

9638 発生工学的手法によるナトリウム利尿ペプチド過剰発現 及び欠損マウスの開発と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意義の検討

助成研究者：中尾 一和(京都大学 医学部)
共同研究者：小川 佳宏(京都大学 医学部)
伊藤 裕(京都大学 医学部)
斉藤 能彦(京都大学 医学部)

ナトリウム利尿ペプチドファミリーはANP, BNP, CNPから構成され、血圧、水電解質代謝調節に関与すると考えられている。本研究では、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の解明と臨床応用に向けて、ナトリウム利尿ペプチド遺伝子過剰発現及び欠損マウスの作製と解析を試みた。

1) BNP遺伝子あるいはCNP遺伝子欠損マウス(ノックアウトマウス)の開発：BNP遺伝子の第1、第2エクソンあるいはCNP遺伝子の第1エクソンをネオマイシン耐性遺伝子に置換したターゲティングベクターを用いてキメラマウス作製後、germline transmissionを確認した。BNPノックアウトマウスについては、現在までに10匹以上のホモ接合体マウスが得られている。又、第1エクソンを欠損するCNPノックアウトマウス(部分欠損マウス)の作製についても、キメラマウスよりヘテロ接合体及びホモ接合体マウスが複数得られた。更にCNP遺伝子の第1、第2エクソンをネオマイシン耐性遺伝子に置換した新しいターゲティングベクターを用いて、CNP完全欠損マウスの作製を進めている。現在までのところ、キメラマウスが7匹得られており、ヘテロ接合体及びホモ接合体の作製を目指して交配を続けている。

2) CNP遺伝子の全構造決定：129/Svマウス染色体DNAライブラリーより全長約4kbのマウスCNP遺伝子を含む1クローンを得た。マウスCNP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ていた。CNP遺伝子の第1、第2エクソンは翻訳領域を含むのに対して、第3エクソンは3'-非翻訳領域のみを含んでいることが明らかになった。転写開始点は5'-RACE法によりTATA boxの約30bp下流に同定された。5'-隣接領域にはY box, GC box, cAMP応答因子様配列と23回のCA反復配列が認められ、NF- κ B結合配列が第1イントロンに、shear stress-response elementが第2エクソンと第2イントロンに認められた。

3) BNP遺伝子過剰発現トランスジェニックマウスを用いたナトリウム利尿ペプチドファミリーの骨軟骨代謝調節因子としての意義の検討：BNP遺伝子過剰発現トランスジェニックマウスでは、体幹・四肢・指趾の著明な伸長を認め、この変化は血中BNP濃度がより高値の系統で一層顕著であった。軟X線撮影にてBNP遺伝子過剰発現トランスジェニックマウスでは、椎体と長管骨の著しい長軸方向の伸長が認められた。一方、頭蓋・顔面骨には明らかな変化は認められなかった。組織学的検討によりBNP遺伝子過剰発現トランスジェニックマウスは、成長板軟骨の増殖層・肥大軟骨層の増大を示し、軟骨細胞の増殖が観察された。鼻中隔軟骨等の永久軟骨では明らかな変化は認められなかった。以上より、BNPは内軟骨性骨化促進作用を有する新しい骨軟骨代謝調節因子であることが示唆された。

9638 発生工学的手法によるナトリウム利尿ペプチド過剰発現 及び欠損マウスの開発と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意義の検討

助成研究者：中尾 一和 (京都大学 医学部)
共同研究者：小川 佳宏 (京都大学 医学部)
伊藤 裕 (京都大学 医学部)
齊藤 能彦 (京都大学 医学部)

1. 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。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、CNPは血管内皮細胞やマクロファージで産生される局所因子として作用することを証明し、ナトリウム利尿ペプチドファミリーが強力な利尿、ナトリウム利尿、降圧作用、血管増殖抑制作用により、心不全、心筋梗塞、高血圧、動脈硬化等の循環器疾患の病態形成に重要な役割を果たしている可能性を示してきた。

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遺伝子過剰発現及び欠損マウスを作製し、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と臨床応用を目指すものである。

2. 研究方法

2. 1 BNP遺伝子あるいはCNP遺伝子欠損マウス(ノックアウトマウス)の開発

1995年度の本研究助成金により、129/SvマウスBNP遺伝子及びCNP遺伝子をクローニングし、得られたBNP遺伝子の第1, 第2エクソンあるいはCNP遺伝子の第1エクソンをネオマイシン耐性遺伝子に置換したターゲティングベクターを用いてキメラマウス作製後、germline transmissionを確認した。本年度は、これら生殖キメラマウスを交配して得られたヘテロ接合体から更にホモ接合体(遺伝子欠損マウス、ノックアウトマウス)の作製を試みた。又、CNP遺伝子については、第1, 第2エクソンをネオマイシン耐性遺伝子に置換した新しいターゲティングベクターの構築を行い(図1)、同様にCNPノックアウトマウスの作製を試みた。

2. 2 CNP遺伝子の全構造決定

ANP遺伝子と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、全遺伝子構造が明らかにされている。一方既報のマウスとヒトのCNP遺伝子については、2つのエクソンしか同定されておらず、転写開始点も不明であり、CNP遺伝子の全構造は不明であった。本研究では、新しいCNP遺伝子ターゲティングベクター構築のためにも、既報のBALB/cマウスCNP遺伝子断片と3'-rapid amplification of cDNA end (3'-RACE)法にて得られたマウスCNPcDNA断片の3'末端部をプローブとして、129/Svマウス染色体ライブラリーよりCNP遺伝子全長をクローニングした。

2. 3 BNP遺伝子過剰発現トランスジェニックマウスを用いたナトリウム利尿ペプチドファミリーの骨軟骨代謝調節因子としての意義の検討

我々は既に血中BNP濃度の著増するBNP遺伝子過剰発現トランスジェニックマウスの作製に成功している。このトランスジェニックマウスの血圧は対照マウスと比較して明らかに低下しており、BNPの持続的な降圧作用が明らかになった。このマウスでは血中BNP濃度に比例して体幹、四肢、指趾の伸長が認められた。本研究では、新しい骨軟骨代謝調節因子としてのナトリウム利尿ペプチドファミリーの意義を明らかにするために、BNP遺伝子過剰発現トランスジェニックマウスを用いて軟X線撮影と組織学的解析を行った。

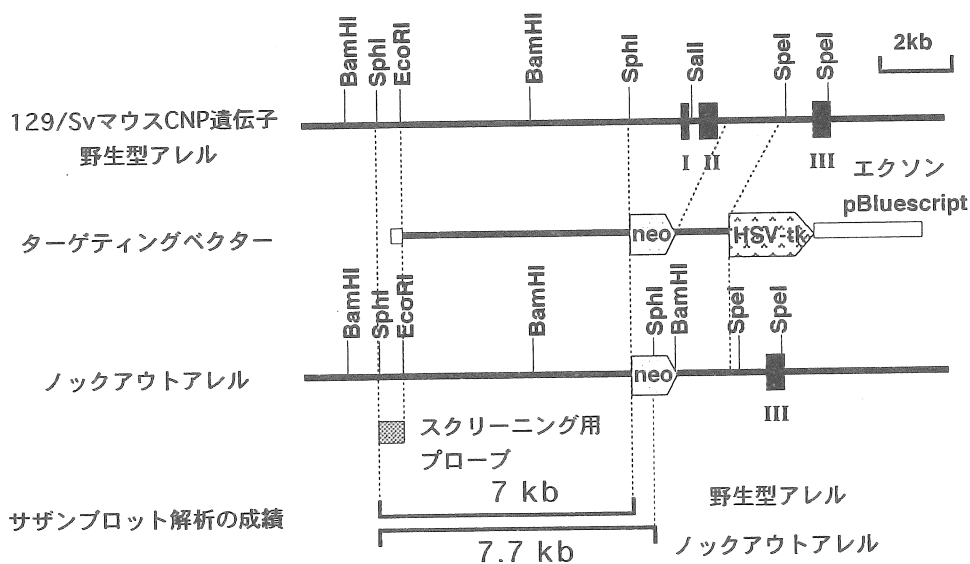


図1 新しいマウスCNP遺伝子ターゲティングベクターの構築

3. 研究結果

3. 1 BNP遺伝子あるいはCNP遺伝子欠損マウス (ノックアウトマウス) の開発

3. 1. 1 BNPノックアウトマウス作製

ターゲティングベクターをES細胞に導入後、得られた相同組み換え体を用いて合計18匹の雄性キメラマウスを得た。それぞれを雌性C57BL/6Jマウスと交配することにより、複数のキメラマウスについてgermline transmissionが確認された。更に、現在までに10匹以上のノックアウトマウスが得られている。BNPノックアウトマウスは外観上、野生型マウスとの間に明らかな差は認められなかった。現在、循環器系を含む全身臓器の組織学的解析と血圧や心拍数等の測定及び血圧の食塩感受性を検討している。

3. 1. 2 CNPノックアウトマウス作製

1995年度に得られたCNPノックアウトマウス作製のための雄性キメラマウスよりヘテロ接合体及びホモ接合体マウスが複数得られた。更に1996年度に新しく作製したターゲティングベクターを用いて同様に雄性キメラマウスが7匹得られており、ヘテロ接合体及びノックアウトマウスの作製を目指して更に交配を続けている。

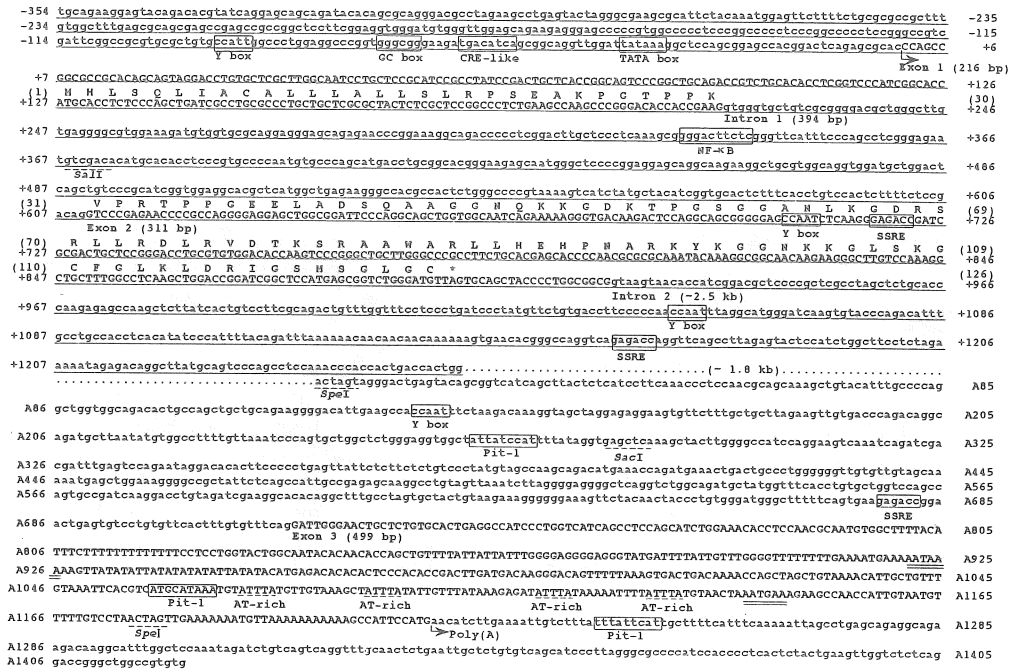


図2 129/SvマウスCNP遺伝子の構造

3. 2 CNP遺伝子の全構造決定

129/Svマウス遺伝子ライブラリー 2×10^6 クローンをスクリーニングし、マウスCNP遺伝子の全長を含む1クローンを得た。今回得られた129/SvマウスCNP遺伝子は全長約4kbであり、CNP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、第1、第2エクソンが翻訳領域を含むのに対して、第3エクソンは3'-非翻訳領域のみを含んでいることが明らかになった。5'-RACE法によりマウスCNP遺伝子の転写開始点はTATA boxの約30bp下流に同定された。遺伝子の5'-隣接領域にはY box, GC box, cAMP応答因子様配列と23回のCA反復配列が認められた。NF- κ B結合配列が第1イントロンに、shear stress-response elementが第2エクソンと第2イントロンに認められた。

3. 3 BNP遺伝子過剰発現トランスジェニックマウスを用いたナトリウム利尿ペプチドファミリーの骨軟骨代謝調節因子としての意義の検討

BNP遺伝子過剰発現トランスジェニックマウスでは、体幹、四肢、指趾の著明な伸長を認め、この変化は血中BNP濃度が高値の系統でより顕著であった。軟X線撮影にてBNP遺伝子過剰発現トランスジェニックマウスでは、椎体の著しい長軸方向の伸長を認め、同様の変化は他の長管骨においても認められた(図3)。更に、長管骨の骨髄幅の増大が認められたが、頭蓋、顔面骨には明らかな変化は認められなかった。骨密度に変化は認められなかった。組織学的検討によりBNP遺伝子過剰発現トランスジェニックマウスでは、成長板軟骨は増殖層・肥大化層の増大を示し、軟骨細胞の増殖が観察された。又、本来、線維軟骨組織の存在する椎間板の硝子軟骨様変化が認められ、海綿骨骨梁内には“島”状の軟骨細胞の集塊を認めた。更に、軟骨膜に接して、旺盛な増殖能を示す細胞集塊が存在した。頭蓋・顔面骨等の膜性骨化部位や鼻中隔軟骨等の永久軟骨では明らかな変化は認められなかった。

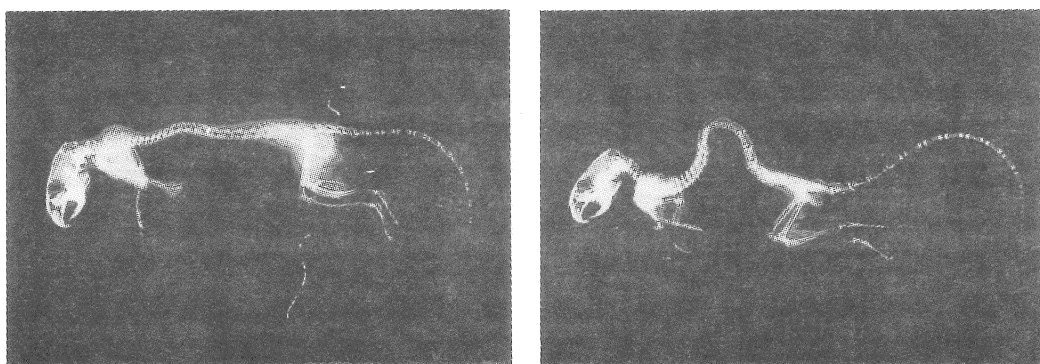


図3 BNP遺伝子過剰発現トランスジェニックマウスの軟X線撮影による解析
(左) 対照マウス, (右) BNP遺伝子過剰発現トランスジェニックマウス

4. 考察

4. 1 BNP遺伝子あるいはCNP遺伝子欠損マウス（ノックアウトマウス）の開発

BNPノックアウトマウスの作製については、1995年度に得られた8匹の雄性キメラマウスではgermline transmissionが確認できなかったため、異なる相同組み換えES細胞を用いて10匹のキメラマウスを作製したところ、内4匹にgermline transmissionが確認された。又、CNPノックアウトマウスの作製については、最初に構築した第1エクソンのみを破壊するターゲティングベクターではCNPそのものをコードする第2エクソンが残存するので、1996年度には新しく、第1、第2エクソンをともに破壊するターゲティングベクターを構築して、ノックアウトマウスの作製を試みた。これによりCNP部分欠損マウスとともに完全欠損マウスが得られると考えられる。現在のところ、新しいターゲティングベクターを用いたCNPノックアウトマウスについては、複数の雄性キメラマウスが得られており、これらの交配によりホモ接合体（ノックアウトマウス）の作製が可能と考えられる。

4. 2 CNP遺伝子の全構造決定

1995年度に心臓ホルモンであるANPとBNPの遺伝子が3つのエクソンと2つのイントロンから構成され同一染色体上に同一方向に隣接して存在することを明らかにしたが、1996年度には本研究により神経ペプチドあるいは局所因子として作用するCNP遺伝子もANP, BNP遺伝子と同様のエクソン/イントロン構造であることが明らかになった。CNPの構造はナトリウム利尿ペプチドの中では種属を越えて最もよく保存されていて、CNP遺伝子がANP, BNP遺伝子と異なる染色体上に存在するため、CNP遺伝子がプロトタイプ（共通の祖先遺伝子）として遺伝子重複などの分子機構によりANPとBNP遺伝子が生じたと考えられる。

4. 3 BNP遺伝子過剰発現トランスジェニックマウスを用いたナトリウム利尿ペプチドファミリーの骨軟骨代謝調節因子としての意義の検討

BNP遺伝子過剰発現トランスジェニックマウスの骨格系の変化は椎体と長管骨のみに局限しており、頭蓋、顔面には明らかな変化が認められなかった。更に、長管骨の皮質骨幅にはトランスジェニックマウスと対照マウスの間に明らかな差は認められなかったが、骨髓腔幅は増大していた。長管骨の組織学的検討よりBNPは成長板軟骨に作用し軟骨細胞の増殖・分化を促進することが明らかとなった。以上より、BNPの内軟骨性骨化促進作用が証明され、ナトリウム利尿ペプチドファミリーが新しい骨軟骨代謝調節因子として作用することが示唆された。

5. 今後の課題

5. 1

BNPノックアウトマウスに関しては、ヘテロ接合体の交配を継続し、多数のノックアウトマウスを得るとともに、循環系と骨格系を含む全身臓器の組織学的解析とともに水・電解質代謝調節系の変化を検討する。特に既報のANPノックアウトマウスでは食塩感受性高血圧を、ANPとBNPの受容体であるGC-Aのノックアウトマウスでは食塩非感受性高血圧を呈することが報告されているので、BNPノックアウトマウスの血圧も食塩感受性に変化をきたすと考えられるため同様の検討を行う。又、CNPが内皮由来血管弛緩ペプチドであることより、CNPノックアウトマウスについても心血管系を中心に全身臓器の検索を行う。更に、ヘテロ接合体あるいはホモ接合体と野生型の食塩代謝調節系の生理学的解析(血中及び尿中パラメータ、血圧、尿量測定等)を進める。

5. 2

マウスCNP遺伝子の全エクソン/イントロン構造が明らかになったため、ヒトCNP遺伝子の全長のクローニングと全体構造決定が可能になった。今後、ヒトCNP遺伝子異常症などの検索にむけての検討が必要であると考えられる。

5. 3

循環血中に過剰に分泌されたBNPが、骨軟骨細胞に直接作用することにより内軟骨性骨化促進作用を有するの可否かを検討するために長管骨の器官培養系を用いたBNP(ナトリウム利尿ペプチドファミリー)の検討を行う。本研究により循環調節因子として注目されてきたナトリウム利尿ペプチドファミリーが、新しく骨軟骨細胞の増殖分化に関与することが明らかとなり、食塩代謝と骨軟骨形成の新しい関連が明らかになる可能性がある。

文 献

1. H. Masuzaki, H. Jingami, N. Matsuoka, O. Nakagawa, Y. Ogawa, M. Mizuno, Y. Yoshimasa, T. Yamamoto and K. Nakao.
Regulation of very-low-density lipoprotein receptor in hypertrophic rat heart.
Circ. Res. 78: 8-14, 1996.
2. Y. Komatsu, H. Itoh, S. Suga, Y. Ogawa, N. Hama, I. Kishimoto, O. Nakagawa, T. Igaki, K. Doi, T. Yoshimasa and K. Nakao.
Regulation of endothelial production of C-type natriuretic peptide in coculture with vascular smooth muscle cells—The role of vascular natriuretic peptide system in vasucular growth inhibition—.
Circ. Res. 78: 606-614, 1996.
3. T. Igaki, H. Itoh, S. Suga, N. Hama, Y. Ogawa, Y. Komatsu, M. Mukoyama, A. Sugawara, T. Yoshimasa, I. Tanaka and K. Nakao.
C-type natriuretic peptide in chronic renal failure and its action in humans.
Kidney Int. 49: S144-S147, 1996.
4. T. Ikeda, H. Itoh, Y. Komatsu, M. Hanyu, T. Yoshimasa, K. Nakao and T. Ban.
Natriuretic peptide receptors in human artery and vein and rabbit vein graft.
Hypertension 27: 833-837, 1996.
5. K. Doi, H. Itoh, Y. Komatsu, T. Igaki, T-H. Chun, K. Takaya, J. Yamashita, M. Inoue, T. Yoshimasa and K. Nakao.
Vascular endothelial growth factor suppresses C-type natriuretic peptide secretion.
Hypertension 27: 811-815, 1996.
6. N. Tamura, H. Itoh, Y. Ogawa, O. Nakagawa, M. Harada, T. Chun, S. Suga, T. Yoshimasa and K. Nakao.
cDNA cloning and gene expression of human type I alpha cGMP-dependent protein kinase.
Hypertension 27: 552-557, 1996.
7. N. Tamura, Y. Ogawa, A. Yasoda, H. Itoh, Y. Saito and K. Nakao.
Two cardiac natriuretic peptide genes (atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide) are organized in tandem in the mouse and human genomes.
J. Mol. Cell. Cardiol. 28: 1811-1815, 1996.
8. Y. Miyamoto, T. Yoshimasa, H. Arai, K. Takaya, Y. Ogawa, H. Itoh, and K. Nakao.
Alternative RNA splicing of human endothelin-A receptor generates multiple transcripts.
Biochem. J. 313: 795-801, 1996.

9. K. Nakao, H. Itoh, Y. Saito, M. Mukoyama, and Y. Ogawa.
The natriuretic peptide family.
Curr. Opin. Cardiol. 5: 4-11, 1996.
10. K. Nakao, Y. Ogawa, S. Suga, and H. Imura.
Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system.
In "**Molecular Reviews in Cardiovascular Medicine**" edited by K. Lindpaintner & D. Ganten, Chapman & Hall, London, pp. 74-82, 1996.
11. M. Suda, K. Tanaka, M. Fukushima, K. Natsui, A. Yasuda, Y. Komatsu, Y. Ogawa, H. Itoh, and K. Nakao.
C-type natriuretic peptide (CNP) as an autocrine/paracrine regulator of osteoblast — Evidence for possible presence of bone natriuretic peptide system —
Biochem. Biophys. Res. Commun. 223: 1-6, 1996.
12. Y. Komatsu, H. Itoh, S. Suga, T. Igaki, Y. Ogawa, I. Kishimoto, O. Nakagawa, T. Yoshimasa and K. Nakao.
Regulation of secretion and clearance of C-type natriuretic peptide in the interaction of vascular endothelial cells and smooth muscle cells.
Hypertension 14: 585-592, 1996.
13. T. Igaki, H. Itoh, S. Suga, Y. Komatsu, Y. Ogawa, K. Doi, T. Yoshimasa, and K. Nakao.
Insulin suppresses endothelial secretion of C-type natriuretic peptide, a novel endothelium-derived relaxing peptide.
Diabetes 45: S62-S64, 1996.
14. K. Takaya, Y. Ogawa, J. Hiraoka, K. Hosoda, R. J. Koletsky, Y. Yamori, and K. Nakao.
Nonsense mutation of leptin receptor in the obese spontaneously hypertensive Koletsky rat.
Nature Genet. 14: 130-131, 1996.
15. T. Okazaki, Y. Ogawa, N. Tamura, K. Mori, N. Isse, T. Aoki, J. M. Rochelle, M. M Taketo, M. F. Seldin, and K. Nakao.
Genomic organization, expression, and chromosomal mapping of the mouse adrenomedullin gene.
Genomics 37: 395-399, 1996.

16. M. Ishikawa, Y. Saito, Y. Miyamoto, K. Kuwahara, E. Ogawa, O. Nakagawa, M. Harada, I. Masuda, and K. Nakao.
cDNA cloning of rat cardiotrophin-1 (CT-1): Augmented expression of CT-1 gene in ventricle of genetically hypertensive rats.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 219: 377-381, 1996.
17. K. Hasegawa, H. Fujiwara, M. Koshiji, T. Inada, S. Ohtani, K. Doyama, M. Tanaka, A. Matsumori, T. Fujiwara, G. Shirakami, K. Hosoda, K. Nakao, and S. Sasayama.
Endothelin-1 and its receptor in hypertrophic cardiomyopathy.
Hypertension 27: 259-264, 1996.
18. K. Yamamoto, J. C. Burnett, Jr., M. Jougasaki, R. A. Nishimura, K. R. Bailey, Y. Saito, K. Nakao, and M. M. Redfield.
Superiority of brain natriuretic peptide as a hormonal marker of ventricular systolic and diastolic dysfunction and ventricular hypertrophy.
Hypertension 28: 988-994, 1996.
19. K. Nishigaki, M. Tomita, K. Kagawa, T. Noda, S. Minatoguchi, H. Oda, S. Watanabe, N. Morita, K. Nakao, and H. Fujiwara.
Marked expression of plasma brain natriuretic peptide is a special feature of hypertrophic obstructive cardiomyopathy.
J. Am. Coll. Cardiol. 28: 1234-1242, 1996.
20. T. Matsumoto, N. Sagawa, M. Mukoyama, I. Tanaka, H. Itoh, M. Goto, H. Itoh, M. Horiuchi, V. J. Dzau, T. Mori, and K. Nakao.
Type 2 angiotension II receptor is expressed in human myometrium and uterine leiomyoma and is down-regulated during pregnancy.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 81: 4366-4372, 1996.
21. T. Naruko, M. Ueda, A. C. van der Wal, C. M. van der Loos, H. Itoh, K. Nakao, and A. E. Becker.
C-type natriuretic peptide in human coronary atherosclerotic lesions.
Circulation 94: 3103-3108, 1996.
22. M. Marttila, O. Vuolteenaho, D. Ganten, K. Nakao, and H. Ruskoaho.
Synthesis and secretion of natriuretic peptides in the hypertensive TGR(mREN-2)27 transgenic rat.
Hypertension 28: 995-1004, 1996.

23. J. Yamashita, H. Itoh, Y. Ogawa, N. Tamura, K. Takaya, T. Igaki, K. Doi, T.-H. Chun, M. Inoue, K. Masatsugu, and K. Nakao.
Opposite regulation of Gax homeobox expression by angiotensin II and C-type natriuretic peptide.
Hypertension 29: S381-S387, 1997.
24. M. Kotani, I. Tanaka, Y. Ogawa, T. Usui, N. Tamura, K. Mori, S. Narumiya, T. Yoshimi, and K. Nakao.
Structural organization of the human prostaglandin EP3 receptor subtype gene (PTGER3).
Genomics 40: 425-434, 1997.
25. K. Yoshimine, M. Horiuchi, S. Suzuki, K. Kobayashi, J. M. Abdul, M. Masuda, M. Tomomura, Y. Ogawa, H. Itoh, K. Nakao, M. Osame, and T. Saheki.
Altered expression of atrial natriuretic peptide and contractile protein genes in hypertrophied ventricle of JVS mice with systemic carnitine deficiency.
J. Mol. Cell. Cardiol. 29: 571-578, 1997.
26. T.-H. Chun, H. Itoh, Y. Ogawa, N. Tamura, K. Takaya, T. Igaki, J. Yamashita, K. Doi, M. Inoue, K. Masatsugu, R. Korenaga, J. Ando, and K. Nakao.
Shear stress augments expression of C-type natriuretic peptide and adrenomedullin.
Hypertension in press, 1997.

Generation of Mice that Overexpress or Lack Natriuretic Peptide Family
and Its Significance in the Regulation of Salt Metabolism

Kazuwa Nakao, Yoshihiro Ogawa, Hiroshi Itoh, and Yoshihiko Saito
Department of Medicine and Clinical Science
Kyoto University Graduate School of Medicine

Summary

Natriuretic peptide family consists at least three endogenous ligands, atrial natriuretic peptide (ANP), brain natriuretic peptide (BNP), and C-type natriuretic peptide (CNP). These peptides can influence body fluid homeostasis and blood pressure control by their potent natriuretic, diuretic, vasorelaxant, and vascular growth inhibitory activities. To examine the physiologic and pathophysiologic significance of natriuretic peptide family, we tried to generate mice that overexpress or lack natriuretic peptide family.

Using a targeting vector for the disruption of BNP, we produced several chimeric mice that transmitted the disrupted allele to their offsprings. We have obtained several wild-type, heterozygous, and homozygous mice and are currently examining their phenotypes including blood pressure and renal function. We also recently generated heterozygous and homozygous mice with the disruption of the 1st exon of the mouse CNP gene. We have obtained some chimeric mice and are checking whether they transmitted the disrupted allele to their offsprings. Furthermore, we have recently constructed a second targeting vector for the disruption of the 1st and 2nd exons of the CNP gene and obtained several chimeric mice.

A 4.0-kb mouse CNP genomic fragment was isolated from a 129/Sv mouse genomic DNA library using the mouse CNP cDNA probe prepared by the 3'-RACE technique. The mouse CNP gene is composed of 3 exons separated by 2 introns. The 5'-flanking region contains an array of cis-acting regulatory elements and a dinucleotide CA repeat (microsatellite). Using the full-length mouse CNP genomic fragment isolated, it was possible to construct a targeting vector for the disruption of CNP, in which the 1st and 2nd exons of the mouse CNP gene would be disrupted.

We have previously developed transgenic mice with overexpression of BNP in the liver and showed that BNP is involved in the chronic blood pressure control. Three independent transgenic mouse lines with marked overexpression of BNP exhibited skeletal abnormalities of variable severity in proportion to plasma BNP concentrations. Skeletal abnormalities included kyphosis, crooked tails, and overgrowth of vertebrae and long bones. No gross abnormalities were found in the craniofacial portion of transgenic mice. Soft X-ray analysis revealed that BNP-transgenic mice have larger vertebral bodies in length, and elongated tibias and metatarsal bones compared to non-transgenic controls. Light microscopic examinations revealed overgrowth of the growth plate cartilage in vertebrae and long bones, both of which are formed by endochondral replacement. The BNP-transgenic mice exhibited overgrowth of the growth plate cartilage and hyaline-like cartilage formation in the intervertebral disc and ligament. The present study provides the first in vivo evidence that natriuretic peptides are involved in the process of endochondral ossification.