

19990201

心血管作動性因子と成人病及び老化に関する研究

(研究課題番号 H10-長寿-030)

平成11年度 厚生科学研究費補助金 (長寿科学総合研究事業)

研究報告書

平成12年3月

主任研究者 寒川賢治
国立循環器病センター研究所
生化学部 部長

心血管作動性因子と成人病及び老化に関する研究

(研究課題番号 H10-長寿-030)

平成11年度 厚生科学研究費補助金 (長寿科学総合研究事業)

研究報告書

心血管作動性因子と成人病及び老化に関する研究

主任研究者 寒川 賢治（国立循環器病センター研究所 部長）

心血管作動性因子（アドレノメデュリン，Na利尿ペプチド，エンドセリン，アンジオテンシンⅡ）による心血管系の調節，保護，再構築などの機能制御機序の解析を行った。また，CNPノックアウトマウスの解析により，CMPが内軟骨性骨化促進因子として作用すること，ウログアニリンの心不全における心臓からの分泌亢進を明らかにし，HDL受容体；SR-BI遺伝子の発現調節解析などを行った。

〔研究組織〕

- 寒川賢治（国立循環器病センター研究所 生化学部長）
- 中尾一和（京都大学大学院医学研究科 臨床病態医科学第二内科教授）
- 木村定雄（千葉大学大学院医学研究科 高次機能系統合機能学教授）
- 宮本 薫（福井医科大学 生化学第2講座教授）
- 平田恭信（東京大学大学院医学系研究科 循環器内科講師）
- 南野直人（国立循環器病センター研究所 研究機器管理室長）
- 中里雅光（宮崎医科大学第三内科講師）
- 小室一成（東京大学大学院医学系研究科 循環器内科講師）

A. 研究目的

生体機能の老化を考える上で心血管系は最も重要な器官であり、その機能の低下や異常は種々の成人病や老化の進展に深く関わる。近年、心血管作動性因子、特にアンジオテンシンⅡ、Na利尿ペプチド、エンドセリン等のペプチド性因子とその受容体に関する生化学的、分子生物学的研究が大きく展開し、その全体像が明らかにされつつある。さらに最近我々が発見した新

しい心血管作動性因子、アドレノメデュリン（AM）と関連ペプチド（PAMP）も、心疾患、高血圧や動脈硬化などの血管代謝障害に深く関与すると考えられている。しかし、心血管系の機能調節における作用機序、各因子間の相互作用、発現調節などの詳細な機序については不明な点が多く残されている。

本研究では、上記因子とそれらの受容体による心血管系の機能制御のメカニズムの解明と、そのバランスの乱れや異常による成人病の発症や老化進展について、分子生物学、発生工学的手法を中心に用いて解明するとともに、診断、治療への応用を目指したものである。

B. 研究方法

本年度は、新しい心血管作動性因子であるアドレノメデュリン（AM）をはじめとして、アンジオテンシンⅡ，Na利尿ペプチド，エンドセリン，グアニリンとそれらの受容体及びHDL受容体；SR-BIについて、発現調節，機能解析，病態生理的意義の検討を行い、これらの成人病の病態と老化への関与を探った。

尚、本研究においてヒトを対象とした研究を行うに際しては、各研究施設で定められた臨床

研究の規定に従って行った。実験動物を用いた研究では、実験動物飼養及び保管に関する基準、各研究施設における実験動物委員会の指針に基づき、実験動物愛護を配慮して行った。

C. 研究結果 及び D. 考察

1) アドレノメデュリン (AM) の発現調節、機能解析及び病態生理的意義

① アドレノメデュリンの多角的な機能解析

AMは生体内の多くの細胞から分泌され、その産生及び機能の異常は成人病と深く関連すると考えられる。間質系細胞の産生するAMの機能を検討し、炎症反応や成人病との関連を探った。特異的受容体を発現するSwiss3T3線維芽細胞を用いて、炎症性サイトカインのTNF- α 産生を検討したところ、AMは基礎分泌量を変化しないがIL-1 β 刺激により亢進したTNF- α 産生を迅速かつ強力に抑制した。また、全身性炎症反応症候群 (SIRS) の血中AM濃度と炎症反応との関連を検討したところ、敗血症性ショックなどを含め症状の重篤度との間に正相関が認められ、診断指標に使用できる可能性が示された。この結果、AMは間質組織を含め炎症反応に相関して産生が亢進し、分泌されたAMは抑制的に機能していると考えられた。

② マウス・アドレノメデュリン (AM) 受容体の構造解析と発現調節

AMは血管拡張に基づく著明な降圧作用を有し、心血管系の保全に役割を担う循環調節因子であると考えられ、心血管の老化の制御にも深く関与すると考えられる。AMの機能解析の一環として、マウスAM受容体構成蛋白質のcDNAクローニングを行うとともに、敗血症の病態モデルにおける発現解析を行い、その生理的意義を検討した。複雑な敗血症性ショックの病態において、AM遺伝子発現とともに受容体の発現変化もAMの生理作用に強く影響を与える可能性が示唆された。

2) ナトリウム利尿ペプチド (BNPおよびCNP) の臨床診断的意義の検討と治療への応用

ナトリウム利尿ペプチドの成人病及び老化における病態生理的意義と臨床応用への可能性を明らかにするため、BNPノックアウトマウスにおける腹部大動脈縮窄の影響を検討した。BNPノックアウトマウスでは心室肥大とともに心筋線維化の明らかな増悪が認められた。以上より、BNPは、心室圧負荷に対して迅速に反応し、心筋線維化を抑制することが明らかになった。又、CNPの骨軟骨形成因子としての意義を明らかにするために、成長板軟骨でCNPを発現するトランスジェニックマウスを作製した。内軟骨性骨化の促進を伴う著しい体幹及び四肢の伸長が認められ、生体においてCNPが骨軟骨局所で内軟骨性骨化促進因子として作用することが明らかになった。

3) 心血管系における2種類のエンドセリン受容体発現のスイッチ機構と動脈硬化

G蛋白質共役受容体キナーゼ2 (GRK2) による受容体シグナルのリン酸化非依存性の抑制機序の解明を目指し、GRK2変異体の機能を解析した。ET-1とAng IIに対する細胞内Ca応答を解析すると、GRK2やキナーゼ不活性のGRK2-K220Wだけでなく、キナーゼ・PHドメイン欠損体GRK2 (1-181)、GRK2 (54-174)でもCa応答の強い抑制を認めた。一方、全長GRK2、GRK2 (1-181)は選択的にGqと結合し、Gi/o、Gsとは結合しなかった。以上より、GRK2のN末端部の新しいRGSドメイン (54-174)がGqに結合して受容体シグナルを抑制するリン酸化非依存の機序が示唆された。

4) 動脈硬化の発症・進行における内因性血管作動物質の病態生理的役割の検討

アドレノメデュリン (AM) は血管緊張の調節ばかりでなく細胞増殖や分化の調節にも関与していると考えられている。AMの病態生理的役割を明らかにするため、内皮細胞のアポトーシ

スに及ぼす影響を検討した。ヒト臍帯静脈の内皮細胞は血清除去培地で培養するとアポトーシスを生ずる。AMを投与すると用量依存的に核濃縮及び細胞死を減少させた。cAMPアナログや細胞内cAMP増加作用を有する物質には抗アポトーシス作用は見られなかったが、L-NAMEの存在下ではAMのこの作用は抑制された。1~10 μ MのSNPによる抗アポトーシス作用は可溶性グアニリルシクラーゼの阻害や8-br-cGMPの存在で変化しなかった。AMおよびNOは内皮細胞のアポトーシスをcGMP非依存性に抑制すると考えられる。

5) 心臓リモデリングにおけるアンジオテンシン(AT)IIの役割

アドリアマイシンは心毒性を示し心筋症を誘導するがその機序は不明である。アドリアマイシン心筋症発症におけるアンジオテンシンIIの役割について、アンジオテンシンII 1型受容体ノックアウトマウスを用いて解析した。アドリアマイシンの投与により心筋細胞の死、ANP、CARP遺伝子発現の低下、心筋線維の疎小化・変性、心機能の低下が認められた。これらの変化はいずれも1型受容体ノックアウトマウスでは認められず、また1型受容体拮抗薬の投与により抑制された。従って、アドリアマイシン心筋症の発症に、アンジオテンシンII/AT1が関与していることが明らかとなった。

6) 水・電解質代謝におけるグアニリンファミリーの基礎的, 臨床的研究

心不全, 腎疾患におけるウログアニリンの病態生理学的意義を検討した。各種腎疾患とウログアニリンの関連を解析し、ウログアニリンが腎臓におけるナトリウム代謝と関連し、ネフローゼ症候群では体液量調節に何らかの役割を果たしていると考えられた。血液透析において血漿ウログアニリン濃度は透析間の体重増加量、血圧および循環血漿量の変化と相関し、これらの調節に関与している。また心不全時に心

臓からのウログアニリン分泌は亢進し、心不全患者の心機能を評価するマーカーの1つであり、体液量調節に密接に関与することが示唆された。

7) コレステロール代謝関連受容体の発現調節に関する研究

老化に伴い増加してくる動脈硬化, 心筋梗塞などの疾患には、血管平滑筋細胞へのコレステロールの取り込みが深く関与している。本研究では、コレステロール輸送に重要な役割を担っている、HDL受容体(SR-BI)遺伝子の発現調節機構の解明を目指した。SR-BI遺伝子上流域をクローニングし、転写活性化領域を同定した。さらにEMSAにより、DNA結合蛋白質の同定を行い、昆虫細胞SL2を用いてSp1ファミリーの役割を検討した。ルンフェラーゼアッセイにより、SR-BI遺伝子上流-140bp付近に存在する3カ所のGCボックスがSR-BI遺伝子発現に重要であることを明らかにした。これらのGCボックスにはSp1及びSp3が共に結合する。Sp1及びSp3は共にSR-BI遺伝子の転写を著しく促進した。これらの結果より、SR-BI遺伝子の発現にはSp1ファミリーが重要であることが明らかとなった。

E. 結論

心血管作動性ペプチドとその受容体による心血管系の調節, 保護, 再構築などの機能制御機序の解析を行った。また、CNPトランスジェニックマウスの作製により、CNPが骨軟骨局所で内軟骨性骨化促進因子として作用すること、ウログアニリンの心不全患者の心機能マーカーとしての可能性、およびHDL受容体としてのSR-BIの遺伝子発現にはSp1ファミリーが重要であることが明らかになった。

G. 知的所有権の取得状況

なし

アドレノメデュリンの遺伝子発現調節と機能解析

主任研究者 寒川 賢治（国立循環器病センター研究所 部長）

アドレノメデュリン(AM)は血管拡張に基づく著明な降圧作用をもち、心血管系の保全に役割を担う循環調節因子であると考えられ、心血管の老化の制御にも深く関与すると考えられる。本研究では、AMとその受容体の機能解析の一環として、マウスAM受容体構成蛋白質のcDNAクローニングを行うとともに、敗血症の病態モデルにおける発現解析を行い、その生理的意義を検討した。複雑な敗血症性ショックの病態において、AM遺伝子発現とともに受容体の発現変化もAMの生理作用に強く影響を与える可能性が示唆された。

A. 研究目的

心房性ナトリウム利尿ペプチドやエンドセリンの発見により新しい循環調節機序が明らかになってきたように、心血管作動性の新しい因子及びその受容体を同定することは循環調節研究の新領域への展開が期待できる。

我々は、ラット血小板中のcAMP増加活性を指標としたin vitroのアッセイ系を用いて、ヒト褐色細胞腫組織より新しいペプチドを発見し、その単離、構造決定を行い、これを“アドレノメデュリン(adrenomedullin, AM)”と命名した。AMは52残基のアミノ酸よりなり、分子内に一個のジスルフィド結合とC末端アミド構造を有し、ラットに経静脈投与した時、強力で長時間持続する降圧活性を示す。

AMは、副腎のみならず心臓、腎臓、肺、血管壁など広く循環器系の臓器に発現し、循環血液中にも存在すると共に、循環器疾患において血中濃度の上昇が見られることから、心血管系の調節に関与する新しい循環ホルモンであると考えられる。また最近、我々はAMの遺伝子構造も明らかにすると共に、AMが血管内皮及び血管

平滑筋細胞で多量に産生され、オートクリン及びパラクリンの局所因子としても機能している可能性を示した。

このようにAMは、循環ホルモン及び局所因子として、血管拡張作用を介して心血管系の保全に重要な役割を担う新しい循環調節因子であると言える。一方、成人病の発症あるいは老化の進展の制御にも深く関与するものと考えられ、AMの遺伝子発現調節とその機能の解明は心血管系と老化の関連を考える上でも重要である。

本年度の研究では、マウスAM受容体の構造解析と敗血症の病態モデルにおける受容体の発現変化を検討することにより、AMの病態生理学的意義について考察を加えた。

B. 研究方法

1) マウスCRLRおよびRAMP1, 2, 3 cDNAのクローニング

cDNAライブラリーは、マウス脳および肺より調製したmRNAを用いてを作成した。CRLRはラットCRLRの部分シーケンスを用いて、

RAMP1, 2, 3はマウスESTに登録されていたクローニングの部分配列を用いてスクリーニングを行った。

2) マウス敗血症の病態モデルにおける受容体構成因子の発現解析

C57Bl/6 マウスにリポポリサッカライド (LPS) 2 mgを腹腔内に投与して、敗血症モデルを作製した。LPS投与後12時間まで経時的に屠殺し、各組織よりRNAを抽出した。AM受容体構成因子であるCRLRとRAMP1, 2, 3のmRNAの発現はノーザンブロットで調べ、イメージアナライザーで定量した。

なお、本研究ではヒトを対象とした研究は行っていない。また、実験動物を用いた研究では、実験動物飼養及び保管に関する基準、当施設における実験動物委員会の指針に基づき、実験動物愛護を配慮して行った。

C. 研究結果

1) マウスCRLRおよびRAMP1, 2, 3c DNAのクローニング

AMの受容体は、7回膜貫通型蛋白質のCRLR (calcitonin receptor-like receptor) とその発現を補助するRAMP (receptor activity modifying protein) という蛋白質が共に発現することにより構成される。RAMPは、CRLRの膜への移動や糖鎖による修飾などの作用を持ち、現在RAMP1から3の三つのisoformが報告されている。つまり、CRLRとRAMP1の共発現によりCGRP特異的受容体が形成され、CRLRとRAMP2によりAM特異的な受容体が形成される。また、CRLRとRAMP3でもAMの受容体を形成することが報告されているが、この4つの蛋白質がどのように相関しているのか不明な点も多い。そこで今回、マウスCRLRおよびRAMP1, 2, 3のcDNAのクローニングを行い構造解析を行った。その結果、マウスCRLRはアミノ酸配列でヒトおよびラットCRLRとそれぞれ

88.4%、94.6%と非常に高い相同性を示した。一方、マウスRAMP1, 2, 3はヒトRAMPsとそれぞれ66.4%、48.8%、79.0%の相同性であり、特にRAMP2においては相同性が低かった。

2) マウス敗血症の病態モデルにおける受容体構成因子の発現解析

次に、マウスのいくつかの臓器に注目して、AM受容体構成因子の発現解析を行った。受容体発現の組織分布を検討したところ、CRLRとRAMP2は肺に強く発現し、RAMP1は脳や胸腺、RAMP3は脳、腎、精巣とそれぞれに特徴的な分布を示した。続いて敗血症モデルとして、マウスにLPSを投与し、12時間後のCRLRおよびRAMP2, 3の発現を検討した。コントロール群とLPS投与群で、それぞれ臓器ごとにCRLRとRAMPの発現を調べた。AMの受容体構成因子とされるCRLRとRAMP2は、肺での発現が著明に減少し、対照的にRAMP3は肺での発現が著明に増加した。また、RAMP3は脾臓や胸腺でも著しい増加を示した。RAMP1, 2, 3を比較すると、RAMP1は、胸腺での発現が減少していた。RAMP1, 2は敗血症モデルでの発現が減少傾向にあるのに対し、RAMP3は逆の変化を示した。そこで、肺での各遺伝子の発現を経時的に検討した。尚、LPS 2 mgを腹腔内に投与した敗血症モデルでは、投与後約13時間前後で全てのマウスが死に至る。CRLRとRAMP2のmRNAはかなり早い時間に減少し、LPS投与後3時間前後で最低となり、以後12時間まで変化しなかった。RAMP3は、病態末期になってかなり上昇することがわかった。AMの血中濃度は、ラットやイヌでの検討において、LPS投与後速やかに上昇することを明らかにしているが、これはAM分泌の増加に加えて、肺においてCRLRとRAMP2で形成される結合部位が著明に減少することも関係していると思われる。

D. 考察

LPS投与後、AM血中濃度は速やかに上昇し、また多くの血管においてAM遺伝子の著明な上昇が見られる。これに関連してAMを血管に強制発現させたトランスジェニックマウスでの検討において、AM強制発現マウスでは、致死量の内毒素を投与した場合でも、野性型のマウスに比べ肝臓の鬱血などが認められず、肝臓のダメージが少なく、AMによる臓器保護の可能性が示唆されている。AM発現増加が、敗血症によってより強く誘導されることは、生体防御機構として、AMが局所の血流調節を司るペプチドであることを示唆している

AM受容体に関しては、CRLRとRAMPの組み合わせでAMの受容体が形成されるが、CRLRのmRNAは全身臓器に広く分布している。従って、AMの作用部位は、RAMPの分布によって決定されると考えられた。また、肺はAMの主要な結合部位であることから、CRLRとRAMP2がAM受容体を形成する可能性が高いと考えられる。敗血症末期にRAMP3-AM受容体が強く発現している臓器は、免疫に関与する臓器であり、AMが免疫系の調節に関与することを示唆する興味深い結果である。

E. 結論

マウスAM受容体の構造および発現解析を行った。敗血症の病態モデルとAMの関係において、受容体の発現変化もAMの生理作用に強く影響を与える可能性が示唆された。トランスジェニックマウス、ノックアウトマウスなどにおいて、AMや受容体の遺伝子がどのように発現しているかなどを含め、さらに検討を進める必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

① T. Horio, T. Nishikimi, F. Yoshihara,

H. Matsuo, S. Takishita and K. Kangawa: Effects of adrenomedullin on cultured rat cardiac myocytes and fibroblasts. *Eur. J. Pharmacol.*, 382, 1-9, 1999.

② H. Ohta, T. Tsuji, S. Asai, S. Tanizaki, K. Sasakura, H. Teraoka, K. Kitamura and K. Kangawa: A simple immunoradiometric assay for measuring the entire molecules of adrenomedullin in human plasma. *Clin. Chim. Acta*, 287, 131-143, 1999.

③ A. Morimoto, T. Nishikimi, F. Yoshihara, T. Horio, N. Nagaya, H. Matsuo, K. Dohi and K. Kangawa: Ventricular adrenomedullin levels correlate with the extent of cardiac hypertrophy in rats. *Hypertension*, 33, 1146-1152, 1999.

④ H. Ohta, T. Tsuji, S. Asai, K. Sasakura, H. Teraoka, K. Kitamura and K. Kangawa: One-step direct assay for mature-type adrenomedullin with monoclonal antibodies. *Clin. Chem.*, 45, 244-251, 1999.

⑤ D. Nagata, Y. Hirata, E. Suzuki, M. Kakoki, H. Hayakawa, A. Goto, T. Ishimitsu, N. Minamino, Y. Ono, K. Kangawa, H. Matsuo and M. Omata: Hypoxia - induced adrenomedullin production in the kidney. *Kidney Int.*, 55, 1259-1267, 1999.

⑥ Y. Isumi, A. Kubo, T. Katafuchi, K. Kangawa and N. Minamino: Adrenomedullin suppresses interleukin-1 β -induced tumor necrosis factor- α production in Swiss 3T3 cells. *FEBS Lett.*, 463, 110-114, 1999.

⑦ N. Nagaya, T. Nishikimi, T. Horio,

F. Yoshihara, A. Kanazawa, H. Matsuo and K. Kangawa: Cardiovascular and renal effects of adrenomedullin in rats with heart failure. Am. J. Physiol., 276, R213-218, 1999.

G. 知的所有権の取得状況

なし

研究協力者

小野 紫 (国立循環器病センター研究所)

児島将康 (国立循環器病センター研究所)

成人病及び心血管老化における心血管ホルモンの
臨床診断的意義の検討と治療への応用

分担研究者 中尾一和（京都大学大学院医学研究科臨床病態医科学 第二内科 教授）

心臓ホルモンとしてのBNPの病態生理的意義を明らかにするために、BNPノックアウトマウスにおける腹部大動脈縮窄の影響を検討した。BNPノックアウトマウスでは心室肥大とともに心筋線維化の明らかな増悪が認められた。以上より、BNPは、心室圧負荷に対して迅速に反応し、心筋線維化を抑制することが明らかになった。また、CNPの骨軟骨形成因子としての意義を明らかにするために、成長板軟骨でCNPを発現するトランスジェニックマウスを作製した。内軟骨性骨化の促進を伴う著しい体幹及び四肢の伸長が認められ、生体においてCNPが骨軟骨局所で内軟骨性骨化促進因子として作用することが明らかになった。

A. 研究目的

1984年に心臓より心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）が単離同定されたのに引き続き、1988年と1990年に相次いでブタ脳より脳性ナトリウム利尿ペプチド（BNP）とC型ナトリウム利尿ペプチド（CNP）が発見され、体液量・血圧調節系としてのナトリウム利尿ペプチドファミリーの生理的・病態生理的意義が注目されるようになり、その臨床応用が期待されている^{1)~3)}。我々は既に、ANPとBNPがそれぞれ主に心房と心室から分泌される心臓ホルモンとして作用するのに対し^{4)~7)}、CNPは血管内皮細胞やマクロファージにおいて産生される局所調節因子として作用することを証明し⁸⁾⁹⁾、強力な利尿、ナトリウム利尿、降圧作用あるいは血管平滑筋細胞増殖抑制作用を有することにより、心不全、心筋梗塞症、高血圧症、動脈硬化症などにおけるナトリウム利尿ペプチドファミリーの病態生理的意義を明らかにしてきた。

本研究は、発生工学的手法により、ナトリウ

ム利尿ペプチドファミリーのトランスジェニックマウスとノックアウトマウスを作製し、ナトリウム利尿ペプチドファミリーの生理的・病態生理的意義の解明を目指すものである。

B. 研究方法

BNPノックアウトマウスを用いた検討

我々は、急性心筋梗塞症における観察や培養心室筋細胞肥大モデルを用いた検討から、心室負荷に対する緊急作動因子としてのBNPの意義に注目してきた¹⁰⁾¹¹⁾。今回は、昨年度に作製したBNPノックアウトマウスの腎動脈起始部直上にて腹部大動脈を27G針の太さに縮窄する心室圧負荷モデルを作製し、心肥大と心筋線維化の程度及び心室における種々の遺伝子発現を検討した。

CNPトランスジェニックマウスの作製

BNP過剰発現トランスジェニックマウスでは長管骨と椎骨の長軸方向への著しい伸長が認められ¹²⁾、マウス胎仔長管骨器官培養系の解析よ

り骨軟骨局所においてCNPが、GC-Bを介して内軟骨性骨化を促進する可能性が示唆されている¹³⁾。今回は、マウスII型コラーゲンプロモーターの下流にマウスCNPcDNA全長を連結した導入遺伝子を作製し、成長板軟骨においてCNPを発現するトランスジェニックマウスを作製した。RT-PCR法にて導入遺伝子及び内因性のCNP遺伝子の発現を検討した。骨格変化は軟X線撮影にて検討し、フィルム上で長さを計測し、骨格の組織学的変化を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究はヒトを対象とした研究は行っていない。また、実験動物を用いた研究では、実験動物飼養及び保管に関する基準、当施設における実験動物委員会の指針に基づき、実験動物愛護を配慮して行った。

C. 研究結果

BNPノックアウトマウスを用いた検討

術後1週間にて、縮窄群では遺伝子型にかかわらず同様の心室肥大が認められた。BNPノックアウトマウスでは心筋線維化に明らかな増悪が認められたのに対して、野生型マウスではこのような所見は認められなかった。心室における遺伝子発現を検討したところ、野生型マウスでは縮窄群において著しいBNP遺伝子発現亢進が認められた。SK α とSERCAの遺伝子発現には、縮窄群では遺伝子型に関係なく同程度の亢進と減弱が認められた。TGF- β_3 およびCol1 α 1遺伝子発現には野生型では明らかな亢進は認められなかったが、BNPノックアウトマウスでは非縮窄群と比較して縮窄群では、それぞれ約4倍および10倍の亢進が認められた。また、ACE遺伝子発現は、非縮窄群と縮窄群のいずれにおいても、BNPノックアウトマウスにおいて亢進していた。以上より、BNPは心室圧負荷に対して迅速に反応し、心筋線維化を抑制していることが明らかになった¹²⁾。

CNPトランスジェニックマウスの作製

今回作製した導入遺伝子を用いて、複数系統のCNPトランスジェニックマウスを得た。このうちサザンブロット法により、内因性のCNP遺伝子は約2.1 kbのバンドとして、導入遺伝子は約3.0 kbのバンドとして検出され、導入遺伝子を有するか否かが確認できた。導入遺伝子を約10コピー有する系統では、RT-PCR法により骨端軟骨に導入遺伝子の発現が検出された。CNPトランスジェニックマウスでは、対照マウスと比較して著しい体幹及び四肢の伸長促進を認めた。特に6週齢頃よりその差は増大し、12週齢の吻腎長は対照マウスと比較して約10%の増加を認めた。また、CNPトランスジェニックマウスのホモ接合体ではヘテロ接合体と比較して、更に伸長促進が認められた。軟X線撮影による検討では、30週齢のCNPトランスジェニックマウスでは、側頭骨、四肢長管骨及び椎骨の長軸方向への伸長促進が認められた。特に伸長促進は近位部において著明であり、上腕骨と大腿骨の長軸方向の長さは、対照マウスと比較して約25%の増加が認められた。組織学的検討により、CNPトランスジェニックマウスでは成長板軟骨層の増大が観察され、更に四肢骨骨端海綿骨における脂肪髄様変化が認められた。

D. 考察

BNPノックアウトマウスを用いた検討

BNPノックアウトマウスの急性心室圧負荷に対する反応を検討し、BNPが急性期心臓ホルモンとして心臓局所で心筋線維化を抑制することが証明された。以上より、急性心筋梗塞症などで急速に増加するBNPが、心室リモデリングで制御することにより病態生理的意義を有することが示唆された。

CNPトランスジェニックマウスの作製

成長板軟骨にCNPを発現するトランスジェニックマウスの作製に成功した。本研究により、

生体においても成長板軟骨局所で発現したCNPが成長板軟骨層を増大し、内軟骨性骨化を促進することが証明された。

E. 結論

ナトリウム利尿ペプチドファミリーのうち、ANPが心房から分泌される循環ホルモンとして、心血管系と腎臓作用して利尿・降圧作用、心肥大抑制作用を発揮すると考えられているが、本研究により、BNPは心室の局所因子として、心筋線維化を抑制し心臓保護作用を有することが示唆された。一方、CNPは骨軟骨局所において、内軟骨性骨化を促進することが明らかになった。本研究で開発・解析したナトリウム利尿ペプチドファミリーの遺伝子操作マウスは、ナトリウム利尿ペプチドファミリーの生理的・病態生理的意義の解明に非常に有用なモデル動物となることが期待される。

引用文献

- 1) K. Nakao, Y. Ogawa, et al. Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system I: Natriuretic peptides. *J Hypertens*, Vol. 10 : 907 - 912, 1992.
- 2) K. Nakao, Y. Ogawa, et al. Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system II : Natriuretic peptide receptors. *J Hypertens*, Vol. 10 : 1111 - 1114, 1992.
- 3) Y. Ogawa, and K. Nakao. Brain natriuretic peptide as a cardiac hormone in cardiovascular disorders. In "Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management" 2nd Edition, edited by J. H. Laragh & B. M. Brenner. Raven Press, New York, 833 - 840, 1995.
- 4) M. Mukoyama, K. Nakao, et al. Brain natriuretic peptide (BNP) as a novel cardiac hormone in humans: Evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system, atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide. *J Clin Invest*, Vol. 87 : 1402 - 1412, 1991.
- 5) N. Tamura, Y. Ogawa, et al. Molecular cloning of hamster brain and atrial natriuretic peptide cDNAs : Cardiomyopathic hamsters are useful models for brain and atrial natriuretic peptides. *J Clin Invest*, Vol. 94 : 1059 - 1068, 1994.
- 6) O. Nakagawa, Y. Ogawa, et al. Rapid transcriptional activation and early mRNA turnover of brain natriuretic peptide in cardiocyte hypertrophy : Evidence for brain natriuretic peptide as an "emergency" cardiac hormone against ventricular overload. *J Clin Invest*, Vol. 96 : 1280 - 1287, 1995.
- 7) N. Hama, H. Itoh, et al. Rapid ventricular induction of brain natriuretic peptide gene expression in experimental acute myocardial infarction. *Circulation*, Vol. 92 : 1558 - 1564, 1995.
- 8) S. Suga, K. Nakao, et al. Endothelial production of C - type natriuretic peptide and its marked augmentation by transforming growth factor - β : Possible existence of "vascular natriuretic peptide system". *J Clin Invest*, Vol. 90 : 1145 - 1149, 1992.
- 9) Y. Komatsu, H. Itoh, et al. Regulation of secretion and clearance of C - type natriuretic peptide in the interaction of vascular endothelial cells and

smooth muscle cells. Hypertension, Vol. 14 : 585 - 592, 1996.

- 10) E. Morita, H. Yasue, et al. Increased plasma levels of brain natriuretic peptide in patients with acute myocardial infarction. Circulation, Vol. 88 : 82 - 91, 1993.
- 11) O. Nakagawa, Y. Ogawa, et al. Rapid transcriptional activation and early mRNA turnover of brain natriuretic peptide in cardiocyte hypertrophy : Evidence for brain natriuretic peptide as an "emergency" cardiac hormone against ventricular overload. J Clin Invest, Vol.96 : 1280 - 1287, 1995.
- 12) N. Tamura, Y. Ogawa, et al. Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide. Proc Natl Acad Sci USA, in press, 2000.
- 13) M. Suda, Y. Ogawa, et al. Skeletal overgrowth in transgenic mice that overexpress brain natriuretic peptide. Proc Natl Acad Sci USA, Vol. 95 : 2337 - 2342, 1998.
- 14) A. Yasoda, Y. Ogawa, et al. Natriuretic peptide regulation of endochondral ossification : Evidence for possible roles of C-type natriuretic peptide / guanylyl cyclase-B pathway. J Biol Chem, Vol. 273 : 11695 - 11700, 1998.

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① M. Kasahara, M. Mukoyama, A. Sugawara, H. Makino, T. Suganami, Y. Ogawa, M. Nakagawa, K. Yahata, M. Goto, R. Ishibashi, N. Tamura, I. Tanaka, and K. Nakao. Ameliorated

glomerular injury in mice overexpressing brain natriuretic peptide with renal ablation. J Am Soc Nephrol, 2000 in press.

- ② N. Tamura, Y. Ogawa, H. Chusho, K. Nakamura, K. Nakao, M. Suda, M. Kasahara, R. Hashimoto, G. Katusura, M. Mukoyama, H. Itoh, Y. Saito, I. Tanaka, H. Otani, M. Katuski, and K. Nakao. Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide. Proc Natl Acad Sci USA, 2000 in press.

G. 知的所有権の取得状況

なし

心血管における2種のエンドセリン受容体発現のスイッチ機構の解析

分担研究者 木村定雄（千葉大学大学院医学研究科高次機能系統合機能学 教授）

G蛋白質共役受容体キナーゼ（GRK）2がG蛋白質共役受容体のリン酸化を介してG蛋白質シグナルの脱感作に寄与していることは、これまで多数報告されている。我々は以前にGRK2及びキナーゼ活性のないGRK2（GRK2-K220W）が、エンドセリンB（ET_B）受容体のリン酸化を介さずにエンドセリン-1（ET-1）刺激によるIP₃産生を抑制することを報告した。本年度はこのGqシグナルの抑制機序を解明するために、GRK2のアミノ末端部のRGS様ドメインの機能を検討した。その結果、GRK2は、G蛋白質共役受容体のリン酸化を介するG蛋白質シグナルの負の調節機構に加えて、アミノ末端部RGSドメインによるリン酸化に依存しないGqシグナル抑制機構を持つことを明らかにした。

A. 研究目的

2種のエンドセリン受容体は作動薬あるいは拮抗薬に対して予期される正常な薬理応答以外に異常とも考えられる高いあるいは低いという多様な薬理応答を示すことがある。それらの現象はエンドセリン受容体が高血圧や動脈硬化・心肥大などの循環器疾患に密接に関与することからなぜそのような異常と思われる薬理応答が生ずるのかを生化学的基盤に立って解明する必要がある。GRK2は種々のG蛋白質共役受容体シグナルを受容体のリン酸化により抑制することが知られている。昨年度は、(1) GRK2とET_B受容体の共発現実験を行った結果、ET_B野性型受容体ではエンドセリン刺激により強い脱感作（細胞内Ca放出能の減弱、IP₃産生の減少）が生じ、βアドレナリン受容体と同様にGRK2によるリン酸化を受け、脱感作と密接な関連を持つことが推定された。しかし、多数のリン酸化部位を含むC末端部を欠損したET_B受容体は効果器への情報伝達は正常であり、脱感作も野性型

と同程度観察されるにもかかわらず、全くリン酸化されなかった。また、GRK2のみならずキナーゼ活性のないGRK2-K220W変異体でもエンドセリンET_B受容体を介したエンドセリン刺激に対するIP₃産性を強力に抑制することが明らかになった。つまり、ET_B受容体はリン酸化されずに抑制されることが明らかになり、GRK2分子内にはキナーゼドメイン以外にも、受容体を抑制する機能部位が存在することが示唆された。

既知の蛋白質キナーゼGRKなどの受容体リン酸化による感受性抑制機構に加えて、最近、三量体G蛋白質活性を調節するRGS（G蛋白質シグナル調節蛋白質）が発見された。RGS蛋白質ファミリーは約120残基のRGSドメイン構造を共通に持ち、G蛋白質αサブユニットと結合して、(1) そのGTPase活性を促進するGAP（GTPase活性化蛋白質）活性あるいは(2) 効果器とG蛋白質αサブユニットの結合を切断する（競合拮抗）活性を持つ。つまり、RGS蛋白質は

活性型G蛋白質のGTPの加水分解を促進してGDP結合型G蛋白質にして不活性化したり、G蛋白質 α と効果器との結合を遮断(効果器拮抗剤)して、最終的には受容体機能を低下(脱感作)させると推定されている。RGS蛋白質は、線虫や酵母において産卵能や増殖能の抑制を行う物質として同定されたが、現在、高等動物においてもこのファミリーに属する約20種の蛋白が報告されており、脱感作現象に關与するG蛋白質共役受容体情報の新しい調節因子としてその解明が期待されている。

従来受容体のリン酸化により脱感作に關与するとされていたGRK2分子が上述のようにリン酸化非依存性の抑制特性をもつ生化学的基盤はなぜかを考慮して、GRK2分子構造をよく解析してみると、1996年にSiderovskyらが指摘したように、N末端部に特殊な構造部があり、1997年以降に発見された上記RGS蛋白質中のRGSドメインと約30%の相同性があることが判明した。そこで、本研究では、種々のGRK2変異体を作製し、そのGRK2のN末端部RGS様ドメインが他のRGS蛋白質と同様にG蛋白質 α と結合するかどうか、また、抑制活性をもつかどうかを解析した。

B. 研究方法

GRK2の種々の deletionconstruct (GRK2、キナーゼ活性のない変異体GRK2-K220W、キナーゼ・PHドメイン欠損変異体GRK(1-181)、N末端部RGS様ドメインGRK2(54-174)、RGSドメイン破壊変異体GRK2(1-80)、GRK2(1-63)、C末端部PHドメイン含有変異体GRK2(505-689))を作成し、アンジオテンシンAT1a受容体を安定発現した293T細胞(293T/AT1a)に一過性に発現させ、ET-1及びAngiotensin II(AngII)に対する細胞内Ca応答の抑制について検討した。GRK2変異体とG蛋白質 α サブユニットの結合特性の解析は、293T/AT1a細胞よ

り調製した膜にHis6-tag付GRK2、His6-tag付GRK2(1-181)を加えて種々の条件下で反応し、可溶化・キレート樹脂処理・SDS-PAGE・ウェスタンブロット後、RGSと結合するG蛋白質 α サブユニットを各種特異的抗体で検出した。逆に、His6-tag付Gqサブユニットと結合するGRK2変異体の解析は、種々のGRK2変異体と共に一過性に発現した293T細胞の膜を上記方法と同様に解析した。

(倫理面への配慮)

本研究はヒトを対象とした研究は行っていない。また、実験動物を用いた研究では、実験動物飼養及び保管に関する基準、当施設における実験動物委員会の指針に基づき、実験動物愛護を配慮して行った。

C. 研究結果

(1) 種々のGRK2変異体を発現する細胞内Ca濃度の測定

GRK2だけでなく、キナーゼ活性のないGRK2-K220WでもAng IIあるいはET-1刺激による細胞内Ca応答の抑制が強く見られた。さらにキナーゼドメインを含まないN末端GRK2(1-181)やRGSドメイン部GRK2(54-174)でも全長GRK2と同等の強いCa応答の抑制が認められた。

(2) GRK2、GRK2(1-181)とG蛋白質 α サブユニットの結合解析

全長His6-GRK2とHis6-GRK2(1-181)は共に選択的にGqサブユニットと結合し、Gi/oやGsとは結合しなかった。その結合はGDP・AlF4存在下でのみ観察され、G蛋白質 α のGDP/GTP遷移状態で結合することが判明した。

(3) GqサブユニットとGRK2変異体との結合解析

GqサブユニットはRGSドメインを含むGRK2、GRK(1-181)、GRK2(54-174)と結合し、RGSドメイン破壊変異体GRK2(1-80)、

GRK2 (1-63)、C末端部PHドメイン含有変異体GRK2 (505-689)とは結合しなかった。

D. 考察

GRK2の分子構造は大きく3部分に分けることができ、受容体と相互作用すると推定されているが機能不明のN末端部(約185残基)、中間に存在するリン酸化能を持つキナーゼ部(約260残基)、そしてC末端部にG蛋白質bgサブユニットや $IP_3 \cdot PIP_2$ を結合するPHドメイン部よりなっている。GRK2のN末端部の構造ホモロジー検索を行うと、ドメイン部でRGS10、RGS12、RGS2と約20%が同一で類似を含めると最終約30%のホモロジーであった。つまり、相同性は低いがRGS様ドメインは存在することが判明した。次に、GRK2のRGS様ドメイン部を含むGRK2変異体を発現させて機能解析を行うと、Ang IIあるいはET-1による細胞刺激による細胞内Ca濃度上昇は、GRK2、GRK2-K220Wだけでなく、RGS様ドメインを含むGRK2 (1-181)、GRK2 (54-174)でも同等に強く抑制した。この結果はGRK2のRGS様ドメインがGq/G11シグナルの抑制作用を持つことを示している。おそらく、RGSドメインのGAP活性あるいは効果器拮抗作用により、Gqシグナルの抑制作用を発揮すると考えられる。しかし、このことは、GRK2のキナーゼ活性が全長GRK2の抑制活性に不必要であることを示すわけではない。GRK2のRGS様ドメインはGqと選択的に結合し、他のG蛋白質 α とは結合しなかった。このことはGRK2が示すGsシグナルの抑制はいかにしてなされるか解明すべき今後の問題である。今回、我々が示したGRK2分子内のRGSドメインがG蛋白質 α と結合するという特性は、重要な可能性を提起している。つまり、これまで7回膜貫通受容体がりガンドにより活性化されると、受容体キナーゼGRKが活性化されるのは古くから知られているが、いかに受容

体の活性化がGRKを活性化させるのかは不明のままであった。しかし、本研究により、受容体活性化後、G蛋白質 α (Gq)が活性化され、その活性化状態のG α にGRK2のRGS様ドメインが結合することでリン酸化能(キナーゼ活性)が上昇することが考えられる。つまり、受容体/G蛋白質/GRK2という情報の流れが存在することが明らかになった。今後、GRK2のRGSドメインがいかにGRK2のリン酸化機能(キナーゼ活性)に関与するかが問題になると思われ、現在それを検討している。

E. 結論

GRK2は、G蛋白質共役受容体のリン酸化を介してG蛋白質シグナルの負の調節を行うだけでなく、アミノ末端RGSドメインによるリン酸化に依存しないGqシグナル抑制機構を持つことを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① T. Shibasaki, K. Moroi, M. Nishiyama, J. Zhou, A. Sakamoto, T. Masaki, K. Ito, T. Haga, S. Kimura. Characterization of the carboxyl-terminal truncated endothelin B receptor coexpressed with G protein-coupled receptor kinase 2. *Biochem Mol Biol Int*, 47: 569-77, 1999.
- ② H. Usui, M. Nishiyama, K. Moroi, T. Shibasaki, J. Zhou, J. Ishida, A. Fukamizu, T. Haga, S. Sekiya, S. Kimura. RGS domain in the amino-terminus of G protein-coupled receptor kinase-2 inhibits Gq-mediated signaling. *Int J Mol Med*, 2000 (in press)

2. 学会発表

- ① 西山真理子、諸井佳代子、碓井宏和、周静、関直彦、石田純治、深水昭吉、木村定雄. G蛋白質シグナル調節因子、RGS5の基本特性および機能の解析. 第72回日本生化学会年会 平成11年10月9日(横浜)生化学 71巻8月号 p1060 (1999)
- ② 碓井宏和、西山真理子、諸井佳代子、柴崎忠雄、周静、石田純治、深水昭吉、芳賀達也、関谷宗英、木村定雄. GRK2のキナーゼドメインを含まないN末端部はGqシグナルを抑制する. 第72回日本生化学会年会 平成11年10月9日(横浜)生化学 71巻8月号 p1061 (1999)
- ③ 碓井宏和、西山真理子、諸井佳代子、柴崎忠雄、周静、石田純治、深水昭吉、芳賀達也、関谷宗英、木村定雄. GRK2アミノ末端部のRGSドメインはGqシグナルを抑制する. 第73回日本薬理学会年会 平成12年3月23日(横浜) Jpn J Pharmacol, 82 (Suppl.I), 54P (2000)
- ④ 周静、諸井佳代子、西山真理子、碓井宏和、周静、関直彦、石田純治、深水昭吉、木村定雄. G蛋白質共役受容体シグナルのRGS5による制御機構の解析. 第73回日本薬理学会年会 平成12年3月23日(横浜) Jpn J Pharmacol, 82 (Suppl.I), 145P (2000)

G. 知的所有権の取得状況

なし

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

コレステロール代謝関連受容体の発現調節に関する研究

分担研究者 宮本 薫（福井医科大学生化学第2講座 教授）

老化に伴い増加してくる動脈硬化、心筋梗塞などの疾患には、血管平滑筋細胞へのコレステロールの取り込みが深く関与している。HDLを介するコレステロールの取り込みは、HDL 特異的受容体であるSR-BI (Scavenger Receptor Class B TypeI) を介して行われると考えられるようになってきた。本研究では、SR-BIのラット卵巣からのクローニング、構造決定および発現調節の解析を行った。SR-BI遺伝子の発現には、上流-140bp付近にある3カ所のGCボックスが必須であることを明らかにした。また本研究により、SR-BI遺伝子の転写調節は、他のステロイド合成遺伝子群とは異なりSp1ファミリーが重要な役割を果たしていることを明らかにした。

A. 研究目的

老化に伴い、動脈硬化や心筋梗塞などの疾患も急激に増加傾向をしめす。これらの疾患による死亡は、これからの高齢化社会を迎えて益々増加してくるものと想定される。そのため、動脈硬化や心筋梗塞などの疾患の原因となる因子の動態を明らかにしてゆく事が求められている。これらの疾患には血管平滑筋細胞へのコレステロールの取り込みが深く関与している事はよく知られている。コレステロールの取り込みは主にLDL受容体及びHDL受容体を介して行われる。特に最近注目されているのはHDL受容体を介してのコレステロールの取り込みである。これは最近新たに見いだされたHDL (High Density Lipoprotein) 特異的受容体であるSR-BI (Scavenger Receptor Class B TypeI) を介して行われると考えられるようになってきた。HDL受容体からのコレステロールの取り込みは肝臓ではコレステロールの逆輸送

に、卵巣などのステロイド合成組織では、ステロイド合成のためのコレステロール基質の供給に重要な役割を果たしている。私共はSR-BI遺伝子をラット卵巣からサブトラクショナルクローニングによってクローニングし、その構造を決定した。本研究の目的は、SR-BI遺伝子の上流転写調節領域を単離し、SR-BI遺伝子転写に関わる諸因子を明らかにすることで、SR-BI遺伝子の生体内での発現調節機構を明確にして行くことである。

B. 研究方法

前年度までの研究により、ラット卵巣cDNAライブラリーからSR-BI遺伝子をクローニングし、その全塩基配列を決定した。本年度の研究では、その塩基配列の情報をもとにDNAゲノミックウォーキングキットを用いてSR-BI遺伝子上流領域をクローニングした。0.8kb及び2.3kbのDNA断片を得、その塩基配列を決定した。次

にこのSR-BI遺伝子の転写開始点を決定するため、プライマーエクステンションを行った。プライマーエクステンションは幼若メスラットにPMSG投与した卵巣からのmRNAを用いて解析した。またプローブはエクソン1内の20bpの塩基配列をもつオリゴヌクレオチドをラベルして使用した。

SR-BI遺伝子の転写調節領域を同定するため、様々な長さを持つディレーションミュータントを作製し、それぞれをルシフェラーゼベクターに組み込んでその転写活性を測定した。細胞はステロイド合成能を持つマウスLeydig細胞由来のMA-10細胞及び副腎由来のY1細胞、肝臓由来のHepG2細胞等を用いた。それぞれのコンストラクトを組み込んだベクターを細胞にトランスフェクトし、48時間培養したのち、細胞を抽出してそのルシフェラーゼ活性をルミノメーターで測定した。また転写因子Sp1の関与を明らかにするため、Sp1ファミリーの欠損した昆虫細胞SL2を用いて、SR-BI遺伝子発現におけるSp1ファミリーの役割を検討した。

上記のルシフェラーゼアッセイで同定したSR-BI遺伝子転写に必須の領域を解析したところ、3つのGCボックスが存在することが明らかとなった。そこで、この3つのGCボックス内で塩基配列の置換を行いミュータント遺伝子を作製した。このコンストラクトをルシフェラーゼベクターに組み込んで、これら3つのGCボックスのSR-BI遺伝子発現における役割をルシフェラーゼアッセイを用いて明らかにした。

さらに、3つのGCボックスに対応する塩基配列をもつ2本鎖オリゴヌクレオチドを合成し、それぞれをラベルしたものをプローブとして用いてゲルシフトアッセイを行った。核抽出標品は、マウスLeydig細胞由来のMA-10培養細胞から、定法に従って調製した。またスーパーシフト解析は、Sp1及びSp3に対する抗体をもちいて行った。

(倫理面への配慮)

本研究はヒトを対象とした研究は行っていない。また、実験動物を用いた研究では、実験動物飼養及び保管に関する基準、当施設における実験動物委員会の指針に基づき、実験動物愛護を配慮して行った。

C. 研究結果

SR-BI遺伝子の転写開始点を決定するため、プライマーエクステンションを行った結果、単一の転写開始点が翻訳開始点の上流128bpに存在することが明らかとなった。次にDNAゲノミックウォーキングキットを用いてSR-BI遺伝子上流領域をクローニングした結果、0.8kb及び2.3kbのDNA断片を得ることができた。塩基配列の解析から、プライマーエクステンションで決定された転写開始点の上流30bpにTATAボックス様配列が存在し、基本転写因子群がここに結合しプロモーターとして働くことが示唆された。さらにその上流（転写開始点から141bpまで）に3カ所のSp1ファミリーが結合すると予想されるGCボックスが存在する事が明らかとなった。様々な長さを持つディレーションミュータントを用いたルシフェラーゼにより、この3カ所のSp1結合サイトがSR-BI遺伝子発現に必須であることを示した。この3カ所のSp1結合サイトを欠失したコンストラクトは、殆どルシフェラーゼ活性を示さない。次にそれぞれのSp1結合サイトの重要性をミュータントジーンを用いて検討したところ、特にボックス1及びボックス3が重要であることが明らかとなった。EMSAアッセイではMA-10細胞の核抽出物中に、これらのボックス1からボックス3と結合する蛋白質が検出された。MA-10細胞中の結合蛋白質の性質を明らかにするために、Sp1及びSp3に対する特異的な抗体を用いてスーパーシフトアッセイを行った。その結果、ボックス1及びボックス3にはSp1とSp3の両方

が結合していることが明らかとなった。ボックス2にもSp1、Sp3が結合するが、ルシフェラーゼアッセイの結果からも予想されるとおり、弱い結合であった。これらの結果から、SR-BI遺伝子上流には、その転写を促進する領域が存在し、その塩基配列から3カ所のGCボックスの役割が示唆された。実際それらのGCボックスにはSp1及びSp3が結合していることを示したが、Sp1あるいはSp3がSR-BIの転写を促進するかどうかを最後に検証した。Sp1およびSp3は、殆どのは乳動物細胞で多く発現しているため、強制発現によって、その効果を観察することは難しい。そこで、Sp1ファミリーを発現していない、昆虫細胞の一種であるSL2細胞を用いて、Sp1およびSp3を強制発現させ、それらのSR-BI遺伝子転写活性に及ぼす影響を観察した。その結果、Sp1及びSp3は共にSR-BI遺伝子の転写を著しく促進する事が明らかとなった。HDL受容体である、SR-BIの転写調節にはSp1ファミリー重要な役割を担っていることを初めて明らかにすることが出来た。

D. 考察

動脈硬化のおもな成因として血管内膜層へのマクロファージの浸潤とそれに伴う血管平滑筋細胞およびマクロファージへのコレステロール取り込みによる泡沫化が挙げられる。動脈硬化巣へのコレステロールの取り込みは血中LDLが主要な役割を果たしているが、この過程に、最近スカベンジャー受容体クラスBIと呼ばれるHDL受容体も深く関わっていることが明らかにされてきている。我々は今回卵巣におけるコレステロール取り込みとそれに続くステロイド合成にかかわる遺伝子群をサブトラクショナルクローニング法を用いて数多く単離し、それらの中にSR-BI遺伝子が含まれることを発見した。一連のステロイド合成酵素群に加えて、コレステロール輸送に関連すると思われる遺伝子群が

単離された。一つは、細胞内でコレステロールをミトコンドリア外膜から内膜に輸送する蛋白質として注目を集めるStARであり、もう一つがSR-BIであった。SR-BIの遺伝子発現調節についてはあまり知られていないが、少なくとも卵巣においてはゴナドトロピンの支配下にあり、他のステロイド合成関連遺伝子と同じ調節を受けている事が示唆される。また、その組織内局在もtheca interna細胞に限局しており、他のステロイド合成関連遺伝子群の局在と一致する。これらの事実はSR-BI遺伝子が卵巣においてはステロイド合成関連遺伝子として機能していることを示している。一方肝臓においては、HDL受容体はコレステロールのリバースアップテイクによって血中コレステロール値の調節を行っていると考えられている。これはSR-BIが卵巣と肝臓において全く異なる発現調節を受けていることを表している。一つの遺伝子の発現がどのようなメカニズムで全く異なる調節を受けるかを明らかにすることが、SR-BIの動脈硬化症における役割を知る上で必要不可欠であると考えられる。そこで本研究では、SR-BI遺伝子の発現調節を明らかにする目的で、SR-BI遺伝子上流域を単離した。この上流域を用いた実験から、転写因子の一種であるSp1及びSp3がSR-BI遺伝子の転写調節に深く関わることを明らかにした。一方もう一つのステロイド合成関連遺伝子であるStARの遺伝子発現調節にはSF-1が関与する事が示唆されており、同じステロイド合成関連遺伝子でもSR-BIとStARとではその制御が異なることが示唆された。

E. 結論

新しいHDL (High Density Lipoprotein) 受容体であるSR-BI (Scavenger Receptor Class B-I) をラット卵巣からクローニングしその遺伝子発現調節機構を明らかにした。SR-BI