

氏名(本籍)	おおにしじゆんじ (東京都)		
学位の種類	博 士 (学 術)		
学位記番号	博 甲 第 1160 号		
学位授与年月日	平成 5 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	農 学 研 究 科		
学位論文題目	CHARACTERIZATION OF ANGIOTENSIN II RECEPTOR SUBTYPE (アンジオテンシンII受容体サブタイプに関する研究) 低圧低酸素環境下における睡眠時生理的応答に関する研究		
主 査	筑波大学教授	農学博士	村 上 和 雄
副 査	筑波大学教授	農学博士	日 下 部 功
副 査	筑波大学教授	理学博士	宗 像 英 輔
副 査	筑波大学教授	薬学博士	後 藤 勝 年

## 論 文 の 要 旨

アンジオテンシンII (A II) は強力な血圧上昇作用を示すペプチドで、高血圧症や心肥大等心臓血管系の病態との関連で注目されている。その昇圧作用は血管平滑筋の収縮をはじめ、A IIの種々の細胞での多様な生理作用により生ずる。

最近、A IIに対するアンタゴニストの開発が進み、薬理的にA II受容体にはタイプ1, 2, 3 (AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub>, AT<sub>3</sub>) の3種類が存在することが明かになった。

従来より、組織膜画分、初代培養細胞、細胞株を用いて、A II受容体を介した細胞内情報伝達系の解析が行われてきた。A IIの生理作用は各標的組織部位により様々で、現在迄のところそれらの生理作用を担う細胞内情報伝達系には3種類あると考えられている。1つはホスホリパーゼCの活性化によるイノシトール3リン酸(IP<sub>3</sub>)産生の促進、そしてIP<sub>3</sub>の作用による細胞内プールからのCa<sup>2+</sup>の放出、2つめに細胞膜上に存在する電位依存生Ca<sup>2+</sup>チャンネルの開口促進、3番目はアデニレートシクラーゼ活性の抑制によるcAMP量の減少である。このような複数の細胞内情報伝達系の使い分けは、標的細胞の種類にも依存するが、同一細胞でも数種の系を持ち合わず場合があることが知られている。こうした幾種もの異なる情報伝達系への作用が1種のサブタイプで発揮され得るのか、また幾つかのサブタイプとで分担しあっているのかは興味が引かれる点の1つである。

I. 組換え体ラットアンジオテンシンIIタイプI受容体を介した細胞内情報伝達機構の解析  
クローン化されたラットのタイプI受容体AT<sub>1A</sub>のcDNAをチャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO細胞)内に導入、発現させ、その細胞を用いてタイプI受容体(AT<sub>1A</sub>)が関与し得る細胞内

情報伝達系を解析、検討した。ここで用いたCHO細胞には内在性のA II受容体は存在しないので、以下の結果は導入したラットタイプ I 受容体 (AT<sub>1A</sub>) に特異的な作用と考えられる。

(1) この細胞を用いて、A IIの刺激に対する細胞内Ca<sup>2+</sup>の濃度の変化を、Ca<sup>2+</sup>蛍光指示薬であるfura-2を用いて検討した。終濃度が10<sup>-8</sup>MのA IIで細胞を刺激すると、スパイク様の細胞内Ca<sup>2+</sup>の上昇が起き、それに続いて持続性の細胞内Ca<sup>2+</sup>動員が見られた。細胞外Ca<sup>2+</sup>をEGTAによりキレートした状態で同じ終濃度のA IIで刺激してやると、一過性のピークは減少し、持続性の上昇は全く見られなかった。又、電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャンネルの拮抗剤であるニカルジピンで処理した細胞を用いてA II刺激によるCa<sup>2+</sup>動員を調べたところ、EGTA処理の細胞と同様の応答を示した。これらの事実より、A II刺激による細胞内Ca<sup>2+</sup>動員には、少なくとも2種類の系が働いていると考えられている。1つは電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャンネルを介した細胞外からのCa<sup>2+</sup>の流入、もう1つは細胞内プールからのCa<sup>2+</sup>の放出である。前者は持続性のCa<sup>2+</sup>上昇と一過性のピークの一部を担い、後者の系は一過性のピークの一部に関与していると思われる。より低い終濃度 (10<sup>-11</sup>M) のA IIで同じ様に細胞を刺激すると電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャンネルの活性化による持続性の上昇のみが現れた。従って、電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャンネルは細胞内Ca<sup>2+</sup>プールよりも、A II刺激に対して高い感受性をしめすといえる。

(2) ホスホリパーゼCの阻害剤であるネオマイシンで細胞を処理すると、その濃度に依存的に一過性のピークが減少していくことから、細胞内プールからのCa<sup>2+</sup>放出には、イノシトール3リン酸(IP<sub>3</sub>)が関与していることが示唆された。更に刺激するA IIの濃度依存的に、産生されるIP<sub>3</sub>量が増加することも確認できた。

(3) アデニレートシクラーゼの活性化剤であるフォルスコリンをA II存在下及び非存在下で細胞に与えたところ、A IIの終濃度を10<sup>-7</sup>M、10<sup>-6</sup>M、10<sup>-5</sup>Mと高めるに従い、細胞内cAMP量は減少した。この阻害作用はタイプ1 (AT<sub>1A</sub>) cDNAを導入していないCHO細胞に於ては全く見られなかったことから、A IIによるアデニレートシクラーゼ活性の阻害はその特異的受容体タイプ1 (AT<sub>1A</sub>) を通して起きたものといえる。

以上のことより、1つのサブタイプAT<sub>1A</sub>だけで、3つの異なる細胞内情報伝達系に作用し得ることを今回作製したモデル細胞を用いて証明することができた。

## II. 生殖器官におけるアンジオテンシンIIタイプ2受容体の解析

(1) ウシ副腎皮質と卵巣膜画分を調製し、受容体への<sup>125</sup>I-A II結合率に対するSH基還元剤ジチオスレイトール (DTT) の影響を調べたところ、副腎ではDTTの濃度に依存して<sup>125</sup>I-A II結合率の低下が観察されるのに対し、卵巣では予想に反し、逆に3倍程度の<sup>125</sup>I-A II結合率の上昇がみられた。Scatchardプロット解析により、更に詳細な検討を加えたところ、副腎ではDTT処理が解離定数 (Kd値) の変化なしに結合部位数を低下させるのに対し、卵巣においては結合部位数に変化を与えることなくKd値を低下、即ちリガンドと受容体の新和性を増大させることが判明した。それに加えて卵巣A II受容体は副腎A II受容体と異なり、A IIの結合がグアニンヌクレオチドのアナログ、GTP<sub>γ</sub>Sにより全く影響を受けなかった。以上のことより、この卵巣膜画分上に発現している

A II受容体は明かに副腎皮質のそれとは異なるタイプのものであることが示唆された。現在では、この卵巣A II受容体はA II受容体サブタイプの1つであるタイプ2 (AT<sub>2</sub>) であると考えられている。又、副腎皮質A II受容体はタイプ1 (AT<sub>1</sub>) に属し、GTP結合タンパク質共役型受容体であることが知られている。

(2) 性周期と卵巣A II受容体との関連を調べるために、ラット卵巣顆粒膜細胞の初代培養系を用いて以下の実験を行った。A II受容体サブタイプを特異的に識別する非ペプチド性アンタゴニストを用いたりガンド競争置換実験より、ラット卵巣顆粒膜細胞上にはタイプ2受容体 (AT<sub>2</sub>) のみが発現していることが明かになった。又、このタイプ2受容体は細胞を1 mM DTTで処理すると、その<sup>125</sup>I - [Sar<sup>1</sup>, Ile<sup>8</sup>] A II結合率が上昇した。顆粒膜細胞を無血清培地にて培養を行うと、培養後48時間目において、24時間培養時の<sup>125</sup>I - [Sar<sup>1</sup>, Ile<sup>8</sup>] A II結合率の2倍強の上昇が見られ、72時間培養時には結合率が低下した。48時間培養時における<sup>125</sup>I - [Sar<sup>1</sup>, Ile<sup>8</sup>] A II結合率の上昇は、培地中に顆粒膜細胞の分化を誘導する卵巣刺激ホルモン (FSH) を添加することにより抑制された。このFSHによるタイプ2 (AT<sub>2</sub>) 発現の抑制は、性周期とAT<sub>2</sub>との関連を示唆するもので、この細胞系を用いることで未だ機能が不明であるタイプ2受容体の解析を行うことができるものと考えられる。

(3) ヒト子宮筋層の膜画分を用いて<sup>125</sup>I - [Sar<sup>1</sup>, Ile<sup>8</sup>] A IIとの結合率を調べたところ、解離定数 (Kd値) が0.4nMの高親和性A II受容体が膜タンパク質当たり2.7pmol総合部位数あることが分かり、サブタイプ選択性リガンドを用いた競争置換実験より、そこで発現されている受容体はタイプ2受容体 (AT<sub>2</sub>) のみであることが明かとなった。この子宮筋層でのタイプ2受容体の発現量は現在迄に報告されているもののうちでは最も多いものであった。SH基還元剤DTT処理による<sup>125</sup>I - [Sar<sup>1</sup>, Ile<sup>8</sup>] A IIの結合率の上昇も確認され、典型的なタイプ2受容体の特性を帯びていることが示された。次に、ウシ卵巣膜画分を用いての実験(1)同様、ヒト子宮筋膜画分AT<sub>2</sub>がGTP結合タンパク質と関連しているかを、GTPγSによるA II結合率の変化を調べることで検討した。対照材料としては今回作製したタイプ1受容体 (AT<sub>1A</sub>) を発現しているCHO細胞の膜画分を用いた。GTP結合タンパク質関連型として知られるタイプ1 (AT<sub>1A</sub>) では、GTPγS添加による<sup>125</sup>I - A IIのAT<sub>1A</sub>からの解離促進が見られたが、子宮筋層タイプ2 (AT<sub>2</sub>) では何等影響は確認できなかった。これはタイプ1と異なり、タイプ2はGTP結合タンパク質とは共役していない可能性を示した。アフィニティラベリング法を用いることで、ヒト子宮筋層で発現されているタイプ2 (AT<sub>2</sub>) の分子量は約74KDaであることを推定した。

以上、ウシ卵巣、ラット卵巣顆粒膜細胞、ヒト子宮筋において、DTTに対する感受性、A II結合率に及ぼすGTPγSの影響の違いから、タイプ1受容体 (AT<sub>1</sub>) とは異なるタイプの受容体が発現していることを示した。

## 審 査 の 要 旨

アンジオテンシンII (AII) の多岐に渡る生理作用は、その特異的な受容体 (AII受容体) を介して発揮される。本論文CHAPTER Iの研究では、一つのサブタイプ (タイプ1受容体) が三つの異なる細胞内情報伝達経路に作用し得ることをモデル細胞を用いて初めて証明したという点において、非常に価値のあるものと思われる。又、CHAPTER IIにおいて、現在迄のところその構造も機能も全く不明であるタイプ2受容体に関して、還元剤やグアニンヌクレオチドに対してタイプ1と全く異なる挙動を示すことを実証したことは特筆に値する。更に生殖器官でのタイプ2の特異的な発現は将来その機能を類推するのに大きく貢献するものと考えられる。

よって、著者は博士 (学術) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。