Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

Molecular Isolation and Characterization of Novel Four Subisoforms of ECE-2

池田, 尚子

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2002-03-31
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲2603
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002603

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

【１２６】

氏　名・（本　籍）　池田　尚子（京都府）

博士の専攻分野の名称　　博　士　（医学）

学　位　記　番　号　　博い第１４４８号

学位授与の　要　件　　学位規則第４条第１項該当

学位授与の　日　付　　平成１４年３月３１日

【学位論文題目】

Molecular Isolation and Characterization of Novel Four Subisoforms of ECE-2

(４つの新規ＥＣＥ－２サブアイソフォームの単離および解析)

審　査　委　員

主査　教授　松尾　雅文

教授　横山　光宏　　教授　久野　高義

<緒言>

エンドセリン変換酵素(ECE)は心血管疾患を含む種々の疾患の病態に関与するエンドセリン(ET)-1 合成系の最終律速段階で働く酵素であり、現在までに ECE-1、ECE-2 の 2 つのアイソフォームが報告されている。これら ECE-1、ECE-2 は共に短い細胞内ドメイン、一つの膜貫通ドメイン、そして酵素活性を規定している長い細胞外ドメインから成る II 型膜結合型メタロプロテアーゼである。ECE-2 は ECE-1 と 5 9 %の相同性を有し、ECE-1 と同様に ET-1 を合成するが、大きく異なる点はその酵素活性至適条件が pH5.5 と酸性条件である事である。このことは ECE-2 が細胞内の pH が酸性の器官もしくは酸性条件における ET 合成に関与することを示唆している。最近、ECE-2 は培養ヒト血管内皮細胞を始め、心臓、肺、肝臓など様々な臓器において発現していることが報告され、また心臓の発生において重要な働き有することが明らかとなった。

II 型膜結合型メタロプロテアーゼファミリーに属する ECE-1 やニュートラルエンドペプチダーゼ（NEP）および我々が以前クローニングに成功した Soluble Secreted Endopeptidase（SEP）には数種類のサブアイソフォームの存在が報告されている。組織特異的なサブアイソフォームの発現や機能的に異なるサブアイソフォームの存在はその生理作用の多様性に密接に関与しており、サブアイソフォームの単離、解析はその物質の生理機能の解明に重要な情報をもたらすと考えられる。現在まで ECE-2 についてはサブアイソフォームの存在は報告されていない。今回、私達は新規 ECE-2 サブアイソフォームの単離に成功し、その組織分布や細胞内局在の解析を行った。

<方法>

ヒト、マウス、ラットの ECE-2cDNA は cDNA ライブラリーのスクリーニング法によりクローニングを行い、サイクルシークエンス法にてその塩基配列を決定した。

新規サブアイソフォームを単離する為、ウシ ECE-2 の cDNA 配列を元にプライマーを設計し、ウシ大脳から調整した RNA を用いて 5 プライム RACE を行った。得られた PCR 産物は TA クローニングベクターにサブクローニングし、サイクルシークエンス法にてその塩基配列を決定した。

各サブアイソフォームの組織発現の解析は様々なウシ組織由来の RNA を用いた RT-PCR 法により行った。得られた PCR 産物はアガロースゲルにて分離し、各 DNA 断片を切り出し、その塩基配列を確認した。

サブアイソフォームの細胞内局在の解析には CHO-K1 細胞を用い、発現コンストラクトの形質導入はリポフェクタミンを使用して行った。形質導入の確認はウサギ抗 ECE-2 血清を一次抗体としたウエスタンブロッティング法にて行った。形質導入が確認された CHO-K1 細胞をスライドグラス上で培養し、細胞表面及び細胞内における発現を免疫染色法にて解析した。

<結果>

ウシ及びヒト、マウス、ラットの ECE-2 の塩基配列を比較した結果、ウシ ECE-2 のみが他の種と相同性の低い細胞内ドメインを有することが明らかとなった。これより ECE-2 にも ECE-1 と同様に細胞内ドメインの異なるサブアイソフォームが存在する可能性が考えられた。

ウシ大脳から調整した RNA を用いた 5 プライム RACE 法により、私達は新規ウシ ECE-2 の単離に成功した。この新規ウシ ECE-2 はヒト、マウス、ラットの ECE-2 と高い相同性を示す細胞内ドメインを有しており、私達は元のウシ ECE-2 を ECE-2a、新たに単離したサブアイソフォームを ECE-2b と名付けた。

様々なウシ臓器から調整した RNA を用いて、各サブアイソフォームの組織分布を検討した。ECE-2a、ECE-2b の塩基配列を元に遺伝子特異的プライマーを設計し、RT-PCR を行ったところ、予想されたサイズの PCR 産物と共に、異なる大きさの PCR 産物が数種類得られた。これら PCR 産物の塩基配列を解析した所、ECE-2a、ECE-2b 各々にさらに同一の 2 9 アミノ酸が挿入されたサブアイソフォームが存在する事が明らかとなった。私達はこれら 4 つのウシ ECE-2 サブアイソフォームを ECE-2a-1、ECE-2a-2 及び ECE-2b-1、ECE-2b-2 と名付けた。ECE-2a-1 は肝臓、腎臓、副腎、精巣、および血管内皮細胞等の様々な臓器において発現していたが ECE-2b-2 は脳と副腎にその発現が限局している事が明らかとなった。ECE-2a-2、ECE-2b-1 は各々 ECE-2a-1、ECE-2b-2 と同様の組織分布を示したが、その発現量は非常に少なかった。

GenBank の EST データベースを検索した結果、ウシ ECE-2a と高い相同性を示すマウスの遺伝子断片を発見した。このマウス EST と cDNA スクリーニング法で得たマウス ECE-2 cDNA の塩基配列を元に遺伝子特異的プライマーを設計し、マウス脳由来の RNA を用いて RT-PCR を行った。その結果、マウスにおいてもウシ ECE-2 サブアイソフォームと高い相同性を示す 4 つのサブアイソフォームの単離に成功し、ECE-2 サブアイソフォームの存在は種特異的なものではないことが明らかとなった。

4 つの ECE-2 サブアイソフォームの中で発現が高い ECE-2a-1、ECE-2b-2 の発現コンストラクトを CHO-K1 細胞に形質導入し、これらの ECE-2 サブアイソフォームの細胞内局在を免疫染色法にて解析した。ECE-2a-1、ECE-2b-2 いずれのアイソフォームも細胞

表面には発現しておらず、細胞内のゴルジ器官や分泌顆粒と考えれる部位にその発現を認めたが２つのサブアイソフォーム間で細胞内局在に大きな差は認められなかった。

＜考察＞

今回私達は４つの新規 ECE-2 サブアイソフォームの単離に成功し、その組織発現と細胞内局在について解析を行った。ECE-2 サブアイソフォームの組織分布の検討では ECE-2a-1、ECE-2a-2 は肝臓、腎臓、副腎、精巣、および血管内皮細胞等の様々な臓器で発現し、ECE-2b-1、ECE-2b-2 は脳および副腎に限局した発現であった。このことは ECE-2 サブアイソフォームは臓器、組織特異的に発現が制御されている可能性を示唆している。

最近、遺伝子ターゲッティングマウスを用いた研究により ECE-2 はマウス胎児期の心血管器官形成に関与している事が報告された。私達の RT-PCR の結果では、心血管において ECE-2a-1 が優勢に発現しており、４つのサブアイソフォームの中でも ECE-2a-1 が特に心血管器官形成に関与していると考えられた。又、培養ヒト血管内皮細胞の分泌顆粒において ECE-2 の発現が報告されているが、ECE-2a-1 が血管内皮細胞における主なエンドセリン合成に関与する ECE-2 サブアイソフォームである事が示唆された。一方、ECE-2b は脳、副腎といった神経系器官に特異的な発現を示しており、これまでの ECE-2 の脳内でカテコラミン分泌顆粒における発現の報告と併せ、ECE-2b が神経細胞における神経伝達物質の合成に関与する可能性が示唆されたが、その詳細については更なる研究が必要と考えられる。

培養細胞を用いた免疫染色では、ECE-2a-1、ECE-2b-2 共に細胞内に限局した発現が確認され、これらサブアイソフォームは共に細胞内における ET-1 合成に関与すると考えられた。またこれら２つのサブアイソフォーム間における細胞内局在に大きな差違は認められなかったが、ECE-2a-1 および ECE-2b-1 はそれぞれ２つもしくは１つのロイシンモチーフ(LL)を細胞内ドメインに有し、ECE-2a-2、ECE-2b-2 はロイシンモチーフに加えタイロシンモチーフ（YKRA）を細胞内ドメインに有している。これらの配列は細胞内における蛋白輸送に関与する配列であることが報告されており、ECE-2 サブアイソフォームの細胞内局在および細胞内輸送についてはより詳細な検討が必要であると考えられる。

エンドセリンは高血圧、心不全等の心血管疾患を含む様々な疾患の病態に関与することが報告されており、ECE 阻害剤はこれら疾患の新しい治療薬として注目されている。今回私達が報告した ECE-2 サブアイソフォームの詳細な解析は選択性の高い ECE 阻害剤の開発に重要な情報をもたらすと考えられる。

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第１４５１号	氏　名	池田　尚子
論文題目	Molecular Isolation and Characterization of Novel Four Subisoforms of ECE-2 ４つの新規 ECE-2 サブアイソフォームの単離および解析		
審査委員	主　査　松尾雅文 副　査　横山光宏 副　査　久野高義		
審査終了日	平成　１４年　４月　１９日		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

エンドセリン変換酵素(ECE)は、心血管疾患を含む種々の疾患の病態に関与するエンドセリン(ET)-1合成系の最終律速段階で働く酵素である。現在までにECEにはECE-1とECE-2の2つのアイソフォームが存在することが知られている。さらに、その生理作用の多様性からサブアイソフォームが存在することが示唆されていた。本研究は、ECE-2の4つの新規サブアイソフォームの単離に成功し、その組織分布や細胞内局在の解析を行ったものである。

ウシ大脳から調整したRNAを基盤として5プライムRACE法を実施することにより、ウシECE-2の新規サブアイソフォームの単離に成功した。この新規ウシECE-2はヒト、マウス、ラットのECE-2と高い相同性を示す細胞内ドメインを有していた。そこで、既知のウシECE-2をECE-2a、新たに単離したサブアイソフォームをECE-2bと名付けた。

様々なウシ臓器から調整したRNAを用いて、各サブアイソフォームの組織分布を検討した。ECE-2a、ECE-2b の塩基配列を元に遺伝子特異的プライマーを設計し、RT-PCRを行った。驚くべきことに、予想されたサイズのPCR産物と共に、異なるサイズのPCR産物が得られた。これらPCR産物の塩基配列を解析した所、ECE-2a、ECE-2bの各々に同一の29アミノ酸が挿入された別のサブアイソフォームが存在する事が明らかとなった。これら4つのウシECE-2のサブアイソフォームをECE-2a-1、ECE-2a-2及びECE-2b-1、ECE-2b-2と名付けた。ECE-2a-1は肝臓、腎臓、副腎、精巣、および血管内皮細胞等の様々な臓器において発現していたがECE-2b-2は脳と副腎にその発現が限局している事が明らかとなった。また、これらと29アミノ酸の違いがあるECE-2a-2、ECE-2b-1はそれぞれECE-2a-1、ECE-2b-2と同様の組織分布を示した。しかし、その発現量は非常に少なかった。

ウシECE-2aと高い相同性を示すマウスの遺伝子断片をGenBankのESTデータベース内で発見した。このマウスESTとcDNAスクリーニング法で得たマウスECE-2 cDNAの塩基配列を元に遺伝子特異的プライマーを設計し、マウス脳由来のRNAを用いてRT-PCRを行った。その結果、マウスにおいてもウシECE-2サブアイソフォームと高い相同性を示す4つのサブアイソフォームの単離に成功し、ECE-2サブアイソフォームの存在は種特異的なものではないことが明らかとなった。

4つのECE-2サブアイソフォームの中で発現が高いECE-2a-1、ECE-2b-2の発現コンストラクトをCHO-K1細胞に形質導入し、これらのECE-2サブアイソフォームの細胞内局在を免疫染色法にて解析した。ECE-2a-1、ECE-2b-2いずれのアイソフォームも細胞表面には発現しておらず、細胞内のゴルジ器官や分泌顆粒と考えれる部位にその発現を認めたが2つのサブアイソフォーム間で細胞内局在に大きな差は認められなかった。

本研究は、エンドセリン変換酵素（ECE）の1つのアイソフォームであるECE-2についてそのサブアイソフォームを研究したものであるが、ECE-2に4つのサブアイソフォームがあることを明らかにするとともに、それぞれのサブアイソフォームの組織分布を明らかにする重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。