

|          |                                                                                                                                                                                                                                                    |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏名       | やま だ ゆう こ<br>山 田 優 子                                                                                                                                                                                                                               |
| 学位(専攻分野) | 博 士 (農 学)                                                                                                                                                                                                                                          |
| 学位記番号    | 論農博第2682号                                                                                                                                                                                                                                          |
| 学位授与の日付  | 平成20年3月24日                                                                                                                                                                                                                                         |
| 学位授与の要件  | 学位規則第4条第2項該当                                                                                                                                                                                                                                       |
| 学位論文題目   | Studies on an angiotensin AT <sub>2</sub> agonist peptide novokinin — Physiological effects, mechanisms, and production in genetically modified soybean —<br><br>(アンジオテンシンAT <sub>2</sub> アゴニストペプチドnovokininに関する研究 — 生理作用と作用機構、および遺伝子改変大豆における生産 —) |
| 論文調査委員   | (主査)<br>教授 吉川正明 教授 井上國世 教授 入江一浩                                                                                                                                                                                                                    |

### 論 文 内 容 の 要 旨

卵白アルブミン由来の血圧降下ペプチドovokinin (2-7) をリード物質として設計した novokinin (Arg-Pro-Leu-Lys-Pro-Trp) は、自然発症高血圧ラット (SHR) に対する経口投与の際に、0.1 mg/kg という、医薬に匹敵する低用量で有意な血圧降下作用を示す。本研究では、novokinin の種々の生理作用とその作用機構を解明するとともに、novokinin 配列を含む遺伝子改変大豆を作出することを目的とした。

生体内の主要な血圧調節因子であるアンジオテンシン II には2種類の受容体サブタイプ (AT<sub>1</sub> および AT<sub>2</sub>) が存在し、AT<sub>1</sub> は血圧上昇、AT<sub>2</sub> は血圧降下に関与している。従来、血圧降下物質としてはアンジオテンシン II の生成を阻害するアンジオテンシン変換酵素阻害物質や AT<sub>1</sub> アンタゴニストが知られてきたが、AT<sub>2</sub> アゴニストとして有効なものは見出されていなかった。今回、novokinin が AT<sub>2</sub> 受容体に対し親和性を示すことを新たに見出し、その血圧降下作用における AT<sub>2</sub> 受容体の関与を検討した。

第1章では、novokinin の動脈弛緩機構を検討した。novokinin は 10 μM で SHR の腸間膜細動脈を弛緩させたが、その作用は AT<sub>2</sub> アンタゴニストである PD123319 により有意に阻害されたことから、AT<sub>2</sub> 受容体を介することが明らかになった。その弛緩作用は一酸化窒素 (NO) 合成酵素阻害剤である L-NAME では阻害されなかったが、シクロオキシゲナーゼ阻害剤であるインドメタシンおよびプロスタグランジン (PG) IP 受容体アンタゴニストである CAY10441 によって阻害された。従来、AT<sub>2</sub> 受容体の下流では NO が関与すると報告されてきたが、novokinin の動脈弛緩作用には AT<sub>2</sub> 受容体の下流で PGI<sub>2</sub> および IP 受容体が関与することが判明した。

第2章では、novokinin の血圧降下機構を検討した。SHR への静脈内および経口投与による血圧降下作用は、PD123319 により有意に阻害された。AT<sub>2</sub> 受容体ノックアウトマウスでは novokinin は血圧降下作用を示さなかったことも、その作用が AT<sub>2</sub> 受容体を介していることを示すものである。また、novokinin の血圧降下作用は動脈弛緩作用と同様、インドメタシンおよび CAY10441 により有意に阻害されたことから、PGI<sub>2</sub> および IP 受容体を介しており、その血圧降下作用は動脈弛緩作用に基づいていることが判明した。

第3章では、novokinin を食品として利用する目的の一環として、遺伝子の部位特異的変異により novokinin 配列を4分子導入した大豆 β-conglycinin α' subunit を、まず大腸菌で生産し、その血圧降下作用を確認した。大腸菌で生産した novokinin 導入タンパク質は、2.5 mg/kg の経口投与により、novokinin そのものの場合と同様、投与4時間後に最大降圧作用を示した。

第4章では、novokinin を導入した β-conglycinin α' subunit を発現する遺伝子改変大豆を作出し、その血圧降下作用を検討した。大豆で生産した novokinin 導入タンパク質も、SHR への経口投与により有意な血圧降下作用を示したが、その最大降圧作用は投与8時間後に見られ、加熱処理により投与4時間後にシフトした。改変 β-conglycinin α' subunit 中では、

novokininはトリプシンおよびキモトリプシンにより切り出されるよう設計されているが、加熱により最大降圧時間が早くなる理由としては、大豆に含まれるトリプシンインヒビターが失活したことが考えられる。大腸菌で生産した、トリプシンインヒビターを含まないnovokinin導入タンパク質の最大血圧降下作用は4時間後に見られ、加熱による影響を受けなかったことも、上記の推論を支持するものである。

第5章では、AT<sub>2</sub>受容体の中枢における機能を探るためのプローブとしてnovokininを用い、マウスへの脳室内投与によりモルヒネの鎮痛作用を抑制することを新たに見出した。その作用は、PD123319およびPGE<sub>2</sub>受容体のサブタイプであるEP<sub>3</sub>のアンタゴニストであるONO-AE3-240により有意に阻害されたことから、AT<sub>2</sub>受容体の下流でEP<sub>3</sub>受容体を介していることが示唆された。また、アンジオテンシンIIも抗鎮痛作用を示し、その作用もPD123319およびONO-AE3-240により阻害された。以上より、中枢におけるAT<sub>2</sub>アゴニストの作用には、末梢の場合と異なり、AT<sub>2</sub>受容体の下流でPGE<sub>2</sub>が関与していることが判明した。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、卵白アルブミン由来の血圧降下ペプチドovokinin (2-7) を基に設計した強力な血圧降下ペプチドnovokininの血圧降下作用がAT<sub>2</sub>受容体を介していることを明らかにし、その下流における作用機構を解明したものである。また、食品としての利用の一環として、novokinin配列を導入することにより、血圧降下作用を賦与した遺伝子改変大豆の生産を試みている。さらに、novokininの中枢作用についても検討したものである。成果として評価すべき点は下記のとおりである。

1. novokininは自然発症高血圧ラット (SHR) の腸間膜細動脈に対して弛緩作用を示し、その作用はAT<sub>2</sub>受容体の下流で、主にプロスタグランジン (PG) I<sub>2</sub>およびIP受容体を介することを、これらの受容体に選択的なアンタゴニストを用いて明らかにした。一般的に、AT<sub>2</sub>受容体の下流のメディエーターは一酸化窒素であると考えられていたが、本研究によりPGI<sub>2</sub>系の関与が初めて明らかになった。
2. novokininの血圧降下作用は動脈弛緩作用と同様、AT<sub>2</sub>およびIP受容体を介することを、これらの受容体に選択的なアンタゴニストおよびAT<sub>2</sub>受容体ノックアウトマウスを用いて明確に示した。
3. novokinin配列を導入した改変β-conglycinin α' subunitを発現する遺伝子改変大豆を作出し、その脱脂粉末および抽出タンパク質はSHRへの経口投与の際に、有意な血圧降下作用を示すことを確認した。生理活性ペプチドを導入した遺伝子改変作物を食品として摂取するという、生活習慣病予防における新しいアプローチの有効性が本論文により示唆された。
4. novokininの中枢作用として、マウスへの脳室内投与の際に抗鎮痛作用を示すことを見出し、その作用はAT<sub>2</sub>受容体の下流でPGE<sub>2</sub>およびEP<sub>3</sub>受容体を介することを示した。また、アンジオテンシンIIも共通の機構を介して抗鎮痛作用を示すことを明らかにした。

以上のように、本論文は、強力な血圧降下ペプチドnovokininの作用機構を明らかにしたものである。novokininは経口投与で血圧降下作用を示すアンジオテンシンAT<sub>2</sub>アゴニストペプチドとしては最初の物質であるのみならず、末梢および中枢において、プロスタグランジン系とカップルしたAT<sub>2</sub>受容体の新機能を解明するためのツールとしても有効であることが判明した。また、novokinin配列を導入することにより、血圧降下作用を賦与した遺伝子改変大豆の作出にも成功した。その成果は食品生理機能学およびペプチド科学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成20年2月12日、論文ならびにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。