

氏名	北 角 和 浩		
授与した学位	博 士		
専攻分野の名称	薬 学		
学位授与番号	博 甲 第 1257 号		
学位授与の日付	平成 6 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	自然科学研究科生体調節科学専攻 (学位規則第 4 条第 1 項該当)		
学位論文題目	エンドセリン-1の血管内皮細胞における産生・分泌機序ならびに 活性発現部位の解析		
論文審査委員	教授 田坂 賢二	教授 篠田 純男	教授 山本 格
	教授 四方田 穆	教授 佐藤 勝紀	

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

Endothelin-1 (ET-1) は主に血管内皮細胞から分泌される21残基のペプチドであり、その強力かつ持続的な血管平滑筋収縮活性から、本態高血圧症をはじめとした種々な循環器疾患との関連が注目されている。そこで、本研究はET-1の血管内皮細胞における産生・分泌機構ならびにその構造活性相関を明らかにすることを目的として行った。血管内皮細胞をthrombin刺激することによりpreproendothelin-1 mRNAの発現とそれに続くET-1分泌の促進作用が認められ、このinductionにはprotein kinase Cの活性化とそれによるc-Junの生合成および脱リン酸化が重要であることが示された。また、血管内皮細胞をthrombin刺激することにより細胞内Ca²⁺貯蔵部位からのCa²⁺遊離と細胞外液中からのCa²⁺流入による細胞内Ca²⁺濃度の上昇が認められ、これらは、一方でCa²⁺-calmodulin complexの形成を促進し、それによって活性化されたmyosin light chain kinaseがmyosin light chainをリン酸化することによりmyosin filamentおよびactin filamentの形成と両者のinteractionを増大させるとともに、他方で微小管の重合を促進し、その結果としてET-1含有細胞内小器官の細胞内輸送に極めて重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、endothelin/sarafotoxin familyの構造活性相関から、血管収縮・弛緩活性発現にはTrp²¹およびCys¹-Cys¹⁵, Cys³-Cys¹¹の2ヵ所の分子内ジスルフィド結合で構成される立体構造が必須であり、血管収縮活性発現にはLys⁹が最も重要であることが示された。さらに、血管平滑筋細胞には血管収縮機能に関連したET_A receptorが存在し、

血管内皮細胞には血管内皮由来弛緩因子 (endothelium-derived relaxing factor) 遊離機能に関連したET_B receptorが存在することも明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

Endothelin-1は主に血管内皮細胞から分泌されるペプチドであり、その強力かつ持続的な血管平滑筋収縮活性から、本態性高血圧症、冠血管攣縮性狭心症、心筋梗塞症などの循環器疾患においてそれらの病態生理と密接に関連することが報告されている。また、生体内では肺、腸管、腎臓などの諸器官で産生されるが、その産生細胞はこれら臓器の血管内皮細胞であると推定されている。しかし、endothelin-1の分泌機序についてはまだほとんど理解されていない。その点の解明を中心にして本研究は行われている。

ブタ大動脈内皮細胞からのendothelin-1分泌に及ぼすthrombinの影響を検討した結果、thrombin作用下にendothelin-1の分泌は増大し、その結果はthrombinの濃度に依存して増大している。これと平行して血管内皮細胞におけるpreproendothelin-1 mRNAの発現に及ぼすthrombinの影響を検討したところ、その1 unit/mlを作用させた15分よりmRNAのinductionが起り、30分から60分にかけて最大になった後、360分後にはほぼcontrol levelに回復している。Preproendothelin-1 mRNAの発現もthrombinの濃度に依存しており、1-10unit/mlで最大となり、そのinductionとendothelin-1の分泌との間には密接な関係が想定される。このmRNAの発現はprotein kinase Cのinhibitorであるcalphostin Cによって濃度依存的に抑制され、一方protein kinase CのactivatorであるTPA (phorbol 12-myristate 13-acetate) によってinductionが増大しているのも観察している。ヒトendothelin-1遺伝子解析によりpreproendothelin-1遺伝子の5' 隣接領域にc-Junおよびc-Jun-c-Fos complexの結合部位として知られているTPA-responsive element (TRE) が存在することが知られている。内皮細胞より抽出した核蛋白質とTREとの結合 (TRE-protein oomplex) はthrombin処理により増大した。更に核蛋白抽出液とTRE probeに抗c-Jun抗体を加えることにより、抗c-Jun抗体がTRE-protein oomplexと結合することが判明した。このことはTRE-protein oomplex中にc-Junが存在することを示している。c-JunはTREに特異的に結合する核内転写因子であるAP-1の主な構成要素であり、AP-1はTPAによって発現誘導される遺伝子の転写調節に直接関与していることが知られている。このことは、thrombinによるpreproendothelin-1 mRNAのinductionの場合も、TREを介したc-Junによってcontrolされている可能性を示唆している。血管内皮細胞にthrombinを作用させた際、39kDaのc-Junが生合成されることが明らかになった。また、抗c-Jun抗体により共沈した免疫沈降物中の55kDaの蛋白質はc-Fosと考えられた。c-Junはc-Fosが存在するとc-Jun homodimerよりもc-Fosとheterodimerを形成しやすく、TREとの結合能はheterodimerはhomodimerより25倍強い。このc-Junやc-Jun-

c-Fosの合成は、preproendothelin-1 mRNA発現を抑制するcalphostin Cによって抑制されている。c-Junは無処理の細胞ではリン酸化された状態で存在するが、protein kinase C pathwayを介して脱リン酸化されると活性化し、TREへの結合活性が上昇することが知られている。血管内皮細胞をthrombinで処理すると 39kDa proteinの脱リン酸化が速やかに惹起されている。以上の事から、thrombin処理した血管内皮細胞で観察されるpreproendothelin mRNAのinductionはprotein kinase Cを介したc-Junの生合成とその脱リン酸化によって惹起されるのが主な機序であることを証明している。その他、thrombin処理により血管内皮細胞内のCa²⁺濃度の上昇し、これがpreproendothelin mRNAをinductionさせる要因の1つになり、endothelin-1の分泌亢進につながることも明らかにしている。以上の研究は学術上に有意義な発見をもたらしており、博士（薬学）の学位論文に値すると判断した。