

氏名 矢中規之  
 学位(専攻分野) 博士 (農学)  
 学位記番号 論農博第 2259 号  
 学位授与の日付 平成 11 年 7 月 23 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 Regulation of Natriuretic Peptide Receptor-C Expression  
 (ナトリウム利尿ペプチド C 型受容体の発現制御に関する研究)

論文調査委員 (主査) 教授 清水 昌 教授 吉川 正明 教授 伏木 亨

### 論文内容の要旨

ナトリウム利尿ペプチド (NP) は、血管弛緩作用、ナトリウム利尿作用や骨芽細胞分化促進作用など多様な生理作用を有する生理活性ペプチドである。ナトリウム利尿ペプチド C 型受容体 (NPR-C) は、血中の NP と結合して、これを細胞内に取り込むなど、NP のクリアランスを主な役割としていることから、NP の血中濃度および生理作用を規定する重要な受容体と考えられている。また、動脈硬化を起こした血管の内側肥厚部分においては、増殖性に富んだ血管平滑筋細胞 (病態型) が主成分であり、NPR-C は、正常の血管平滑筋細胞の形質が変化し、増殖性を獲得する際にその遺伝子の発現が著明に亢進することから、病態型平滑筋細胞のマーカー遺伝子と考えられている。本研究では、このような NPR-C のユニークな生理作用に着目し、同遺伝子の発現調節機構の解明を目的として分子生物学的検討を加えた。さらに NP の細胞内セカンドメッセンジャーである cyclic GMP (cGMP) の細胞内濃度を規定するヒト 5 型ホスホジエステラーゼ (PDE) の遺伝子構造についても論じた。その主な内容は以下のとおりである。

第 1 章第 1 節では、マウス NPR-C 遺伝子転写調節について概説した。マウス NPR-C cDNA および NPR-C の転写調節領域の構造を明らかにし、プロモーター解析によって、転写開始点近傍の領域がマウス NPR-C 遺伝子発現に必須であることを示した。

第 1 章第 2 節では、ヒト NPR-C 遺伝子転写調節について概説した。ヒト NPR-C 遺伝子調節領域は、マウス同領域と塩基配列で極めて相同であった。さらに、ヒト NPR-C 遺伝子は少なくとも 2 カ所から転写が開始しており、転写開始点近傍の三つの領域にエンハンサー様配列の存在が示され、各領域に結合する核内タンパク質の存在が明らかになった。

第 1 章第 3 節では、ヒト上皮細胞における NPR-C で由来の NP の結合量が、ホルボールエステルの添加によって著しく減少することを見だし、その作用機序を明らかにした。すなわち、ホルボールエステルの短時間の添加による同作用は、レセプターインタナリゼーションの促進による細胞膜上 NPR-C の発現量の低下に由来し、長時間投与においては *de novo* での NPR-C タンパク質の合成に対する阻害に由来することを明らかにした。さらに、ホルボールエステルの同作用はプロテインキナーゼ C の経路に依存していることを見いだした。

第 1 章第 4 節では、骨芽細胞分化のモデュレーターである活性型ビタミン D<sub>3</sub> (VD<sub>3</sub>) が、培養骨芽細胞における NPR-C の発現をタンパク質レベルおよび mRNA レベルで著しく上昇させることを見いだした。また、VD<sub>3</sub> の添加によって NPR-C mRNA の安定性が有意に上昇していることから、VD<sub>3</sub> の同作用点は通常の VD<sub>3</sub> レセプター (VDR) を介した遺伝子転写の促進ではなく、転写以降にあることを示した。さらに、VD<sub>3</sub> の投与によりマウス頭頂骨において NPR-C mRNA が著しく発現誘導されることを認め、VD<sub>3</sub> は NP の骨芽細胞分化作用に対して、NPR-C の発現誘導を介して拮抗する可能性を示した。

第 2 章では、ヒト 5 型 PDE 遺伝子の一次構造および遺伝子構造を概説した。ヒト 5 型 PDE は 875 アミノ酸からなる分子量 100012 Da のタンパク質であり、臍臓、胎盤、心臓、骨格筋およびヒト血管平滑筋培養細胞や巨核球由来 (血小板前駆) 細胞などヒト組織に広く存在していることを明らかにした。また、100 kb 以上にわたる 5 型 PDE 染色体遺伝子を単離し、21 個以上のエキソンから構成される同遺伝子構造を明らかにした。さらに、エキソン-イントロンの構造が、cGMP 特異的

PDEのアイソザイムである網膜皁状体由来光受容器PDE $\beta$ サブユニット(PDE 6B)の活性ドメインにおいてもよく保存されていることを認め、両遺伝子の進化論的な関連性を示した。

以上を総括し、NPR-Cおよび5型PDEは、細胞内cGMPレベルを調節する重要な機能を担っていることから、両遺伝子に関するゲノム情報は様々な疾患との関連性を明らかにする可能性があるだけでなく、両遺伝子の発現調節は循環器病などの新たな治療薬の開発に応用可能なことを示唆した。

### 論文審査の結果の要旨

NPは、細胞内のcGMPの産生を介して、血管弛緩作用など種々の重要な生理機能を担っている。NPの血中からのクリアランスを主な生理的役割とするNPR-Cは、血中のNPの濃度を規定する分子であるだけでなく、動脈硬化巣における病態型平滑筋細胞のマーカー遺伝子としても注目されている。また、cGMP特異的分解酵素である5型PDEは、cGMPの生理作用に拮抗する分子として新たな循環器病の治療薬のターゲットとして注目されている。本論文は、NPR-C遺伝子の発現調節機構や5型PDE遺伝子の構造解析についての研究成果をまとめたものであり、評価すべき主要な点は以下のとおりである。

1. NPR-Cが、動脈硬化巣における病態型平滑筋細胞に特異的に発現することを認め、同細胞のマーカー遺伝子としての性質を明らかにした。また、マウスおよびヒトNPR-C遺伝子の転写調節領域を単離し、両領域の遺伝子構造が極めて似ていること、および両遺伝子の転写開始点近傍の領域に遺伝子発現に重要なエレメントが存在することを示した。

2. NPR-Cの発現が、プロテインキナーゼCの活性化剤であるホルボールエステルやVD<sub>3</sub>によって調節を受けることを示した。さらに、プロテインキナーゼCの作用は転写、および翻訳以降の経路によって、また、VD<sub>3</sub>の作用はmRNAの安定化の経路に依存していることを示した。これらの結果は、種々の病態によってNPR-Cの発現が大きく変動することを示しており、NPの生物活性が病態と密接に関連することを示唆した。

3. ヒト5型PDEの一次構造を明らかにし、その大部分においてラット、ウシの同配列と極めて相同であることを示した。さらに、ヒト5型PDEを含むゲノム遺伝子を単離し、エキソン-イントロンの境界など遺伝子構造を明らかにすることによって、cGMP特異的分解酵素ファミリーの進化論的な関連性を明らかにした。

以上のように、本論文はNPR-C遺伝子の発現を調節する転写因子、および細胞内cGMPレベルの調節にかかわる因子を分子生物学的側面から解明したものである。これらの知見は循環器病などの疾患の新たな治療法開発への糸口を与えるものであり、分子生物学、応用酵素学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11年6月10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。