

特集

Atrial Natriuretic Peptides (ANP)

松尾壽之*

はじめに

1960年代初頭から、ホ乳類の心房細胞内に特殊顆粒が存在し、これらが、ペプチドホルモン産生細胞に認められる顆粒と形態学的に極めて類似していることが知られていた¹⁾。しかし、その生体内での役割については未知のままであった。1979年、deBold は、食塩負荷や絶水したラットでは、この心房性特異顆粒が増減することを報告²⁾、さらにラット心房の抽出物を別のラットに静注すると、著しい利尿および尿中への電解質排泄が促されることを明らかにした³⁾。

以来、心房の特異顆粒にはナトリウム利尿作用を有する未知の因子が存在し、体液の容量調節に関して重要な役割を担っていると考えられ、また本態性高血圧と腎臓におけるナトリウム排泄能と

を関連づける可能性を持つ物質として注目されていた⁴⁾。多くの研究グループがこの未知の因子の探索、同定に意欲的にとり組んでいたが、最近これらの生化学的研究により、ヒトおよびラットの心房から、ナトリウム利尿作用を有するペプチド性ホルモンの単離、精製、構造決定が行われると同時に、これらの前駆体の cDNA の塩基配列も報告され、構造の全ぼうがほぼ明らかとなった。筆者等はこのホルモンを心房性ナトリウム利尿ペプチド (atrial natriuretic polypeptides: ANP) と命名した。

ヒト心房性ナトリウム利尿ペプチド (human atrial natriuretic polypeptide: hANP)

ヒトの心房からは、分子量の異なる3種のペプチド性ホルモン、 α - (分子量約3,000)、 β - (分子量

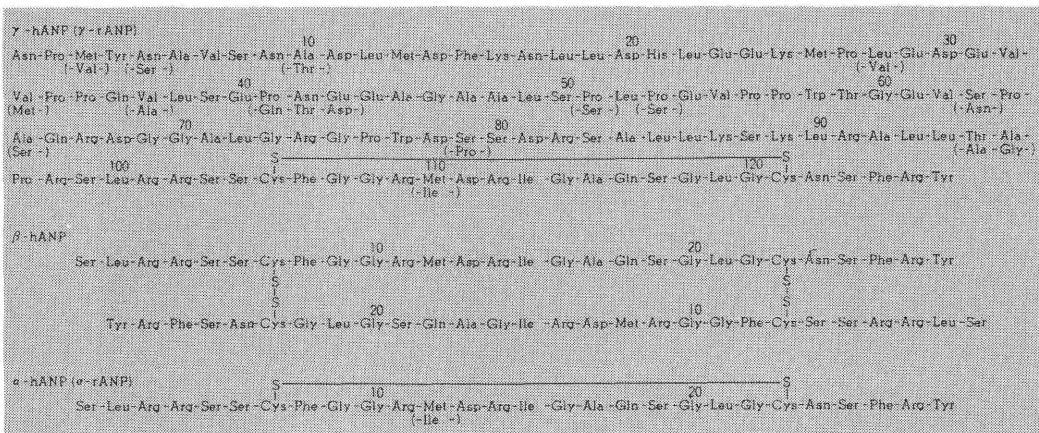


図1 α -, β -, γ -hANP のアミノ酸配列と α -, γ -rANP におけるアミノ酸置換

*宮崎医科大学第二生化

約6,000), γ -hANP (分子量約16,000) が単離・精製され、図-1に示すようなアミノ酸配列であることが明らかにされた^{5,6)}。

α -hANP は、アミノ酸28残基から成るポリペプチドで、1本のジスルフィド (S-S) 結合が分子内に存在する。 α -hANP のナトリウム利尿作用は迅速に強い効果を発現し、麻酔ラットに α -hANP 合成品 1.2 μ g (0.4ナノモル) を静注した場合、投与後5分以内に尿量は投与前の約20倍、 Na^+ , Cl^- , Mg^{++} , Ca^{++} の尿中への排泄は約30倍に達する。この効果は投与後約30分間観察される。さらに種々の平滑筋に対し著明な弛緩作用を示し、血圧を 15~20 mmHg 低下させ、この血圧降下作用は約45~60分持続する⁵⁾ (図2及び表1)。これらの利尿および血圧降下作用は、 α -hANP の N-末端から12番目のメチオニン残基 (Met) が酸化されると消失する。

γ -hANP は、その C-末端部 (99-126) に α -hANP 構造を含む鎖長の長いポリペプチドで、126個のアミノ酸から構成される⁶⁾。麻酔ラットを用いた実験では、 γ -hANP は α -hANP とほぼ同様のナトリウム利尿、血圧降下活性を示すが、比活性は α -hANP に対し約1/5とやや弱い⁶⁾。

β -hANP は、 α -hANP の二量体であるが、ペプチドホルモンとしては非常に珍しい逆平行二量体構造で、 α -hANP の分子内ジスルフィド結合が、 α -型2分子間の結合に組み換えられた形をし

表1 α -, β -, γ -hANP の利尿活性⁷⁾

(nmol)	α -hANP 0.2	β -hANP 0.8	γ -hANP 1.0
尿排泄	315±52	298±4	212±38
Na^+ 排泄	422±83	335±78	295±52
K^+ 排泄	278±48	152±27	143±12
Cl^- 排泄	451±78	366±62	320±49

活性は、麻酔ラットに静注前後15分間に集めた尿における%変化 (mean±S. E.) で表わした。

ている⁶⁾。 β -hANP も、 α - および γ -hANP と同様のホルモン活性を有するが、 α -, γ - 体に比べて幾分遅効性かつ持続的な効果が認められる⁶⁾。

剖検例を用いたヒト心房における α -, β -, γ -hANP の心房内含有比は一定ではない。 α -, β -, γ -hANP の3者を同等に含むもの、 γ -hANP が主成分であるもの、 β -hANP が圧倒的に多いものの3種のタイプが見い出されており⁷⁾、ヒト心房の細胞内において、 α -, β -, γ - 型のいずれの型で顆粒内に貯蔵され、どのような機構で分泌されるのかは不明である。

ラット心房性ナトリウム利尿ホルモン (rat atrial natriuretic polypeptide: rANP)

多くの研究グループがラット心房からの利尿因子の単離・精製を進めていたが、ほぼ同時期に cardionatrin⁸⁾, rANP^{9,10)}, ANF^{11,12,13)}, atriopeptin¹⁴⁾, auriclin¹⁵⁾ などの名称で報告された。これ

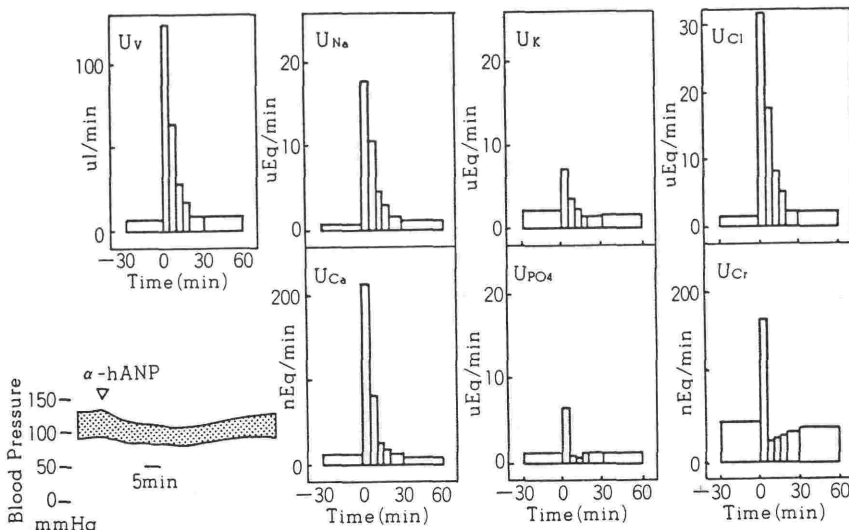


図2 α -hANP (1.2 μ g) 静注による利尿及び降圧作用 (麻酔ラット)

らは種々のサイズの低分子ペプチドで、ナトリウム利尿活性の本態についてはやや混乱気味であったが、最近になってほぼ統一的方向に整理されつつある。

deBold ら⁸⁾、ついで筆者ら¹⁰⁾のグループがアミノ酸28残基から成るペプチドホルモンをラットの心房抽出物の低分子分画から単離・精製し、それぞれ cardionatrin I, α -rANP と命名、アミノ酸配列を明らかにした(図-1)。

α -rANP はヒトの α -hANP と極めてよく似た構造をしており、N-末端から12番目のアミノ酸1カ所に差異(ヒトでは Met, ラットでは Ile)が認められるのみである(deBold の最初の報告⁸⁾では、C-末端から2番目の Arg が未確定であった)。

続いて、この α -rANP の N-末端側で延長あるいは切断されたペプチドおよび C-末端側で短縮された形の数種のペプチドが、やはりラット心房から、いずれも低収率ながら単離された⁹⁻¹⁵⁾。しかし、その後、筆者らにより¹⁶⁾、ラット心房中の主成分として、126個のアミノ酸残基から成る高分子の γ -rANP が精製され、構造決定がなされた結果、これまでに報告された低分子の活性ペプチドは、 γ -rANP の C-末端部分に相当することが明らかになった。図1に示すように、 γ -rANP と γ -hANP のアミノ酸配列を比較すると、両者は極めて高い構造上の相同性を示し、とくに C-末端部では110番目(α -ANP の12番目)に Met (ヒト)→Ile (ラット)の置換があるに過ぎない。最近、筆者ら⁷⁾はさらに、ラット心房中では、ほとんどすべて、高分子の γ -rANP の形で存在し、低分子形の ANP は含まれないことを証明した。

低分子ペプチドは、おそらく抽出過程において、極く僅か生じた二次分解物であろうと考えられている。

これに対し、血中では、アミノ酸28残基から成る α -rANP の形で循環していることも明らかになった^{7,17)}。しかし、 γ -型から α -型への転換がどの部位で行なわれるのかは、まだ解明されていない。

ANP-前駆体蛋白質

最近、ラット^{16,18,19)}、ヒト²⁰⁾の ANP 前駆体の構造は筆者らを含む3グループが同時に cDNA 解析の結果から明らかにした。それによると、まずヒトの ANP 前駆体は、151個のアミノ酸から構成され、N-末端部に位置するシグナルペプチドが(25残基)が酵素による加水分解によって切断されると直ちに γ -hANP を生成することを示している²⁰⁾(図3)。

一方、ラット ANP の前駆体蛋白質は^{16,18,19)}、ヒトに比べてアミノ酸が1個多く152残基から成る。N-末端側にアミノ酸24残基のシグナルペプチド存在し、126個のアミノ酸から成る γ -rANP ユニットが続くという構造はヒト型と同様、ラット型にも共通している。しかし、ラットの場合には、さらに C-末端部に Arg-Arg 構造が付加されているという特徴がある。

ヒトおよびラットとも、ANP 前駆体が合成された後、N-末端シグナルペプチドが切断されて、高分子型の γ -hANP または γ -rANP (いずれも126アミノ酸残基)が生成される。続いて、プロセッシングが進むと、 γ -ANP の C-末端部分28残基に対応する α -ANP に生成され

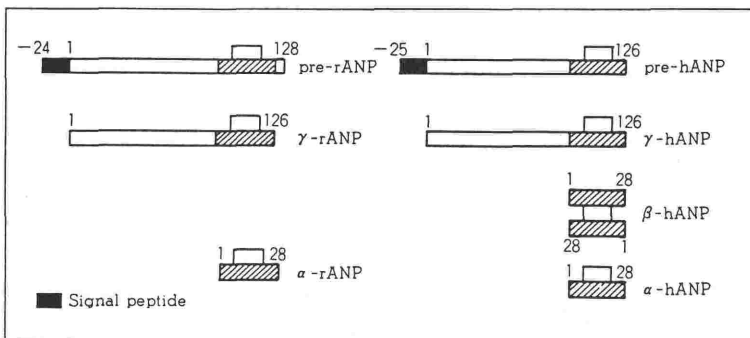


図3 rANP および hANP 前駆体とそのプロセッシング模式図

る系が存在することを示唆している。

現在のところ、各々の ANP の生合成の機序については不明な点も多いが、ヒトの心房組織中には α -、 β -、 γ -hANP の 3 種類の分子型が見出されていることから^{5,6,7}、 γ -型から α -hANP への転換、さらに β -hANP の生成はともに心房細胞内で行なわれると考えられる。しかし、ラットに関しては、心房組織は γ -型のみを含み、 α -型の存在は認められない。しかし、循環血流中では α -rANP として存在している^{7,17}。そのプロセシング機序は現在不明であるが、ラットにおいてもヒトと同様に心房細胞内で、 γ -型から α -型に変換された後、血中に分泌されている可能性が高い。なお、ヒトに見られる二量体 (β -型) は、ラットにおいては見出されていない。

ANP の生理作用

hANP 及び rANP の構造決定によって、ANP 関連のペプチド合成が可能となり、これらの合成品を用いて種々の生理作用が明確になりつつある。

ANP のもつナトリウム利尿の作用は先にも述べたように、静注後速やかに発現し、かつ短時間でその効果は消失する⁵。ANP レセプターが、腎糸球体および集合管部に存在することが指摘されているものの²¹、強力な利尿活性の発現機序についてはよく判っていない。マイクロパンクチャー実験による尿細管内作用部位についての検討もなされているが、近位尿細管やヘンレ係蹄には直接作用はないようである²²。糸球体濾過率 (GFR) の増加、腎血流量 (RBF) の増大、髄質部集合管における Na 再吸収の抑制などの報告もあるものの、互いに矛盾する報告が多い^{23,24,25}。ANP は、内因性ジキタリス様物質とは異なり、 Na^+ 、 K^+ -ATPase 阻害作用は有しない²⁶。

雪村ら²⁷は、ペントバルビタール麻酔した犬を用いて、左側腎動脈に α -hANP 合成品を持続的に投与して、ANP の GFR, RBF に対する影響を調べた。その結果、 $0.2 \mu\text{g}/\text{min}$ では、GFR, RBF とともに投与前とほとんど同じだが、 $1 \mu\text{g}/\text{min}$ の ANP の持続投与では、投与直後から GFR, RBF が増加する。さらに、 $5 \mu\text{g}/\text{min}$ 投与では、RBF が一過性に増大するとともに、血圧が低下し始める。血圧降下に伴い、いったん増加した RBF は徐々に減少し、対照値に近づくと報

告している。腎血管抵抗値は、常に低値を示すことより、腎血管および他の末梢血管壁も拡張すると考えられる。麻酔ラットで ANP 投与の影響を調べた場合、降圧効果は利尿作用よりやや持続的で、摘出標本を用いた血管平滑筋拡張作用は、特に腎動脈に対して著しく²⁸、したがって血管拡張は利尿作用の大きな要因のひとつと考えられている。当然、ANP レセプターが血管壁に存在することも報告されている²¹。また、ANP は副腎遊離細胞、血管平滑筋細胞、あるいは尿において cyclic GMP (cGMP) の増加を起こすことから^{29,30}、ANP と cGMP 系との関連が注目されている。Hamet らは、cGMP-フォスホジエステラーゼの阻害説を提出している²⁹。また、cGMP による平滑筋弛緩時には、細胞内の遊離の Ca^{++} イオンが減少すると考えられる。ともかく、ANP による血管拡張作用が、cGMP の介在により発現するのかどうか、明確な定説はない現状である。

一方、体液量や血圧の重要な調節因子であるアルドステロンと ANP との関係についての研究もなされている。

Atarashi ら³¹は、ラット副腎皮質球状細胞系において、ANP がアルドステロン産生を抑制する他、ACTH、アンジオテンシン II の作用をも部分的に抑制することを報告している。また、石井ら³²も、ラット副腎皮質球状遊離細胞を用いた実験で、 $3 \times 10^{-8} \text{ M}$ 以上の ANP 濃度でアルドステロン産生が抑制されることを観察している。詳細な機構については明らかではないが、ANP レセプターが副腎皮質に存在することや、ANP が ACTH によるコルチゾール産生を低下させる³³ことを考えあわせると、ANP はアルドステロン生成の初期過程で阻害効果を及ぼすものと考えられる。

腎スライス実験で、ANP がアンジオテンシン II によるレニン分泌の抑制をさらに増強すること (Horton ら³⁴)、ANP を持続静注したイヌで血漿レニン活性が低下すること (Maack ら³⁵) など、ANP の傍糸球体装置からのレニン分泌への抑制効果を示す報告もある。

最近の Lang ら³⁶のラットを用いた実験報告によると、生理食塩水の静注、または摘出した心臓の灌流によって右心房圧を $1 \sim 5 \text{ mmHg}$ 上昇さ

せると、血中あるいは灌流液中に低分子型の ANP が増加するという。このことは、右心房圧の変化が心臓からの ANP 分泌に何らかの影響を及ぼすことを示しており、心房が容量または圧受容体としての機能を有することとも関連して、非常に興味深い。

ANP のラジオイムノアッセイ (RIA)

ANP 特異抗体を利用して RIA や免疫組織化学的な知見が蓄積されつつある^{7,37)}。

筆者ら⁷⁾は、 α -hANP-サイログロブリン複合体を家兔に免疫して作製した抗 α -hANP 抗血清を用いて RIA 系を確立した。

本抗血清は40万倍希釈で測定可能で、最小検出感度が 2 pg/tube と極めて高感度である。この抗体は、 α -、 β -、 γ -hANP を等しく認識するとともに、ラット由来の ANP に対しても、 γ -型をはじめ、各種の低分子 rANP 類を約40%の交差活性で認識しうる。本 RIA と逆相 HPLC とを組み合わせた系を用いて、ANP の分布を調べ、以下のような結果を報告した。

まず、ラット、ウシ、ブタ及びヒトの心房組織内での ANP の同定を行った実験では、ヒト(剖検組織)の場合、前述したように α -、 β -、 γ -、hANP の3種の存在比が検体によりさまざまに一定しないのに対し、ヒト以外の動物の心房では、 γ -型の大分子 ANP のみが含まれることが明らかとなった。このヒトと他の動物群との差異の理由については現在検討中である。また、血中での存在様式は、心房の場合と異なり、ラットでは α -rANP (28アミノ酸残基)、ヒトでは α -及び β -hANP の形として循環していることが確認さ

れた。しかしながら、 γ -体から α -ANP への変換部位、さらにその分泌過程などは、依然として不明である。

ラットの各種臓器における ANP 免疫活性の分布を表2にまとめて示した⁷⁾。心臓では、特に心房に集中して局在するのは当然のことながら、心室にも心房の数100分の1の濃度の ANP の免疫活性が認められた。さらに、心房の左右を比較した場合、左心房は右心房の約60%と少なく、右心房に ANP 活性が偏る事実は、今後の研究に対して極めて示唆的ではある。他の臓器含量を概観すると、心臓に比して著しく低値であるが、顎下腺、甲状腺、脳、副腎などにも明らかな免疫活性が認められる。

脳の免疫組織化学的研究³⁸⁾では hypothalamus, pontine tegmentum などに ANP 陽性ニューロンが観察されており、循環系の調節に關与する神経系の伝達物質としての作用もあわせ持つ可能性も考えられる。

既述したようにラット血液中の ANP はほとんど α -型で 400 pg/ml とかなり高濃度だが、¹²⁵I で標識した ANP を用いた血中の ANP 半減期は約2.5分と短いことより、ANP の心房からの分泌量は予想以上に大量であろうと思われる。

高血圧発症と ANP との関連を検討した研究では、13-15週令の高血圧発症ラット (SHR, SHR-sp) の心房内 ANP 濃度が正常ラットに比べて有意に低値を示すことを報告している³⁹⁾。

以上、ANP の構造決定が重要な端緒となって短期間の間に大きく発展した ANP 研究の概略について述べた。これまで、ANP の Na 利尿活性を中心に腎、循環系における ANP の生理作用の解明が主として進められてきたが、ANP の血中濃度ならびに心房内含有量が極めて高いことから、ANP がより全身的な作用、すなわち生体内の水-電解質調整に係わる基本的ホルモンとして、生体のホメオスタシス維持に重要な役割を果たしている可能性が強い。今後、ANP と種々の疾患との関係、さらに治療薬としての ANP の活用など、広範囲にわたる ANP 研究が意欲的に展開されるものと思われる。

表2 ラット各種臓器における ANP 免疫活性の分布

全 脳	6.03±0.45	肺	< 5
下垂体	< 5	腎	< 5
甲状腺	94.9±8.57	膵	< 5
顎下腺	241.5±38.8	肝	< 5
舌下腺	< 5	脾	< 5
唾液腺	< 5	副腎	5.56±0.58
右心房	99,720±14,270	胃	< 5
左心房	56,140±4,240	小腸	< 5
心室	313±110	結腸	< 5
		血漿	389.3±53*

* pg/ml

文 献

- 1) Jamieson, J. D. & Palade, G. E.: *J. Cell Biol.*, **23**, 151 (1964).
- 2) de Bold, A. J.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **161**, 508 (1979).
- 3) de Bold, A. J. et al.: *Life Sci.*, **28**, 89 (1981).
- 4) deWardner, H. E. & McGregor, G. A.: *Medicine*, **62**, 310 (1983).
- 5) Kangawa, K. & Matsuo, H.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **118**, 131 (1984).
- 6) Kangawa, K. et al.: *Nature*, **313**, 397 (1985).
- 7) Miyata, A. et al.: *Biochem. Biophys. Commun.*, **129**, 248 (1985).
- 8) Flynn, T. G. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **117**, 859 (1983).
- 9) Kangawa, K. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **119**, 933 (1984).
- 10) Kangawa, K. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **121**, 585 (1984).
- 11) Seidah, N. G. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **81**, 2640 (1984).
- 12) Thibault, G. et al.: *FEBS Lett.*, **167**, 352 (1984).
- 13) Sugiyama, M., Fukumi, H., Grammer, R. T., Misono, K. S., Yabe, Y., Morisawa, Y. & Inagami, T.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **123**, 338 (1984).
- 14) Currie, M. G. et al.: *Science*, **223**, 67 (1984).
- 15) Atlas, S. A., et al.: *Nature*, **309**, 717 (1984).
- 16) Kangawa, K. et al.: *Nature*, **312**, 152 (1984).
- 17) Schwartz, D., et al.: *Science*, **229**, 397 (1985).
- 18) Yamanaka, M. et al.: *Nature*, **309**, 719 (1984).
- 19) Maki, M. et al.: *Nature*, **309**, 722 (1984).
- 20) Oikawa, S. et al.: *Nature*, **309**, 724 (1984).
- 21) Napier, M. A., et al.: *Prsc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **81**, 5946 (1984).
- 22) 根東義明ほか: ホルモンと臨床 **33**, 351 (1985).
- 23) 雪村時人ほか: ホルモンと臨床 **33**, 345 (1985).
- 24) Seymour, A. A., et al.: *Life Sci.*, **36**, 33 (1984).
- 25) Burnett, J. C. Jr. et al.: *Am. J. Phrpial.*, **247**, F863 (1984).
- 26)
- 27) Yukimura, T., et al.: *Eur. J. Pharmacol.*, **103**, 363 (1984).
- 28) Ishihara, T. et al.: *Life Sci.*, **36**, 1205 (1985).
- 29) Hamet, P., Tremblay, J., Pang, S. C., Garcia, R., Thibault, G., Gutkowska, J., Cantin, M. & Genest, J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **123**, 515 (1984).
- 30) Ishii, M. et al.: *Adv. Prosta. Thrombo. Leuko. Res.*, in press.
- 31) Atarashi, K., et al.: *Science*, **224**, 992 (1984).
- 32) Matsuoka, H., et al.: *Biochem. Biophys. Commun.*, **127**, 1052 (1985).
- 33)
- 34) Horton, R. et al.: personal communication.
- 35) Maack, T., et al.: *Amer. J. Med.*, **77**, 1069 (1984).
- 36) Lang, R. E., et al.: *Nature*, **314**, 264 (1985).
- 37) Nakao, K., et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **124**, 815 (1984).
- 38) Saper, C. B. et al.: *Science*, **227**, 1047 (1985).
- 39) Higa, T. et al.: *Jap. Circ. J.*, **49**, 973 (1985).