

氏 名 小 寺 淳  
 学位(専攻分野) 博 士 (農 学)  
 学 位 記 番 号 論 農 博 第 2292 号  
 学位授与の日付 平 成 12 年 3 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 Studies on Characterization and Tissue Distribution of cGMP-binding cGM-  
 P-specific Phosphodiesterase  
 (cGMP 特異的ホスホジエステラーゼの性質と組織分布について)

論文調査委員 (主 査)  
 教 授 伏 木 亨 教 授 佐々木隆造 教 授 井上國世

### 論 文 内 容 の 要 旨

生体内において cGMP は血管や神経系でさまざまな機能を有している。cGMP 伝達系が存在するところにはその分解酵素であるホスホジエステラーゼ (PDE) が存在する。cGMP 分解酵素の 1 つである PDE 5 の詳細な組織分布や発現調節を明らかにすることが、その組織での cGMP 系の存在を知る手がかりとなり、さらに PDE 5 阻害薬の疾患に対する有効性を検討するために重要である。PDE 5 は古くから血管平滑筋以外に肺や血小板でその活性が確認されているが、これまで PDE 5 mRNA の詳細な組織分布や発現調節に関する研究は全く行われていなかった。本研究は PDE 5 cDNA をクローニングし、その組織分布および発現調節を調べたものであり、内容は次のように要約される。

#### 1. ヒト、イヌおよびラット PDE 5 cDNA のクローニングとサブライシングバリエーションの探索

ヒト、イヌおよびラットの PDE 5 cDNA を単離した結果、それぞれ相互に 93～98% の相同性を認めた。ヒト、イヌおよびラットの動物種においてサブライシングバリエーションである PDE 5 A 1 と PDE 5 A 2 の 2 種類の mRNA が存在することを明らかにした。PDE 5 A 1 および PDE 5 A 2 には酵素化学的な違いは無いことを示した。

#### 2. PDE 5 A 1 と PDE 5 A 2 mRNA の組織分布

イヌおよびヒトにおける PDE 5 A 1 と PDE 5 A 2 mRNA の組織発現パターンを RT-PCR により明らかにした。その結果、両動物種において、これまで酵素活性として確認されていた肺や血管以外の組織 (脾臓、小腸など) にも PDE 5 mRNA の発現を認め、これらの組織で PDE 5 の基質である cGMP が生理的な役割を演じている可能性を示唆した。ヒトでは組織ごとの各バリエーションの発現パターンを明らかにした。

#### 3. PDE 5 A 1 と PDE 5 A 2 mRNA の発現調節

ヒトおよびラットの PDE 5 染色体 DNA をクローニングし、5' 非転写領域およびイントロンの塩基配列を決定した。両者に cAMP responsive element, AP-1, AP-2 および SP-1 などの転写因子結合配列を見出した。ラット培養血管平滑筋細胞に cAMP アナログを添加したところ、PDE 5 mRNA の発現の上昇が認められ、その mRNA は主に PDE 5 A 2 であることを明らかにした。このことから、PDE 5 A 2 は誘導型バリエーションであろうと推定した。この cAMP の上昇が PDE 5 を増加させることにより、その基質である cGMP 濃度を調節する可能性を示唆した。

#### 4. ラットにおける PDE 5 の発現と組織化学的な解析

ラット PDE 5 mRNA は肺、大動脈、小脳および小腸などに発現していることを明らかにした。PDE 5 mRNA は小脳のプルキンエ細胞に局在し、PDE 5 タンパク質は同細胞の細胞体および樹状突起に存在していた。加齢による小脳の PDE 5 mRNA 発現の変化を調べたところ、PDE 5 mRNA は生後 0 日では全く発現が認められないのに対し、16 日目から発現が認められるようになり、その後 8 週目まで発現量が上昇した。PDE 5 の発現が上昇する時期と小脳の発達時期が一致することや、cGMP などによる小脳の長期抑圧が運動学習の基盤になると考えられていることから、PDE 5 発現の変化と小脳における運動機能の獲得との関連を示唆した。

## 論文審査の結果の要旨

cGMP 分解酵素の 1 つである PDE 5 は、血管平滑筋をはじめ肺や血小板でその活性が確認されているが、詳細な組織分布や発現調節に関する研究は行われていなかった。本研究は、PDE 5 阻害薬の疾患に対する有効性を検討する目的で、PDE 5 cDNA をクローニングし、その組織分布および発現調節を調べたものであり、評価すべき点は次の通りである。

### 1. ヒト、イヌおよびラット PDE 5 cDNA のクローニングとスプライシングバリエーションの探索

ヒト、イヌおよびラットの PDE 5 cDNA を単離し、これらの動物種においてスプライシングバリエーションである PDE 5 A 1 と PDE 5 A 2 の 2 種類の mRNA が存在することを明らかにした。

### 2. PDE 5 A 1 と PDE 5 A 2 mRNA の組織分布

イヌおよびヒトにおける PDE 5 A 1 と PDE 5 A 2 mRNA の組織発現パターンを RT-PCR により明らかにした。両動物種において、これまで酵素活性としてしか確認されていなかった多くの組織にも PDE 5 mRNA の発現を見いだした。ヒトの組織ごとの各バリエーションの発現パターンを明らかにした。

### 3. PDE 5 A 1 と PDE 5 A 2 mRNA の発現調節

ヒトおよびラットの PDE 5 染色体 DNA をクローニングし、5' 非転写領域およびイントロンの塩基配列を決定した。両者の非転写領域に cAMP responsive element や AP-2 が存在することに注目し、ラット培養血管平滑筋細胞に cAMP アナログを添加したところ、PDE 5 mRNA の発現の上昇が認められ、その mRNA は主に PDE 5 A 2 であることを明らかにした。このことは、PDE 5 A 2 が誘導型バリエーションであることを示唆するものであり、cAMP の上昇が PDE 5 を増加させることにより、基質である cGMP 濃度が調節される可能性を示した。

### 4. ラットにおける PDE 5 の発現と組織化学的な解析

ラット PDE 5 mRNA が肺、大動脈、小脳および小腸などに発現していることを明らかにした。PDE 5 mRNA は小脳のプルキンエ細胞に局在し、PDE 5 タンパク質は同細胞の細胞体および樹状突起に存在していることを示した。PDE 5 mRNA の発現は生後、加齢とともに上昇することを示し、小脳における運動機能の獲得との関連を示唆した。

以上のように、本論文は、PDE 5 の組織分布および発現調節を調べることにより、基質である cGMP がそれらの組織で生理的な役割を演じていることを示唆するとともに、PDE 5 阻害薬の感受性が加齢や病態で変化すると考えるべき根拠を導いており、組織生化学、薬理学、および酵素化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 12 年 1 月 20 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。