

9241 ナトリウム利尿ペプチドファミリーの生理的並びに臨床的意義に関する研究

助成研究者:中尾 一和(京都大学 医学部)

共同研究者:井村 裕夫(京都大学)

ナトリウム利尿ペプチドファミリーは、心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)、脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)、及びCタイプナトリウム利尿ペプチド(CNP)から構成され、心臓ホルモン、神経ペプチドあるいは局所調節ホルモンとして、血圧・体液量調節に関与している。我々は、心不全や高血圧症といった食塩負荷状態の認められる疾患において、心臓におけるANP及びBNP遺伝子発現が著しく亢進していることを証明し、また、ANPやBNPを心不全患者に投与することで体内での異常な塩分貯留が是正され病態改善効果をもたらすことも報告した。今回、ナトリウム利尿ペプチドファミリーの食塩代謝における生理的並びに臨床的意義について、主に分子生物学的手法を用いて検討した。

1. ナトリウム利尿ペプチドファミリー遺伝子過剰発現動物の開発: 我々は、ヒト及びラットBNPの単離同定に成功しているが、その結果BNPは種によって著しくその一次構造が異なり、リガンドと受容体の構造活性相関に著しい種族差が存在することを明らかにした。そこでBNPトランスジェニックマウスの開発に向け、マウスBNPの遺伝子クローニングを行った。マウスBNP遺伝子は、3つのエクソンと2つのイントロンから構成され、5'非翻訳領域には、ATG翻訳開始コドンから約100bp上流に典型的なTATAAA配列(TATA box)が認められた。Primer extension法により決定した転写開始点は、TATA boxから30bp下流のcytosineであった。また3'非翻訳領域には、BNP遺伝子に特徴的なmRNAの不安定化に関与するとされるATTTA反復配列が認められた。マウスprepro BNPは、ラットprepro BNPと78%の相同性を認めたが、プロセッシング後のマウスBNPとラットBNPは64%の相同性しか認められず、これはマウス及びラットANPの構造が同一であると極めて対照的であった。マウスBNP mRNA (0.9kb)は、心房・心室において検出され、その濃度は心房・心室でほぼ同程度であった。組織重量を考慮すると心室がBNPの主要な産生部位であることが明らかとなった。

得られたマウスBNP遺伝子をヒトSerum amyloid Pのプロモーターに結合し発現ベクターを作成しマウス卵母細胞(C56 B1/6J)に注入することで、15匹のFo世代BNP遺伝子導入マウスを得た。これらFo世代マウスは、1~2コピーより最高100コピーまで種々のコピー数を有していることが明らかとなった。現在、これらFoマウスにおける導入ヒトBNP遺伝子の発現量を、導入されたコピー数と対比しつつ検討し継代可能なBNPトランスジェニックマウスの開発を進めている。

2. ナトリウム利尿ペプチドファミリー遺伝子発現調節の解析: 我々はこれまで、ANPは主として、心房より、BNPは心室より生合成、分泌される心臓ホルモンである事を明らかにした。一方、CNPは神経ペプチドとして作用すると考えられていたが、我々は最近このCNPが血管内皮細胞より分泌されている事を発見し、CNPが血管内皮由来弛緩因子としても作用する可能性を明らかにしてきた。このようにナトリウム利尿ペプチドファミリーには組織特異的な遺伝子発現機構が存在する。そこで、食塩摂取によるナトリウム利尿ペプチドファミリー遺伝子発現亢進の分子機構の解明を目指し、既に明らかにされているANPの遺伝子構造に加えて、ヒトのBNP、CNPの5'隣接領域を含む遺伝子構造を決定した。

クローニングしたヒトBNP遺伝子3.5kb断片の5'隣接領域約1.8kbには典型的なTATA boxは存在せず、Primer extension法にて決定された転写開始点より30kb及び80bp上流にGATAAAの配列が認められた。またAP-1結合部位、CTrich領域、cAMP応答因子様配列が存在し、更に複数のacute phase regulatory elementsが認められた。既に報告されているヒトANP遺伝子5'隣接領域との間に相同性を認めず、心臓ホルモンであるANP、BNPは心臓において異なった遺伝子発現調節を受けていると考えられた。一方ヒトCNP遺伝子は少なくとも2つのエクソンと1つのイントロンより成ると考えられ、その5'隣接領域には、inverted CCAATボックス、GCボックス、cAMP応答因子様配列等を認めた。また、このCNP遺伝子によりコードされるヒトpreproCNPは126個のアミノ酸より成り、23個のシグナルペプチドを有し、proCNPは、それぞれLeu49-Arg50及びLys80-Lys81のC端側でプロセッシングを受け、CNP-53及びCNPが合成されると考えられた。

現在、得られたヒトBNP及びCNP5'隣接領域の種々のdeletion mutantを作成しこれらをCAT発現ベクターに組み込み、培養ラット心室筋細胞あるいは血管内皮細胞にトランスフェクションしてその転写活性を検討中であり、ナトリウム利尿ペプチドの組織特異的発現の分子レベルでの解明を進めている。

9241 ナトリウム利尿ペプチドファミリーの生理的並びに臨床的意義に関する研究

助成研究者:中尾 一和(京都大学 医学部)

共同研究者:井村 裕夫(京都大学)

【研究目的】

1984年、ヒト、ラット心臓の心房組織より強力な利尿・ナトリウム利尿・血管平滑筋弛緩作用を有する心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)が分泌されていることが発見され、1985年我々はいち早くこのANPが脳にも存在し、食塩嗜好性の抑制を含む中枢性の水電解質・血圧調節作用を有する神経ペプチドとしても作用していることを世界に先駆け証明した。この発見が端緒となり、1988年にはブタ脳より脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)、1990年には同じくブタ脳よりCタイプナトリウム利尿ペプチド(CNP)が発見され、体液量血圧調節に関与する心臓ホルモン及び神経ペプチドとしてのナトリウム利尿ペプチドファミリーの生理的、病態生理的意義が益々注目されるようになり、その臨床応用が期待されている。

我々は、これまで分子生物学的手法を用いて各ナトリウム利尿ペプチド及びナトリウム利尿ペプチド受容体(少なくともANP-A, ANP-B及びC受容体の3種類が存在する)の遺伝子発現をヒト、ラット等の体内各組織において詳細に検討した。更に、心不全や高血圧症といった食塩負荷状態の認められる疾患において、心臓におけるANP及びBNP遺伝子発現が著しく亢進していることも証明した。また、ANPやBNPを心不全患者に投与することで体内での異常な塩分貯留が是正され病態改善効果をもたらすことも報告し、ナトリウム利尿ペプチドの臨床応用面でも世界をリードしてきた。

本研究は、1984年以来研究を続けてきた心臓ホルモン及び神経ペプチドとしてのナトリウム利尿ペプチドファミリーの食塩摂取(食塩嗜好性を含む)や食塩代謝における生理的並びに臨床的意義について、主に分子生物学的手法を用いて検討するものである。

【研究方法及び結果】

1. ナトリウム利尿ペプチドファミリー遺伝子過剰発現動物の開発

食塩摂取(食塩嗜好性)や食塩代謝におけるナトリウム利尿ペプチドファミリーの生理的意義や臨床応用を検討するためには、ナトリウム利尿ペプチドファミリーの過剰産生動物や欠損動物の開発は極めて有用な手段になる。そこで、本研究においてナトリウム利尿ペプチドファミリー遺伝子を過剰発現するトランスジェニックマウスの開発を試みた。

1-1. マウスBNP遺伝子及びcDNAクローニング

我々は既に、ナトリウム利尿ペプチドファミリーの中でBNPについてヒト及びラットBNPの単離同定に成功しているが、その結果BNPは種によって著しくその一次構造が異なり、リガンドと受容体の構造活性相関に著しい種属差が存在することを明らかにした。そこで

BNPトランスジェニックマウスの開発に向け、マウスBNPの遺伝子クローニングを試みた。入ファージ(λ EMBL-3 SP6/T7)をベクターとするBALB/cマウス遺伝子ライブラリー 10^6 クローンを既報のラットBNPcDNAプローブを用いてスクリーニングした。スクリーニングしたクローンのうち9個の陽性クローンを得、これらよりマウスBNP遺伝子を含む3.2kbのDNA断片のクローニングに成功した。更に、得られたマウスBNP遺伝子の塩基配列をもとに作成した1組のプライマーを用いて、マウス心室より抽出したRNAを、逆転写酵素反応後得られたcDNAを鋳型とし、Reverse transcription-polymerase chain reaction法を施行し、マウスBNPcDNA塩基配列を決定した。

得られたマウスBNP遺伝子及びcDNAから、図1に示すようにマウスBNP遺伝子は、3つのエクソンと2つのイントロンから構成されることが明らかとなった。5'非翻訳領域には、ATG翻訳開始コドンから約100bp上流に典型的なTATAAA配列(TATA box)が認められたが、ヒト、ブタ、イヌBNP遺伝子の5'非翻訳領域に存在するAGC反復配列は認められなかった。Primer extension法により決定した転写開始点は、TATA boxから30bp下流のcytosineであった。また3'非翻訳領域には、BNP遺伝子に特徴的なmRNAの不安定化に関与するとされるATTA反復配列が認められた。

マウスBNPcDNAより考えられるマウスprepro BNPは、ラットprepro BNPと78%の相同性を認めたが、プロセッシング後のマウスBNPとラットBNPは64%の相同性しか認められず、これはマウス及びラットANPの構造が同一であることと極めて対照的であった。

1-2. マウスBNPの体内各組織における遺伝子発現

マウス各組織より抽出したRNAを用いて、Northern blot法にてBNPmRNA発現を検討した。図2に示すように心房・心室で0.9kbの大きさのBNPmRNAが検出され、その濃度は心房・心室でほぼ同程度であった。組織重量を考慮すると心室がBNPの主要な産生部位であることが明らかとなった。一方、脳、肺、腎臓、肝臓ではBNP遺伝子発現は検出されなかった。

1-3. マウスBNP遺伝子過剰発現トランスジェニックマウスの開発

我々がクローニングに成功したマウスBNP遺伝子を肝臓で発現の認められるヒトSerum amyloid Pのプロモーターに結合し発現ベクターを作成しマウス卵母細胞(C56 BI/6J)に注入することで、15匹のFo世代マウスを得た。得られたFoマウスよりDNAを抽出し、Southern blot法により導入BNP遺伝子を検討すると、1~2コピーより最高100コピーまで種々のコピー数を有していることが明らかとなった。現在、これらFoマウスにおける導入ヒトBNP遺伝子の発現量を、導入されたコピー数と対比しつつ検討し継代可能なBNPトランスジェニックマウスの開発を進めている。

2. ナトリウム利尿ペプチドファミリー遺伝子発現調節の解析

我々は既にANP、BNP、CNPに対する抗血清やモノクローナル抗体を調整し、特異的ラジオイムノアッセイを開発して、ナトリウム利尿ペプチドファミリーの体内分布、生合成、分泌調節等について検討し、体液量血圧調節に関与するホルモン及び神経ペプチドとしての

意義を明らかにしてきた。すなわちANPは主として心房より、BNPは心室より生合成、分泌される心臓ホルモンである事を証明した。一方、CNPは脳、下垂体に分布する局所調節因子として作用すると考えられていたが、最近我々はこのCNPが血管内皮細胞より分泌されている事を明らかにし、CNPが血管内皮由来弛緩因子としても作用する可能性を明らかにしてきた。このようにナトリウム利尿ペプチドファミリーには組織特異的な遺伝子発現機構が存在する。そこで本研究では、食塩摂取によるナトリウム利尿ペプチドファミリー遺伝子発現亢進の分子機構の解明を目指し、既に明らかにされているANPの遺伝子構造に加えて、ヒトのBNP、CNPの5'隣接領域を含む遺伝子構造を決定した。

2-1. ヒトBNP遺伝子5'隣接領域の構造決定

ヒト染色体DNAを用いて、ヒトBNPcDNAプローブにてSouthern blot解析を行い、HindIII消化後、陽性の約3.5kbの断片より5'隣接領域を含むヒトBNP遺伝子をクローニングした。得られたヒトBNP遺伝子の5'隣接領域約1.8kbには典型的なTATA boxは存在せず、Primer extension法にて決定された転写開始点より30bp及び80bp上流にGATAAAの配列が認められた。-388~-382、-1248~-1191、-1456~-1449の部位にAP-1結合部位、CTrich領域、cAMP応答因子様配列が存在し、更に複数のacute phase regulatory elementsが認められた(図3)。また、得られたヒトBNP遺伝子5'隣接領域は、既に報告されているヒトANP遺伝子5'隣接領域との間に相同性を認めず、心臓ホルモンであるANP、BNPはそれぞれ異なるDNA配列を介して、心臓において異なった遺伝子発現調節を受けていると考えられた。

現在、得られたヒトBNP5'隣接領域の種々のdeletion mutantを作成しこれらをCAT発現ベクターに組み込み、培養ラット心室筋細胞にトランスフェクションしてその転写活性を検討中であり、ナトリウム利尿ペプチドの組織特異的発現の分子レベルでの解明を進めている。

2-2. ヒトCNP遺伝子のクローニング

λファージに組み込まれたヒト遺伝子ライブラリー 10^6 クローンを、ラットBNPcDNAプローブを用いてスクリーニングした。9個の陽性クローンより、15kbのヒトCNP遺伝子断片を得た。このCNP遺伝子3.0kb BamHI-SalI断片の塩基配列の決定を行った。その結果、図4に示すようにヒトCNP遺伝子は少なくとも2つのエクソンと1つのイントロンより成ると考えられ、その5'隣接領域には、inverted CCAATボックス、GCボックス、cAMP応答因子様配列等を認めた。また、このCNP遺伝子によりコードされるヒトpreproCNPは126個のアミノ酸より成り、23個のシグナルペプチドを有し、proCNPは、それぞれLeu⁴⁹-Arg⁵⁰及びLys⁸⁰-Lys⁸¹のC端側でプロセッシングを受け、CNP-53及びCNPが合成されると考えられた。

【考察及び今後の課題】

1. これまで薬理学的手法を用いた種々の研究により、ナトリウム利尿ペプチドファミリーの食塩摂取及び体内食塩代謝における意義が指摘されてきた。しかしながら従来のアプローチでは、ナトリウム利尿ペプチドの、定常状態における生理的意義の検討は不可能であった。今回分子生物学的手法を用い、慢性的なナトリウム利尿ペプチド遺伝子過剰発現状態を *in vivo* で作り出し、ナトリウム利尿ペプチドの生理的、臨床的意義を解明する事を試みた。今回の研究により我々はマウスにおけるBNP遺伝子の構造決定に成功し、BNPトランスジェニックマウスF₀世代を得た。今後更にF₁世代以後の作成を行い、継代可能なナトリウム利尿ペプチドファミリー遺伝子過剰発現動物としてBNPトランスジェニックマウスの系統確立を目指したい。また今回我々の決定したマウスBNPのアミノ酸構造をもとにマウスBNPに対し特異的なモノクローナル抗体を作成し、BNPトランスジェニックマウス各組織でのBNP産生量、血中濃度を評価する計画である。更にこの動物を用いて食塩嗜好性、食塩排泄能、血圧調節能を検討し、ナトリウム利尿ペプチドの水電解質ホメオスターシス及び血圧維持における生理的・病態生理的意義を明らかにしたい。またBNP遺伝子過剰発現状態において、新たなナトリウム利尿ペプチドの食塩代謝における生理作用の発見あるいは、新たなナトリウム利尿ペプチド受容体の同定がなされる可能性も合わせ検討していく。

2. 今回の我々の研究により、既に明らかにされているANPの遺伝子構造に加えて、ヒトのBNP、CNPの5'隣接領域を含む遺伝子構造が明らかになった。我々は、ANP、BNP、CNPが心臓、脳あるいは血管等体内各組織において異なる遺伝子発現調節を受けている事、更に、食塩摂取亢進及び過剰な食塩の体内貯留時に、心臓におけるナトリウム利尿ペプチド遺伝子発現の代償的亢進がおこる事を報告してきた。今後、今回得られたナトリウム利尿ペプチド遺伝子をもとに、食塩バランスの維持におけるナトリウム利尿ペプチドファミリー遺伝子発現調節機構の臨床的意義に注目し、その遺伝子発現調節機構を分子レベルで解明し、食塩代謝におけるナトリウム利尿ペプチドファミリーの生理的、病態生理的意義を明らかにしていきたい。

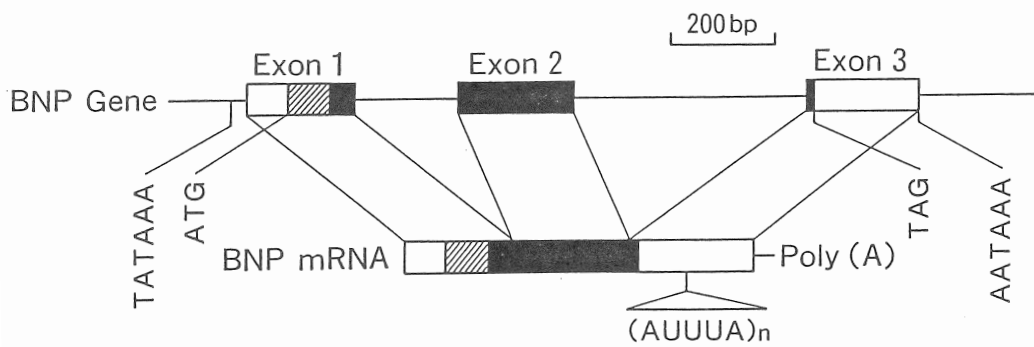


FIGURE 1. Schematic representation of the mouse BNP gene and mRNA

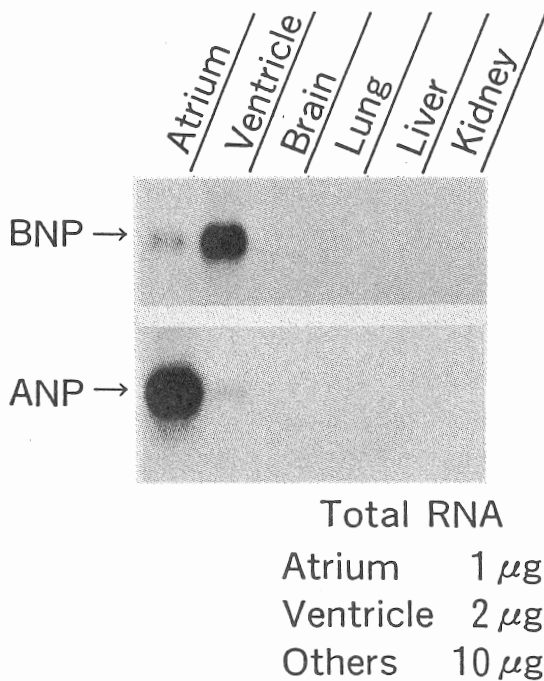


FIGURE 2. Northern blot analysis of BNPmRNA and ANPmRNA in mouse tissues

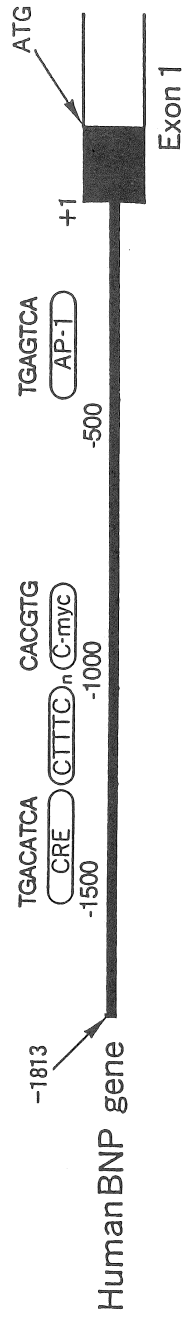
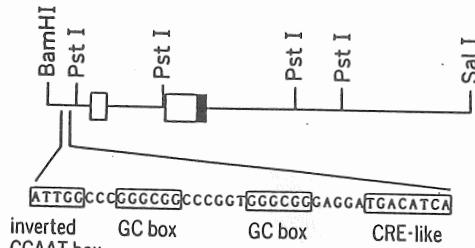


FIGURE 3. The array of cis elements in the 5'-flanking region of human BNP gene

(A)



(B)

GGATCCCTCCGGGGTGGGATAAAGGAGGGGAGCCCCCGGGCCCTCCGGGCCCTCGGGCGG 63
 GCCGGTCCGTGTGCTATTGGCCCGGCGGCCCGGTGGCGGGAGGATGACATCGGGCGAG 126
 Inverted CCAAT box GC box GC box CRE-like
 GTTGGATATAAGGCGGAGCAGAGTCAAGGGCTCAGAGGCCACCCAGCCGGCCCGCCGAG 189
 ATA box
 CACTGGGACCTGCTCGCCCTGACGCCAGCCAGCCCTGCTCCGCATCCCCCTGCTGGTCTGCC 252
 CGCCGACCTGCGCCCTGCTGCGCCCGGTGCGGCCCTCGACCCCAAGCGGACCCATGCAT 315
 HeLIa
 -23
 CTCTCCAGCTGCTGGCCTGCGCCCTGCTGCTCACGCTGCTCTCCCTCCGGCCCTCCGAGCC 378
 LeuSerGlnLeuLeuAlaCysAlaLeuLeuLeuThrLeuLeuSerLeuArgProSerGluLeu
 -20 -10 -1
 AAGCCCGGGCGCCCGCCGAGGTTGGTCTGCTGCTGGGACGCCGAGCCCTGGGAGAGCCGTGG 441
 LysProGlyAlaProProLys
 11
 GAGCTGGGGGCTTGGAGAAATCGGGCGCCAGGACCCAGGAGAGGGAAGGCCAGCCGGCTGT 504
 CTCCTCCGAGTGGCCCTGCGCGAGAGCCGGGAGCCCTCGAAGCCGGGATTCGGGGGCTCCAC 567
 TTCTCCAGCCTCCGGGAGACATCGCCCATGCCAGCCCTACCCAGTGTGGCCCTGCCCGG 630
 CGAGCAGCAAAGGGAGGGCAGGGGGCTCCGGAGGAGCGGGAAGGCCGGCCGGGTGGCAGGT 693
 GGATGCGGGCCCAAGCTGGCCGGCATCGGTGGGGCGGCTGGGCTTGGAGGGACACCCCG 756
 CGCCGGCGGGCGCTGGGGCTGGAGCATCAGATCCCCCTGCTGCGAGCCCGTGCCTTCA 819
 CCTGCCCGCTCTTCTCGGACAGTCCCGCAACCCGGCGGAGAGGAGCTGGCCGACCGG 882
 ValProArgThrProProAlaGluGluLeuAlaGluPro
 8 10 20
 CAGGCTCGGGCGGGCTCAGAAAGGGCGACAAGGCTCCCGGGGGCGGGCGCCAAATCTC 945
 GlnAlaAlaGlyGlyGlyGlnLysLysGlyAspLysAlaProGlyGlyGlyAlaAnLeu
 30 40
 AAGGGCGACCGTCCGACTGCTCCGGGACCTGCGCGTGGACACCAAGTCCGGGGCCGCGTGG 1008
 LysGlyAspArgSerArgLeuLeuArgAspLeuArgValAspThrLysSerArgAlaAlaTrp
 50 60
 GCTCGCCTTCTGCAAGACACCCCAACCCCGCAAAATCAAAGGAGCCAAAGAAAGGGCTTG 1071
 AlaArgLeuLeuGlnGluHisProAnAlaArgLysTyrLysGlyAlaAnLysLysGlyLeu
 70 80
 TCCAAGGGCTGCTTCGGCCTCAAAGCTGGACCGAATCGGCTCCATGAGCGGCGCTGGCATTTAG 1134
 SerLysGlyCysPheGlyLeuLysLeuAspArgIleGlySerHetSerGlyLeuGlyLys
 90 100 103
 TCGGGCGCCCTCGGGCGGGTGGAGTACGGCCACCCGACGGCCAGCCCGAGCCCGCCCGGG 1197
 ACGCCCGCGCGCCAGCCGGCTTCGGAGGGCGCGGAGCCGCTTTGCTCAAGTGTGGTGGCC 1260
 CTTTGGCCAGCCGCCCCCTTTATATCCCACTTTACAGACAAAGAAAGCGAAGGATAACGTGAT 1323
 CGGGGAACCTTGGCAAGGCTGGGTGCTCTCACCGGCTCAGCCTGGTGAACCCCACTGGCTTCT 1386
 GAGCAGAAACAGGGCTGGGTGCTCTCACCGGCTCAGCCTGGTGAACCCCACTGGCTTCTCT 1449
 GGCCCTATTGGCCAGCTGGTGGGGGATTCAGCGGAGATCATGGTTTGGGGAGCAGAGAA 1512
 GGAAGGTTACCCCAAGTCCAGGGACATCAATATCTGCTGGCACCATTCCCTCCCTGTAG 1575
 TGAGAGTAGCCCTGCTGGCAGCTGTCAGGGCCCTTCTGCTGGGACACTCCGATTCCTGTC 1638
 CCTTCTTAAACCCAGGCACTGGGCAAACTGGTCTGTCCAGGGCTCTGAGGCACTGGCAAGCT 1701
 GGTGGCTCGGGGTGAATCTCAGTCTTGTGGCACTATTCAAGGAAATAGGAAACACTAA 1764
 AGTAAATATTTTGGCCAGCCTCGAACTCAACACGTCACAGAGTCCCTCACCAACCGCTGTC 1827
 CCGACCCAAACCGTCTCTGGGCTCCGTTTCTGGTGGGGTCTCACCCCGCACTAGGCTGG 1890
 AAACCTTGGCCTTACCGCCACCCCTGCGGGGTGCGCCGTGGTGTAATTTACTGCTCGAGAGA 1953
 GCCTCACCTCTCCTCTTCCCTCCTCTCTATTCTCGCCGCTGCCCCGTGCCCACTGAATAACA 2016
 TCCCAAGCTTGCACATGACAGTCAATGTCGCTTAGGATCAGGCTTACTGGCTTCTCGCTTT 2079
 CTTCCTCCAGCTCAGCAGTCCCACTGCTGCTCCACACCTTGAATGCTGCTCCATCCCAAGGTA 2142
 CGGGAAGCTGCTGCTCTCTCCCAAGACCTTGTCAAGTCCGATCTTCTCCCGGAGGAA 2205
 CAGAGAGCCCTGTCCAGCACACTGTCTCTTTACAGTACAGAACTTTTCCACAGTTTGT 2268
 GAACCAATTCACCTTCCATATTAACAGCTTAAAGGCGAAGTCTGCTGCTTAAAGCACTTAA 2331
 GACCCACTGACCCCGAACAGACTCGTGGAAATTTGTCAATGACCAAGAGAACACAGCAC 2394
 CCTGGCCCAAGGCACTCCCACTGCCAGGTTTAAACAGTGGCCCTCTCTCTTTGACGCC 2457
 AGACCTCACTCGCTGTTGGGCTCTCCCAAGTTCGAAAGGCTGTAGTTGTCTGTGATCTTG 2520
 ACTTCCCTGCAACAGGGAAGAATGATTTGACACTTGGGGCCAGGCTTCAAGTACTCTG 2583
 CTTGGAAATGGCTTTGCT 2646
 AAATTTCAAGTTGATTTAAGCATCAAGTCAAAGTCTTAAAGTCTGAGCAAAATGTTAGTACT 2709
 CTCCATGGTCTTACCTGGAATCGCATCCACAGGGGCTTTGTTCTGGCCGCTGGATGCTG 2772
 TGCTACCAAGTGAATGCGCAACGGGTGGTGAAGATGCTGTGATGAGGAAATCCCATTTGTT 2835
 AAGAATTTCCGACCCCTTGTATCAGGGGGTTCAATAATCTCTACCAAGCTCTCTAGCATAG 2898
 ATGAACACTTACCGTGCAC 2917

FIGURE 4. (A)Schematic representation of 2917 -bp Bam HI-Sal I digestion fragment of human CNP gene

(B)Nucleotide and deduced amino acid sequences of the Bam HI-Sal I fragment of human CNP gene

【発表文献(92年度)】 -英文-

1. S. Suga, K. Nakao, K. Hosoda, M. Mukoyama, Y. Ogawa, G. Shirakami, H. Arai, Y. Saito, Y. Kambayashi, K. Inouye and H. Imura.
Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide.
Endocrinology 130: 229-239, 1992.
2. Y. Ogawa, K. Nakao, O. Nakagawa, Y. Komatsu, K. Hosoda, S. Suga, H. Arai, K. Nagata, N. Yoshida and H. Imura.
Human C-type natriuretic peptide — Characterization of the gene and peptide —.
Hypertension 19: 809-813, 1992.
3. S. Suga, K. Nakao, M. Mukoyama, H. Arai, K. Hosoda, Y. Ogawa and H. Imura.
Characterization of natriuretic peptide receptors in cultured cells.
Hypertension 19: 762-765, 1992.
4. S. Suga, K. Nakao, I. Kishimoto, K. Hosoda, M. Mukoyama, H. Arai, G. Shirakami, Y. Ogawa, Y. Komatsu, O. Nakagawa, N. Hama and H. Imura.
Phenotype-related alteration in expression of natriuretic peptide receptors in aortic smooth muscle cells.
Circ. Res. 71: 34-39, 1992.
5. S. Suga, K. Nakao, H. Itoh, Y. Komatsu, Y. Ogawa, N. Hama and H. Imura.
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. 90: 1145-1149, 1992.
6. K. Nakao, Y. Ogawa, S. Suga and H. Imura.
Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system I: Natriuretic peptides.
J. Hypertens. 10: 907-912, 1992.
7. K. Nakao, Y. Ogawa, S. Suga and H. Imura.
Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system II: Natriuretic peptide receptors.
J. Hypertens. 10: 1111-1114, 1992.
8. H. Imura, K. Nakao and H. Itoh.
The natriuretic peptide system in the brain: Implications in the central control of cardiovascular and neuroendocrine functions.
Frontiers in Neuroendocrinology 13: 217-249, 1992.

9. Y. Komatsu, K. Nakao, H. Itoh, S. Suga, Y. Ogawa and H. Imura.
Vascular natriuretic peptide.
Lancet 340: 622, 1992.

10. H. Itoh, K. Nakao and H. Imura.
Natriuretic peptide system in the brain and its implication in
central cardiovascular regulation.
In Central Neural Mechanisms in Cardiovascular Regulation
volume 2 edited by G. Kunos and J. Ciriello. Birkhauser Pub-
lishers, Boston pp 266-279, 1993

11. H. Itoh, N. Sagawa, M. Hasegawa, A. Okagaki, K. Inamori, Y.
Ihara, T. Mori, Y. Ogawa, S. Suga, M. Mukoyama, K. Nakao and H.
Imura.
Brain natriuretic peptide is present in the human amniotic
fluid and is secreted from amnion cells.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 76: 907-911, 1993.

－ 邦 文 －

1. 向山政志、中尾一和、井村裕夫
BNP
臨床医 18: 78-82, 1992.
2. 菅 真一、中尾一和、井村裕夫
ナトリウム利尿ペプチドレセプター
最新医学 47: 84-92, 1992.
3. 中尾一和
ナトリウム利尿ペプチドファミリー
日本内分泌学会雑誌 68: 134-142, 1992.
4. 小川佳宏、中尾一和、井村裕夫
ナトリウム利尿ペプチドファミリーの分子生物学
日本臨床 第50巻 増刊 高血圧 上巻: 46-53, 1992.
5. 伊藤 裕、中尾一和、菅 真一、井村裕夫
ナトリウム利尿ペプチドファミリー
日本臨床 第50巻 増刊 高血圧 上巻: 124-133, 1992.
6. 岸本一郎、中尾一和、井村裕夫
ナトリウム利尿ペプチド系の情報伝達機構
医学のあゆみ vol.161 No.1: 38-42, 1992.
7. 小松弥郷、中尾一和
ナトリウム利尿ペプチドファミリーおよび分解酵素阻害薬
Current Circulation vol.3 No.3: 18-19, 1992.
8. 中尾一和
ナトリウム利尿ペプチドファミリーの病態生理的意義と細胞内情報伝達に関する研究
細胞科学 第3巻: 58-66, 1992.
9. 小川佳宏、中尾一和、伊藤 裕、菅 真一、井村裕夫
ナトリウム利尿ペプチド系の分子生物学
日本臨床 第50巻 第12号: 47-54, 1992.
10. 伊藤 裕、中尾一和
ナトリウム利尿ペプチド研究の最近の展開
Modern Physician 13: 37-42, 1993.
11. 伊藤 裕、菅 真一、小松弥郷、中尾一和
血管内皮由来ペプチド性弛緩因子としてのC型ナトリウム利尿ペプチド
— 血管壁ナトリウム利尿ペプチド系の存在
Modern Medicine 30: 364-373, 1993.

**Natriuretic Peptide Family—
Physiological Significance and clinical implication**

Kazuwa Nakao: 2nd Division, Department of Medicine
Kyoto University School of Medicine
Hiroo Imura: Kyoto University

Summary

Following the discovery that the heart secretes atrial natriuretic peptide (ANP) with potent diuretic, natriuretic and vasorelaxing activities, brain natriuretic peptide (BNP) and C-type natriuretic peptide (CNP) have been isolated from the porcine brain. ANP and BNP are elucidated to be the cardiac hormone mainly secreted from the atrium, and from the ventricle, respectively. CNP first recognized as the neuropeptide is now identified within the vascular wall, especially in endothelial cells and considered to be an autocrine/paracrine regulator. We have demonstrated that the natriuretic peptide family, as cardiac hormone, neuropeptide and local regulator, plays the pivotal role in blood pressure and body fluid homeostasis. In this study we tried to elucidate the physiological and clinical significance of natriuretic peptide family in salt handling mechanism using molecular biology technique, and seek for the clinical application of the natriuretic peptide family in salt homeostasis.

Since the primary structure of BNP is quite divergent among species and there exists striking species difference in structure-activity relationship, we first isolated mouse BNP gene and cDNA for generation of BNP over-expressing transgenic mice. Mouse BNP gene contains three exons and two introns. Typical TATAAA sequence exists about 100 base pairs upstream of the translation initiation site. In its 3'-flanking region, ATTTA repeat, which is considered to be involved in mRNA instability, was found. Mouse BNP mRNA is demonstrated to preferentially express in the atrium and the ventricle. By microinjecting the expression vector which contained cloned mouse BNP gene linked to human serum amyloid P promoter into mouse male pronucleus of fertilized egg, we succeed in obtaining several Fo transgenic mice with various copy numbers of BNP gene (up to 100 copies). By analysing these BNP over-expressing mice, the physiological significance of BNP in sodium balance is now under investigation.

We also succeed in cloning human BNP and CNP genes. In 1.8 kb of human BNP gene 5'-flanking region, there exists an array of putative cis-regulatory elements; AP-1 binding site, CT rich region, cAMP responsive element-like sequence. Isolated human CNP gene is composed of at least two exons and one intron. Its 5'-flanking region contains an inverted CCAAT box, two GC boxes and a cAMP responsive element-like sequence. The molecular mechanism of natriuretic peptide gene regulation in salt handling is further elucidated, using these cloned natriuretic peptide genes.