

氏 名	城 戸 常 雄
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 1892 号
学位授与の日付	平 成 9 年 3 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 内 科 系 専 攻
学位論文題目	Processing of proendothelin-1 at the carboxyl-terminus of big endothelin-1 is essential for proteolysis by endothelin-converting enzyme-1 <i>in vivo</i> (ビッグエンドセリン-1のC端におけるプロエンドセリン-1のプロセッシングが <i>in vivo</i> でのエンドセリン変換酵素による切断に必須である)
論文調査委員	(主 査) 教 授 成 宮 周 教 授 中 西 重 忠 教 授 木 村 淳

論 文 内 容 の 要 旨

エンドセリン-1は血管内皮細胞から主に産生される強力な血管収縮ペプチドである。その生成過程は3段階のステップを踏んでいると考えられている。まずシグナルペプチドのはずれたプロエンドセリン-1はビッグエンドセリン-1-Lys-Argに切断され、次にカルボキシペプチターゼによりビッグエンドセリン-1のC端の2残基が削られてビッグエンドセリン-1が生成される。次にエンドセリン変換酵素によりエンドセリン-1が生成されると考えられている。しかしビッグエンドセリン-1の生成についての研究は少なく、この前駆体の役割やエンドセリン変換酵素との関わり合いなどについてはあまりよく解っていない。そこで我々はプレプロエンドセリン-1のcDNAに対して部位特異的変異導入法により点変異を導入する事によりこの生成過程をさらに詳しく検討した。

以前我々はプロエンドセリン-1からビッグエンドセリン-1に変換される際にフリンが関与している可能性を示した。そこで今回プレプロエンドセリン-1のcDNAの中に存在するフリンの二つの認識配列(Arg-Ser-Lys-Arg)のそれぞれの-4位のアルギニン(Arg49またはArg89)をグリシンになるように点変異を導入した(それぞれR49G, R89Gと命名)。これらのcDNAをエンドセリン変換酵素の活性を持たないCHO-K1細胞に発現させて、培養液中に放出されるビッグエンドセリン-1やエンドセリン-1を酵素免疫測定法にて測定した。また分子の大きさの情報を得るために一部のサンプルはゲル濾過にて分離した後に再び酵素免疫測定法にて測定した。

プレプロエンドセリン-1のcDNA及び変異体であるR49G, R89GをそれぞれCHO-K1細胞に発現させたところ、プレプロエンドセリン-1では正常の大きさのビッグエンドセリン-1が培養液中に検出された。また変異体を発現させたものではどちらも変異を導入した部位での切断が阻害されていた。これはプレプロエンドセリン-1の中に存在するArg-Ser-Lys-Argモチーフがフリン様の変換酵素にて認識されて

いる事を示唆するものである。

更にエンドセリン変換酵素との関わり合いを検討するためにこれらの cDNA をエンドセリン変換酵素の cDNA と同時に発現させた。プレプロエンドセリン-1 の cDNA とエンドセリン変換酵素の cDNA を同時に発現させた時には正常のエンドセリン-1 が培養液中に検出された。またこれはエンドセリン A 受容体に対して活性を持っていた。また R49G では変異を導入した部位での切断が阻害されていたが、エンドセリン変換酵素の切断部位は正常に切断されていた。しかし R89G の場合は変異を導入した部位での切断が阻害された上にエンドセリン変換酵素の切断も阻害されていた。またどちらの変異体をエンドセリン変換酵素と一緒に発現させても生成されたペプチドはエンドセリン A 受容体に対して活性を持っていなかった。これらの結果よりエンドセリン変換酵素の切断に対してビッグエンドセリン-1 の C 端が前もって切断されることが必須であることが示された。またエンドセリン-1 の活性に関してはビッグエンドセリン-1 の両端での切断が必須であることも示された。

以上より、エンドセリン-1 の生成過程においてビッグエンドセリン-1 の両端での切断が必須であり、またその際にフリンと同様の認識配列を持つ変換酵素が関与していることを証明した。またこの認識配列での突然変異によりエンドセリン-1 の活性がなくなる事より、同部位の突然変異による先天異常の存在の可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

エンドセリン-1 (ET-1) は主として血管内皮細胞から産出される強力な血管収縮ペプチドで proET-1 から bigET-1 を経て生成される。当申請者は、部位特異的変異導入法により bigET-1 の生成過程を検討した。preproET-1 の cDNA の中に存在するフリンの二つの認識配列で、Arg から Gly への点変異を導入し、それぞれ R49G, R89G と命名した。preproET-1 の cDNA 及び R49G, R89G を ET 変換酵素の活性を持たない CHO-K1 細胞に発現させると、preproET-1 では正常の大きさの bigET-1 が産出されたが、変異体では切断が阻害された。また ET 変換酵素 (ECE) と同時に発現させると preproET-1 では ET 受容体に対して活性をもつ正常の ET-1 が産出された。一方、R49G では変異を導入した部位での切断が阻害されたが、ECE では正常に切断され、R89G では変異を導入した部位での切断のみならず ECE での切断も阻害された。また変異体で生成されたペプチドはどちらも ET 受容体に対する活性を示さなかった。これらの結果は bigET-1 の両端がフリンと同様の認識配列を持つ変換酵素で切断されることを示唆するもので、この所見は ET-1 の生成過程の解明に貢献し、血管収縮機構の理解に寄与する。

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 9 年 2 月 24 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。