総	説
---	---

ナトリウム利尿ペプチドファミリー

京都大学第2内科

中 尾 一 和

Natriuretic Peptide Family

Kazuwa NAKAO

Second Division, Department of Medicine,
Kyoto University School of Medicine, Kyoto, Japan

The natriuretic peptide system consists of at least three endogenous ligands: atrial natriuretic peptide (ANP), brain natriuretic peptide (BNP) and C-type natriuretic peptide (CNP), and three receptors, ANP-A receptor (guanylate cyclase A), ANP-B receptor (guanylate cyclase B) and clearance receptor (C receptor).

ANP, the prototype of natriuretic peptides, is mainly produced in the atrium and secreted into the circulation as a cardiac hormone. ANP is also produced in the ventricle and in the central nervous system. BNP, first isolated from the porcine brain, has a marked divergence in its molecular size and sequence among species. In humans and rats, the major site of production of BNP is the ventricle of the heart. BNP is also secreted into the circulation as a cardiac hormone. The plasma BNP level in normal subjects is approximately one sixths of the plasma ANP level; however, the plasma BNP level markedly increases in heart failure, renal failure and hypertension and the augmentation of the BNP secretion is much larger than that of the ANP secretion. In addition, clearance of BNP from the circulation is slower than that of ANP. Furthermore, BNP is secreted more urgently than ANP in acute heart failure. CNP distributes mainly in the central nervous system and pituitary gland. No significant amount of CNP is detectable in the heart and plasma. Thus, CNP is a local regulator rather than a cardiac hormone.

Three natriuretic receptors have ligand selectivity. The rank order in potency for cyclic GMP production via ANP-A receptor is $ANP \geq BNP \gg CNP$, while that via ANP-B receptor is $CNP > ANP \geq BNP$. The rank order of binding affinity for C receptor is $ANP > CNP > BNP$.

The complicated natriuretic peptide system is implicated in the control of body fluid and blood pressure in endocrine and paracrine fashions.

Key words : Atrial natriuretic peptide, Brain natriuretic peptide, C-type natriuretic peptide, Natriuretic peptide receptor, Clearance receptor, Particulate guanylate cyclase

はじめに

1983年の年末から1984年の初頭にかけての atrial natriuretic peptide (ANP) の単離構造決定の報告以来¹⁾²⁾, 血圧・体液量調節に関与する心臓ホルモンおよび神経ペプチドとしての ANP が注目されてきたが³⁾, 1988年になりブタ脳より第2のナトリウム利尿ペプチドとして brain natriuretic peptide (BNP) が単離同定され, ナトリウム利尿ペプチドファミリーの存在が明らかになった¹⁾。一方, 受容体に関する研究も進展し, 1988年のクリアランス受容体のクローニングにつづいて⁴⁾, 1989年には膜型グアニル酸シクラーゼそのものである2種類の受容体がクローニングされた⁵⁾⁶⁾。

更に1990年になり, 松尾らにより第3のナトリウム利尿ペプチドである C-type ナトリウム利尿ペプチド (CNP) がブタ脳より単離構造決定された⁷⁾。このようにナトリウム利尿ペプチドシステムは, 少なくとも3種類の内因性ペプチドと3種類の受容体より成る複雑且つ巧妙な血圧, 体液量調節系であり, 今後ナトリウム利尿ペプチドシステムの分子機構と生理的意義の解明, この成果を踏まえた臨床応用の発展が期待される⁸⁾。

図1. ヒトのナトリウム利尿ペプチドファミリーの構造

NATRIURETIC PEPTIDE FAMILY

<u>ANP</u>		1		28									
α-rat ANP		SLRRSSCFGGR	I	DRIGAQSGLGCNSFRY									
		1		28									
α-human ANP		SLRRSSCFGGR	M	DRIGAQSGLGCNSFRY									
<u>BNP</u>	1			45									
rat BNP	SQDSAFRIQERLRLRNSKMAHS	S	S	CFG	QKI	DRI	GAV	S	R	LGC	DG	LR	LF
		1											32
human BNP	SPKMQVG	S	G	CFG	RKM	DRI	SSS	S	G	LGC	KV	LR	RH
		1											26
porcine BNP	D	S	G	CFG	RRL	DRI	GSL	S	G	LGC	NV	LR	RY
		1											35
bovine BNP	ALRGPKMMRD	S	G	CFG	RRL	DRI	GSL	S	G	LGC	NV	LR	RY
<u>CNP</u>		1		22									
CNP		GLSKGCFGLKLDRI	GSM	SLGC									

図2. ナトリウム利尿ペプチドファミリーの一次構造の種属差

I ナトリウム利尿ペプチドファミリー

ANP (図1, 図2) ¹⁾²⁾³⁾

哺乳類の心臓ホルモンとしての α -ANPは28アミノ酸より成っており、アミノ酸配列は12番目を除いて完全に保存されている。ヒト、ウシ、ブタ、イヌ等では12番目のアミノ酸はメチオニンであり、ラット、マウスではイソロイシンに置換されている。前駆体である γ -ANPは126アミノ酸よりなり、心筋細胞の分泌顆粒中の貯蔵型であり、分泌の直前あるいは分泌中に α -ANPに変換されると考えられている。またヒトのみで α -ANPの逆平行2量体である β -ANPが検出されており、特に心不全で増加することが注目される。 β -ANPは α -ANPに変換されて作用すると考えられている。

ANPは中枢神経系にも存在するが、神経ペプチドとしてANPはN端部のアミノ酸の欠如した α -ANP[4-28]、 α -ANP[5-28]であり、組織特異的なプロセッシング酵素が存在すると考えられている³⁾。

ANP生合成・分泌の主要組織は心房であり、心房筋の伸展が主要な分泌刺激となる。正常心室にも心房の100分の1程度のANP mRNAが検出され心室でもANPが生合成されるが、胎生期や新生児期、並びに肥大心臓の心室筋細胞ではANP生合成が亢進していることが知られている。また、ラットでは第3脳室前腹側部 (anteroventral third ventricular region, AV3V region) 等にANP陽性神経細胞の分布が明かにされており、中枢性体液量血圧調節に作用していると考えられている³⁾。

BNP (図1, 図2) ¹⁾⁸⁾

BNPは1988年ブタ脳より単離構造決定されたが、26アミノ酸より成るBNP-26に加え、N端部に6アミノ酸が延長したBNP-32が存在することが知られている。クローニングされたブタBNP前駆体は106アミノ酸より成るが、2カ所で蛋白分解酵素の作用を受けBNP-32、BNP-26が生成される。ブタBNPの脳内分布はANPの脳内分布と明らかに異なることが知られている。また、その後の研究によりブタBNPの組織濃度は脳より心臓で高濃度であること、分泌型は低分子型のBNP-32、BNP-26であることが明らかになってきている。しかし、ANPの構造が哺乳類でよく保存されているのと対照的に、BNPのアミノ酸配列と分子サイズは著しい種属差が存在するため、ブタBNPに対する抗体はヒトやラットのBNPと交叉反応を示さず、研究上の大きな妨げになっていた。

松尾ら著者らは、1989年にラットBNPを、1990年にヒトBNPの単離構造決定に成功したが、ラットBNPは45アミノ酸、ヒトBNPは32アミノ酸より成り、ナトリウム利尿ペプチド特有の環状構造が著しく異なることが明らかになった (図2)。De Leanらにより報告されたウシBNPは35アミノ酸より成っており、分子サイズも多様であることが注目される。前駆体のアミノ酸数も種属差が著しく、ブタが106個であるのに対し、ラットでは95個、ヒトでは108個である。更に注目すべきは生物活性に認められる種属差であり、ヒトBNPはラットに静脈内投与してもそのナトリウム利尿作用はラットBNPやANPの数十分の一に過ぎず、またラット大動脈標本の弛緩活性も著しく弱い。ブタ冠動脈の弛緩活性はブタBNPの10倍、ラットBNPの500倍であり、ANPより強い⁹⁾。ヒトBNPはヒトに投与した際にはANPと同等以上の生物作用を発揮することも明らかにされている¹⁰⁾。

ヒトBNPとラットBNPの単離同定によりBNP生合成や分泌に関する研究は急速に進展し、BNPはブタ脳より単離同定されたにもかかわらず、ヒトやラットの脳にはほとんど検出されないこ

と¹¹⁾、組織中 BNP 濃度は心房で最も高濃度であるが、BNP mRNA 総量は心室で最大であり、ヒトの心臓カラーラール検査時に得られた血漿サンプルの解析やラット心臓の灌流実験の結果より血中 BNP の主要な分泌源は心室であることが証明されている¹¹⁾¹²⁾。また、BNP の半減期は ANP に比較すると有意に大きく、BNP は ANP より long acting であり、この BNP の特徴も BNP の臨床応用を期待されるものである¹²⁾。

以上より心臓は主に心房より ANP、主に心室より BNP を合成し、各々心房、心室に対する負荷に応じて分泌すると考えられる。

CNP (図1, 図2)¹³⁾

CNP は、ブタ脳より単離同定された22個のアミノ酸から成る第3のナトリウム利尿ペプチドであり、ナトリウム利尿ペプチドに共通のジスルフィド結合によって形成される環状部分を有するが、C 端部分への伸長が欠如している点が特徴的である⁷⁾ (図1)。その後、ブタ脳より、N 端部が伸長した53残基から成る CNP-53が単離され、ブタ脳内における主要な分子型として報告されている。ブタ CNP 遺伝子、ラット CNP cDNA、ヒト CNP 遺伝子の構造解析が行われ、CNP の構造は、ヒト、ブタ、ラットで完全に同一であり、CNP-53では、ブタとラットは同一でヒトでは2箇所アミノ酸が異なることが明らかにされた¹³⁾。

このように CNP 構造は種を越えて保存されており、多様な分子型を示す BNP とは極めて対照的である。また CNP-53は CNP と同様に生物活性を有することが知られている。著者らは、最近、CNP に対する RIA を開発しラットの体内分布およびヒト脳内における CNP の分布を検討した¹⁴⁾。ラットにおいては CNP は、下垂体において最も高濃度検出され (前葉>後葉)、脳内各部位にも広範に分布していた。腸管、腎においてもわずかに検出されたが、心臓を含む他組織では検出されなかった。これらの結果は、ラット各組織における CNP 遺伝子発現を Northern blot 法にて検討し、脳においてのみ mRNA が検出されたことと合致するものである。表1には、ヒト脳内各部位におけるナトリウム利尿ペプチドの分布を示すが、CNP は、ヒト脳内各部位に広く分布し、視床下部・視床・中脳・延髄において高濃度検出され、同時に測定した ANP, BNP 濃度の10倍以上であり、CNP がヒト脳内の主要なナトリウム利尿ペプチドであることが示唆された。また CNP はヒトの脳脊髄液中にも検出され、その濃度は ANP, BNP 濃度より高値を示す。以上の成績より CNP は ANP や BNP とは異なり神経ペプチドあるいは、局所因子として作用していると考えられる。

ヒト血液中のナトリウム利尿ペプチドファミリー

図3には正常血中 ANP, BNP 濃度と心不全、腎不全、本態性高血圧症、内分泌性高血圧患者の血中濃度を示している¹⁵⁾。ヒトの正常血中 BNP 濃度は平均0.9fmol/ml 位であり、同時に測定した ANP 濃度の6分の1程度であるが、重症心不全では基礎値の100倍以上の増加を示し、ANP より高値を示す場合も多い。腎不全や高血圧でも BNP の基礎値よりの増加率は ANP より大きく、心室での生合成・分泌の亢進とクリアランスされにくい性質によると考えられている。また最近、著者らは急性心筋硬塞による急性心不全患者において血中 BNP 濃度は発作後数時間以内に著しい増加を示すことを報告した¹⁶⁾。心臓は急性心筋硬塞に代表される緊急事態には心室での BNP 生合成と分泌が亢進することを示唆しており、更に検討を進めている。心臓は主に心房より ANP、心室より BNP を分泌していることは既に述べたが、2種類の心臓ホルモンの存在する生理的・臨床的意義の解明が期待される。

表1. ヒトの脳におけるナトリウム利尿ペプチドファミリーの分布

Brain regions	CNP-LI	ANP-LI	BNP-LI
Cerebral cortex	0.61	<0.07	<0.06
Thalamus	2.90	<0.07	<0.06
Hypothalamus	4.02	0.13	<0.06
Midbrain	3.28	<0.07	<0.06
Pons	<0.40	0.15	<0.06
Medulla oblongata	2.78	0.08	<0.06
Cerebellum (cortex)	0.85	<0.07	<0.06

LI=like immunoreactivity

(pmol/g wet tissue)

図3. ヒト血液中の ANP, BNP 濃度

図4. ナトリウム利尿ペプチド受容体の構造

II ナトリウム利尿ペプチド受容体¹⁷⁾

ナトリウム利尿ペプチド受容体については、結合実験と cyclic GMP 産生能の研究により、膜型グアニル酸シクラーゼと共役し、生物作用に關与する受容体 (Biologically Active Receptor, B 受容体) とグアニル酸シクラーゼとは共役せず、クリアランスのみに關与するクリアランス受容体 (Clearance Receptor, C 受容体) の存在が提唱されてきた¹⁸⁾。そして実際にウシの血管平滑筋の C 受容体の全構造がクローニングされた⁴⁾。

1989年には、ウニの精子のリサクト受容体の研究に端を発したラットの膜型グアニル酸シクラーゼのクローニングが行われ、膜型グアニル酸シクラーゼそのものが ANP 受容体であることが証明された⁵⁾。更にその後、基本構造の類似した異なる受容体がヒト胎盤 cDNA ライブラリーよりクローニングされた。この受容体は ANP よりブタ BNP の方が cyclic GMP 産生能が強いことが報告され⁶⁾、前者は ANP-A 受容体あるいは GC-A、後者は ANP-B 受容体あるいは GC-B と命名された。図4に3種類の受容体の構造を模式的に示している。3種類の受容体は1回膜貫通型であるが¹⁷⁾、最初にクローニングされた C 受容体は細胞内ドメインは37アミノ酸よりなるのみであり細胞内情報伝達機構を持たないと考えられている⁴⁾。しかし、サイトカイン受容体のように他の蛋白質と共役して情報伝達を行う可能性も残されている。C 受容体はホモダイマーとして存在している。現在までのところ、C 受容体のサブタイプの存在は明らかにされていない。

ANP-A 受容体と ANP-B 受容体はその基本構造は極めて類似しており、ナトリウム利尿ペプチドの結合する細胞外ドメインとプロテインキナーゼドメイン、グアニル酸シクラーゼドメインよりなる細胞内ドメインを有する。グアニル酸シクラーゼ構造を含む細胞内ドメインの相同性は極めて高く、対照的にリガンド選択性に關与する細胞外ドメインの相同性は相対的に低い。プロテインキナーゼドメインの deletion mutant を Cos7 細胞に発現させると cyclic GMP 産生が

constitutive に活性化されることが明らかになり、このドメインはグアニル酸シクラーゼ活性を抑制的に調節していることが示唆されている¹⁷⁾。また ATP によるグアニル酸シクラーゼの活性化はこのプロテインキナーゼドメインへの ATP の結合によって起ると考えられている¹⁷⁾。

ANP-A 受容体, ANP-B 受容体の細胞内ドメインのプロテインキナーゼドメインに続く C 末端に存在するグアニル酸シクラーゼドメインはアデニル酸シクラーゼとの相同性が知られているが実際に cyclic GMP 産生に与ることが証明されている¹⁷⁾。

表2. ナトリウム利尿ペプチド受容体のリガンド選択性

ANP-A 受容体	ANP ≥ BNP ≫ CNP
ANP-B 受容体	CNP > ANP ≥ BNP
クリアランス受容体	ANP > CNP > BNP

III ナトリウム利尿ペプチド受容体のリガンド選択性¹⁹⁾²⁰⁾

ナトリウム利尿ペプチドファミリーの作用を解明するためには、これまで述べてきた3種類の受容体、即ち ANP-A 受容体, ANP-B 受容体, C 受容体のリガンド選択性を明らかにすることが重要である。この際に十分に留意すべきことは、BNP の一次構造に著しい種属差が存在することであり、in vivo や in vitro の bioassay 標本としてどの種属を用いるかで生物作用が大きく異なることは既に述べた通りである。従ってナトリウム利尿ペプチド受容体のリガンド選択性を解明するためには、同種属の受容体とリガンドを用いることが不可欠である。表2にはヒトとラットにおいて著者らが検討した3受容体のリガンド選択性をまとめて示している¹⁹⁾。同種属の受容体とリガンドを用いて検討するとヒトとラットで本質的に同一の選択性が認められ、ANP-A 受容体においては ANP が最も強力に cyclic GMP 産生を刺激し、BNP は ANP に次いで cyclic GMP 産生を刺激することが明らかになった。しかし CNP は ANP の10³分の1以下の cyclic GMP 産生しか示さず生理的には ANP-A 受容体には作用しないと考えられる。一方、ANP-A 受容体とは対照的に ANP-B 受容体は CNP により最も強力に cyclic GMP 産生が促進され、ANP, BNP の作用は弱い。ヒト ANP-B 受容体とブタ BNP を用いて検討された当初の研究ではブタ BNP が例外的に ANP-B 受容体の cyclic GMP 産生を刺激したため、ANP-B 受容体は BNP の受容体として報告されていたが、実際には CNP の受容体であると考えられる。結合実験で C 受容体に対する親和性を検討すると ANP が最も高い親和性を示したが、BNP の親和性は低く ANP の10分の1以下であった。この結果は BNP のクリアランスが ANP に比較して遅いこととよく一致している。以上述べた3種類のナトリウム利尿ペプチド受容体のリガンド選択性はヒトの受容体を Cos7細胞に発現させて検討した Koller らの成績とよく一致している²⁰⁾。

我々はラットにおいて BNP を静脈内に投与すると ANP の約2倍の利尿作用や降圧作用を観察しており⁹⁾、またヒトにおいても BNP 投与は少なくとも ANP と同等の作用を示すことを報告している¹⁰⁾。これらの結果は ANP-A 受容体と ANP-B 受容体のリガンド選択性では説明が困難であり、i) BNP 選択性の未知の受容体が存在する可能性 ii) BNP は C 受容体への親和性が低いので代謝されにくく、ANP-A 受容体を介する作用が in vivo では in vitro より相対的に強く現われる可能性 iii) ANP, BNP, CNP が代謝酵素である Neutral Endopeptidase に対する親和性においても異なっている可能性、等が考えられる。今後の研究の進展が期待される。

最近 Garbers らは第3の膜型グアニル酸シクラーゼをラット小腸の cDNA ライブラリーよりクローニングしたが、この酵素 (GC-C) はナトリウム利尿ペプチド受容体と基本構造は類似しているにもかかわらず、ナトリウム利尿ペプチドとは反応せず、大腸菌のエンテロトキシンの受容体であると報告されている¹⁷⁾。この新しい受容体の内因性リガンドは不明であるが、この発見は膜型グアニル酸シクラーゼはナトリウム利尿ペプチドファミリーに特異的な受容体のみではないことを示唆している。

おわりに

ナトリウム利尿ペプチドファミリーとその受容体に関する研究の最近の進歩について概説した。少なくとも3種類の内因性ペプチドと3種類の受容体よりなるナトリウム利尿ペプチドシステムは、1種類の内因性リガンドと1種類の受容体のみよりなる単純な生体調節システムと比較し、複雑な分子機構の存在する故の巧妙な生理的役割を果している可能性が強い。更に、第4のナトリウム利尿ペプチドの存在する可能性、BNP 選択性受容体の存在の可能性等が示唆されており、今後の研究の発展が期待される。また、この複雑な分子機構の解明はナトリウム利尿ペプチドファミリーの臨床応用を更に発展させるものと期待される。紙面の都合により生理作用に関しては割愛させていただいた。

文 献

- 1) 松尾壽之, 寒川賢治, 南野直人: ナトリウム利尿ホルモンファミリー・蛋白質・核酸・酵素 1988; 33: 2438-2450
- 2) de Bold AJ Atrial natriuretic factor: a hormone produced by the heart. Science 1985; 230: 767-770
- 3) 中尾一和, 井村裕夫: ANP の生合成と分泌・蛋白質・核酸・酵素 1988; 33: 2461-2480
- 4) Fuller F, Porter JG, Arfsten AE, Miller J, Schilling JW, Scarborough RM, Lewicki JA, Schenk DB Atrial natriuretic peptide clearance receptor. J Biol Chem 1988; 263: 9395-9401
- 5) Chinkers M, Garbers DL, Chang MS, Lowe DG, Chin H, Goeddel DV, Schulz S A membrane form of guanylate cyclase is an atrial natriuretic peptide receptor. Nature 1989; 338: 78-83
- 6) Chang MS, Lowe DG, Lewis M, Hellmiss R, Chen E, Goeddel DV Differential activation by atrial and brain natriuretic peptides of two different receptor guanylate cyclases. Nature 1989; 341: 68-72
- 7) Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. Biochem Biophys Res Commun 1990; 168: 863-870
- 8) 中尾一和: ナトリウム利尿ペプチドファミリー -最近の進歩- ・最新医学 1991; 46: 10-15
- 9) Kambayashi Y, Nakao K, Kimura H, Kawabata T, Nakamura M, Inouye K, Yoshida N, Imura H Biological characterization of human BNP and rat BNP -species-specific actions of BNP- Biochem Biophys Res Commun 1991; 173: 599-605
- 10) M. Yoshimura, H. Yasue, E. Morita, N. Sakaino, M. Jougasaki, M. Kurose, M.

- Mukoyama, Y. Saito, K. Nakao, H. Imura: Hemodynamic, renal, and hormonal responses to brain natriuretic peptide infusion in patients with congestive heart failure. *Circulation* 1991; 84: 1581–1588
- 11) Ogawa Y, Nakao K, Mukoyama M, Shirakami G, Itoh H, Hosoda K, Saito Y, Arai H, Suga S, Jougasaki M, Yamada T, Kambayashi Y, Inouye K, Imura H Rat brain natriuretic peptide-Tissue distribution and molecular form-*Endocrinology* 1990; 126: 2225–2227
 - 12) Mukoyama M, Nakao K, Hosoda K, Suga S, Saito Y, Ogawa Y, Shirakami G, Jougasaki M, Obata K, Yasue H, Kambayashi Y, Inouye K, Imura H: 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* 1991; 87: 1402–1412
 - 13) 南野直人, 松尾壽之, 児島将康, 寒川賢治: 新しいナトリウム利尿ペプチド: CNP・実験医学 1990; 8: 2359–2366
 - 14) Komatsu Y, Nakao K, Suga S, Ogawa Y, Mukoyama M, Arai H, Shirakami G, Hosoda K, Nakagawa O, Hama N, Kishimoto I, Imura H 1991 C-type natriuretic peptide (CNP) in rats and humans. *Endocrinology* 1991; 129: 1104–1106
 - 15) Mukoyama M, Nakao K, Saito Y, Ogawa Y, Hosoda K, Suga S, Shirakami G, Jougasaki M, Imura H Human brain natriuretic peptide, a novel cardiac hormone. *Lancet* 1990; 335: 801–802
 - 16) M. Mukoyama, K. Nakao, K. Obata, M. Jougasaki, M. Yoshimura, E. Morita, K. Hosoda, S. Suga, Y. Ogawa, H. Yasue, H. Imura: Augmented secretion of brain natriuretic peptide in acute myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 180: 431–436
 - 17) Chinkers M, Garbers DL: Signal transduction by guanylyl cyclases. *Annu Rev Biochem* 1991; 60: 553–575
 - 18) Maack T, Suzuki M, Almeida FA, Nussenzveig D, Scarborough RM, McEnroe GA, Lewicki JA Physiological role of silent receptors of atrial natriuretic factor. *Science* 1987; 238: 675–678
 - 19) Suga S, Nakao K, Hosoda K, Mukoyama M, Ogawa Y, Shirakami G, Arai H, Saito Y, Kambayashi Y, Inouye K, Imura H: Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide. *Endocrinology* 1992; 130: 229–239
 - 20) Koller KJ, Lowe DG, Bennett GL, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H, Goeddel DV: Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP). *Science (Wash DC)* 1991; 252: 120–123