

氏 名	井 倉 毅
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 1889 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 外 科 系 専 攻
学位論文題目	cDNA cloning and expression of bovine endothelin converting enzyme (牛エンドセリン変換酵素の cDNA クローニングとその発現)
論文調査委員	(主 査) 教 授 成 宮 周 教 授 中 西 重 忠 教 授 飯 塚 忠 彦

論 文 内 容 の 要 旨

血管系のホメオスタシスの調節には、近年、血管内皮細胞の機能が重要な役割を果たしていることが明らかになってきている。血管を構成するさまざまな細胞は血球細胞を含めて、互いに液性因子、接着因子を通じて相互作用しているが、血管内皮細胞が主体となって他の細胞の機能を積極的にコントロールしていることが明らかになりつつある。特に血管のトーンズの調節を行なう重要な因子として弛緩作用を有する Nitric Oxide(NO), 収縮作用を有するエンドセリン (ET-1) がある。

ET-1 はその前駆体である preproET-1 がまず2カ所で切断され、bigET-1 とよぶ中間体が作られ、さらに bigET-1 の21番目のトリプトファンと22番目のバリンとの間でエンドセリン変換酵素により切断され活性型の ET-1 になる。ET-1 はリガンド依存性にその発現が調節される regulated pathway の分泌様式をとらず、常に分泌状態にある constitutive pathway という分泌様式をとる。従ってその発現調節はエンドセリン前駆体の preproET-1 の遺伝子発現、あるいは ECE の発現調節に依存していることになる。したがって ECE の構造および機能を明らかにすることは非常に重要である。

ECE の構造決定のために、ECEcDNA の発現クローニング法を開発した。ECE 活性を持たない CHO-K1 細胞に、preproET-1 遺伝子を導入し、big ET-1 を恒常的に産生する細胞株が樹立された。ウシ血管内皮より作製した発現ベクターライブラリーを導入後、抗 ET-1 抗体を結合した赤血球の溶血反応で ET-1 を産生する単一細胞が同定された。

クローニングしたウシ内皮型 ECE の cDNA の塩基配列から予想されるアミノ酸配列は N 端に膜貫通部位をもち、さらに金属プロテアーゼに共通してみられる亜鉛結合領域をもつことがわかった。この構造は ECE の生化学特徴と一致した。またほぼ同時期に構造決定されたラット ECE の今回クローニングされたウシ ECE のアミノ酸配列を比較すると約91%の identity を示し、生化学的な酵素活性部位と考えられる亜鉛結合領域および膜貫通領域は完全に保存されていることがわかった。ただ活性とは関係のないと考えられる N 端細胞内領域では相同性が低かった。

ノーザンブロット解析の結果は、発現の程度に違いがあるがさまざまな臓器で発現しており、特に肺および心臓にその発現が多くみられた。つぎにクローン化したウシ内皮型 ECE が *in vivo* で活性をもつかどうかの検討が成された。ECE 活性のない CHO-K1 細胞に ECEcDNA を co-transfection しその培養上清中の immunoreactive-ET を測定した。その結果、CHO-K1 細胞は ECE の cDNA を co-transfection したときのみ ET-1 を産生した。また金属プロテアーゼ阻害剤であるホスホラミドンはこの ECE の cDNA に依存した ET-1 産生を阻害した。したがって今回クローニングした cDNA は実際に細胞レベルで ECE として働いていることがわかった。さらに遺伝子構造が明らかにされ、そのゲノム断片をプローブとし、間期染色体に対し、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションにより ECE 遺伝子はヒト染色体、1p36.1 に位置することがあきらかになった。

論文審査の結果の要旨

培養内皮細胞上清から単離、クローニングされたエンドセリン (ET-1) は血管収縮因子として作用し、その分泌様式は constitutive pathway によると考えられる。

その生合成は前駆体である preproET-1 がまず 2 カ所で切断され、bigET-1 とよぶ中間体が作られ、さらに bigET-1 の 21 番目のトリプトファンと 22 番目のバリンとの間でエンドセリン変換酵素により切断され活性型の ET-1 になる。この bigET-1 から ET への processing は ET に特異的である。

今回クローニングしたウシ内皮型 ECE の cDNA の塩基配列から予想されるアミノ酸配列は N 端に膜貫通部位をもち、さらに金属プロテアーゼに共通してみられる亜鉛結合領域をもつことがわかった。またクローン化したウシ内皮型 ECE が活性をもつことを CHO-K1 細胞において確認した。

さらに遺伝子構造を明らかにし、ECE 遺伝子はヒト染色体、1p36.1 に位置することが明らかとなった。

以上の研究は ET-1 の分泌調節機序の解明に貢献し、また将来 ECE 阻害薬の開発などにより脳虚血や心筋梗塞の治療薬としての臨床的意義が期待される。

したがって、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。