

氏 名	しら き たく ま 白 木 琢 磨
学位(専攻分野)	博士 (人間・環境学)
学位記番号	人 博 第 15 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	人間・環境学研究科 人間・環境学専攻
学位論文題目	Endothelin ; Synthesis and Activity エンドセリン ; 合成と活性

論文調査委員	(主 査) 教授 小林茂夫	教授 竹安邦夫	教授 津田謹輔
--------	------------------	---------	---------

論 文 内 容 の 要 旨

エンドセリン (endothelin) は、血管内皮 (endothelium) に由来し、強力な血管収縮作用を示すペプチドとして単離・同定された。最近では、エンドセリンは、血管平滑筋活動の調節だけでなく、血管の修復、神経提由来の細胞を含む組織の発生にも関与することが示唆されている。本論文の第 1 章では、エンドセリンの生合成に関わるエンドセリン変換酵素 cDNA をクローニングし、その遺伝子の発現調節、アイソフォーム、遺伝子構造、染色体上の位置を明らかにしている。第 2 章では、黒色腫由来の細胞株を用いて、エンドセリンの色素細胞発生調節機構を明らかにしている。

第 1 章 エンドセリン変換酵素

エンドセリンをコードする遺伝子から発現したペプチドは、2 種類のプロテアーゼによって段階的に切断されて、活性のあるエンドセリンが産生される。前駆体のプレプロエンドセリンは、二カ所で切断されて中間体のビッグエンドセリンがつくられる。次に、ビッグエンドセリンの 21 番目のトリプトファンと 22 番目のバリンとの間が切断され、エンドセリンとなる。後者のプロテアーゼ (エンドセリン変換酵素, ECE) は、エンドセリン産生に特異的な酵素と考えられている。しかし、ECE の遺伝子は、同定されていなかった。申請者は、ECE の構造決定のために、ECEcDNA を発現クローニングする方法を開発した。ECE 活性を持たない CHO-K1 細胞に、プレプロエンドセリン遺伝子を導入し、ビッグエンドセリンを恒常的に産生する細胞株を樹立した (CHO/big)。次に、ウシ血管内皮より作製した cDNA ライブラリーをベクターに組み込んだ後に CHO/big 細胞に導入した。エンドセリンを産生ようになった CHO/big の単一細胞を、抗エンドセリン抗体を結合した赤血球の溶血反応で検出した。クローニングしたウシ ECEcDNA から、ECE は一回膜貫通型の金属プロテアーゼ族に属する事がわかった。また ECEcDNA から作成したプローブによるノーザンブロットハイブリダイゼーション法で、様々な組織で mRNA の発現がみられた。

培養内皮細胞での ECEmRNA の発現は、非増殖期には低く、細胞増殖期、特に G1 期および S 期に高

い事が明らかになった。また、高密度培養した内皮細胞の一部を剥離し、残る細胞の増殖・遊走を刺激した後、ECE mRNA の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法で検討した。その結果、高密度状態により増殖を停止した細胞での発現はほとんどないのに対し、増殖・遊走中の内皮細胞で発現が上昇していた。生体内では血管内皮は正常血管の内腔を一層でおおっており、高密度培養は正常血管内皮に対応すると考えられる。血管傷害後などに観察される血中エンドセリンレベルの上昇は、傷害後の内皮の増殖で ECE の発現が誘導されることによる可能性がある。

ウシとラット ECE アミノ酸配列および塩基配列の比較は、細胞内のアミノ末端だけが異なるアイソフォームの存在を示唆した。5'-RACE により 5'末端の異なる 4 種類のアイソフォームを同定した。分析の結果、同一 ECE 遺伝子から、異なった転写により、異なる第 1、第 2 エクソンを含むアイソフォームが産生されることがわかった。ECE のゲノム遺伝子から作成したプローブで間期染色体に対して蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、ECE 遺伝子が、ヒト染色体の 1p36.1 に位置することを明らかにした。

第 2 章 エンドセリンの色素細胞発生調節機構

エンドセリンは、血管調節因子として単離されたペプチドであるが、神経提細胞由来のいくつかの組織の発生にも関与することが知られている。申請者は、エンドセリンによる色素細胞発生の調節機構を解析した。すなわち、分化形質の異なる複数の黒色細胞腫由来の細胞株に対するエンドセリンの効果を検討した。その結果、もっとも未分化な形質を持つ細胞株 A375 において、エンドセリンは形態変化および、アポトーシスによる細胞死を引き起こすことを見出した。これらの効果にはエンドセリン B 受容体依存性の Gi 蛋白質の活性化が必要であり、形態変化にはアクチンの重合が、細胞死には p53 が関与することを明らかにした。

しかし、これらの効果を引き起こすためには、細胞周期を同調させることが必要であり、非同期で培養した場合には、エンドセリンに対するこれらの効果が弱いことを指摘した。細胞周期同調後一時的に、エンドセリン受容体の発現が上昇していることから、エンドセリン受容体の発現量の違いが、エンドセリンに対する効果の違いを引き起こしている可能性が考えられる。

これらの結果は、エンドセリン B 受容体は色素細胞発生において、より初期のステージに関与し、エンドセリンの効果には、受容体の発現の上昇が必要であることを示唆する。

論文審査の結果の要旨

本論文では、多様な分子生物学的、細胞生物学的な解析方法を組み合わせることによって、エンドセリンに関する 2 つの大きなテーマを追求している。すなわち、第 1 章でエンドセリンの生合成機構を、第 2 章で色素細胞発生におよぼすエンドセリンの作用の研究を行い、いずれのテーマにおいても注目すべき成果を上げている。

第 1 章では、エンドセリンの生合成に関して最も解決が求められていたエンドセリン変換酵素 (ECE) をコードする遺伝子のクローニングに成功した。そして、ECE の一次構造、ECE 遺伝子の発現制御、ECE 遺伝子の染色体位置等を明らかにしている。従来、エンドセリン変換酵素に関する研究は、生化学

的手法によるタンパク質の精製が中心であった。しかし、プロテアーゼの精製は阻害剤の使用に制限があるため、構造決定に至る精製単離は一般に非常に困難である。この欠点を克服するため、タンパク質の精製から始めるのではなく、直接的に遺伝子を単離することを目指した着眼点は独創的である。また、申請者が発案した発現クローニング法 (reverse hemolytic plaque assay) は、細胞から分泌されるペプチド (抗原) の生合成に関わる遺伝子を単離するのに極めて有効であり、その応用が期待される。

申請者は、単離した ECEcDNA からプローブを作製し、内皮細胞での ECE の発現調節を解析した。その結果、ECE の発現は細胞周期に依存し、血清除去および高密度培養による増殖停止期には発現が弱く、増殖期、特に G1 および S 期で発現が高いことを発見した。血管傷害により血中エンドセリンレベルが上昇する現象を説明する上で、この知見は意義深い。

また、ECE にはアミノ末端の異なるアイソフォームが少なくとも 4 種類は存在することを 5'-RACE 法により示した。ECE のゲノム遺伝子の分析から、異なったプロモーターにより転写が開始され、スプライシングによりアミノ末端のみの異なるアイソフォームが産生されることを明らかにした。さらに、各々のアイソフォームの発現分布は組織によって異なり、何らかの機能的な違いがあることを示唆している。ECE のアミノ末端は細胞内に位置するため、アミノ末端の違いは ECE の細胞内局在に影響する可能性があり、今後、その調節機構を研究する基礎となる重要な知見である。

ECE の位置する 1p36.1 近傍には、家族性悪性黒色腫をはじめ神経芽細胞腫、Schwartz-Jampel 症候群、Peutz-Jeghers 症候群などが家系解析によりマップされている。ECE が、これらの遺伝性疾患の原因遺伝子を決定する為の重要な位置情報となる事が期待される。

これらの ECE に関する一連の研究成果は、新規の遺伝子の構造を明らかにしただけでなく、様々な分野の基礎となる知見を得た点で、高く評価できる。

第 2 章では色素細胞発生に及ぼすエンドセリンの作用に注目している。これまで、エンドセリンの血管収縮、弛緩作用については多くの研究がなされてきたが、エンドセリンの発生への作用機構はほとんど判明していなかった。

申請者は、黒色腫に由来する分化段階の異なる細胞株を検討し、エンドセリンは最も未分化な細胞株にのみ分化誘導を引き起こすことを明らかにした。そこで、エンドセリンは色素細胞発生の初期段階で重要と考えられる。この結果は、ノックアウトマウス胎児で色素芽細胞は存在するが、上皮内の色素細胞まで発生しないという *in vivo* の結果に一致する知見といえよう。

さらに、エンドセリンは形態的分化を引き起こすだけでなく、一部の細胞にはアポトーシスを引き起こすことを発見した。いずれの作用も、エンドセリン B 受容体から Gi 蛋白質を介して起こることを確認している。今までに、エンドセリンによるこれらの作用の報告はなく、この結果に関与する細胞内機構は、エンドセリンの新たなシグナル伝達経路の発見を予感させるものである。

また、エンドセリンの作用機構について考察を深め、細胞に発現しているエンドセリン受容体量が少ないと分化誘導作用はみられず、エンドセリンの作用には受容体量に対して閾値があることを見いだしている。この結果は、従来のリガンドの濃度が反応性の閾値を決めるという概念とは異なり、申請者は新たに受容体の発現量が反応の閾値を決めるというモデルを提案している。このモデルは、リガンド-受容体相

相互作用によるシグナル伝達経路の活性化機構に新たな概念を導くものといえる。

以上のように、本論文は、エンドセリンに関する重要な課題を解決し、注目すべき成果を上げている。

よって、本論文は博士（人間・環境学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成9年1月29日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。