間部を認識するAs-ETL、およびbig ET-2(31-38)のC端を認識するAs-bET2Cを用いて、ラジオイムノアッセイ(RIA)で検出した。ET-1変換酵素阻害剤であるホスホラミドンの影響は、ACHN細胞培養液にこれを添加し培養し、培養上清に産生されるET-2関連ペプチドを定量測定して調べた。ET-2変換酵素の活性測定には、酵素としてACHN細胞の膜分画からTriton X100による可溶化画分を供し、基質としてヒトbig ET-1、big ET-2、

または big ET-3を供し、産生(ET)を RIA 法により定量して活性を表示した。変換酵素の部分精製には、Triton X100による可溶化画分から1M 硫酸で沈澱物を除去し、その上清を疎水性カラムクロマトグラフィにより分画した。

#### 〈結果および考察〉

ACHN 細胞の培養上清には、4種の ET-2関連ペプチドが検出され、それぞれ ET-2(1-21, 数字はアミノ酸配列順序), big ET-2(1-38), big ET-2(1-37), big ET(22-38)であった。ET-2(1-21), と big ET-2(33-38)はモル比約 1 : 1 で存在し, big ET-2(1-38)は ET-2の約15%存在していた。ホスホラミドン存在下では、その濃度依存的に ET-2の産生量は減少し、逆に ET-2(1-38)が増加した。

ACHN 細胞表面は big ET を ET-2に変換するプロテアーゼがあり、その基質特異性は big ET-1 > big ET-3 > big ET-2であり、ホスホラミドン  $10^{-4}$ M で big ET-1と big ET-3を基質した場合には約30%に抑制され、big ET-2では約70%に抑制された。この酵素は細胞膜分画に2種類(ECE-2A と ECE-2B)存在することが確認された。ECE-2Aは big ET-1を基質とした場合、 $K_m=2.1 \mu\text{M}$ ,  $V_{\text{max}}=2.6 \text{ nmol/mg protein/h}$ , big ET-2を基質とした場合、 $K_m=1.4$ ,  $V_{\text{max}}=2.0$ で、ほぼ同程度の活性を示し、ET-3では  $K_m=0.11$ ,  $V_{\text{max}}=0.06$ であった。分子量約60kD, 至適 pH7.0-7.2, ホスホラミドンの阻害は  $IC_{50}=3 \times 10^{-4}$ M であり、SH 基阻害剤でも阻害をうける中性金属プロテアーゼであった。ECE-2Bは、big ET-1を基質にする場合には至適 pH6.8,  $K_m=0.51 \mu\text{M}$ ,  $V_{\text{max}}=2.0 \text{ nmol/mg protein/h}$ , ホスホラミドンの阻害効果は  $IC_{50}=3 \times 10^{-6}$ M であった。big ET-2または big ET-3を基質とする場合には至適 pH6.4-6.6で、それぞれ  $K_m=0.03$ と  $0.04$ ,  $V_{\text{max}}=0.38$ と  $0.21$ , ホスホラミドンの阻害濃度は  $IC_{50}=6 \times 10^{-7}$ M と  $3 \times 10^{-7}$ M で類似の特性をしめし、いずれも SH 阻害剤非感受性の中性金属プロテアーゼであった。部分精製による推定分子量は約500kDaであった。ET-2は、まず ACHN 細胞内で中間体として big ET-2(1-38)が合成され、細胞膜に存在する ET-2変換酵素の作用で Trp<sup>21</sup>と Val<sup>22</sup>の間が開裂して成熟活性型になることがわかった。ACHN 細胞には ET-2変換酵素が2種類あり、それぞれは3種類の big ET を21アミノ酸残基の ET に変換するが、ECE-2Bは内皮細胞由来の ET-1変換酵素の特性と類似しており、活性阻害剤による解析から、これが主として ACHN 細胞における生合成に関与していることが示唆された。

## 審 査 の 要 旨

ヒト腎腺腫瘍由来の株化細胞 ACHN 細胞におけるエンドセリン-2の生成機構を解析し、中間体である big ET-2の構造を明らかにし、big ET-2を ET-2に変換する酵素を同定した。研究目的は明確で、実験方法は適切であり、結果は信頼性が高く、有意義である。本研究は、この分野の研究進展に貢献するものであり、今後、血管循環調節のための薬剤開発にも応用できる実用性も含む、質の高い研究論文である。

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。