

エンドセリンの情報伝達を司る受容体の発現調節機構の解析と局在部位の同定
(Analysis of Structure and Gene Expression Mechanism of Endothelin Receptor)

萩原 啓実 (Hiromi Hagiwara)

東京工業大学生命理工学部 助手

(Department of Biological Sciences, Tokyo Institute of Technology, Research associate)

Summary

Immunohistochemistry and autoradiographic studies revealed dense localization of ET_A receptors in the perichondrium and ET_B receptors in the endothelium. These results suggest that the ET/ET_A receptor system and the ET/ET_B receptor system play an important role in regulating cartilage metabolism and endothelial functions, respectively.

4-1 研究目的

エンドセリンは、1987年にブタ血管内皮細胞の培養上清から発見された21個のアミノ酸から成る血管作動性ペプチドである。その後の研究で、ヒトを含めた多くの生物に存在することが確認されている。エンドセリンは3種のイソペプチド($ET-1$, $ET-2$, $ET-3$)から成るファミリーを形成していること、受容体には、 $ET-1$ と $ET-2$ に親和性の高いA型受容体(ET_A)と3種に等しい親和性を持つB型受容体(ET_B)が存在することが知られている。非常に強力な血管収縮力を有することとヘビ毒にその構造が類似していることから、生体内での生理作用、作用部位、作用機序の解明に多くの研究者が鎧を削っている。最近ではエンドセリンが血管収縮の他に血管弛緩や細胞増殖調節にも働いていることが報告され注目されている。私は、エンドセリンの働きを受容体研究の側面からとらえ、現在までにエンドセリン受容体の精製(J. Biol. Chem., 266: 16892, 1991)、遺伝子クローニング(J. Biol. Chem., 266: 23433, 1991)、肺、睾丸などの組織での局在と生理機能を明らかにしている(An. J. Physiol., 263: R15, 1992 and An. J. Physiol., 264: F777, 1993)。本研究では、受容体の特異抗体を用いた免疫組織化学染色と ^{125}I 標識リガンドを用いたオートラジオグラフィにより受容体の局在部位を同定することにより、エンドセリンの各組織における作用を探ることを目的とする。

4-2 研究経過及び成果

B型受容体 (ET_B) 特異抗体によるET_Bの組織分布： 私たちの作製したウシET_B特異抗体 (ET_Aとは交差しない) を用いて種々のウシ組織の免疫組織化学染色を行ない、ET_Bの局在部位を調べた。ウシ肺、気管、腎臓、副腎、脳下垂体、小脳の凍結切片をクリオトームで作製しET_B特異抗体を組織の受容体に結合させた後、抗体/受容体の複合体をペルオキシダーゼで染色して顕微鏡下で観察した。その結果、いずれの組織においても毛細血管及び血管内膜、内皮細胞が強く染色されていることが確認された。内皮細胞でのET_Bの局在から、エンドセリン/ET_Bシステムがエンドセリンの生理作用の1つである血管弛緩に血管弛緩因子(EDRF)あるいはプロスタグランジンの放出を介して関与していることが示唆された。(Journal of Cardiovascular Pharmacology, 22: S111-112, 1993)

軟骨膜におけるET_Aの局在とその生理的役割： ラットの気管軟骨、剣状軟骨、胎児の成長軟骨の凍結切片を作製し、¹²⁵I標識ET-1を用いたオートラジオグラフィを行なったところ、軟骨膜に大量のエンドセリン受容体が存在していた。ET_Aのアンタゴニスト(BQ-123)とET_Bのアゴニスト(BQ-3020)を競争剤として用いた結合実験から、軟骨膜に局在する受容体はET_Aサブタイプであることが確認できた。軟骨膜に存在する細胞は軟骨細胞へ増殖・分化していくことが知られている。そこで軟骨組織を培養しET存在下での³H標識チミジンの取り込み実験からETによる増殖能を測定した。その結果ETにより軟骨組織の増殖能が明らかに促進した。以上の結果から軟骨組織を形成する軟骨膜にはET_Aが局在しており、軟骨代謝、特に軟骨細胞の増殖・分化に関わっていることが分かった。今後、この成果は軟骨に関わる骨折の治療、あるいはリュウマチなどの病態の成因解明に大いに役立つものと思われる。(American Journal of Physiology, submitted).

魚類のエラにおけるET_Aの局在： ニジマスのエラの凍結切片を作製し¹²⁵I標識ET-1を用いたオートラジオグラフィを行なった。その結果エラでガス交換等を行なっているlamellaの血管にET_Aが局在していた。その生理的意義に関しては今後の課題であるが、ET/受容体システムが哺乳類以外の種にも存在していることが明らかになりこのシステムが進化の過程で非常に良く保存されていることが示された。

本研究によりエンドセリン受容体サブタイプが組織特異的に発現してその組織に特有の機能を担っていることが明らかになった。今後はET_A、ET_Bにどのような発現調節機構が備わって

いるのかを解明していく。

以上の予定していた成果とは別に、新しい研究が本研究から派生して発展している。すなわちラットの軟骨細胞を剣状突起より培養してET受容体の存在を 125 I標識ETを用いて調べたところ、その存在がほとんど確認されなかった。これに対してETとは正反対の生理作用を有するナトリウム利尿ペプチド(NP)ファミリーの受容体の存在を調べたところ、3種類確認されている受容体のうちB型受容体(NPR-B)が存在していた。さらに、ラジオイムノアッセイにより軟骨細胞がNPR-BのリガンドであるC型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)を合成・分泌していることも確認された。このように軟骨細胞ではCNP/NPR-Bシステムがオートクリンあるいはパラクリンに働いていることが示された。さらにこのシステムの生理的役割を検討するために 3 H標識チミジンの取り込みによるDNA合成への効果を調べた。その結果CNPにより軟骨細胞のDNA合成が著しく抑制された。以上の結果より、軟骨細胞ではCNP/NPR-Bシステムがオートクリン・パラクリンに働いてその増殖を調節していることが明らかになった。

(Journal of Biological Chemistry; 269: 10729, 1994)

4-3 発表論文リスト

1. M. A. Ghoneim, T. Yamamoto, S. Hirose, T. Nagasawa, & H. Hagiwara. Endothelium Localization of ET_A Receptor Revealed by Immunohistochemistry. Journal of Cardiovascular Pharmacology, 22; S111-S112 (1993)
2. H. Hagiwara, H. Sakaguchi, M. Itakura, T. Yoshimoto, M. Furuya, S. Tanaka, & S. Hirose: Autocrine Regulation of Rat Chondrocyte Proliferation by Natriuretic Peptide C and Its Receptor, Natriuretic Peptide Receptor-B. Journal of Biological Chemistry, 269: 10729-10733 (1994)
3. K. M. Lodhi, H. Sakaguchi, S. Hirose, S. Shibabe, & H. Hagiwara. Perichondrial Localization of Endothelin A Subtype in the Rat Tracheal and Xiphoid Cartilage and in the Fetal Rat Epiphysis. American Journal of Physiology, submitted.