

氏 名	ふじ しげ こ と み 藤 重 古 都 美
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2312 号
学位授与の日付	平 成 12 年 7 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	Metabolism of Cyclic Nucleotides: Association of Cyclic GMP with Chondrogenic Differentiation and Identification of a Novel Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase (環状ヌクレオチドの代謝—軟骨分化とサイクリック GMP の関わりおよび新規な環状ヌクレオチドホスホジエステラーゼの発見—)
論文調査委員	(主 査) 教 授 大 山 莞 爾 教 授 佐 々 木 隆 造 教 授 伏 木 亨

論 文 内 容 の 要 旨

環状ヌクレオチド (cAMP および cGMP) は細胞内セカンドメッセンジャーとして生体制御に広く関与している。これらは種々の生理活性物質の刺激によって産生され、その分解酵素である環状ヌクレオチドホスホジエステラーゼ (PDE) によって分解される。本論文は、複雑な環状ヌクレオチド代謝系の一部を解明したものであり、その主な内容は以下のとおりである。

(1) ナトリウム利尿ペプチド受容体 (NPR) の中で、グアニル酸シクラーゼ部位を持たない NPR-C は、これまで単にナトリウム利尿ペプチド (NP) を代謝するクリアランスレセプターとして捉えられ、重要視されていなかった。本論文では環状ヌクレオチドの代謝を考える上で NPR-C に注目し、免疫組織化学的手法によりその発現部位を明らかにしている。すなわち NPR-C は気道軟骨周囲の前駆軟骨細胞に発現し、分化した軟骨細胞には発現していないことを示している。

(2) 軟骨分化を行う細胞株 ATDC 5 を用いて cGMP の代謝系について検討し、ATDC 5 細胞に cGMP の産生系と分解系が備わり、分化後それらが活性化されることを報告している。また、主たる産生系は NP の 1 つである C 型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) が NPR-B を介する系であり、主たる分解系は PDE ファミリーの中で Ca^{2+} によってその活性が制御される PDE 1 によって行われることを報告している。従来、軟骨分化には cAMP の重要性が唱えられてきたが、ATDC 5 細胞において cGMP の代謝が活発に行われていることより、軟骨分化には cAMP に加え cGMP も重要な役割を演じている可能性について報告している。

(3) PDE はこれまで阻害剤の感受性などによって大きく 9 種ファミリーに分類され、それぞれ基質特異性や組織分布が異なることが知られている。本論文では新規な PDE (PDE10A) のクローニングを行い、その組織分布と酵素化学的性質について報告している。ヒト PDE10A の触媒部位は、既知 PDE と 16~47% の相同性を有し、全長は 779 アミノ酸からなること、また、cGMP 結合に関与する配列が存在することを証明している。さらに、ヒト PDE10A mRNA は、主に脳、精巣および甲状腺に強く発現していることを示している。次に、COS-7 細胞で発現させた PDE10A の酵素化学的性質を調べ、cAMP と cGMP 分解活性に対する K_m 値を測定し、cAMP に対する親和性の方が約 30 倍高いことを報告している。

(4) ラット PDE10A cDNA をクローニングし、その発現部位は主に脳および精巣であり、特に脳では線条体の神経細胞に局在していることを示している。また、線条体および精巣のホモジネートを陰イオン交換カラムクロマトグラフィーにて分画し、抗 PDE10A 抗体で認識される画分を得ている。そして、その酵素化学的性質が、COS-7 細胞で発現させたヒト PDE10A と一致することを確認している。よって、新たに見出された PDE10A の酵素活性は、確かに線条体および精巣に存在し、細胞内環状ヌクレオチドレベルの調節に関与していることを報告している。

(5) 各 PDE ファミリーにはそれぞれ非常に多くのスプライスバリエントが存在し、それらは活性調節や組織分布が異なることが知られている。ヒト PDE10A では、N 末端の異なる 2 種のスプライスバリエント (PDE10A 1 および PDE10A 2) が存在し、PDE10A 2 が cAMP-dependent protein kinase (cAK) によるリン酸化に関与していることを明らかにし

ている。すなわち、PDE10A 2のみが有するリン酸化モチーフ [RRLTE] が、cAKによってリン酸化されている可能性について報告している。

論文審査の結果の要旨

環状ヌクレオチド (cAMP および cGMP) は、種々の生理活性物質の刺激によって産生され細胞内シグナル伝達に関与した後、環状ヌクレオチドホスホジエステラーゼ (PDE) によって分解される。本論文は、複雑な環状ヌクレオチド代謝系の一部を解析したものであり、主な評価すべき点は以下のとおりである。

(1) ナトリウム利尿ペプチド受容体の1つである NPR-C は、その細胞内部位にグアニル酸シクラーゼ部位が存在しないため、ナトリウム利尿ペプチドを代謝する単なるクリアランスレセプターとして捉えられてきた。しかし、その NPR-C に着目し、ラット気道軟骨において軟骨分化に伴って NPR-C の発現が低下していることを明らかにした。その結果、軟骨の分化過程に NPR-C による環状ヌクレオチドレベルの制御が重要であると結論している。

(2) 軟骨細胞に分化する細胞株 ATDC 5 に、cGMP の産生系と分解系が備わり、分化後それらが活性化されることを明らかにした。従って、従来軟骨分化における重要性が唱えられてきた cAMP に加え、cGMP も重要な役割を演じていると結論している。

(3) ヒトの新規な PDE (PDE10A) の全長 cDNA をクローニングした。ヒト PDE10A は脳、精巣および甲状腺に強く発現していた。COS-7 細胞で発現させた PDE10A の酵素化学的性質を調べた結果、PDE10A は cAMP と cGMP を共に基質とするが、その親和性は cAMP の方が約30倍高いことを明らかにしている。

(4) ラット PDE10A の cDNA をクローニングし、その主な発現部位は脳および精巣であり、特に脳では線条体に存在する神経細胞に発現していることを明らかにしている。また PDE10A の酵素活性が線条体および精巣に存在し、細胞内環状ヌクレオチドレベルの調節に関与していることを確認している。

(5) ヒト PDE10A には、他の PDE ファミリーと同様にスプライスバリエント (PDE10A 1 および PDE10A 2) が存在すると結論している。また、PDE10A 2のみがリン酸化モチーフを有し、cAMP-dependent protein kinase によってリン酸化されることを明らかにしている。

以上のように本論文は、軟骨分化における cGMP の関与を示すと共に、脳線条体と精巣特異的に発現する新規な PDE の性質を解析したものであり、複雑な環状ヌクレオチド代謝系の一部を明らかにした。従って、生化学、酵素化学、分子生物学の発展に寄与するところが大い。

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12年4月14日、論文並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。