

氏名	長谷川 浩史
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	医博第2055号
学位授与の日付	平成10年11月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学研究科脳統御医科学系専攻
学位論文題目	Purification of a novel endothelin-converting enzyme specific for big endothelin-3 (ビッグエンドセリン-3に特異的な新しいエンドセリン変換酵素の精製)
	(主査)
論文調査委員	教授 成宮 周 教授 篠山重威 教授 柴崎 浩

### 論 文 内 容 の 要 旨

エンドセリン(ET)は強力な血管作動性物質として発見されたが、このたび我々は、ビッグエンドセリン-3(big ET-3)に特異的なエンドセリン変換酵素(ECE)-3の精製を行った。これまでにET-1では、その合成経路は以下のように明らかとなっている。はじめに前駆体であるプレプロエンドセリン-1が翻訳される。次にシグナルペプチドが切断された後、カルシウム依存性セリンエンドプロテアーゼであるフリン様プロテアーゼにより2ヵ所に存在するArg-Ser-Lys-Arg配列の直後で切断され、big ET-1となる。最後にbig ET-1はECEによりTrp<sup>21</sup>-Val<sup>22</sup>が切断され、活性型のET-1が生成される。一方、ET-3の合成経路は明確には確立されていないが、ゲノムより予想されるアミノ酸配列や前駆体の存在よりET-1と同様の合成過程を経ると考えられている。

これまでに2種のECE(ECE-1, ECE-2)のcDNAがクローニングされているが、ともにホスホラミドンにより活性を阻害されるメタロプロテアーゼである。両者はともにbig ET-1に高い基質特異性を示すが、big ET-2, big ET-3には低い基質特異性しか示さない。生体にはET-3を優位に発現している組織があることから、既知のECEとは異なりbig ET-3に高い基質特異性を持つECEの可能性を考えてこの酵素の精製を行うことにした。

眼球ではプレプロエンドセリン-3の発現が多いことからこれを精製材料とし、サンドイッチEIA法を用いてエンドセリン変換活性を測定した。はじめにウシ眼球におけるエンドセリン変換活性を虹彩、脈絡膜、網膜の各組織で検討したところ、big ET-3の変換活性は虹彩で最も高いことが明らかとなったので、これを精製材料とした。

まず、虹彩からミクロソーム分画を分離し可溶化した。これを出発材料として、ブルーBアガロース(非吸着)、ピーナツ凝集素アガロース(非吸着)、小麦麦芽凝集素アガロース(吸着)、Hiload 26/60 Superdex 200pg(ゲル濾過)およびHitrap Chelating Sepharose(非吸着)を用いて精製を行い、SDSポリアクリルアミド電気泳動では、140kDaの単一バンド(銀染色)であり、また、比活性では約650倍に精製することができた。

この精製した酵素はbig ET-3に特異的で、Kmは0.14 μM, Vmaxは7.4 pmol/min/mg proteinであった。一方、big ET-1およびbig ET-2を用いた場合には有意な活性を認められなかった。また、この酵素は、ホスホラミドン感受性を有しているが、チオルファンに対しては非感受性であったことから、既知のECEと同様のメタロプロテアーゼと予想された。

big ET-3を基質とした場合の反応生成物を確認するために、逆相クロマトグラフィーを行ったところ、ET-3と同じ溶出時間を示すことが分かった。また、反応生成物の生物活性を検討するために、ヒトエンドセリンB受容体(hET<sub>B</sub>)を安定発現するCHO-K1細胞を用いて細胞内カルシウム測定を行ったところ、ET-3と同様のカルシウム上昇を認め、この反応はhET<sub>B</sub>の選択的アンタゴニストで阻害された。

以上の結果から、精製した酵素は、これまで報告されているECEと異なりbig ET-3に対する高い基質特異性を持つ、新

しいECE (ECE-3) であることが明らかとなった。

### 論文審査の結果の要旨

エンドセリンの合成は、まず前駆体が翻訳され、最終的にエンドセリン変換酵素がビッグエンドセリンを切断することにより完成すると考えられている。エンドセリンには3つのアイソフォームが存在することが明らかとなっているが、これまでに、ビッグエンドセリン-1をより特異的に切断するECE-1, ECE-2が報告されている。

今回の研究で、ビッグエンドセリン-3に基質特異性を持つ新しいエンドセリン変換酵素をウシ虹彩から精製した。SDS-PAGEでは140kDaで、ビッグエンドセリン-3に対するKmは0.14 $\mu$ Mであった。阻害薬を用いた実験から、メタロプロテアーゼと考えられた。EIA, 逆相カラムからの溶出様式, エンドセリンB受容体を安定発現した細胞における細胞内カルシウム応答から、反応生成物はエンドセリン-3と考えられた。

以上の研究は、ビッグエンドセリン-3に基質特異性を持つ新しいエンドセリン変換酵素を精製することによって、エンドセリン-3の合成経路の解明に貢献し、エンドセリン-3の関与が示唆される神経堤細胞の発生分化のメカニズムを明らかにする上で寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値のあるものと認める。

なお、本学位授与申請者は平成10年9月25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。