

氏名	堀 清 次
学位(専攻分野)	博士 (医学)
学位記番号	論医博第1491号
学位授与の日付	平成6年11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	Distinct tissue distribution and cellular localization of two messenger ribonucleic acids encoding different subtypes of rat endothelin receptors (2種類のエンドセリン受容体メッセンジャーRNAの異なる組織分布と細胞局在に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 眞崎知生 教授 中尾一和 教授 中西重忠

論 文 内 容 の 要 旨

エンドセリンは強力な血管収縮活性をもつペプチドで、血管系以外の組織においても様々な生理作用を示す。本研究はラットの2種類のエンドセリン受容体 (ET_A と ET_B) cDNA を単離し、各受容体の性質を明らかにすると共に、mRNA の組織分布と細胞局在を明らかにしたものである。

先にアフリカツメガエル卵母細胞遺伝子発現系を用いてクローニングしたウシ ET_AcDNA をプローブとして、ラット肺 cDNA ライブラリーより 46 個の cDNA クローンを単離した。制限酵素解析、塩基配列の解析の結果これらは 2 つのグループに分類できた。それぞれのグループの cDNA がコードする蛋白はいずれも 7 回の細胞膜貫通領域を持つロドプシンファミリーに属する受容体の構造を有し、一方は 426 アミノ酸からなり、ウシ ET_A と 91.1% の高いホモロジーを示し、ラット ET_A と結論された。もう一方の受容体は 442 アミノ酸からなり、ウシ ET_A とのアミノ酸の一次配列上のホモロジーは 50% 程度で、独立に報告されたラットエンドセリン受容体、ET_B に相当することが明らかとなった。ラット ET_A と ET_B 間のホモロジーは 53.3% であった。

各受容体を動物細胞に発現させ結合様式を調べると、¹²⁵I で標識したエンドセリン 1 (ET-1) の ET_A 細胞膜分画に対する結合を阻害する各ペプチドの活性は ET-1 > ET-2 > サラフォトキシン S6b > ET-3 の順で差が見られ、又、ET_B に対しては各ペプチドはほぼ同等の活性で ¹²⁵I ET-1 の結合を阻害することが明らかとなった。¹²⁵I ET-1 の ET_A、ET_B に対する結合の Kd 値はそれぞれ 0.11 nM、0.04 nM であった。ET-1、ET-2、ET-3、サラフォトキシン S6b の ET_A に対する Ki 値はそれぞれ 0.27 nM、1.2 nM、638 nM、23.2 nM であり、一方、ET_B に対しては 71 pM、113 pM、113 pM、90 pM であった。

ノザンプロット法によって、ET_A mRNA の発現は肺や子宮といった平滑筋の豊富な組織に多く、心臓でも強い発現がみられ、一方、ET_B mRNA は脳や肺、腸、腎臓で発現が多いことが明らかになった。

in situ ハイブリダイゼーション法による mRNA の発現解析によって、ET_A mRNA の主要な発現部位

は様々な組織の血管平滑筋細胞であるが、この細胞におけるET_Bの発現は多くない。一方、ET_BmRNAの発現細胞はET_Aに比して多岐に亙り、脳のグリア細胞、脈絡叢の上皮細胞、心筋細胞、腎糸球体、ヘンレのループの上皮細胞などにみられた。従って、種々の組織でみられるエンドセリンによる血管収縮作用は、ET_Aを介していると結論された。一方、ET_BmRNAの発現は特に小脳のプルキニエ細胞層のグリア細胞と腎糸球体の内皮細胞には強い局在がみられこれらの組織において重要な役割を果たしているとは結論された。

本研究によって、2種類のエンドセリン受容体の神経系や末梢組織における特徴的な分布を明かした。又、これらの受容体はエンドセリンファミリーのペプチドに対する親和性の様式も異なっていることから、エンドセリンの多彩な生理作用は親和性と局在を異にする2種類の受容体の役割分担あるいは共同作用で担われていることが示された。

論文審査の結果の要旨

本研究はエンドセリンの生体内での作用を明らかにする目的で、2種類のラットエンドセリン受容体ET_A、ET_Bを単離し、その分子的特徴を明らかにすると共に、mRNAの分布を組織レベルおよび細胞レベルで明らかにしたものである。

動物細胞における遺伝子発現系を用いて、ET_AはET-1に対する特異性が高く、ET_Bはエンドセリンの各アイソペプチドに対して同程度の高親和性を示すことを明らかにした。また、ノザンプロット法、*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて、ET_Aは各組織の血管平滑筋の他に心臓、脳下垂体前葉に強く発現していること、ET_Bは神経系のグリア細胞や脈絡叢、心臓、腎糸球体の内皮細胞などに強く発現していることを明らかにした。

以上の研究はエンドセリンの機能を分子生物学的に解明することに貢献することが多い。従って本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は平成6年9月26日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。