

氏 名	こ ばやし たく や 小 林 拓 也
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	論 医 博 第 1721 号
学位授与の日付	平 成 12 年 9 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Amino acid residues conferring ligand binding properties of prostaglandin I and prostaglandin D receptors に関する研究 (プロスタグランジン I とプロスタグランジン D 受容体のリガンド結合特異性を決定するアミノ酸の同定)
論文調査委員	(主 査) 教 授 武 藤 誠 教 授 乾 賢 一 教 授 成 宮 周

論 文 内 容 の 要 旨

プロスタノイドはプロスタグランジン (PG) とトロンボキサン (TX) より成る生理活性物質群である。その作用は、標的細胞の細胞膜上にあるプロスタノイド受容体を介して発現される。これまでに PGD, PGE, PGF, PGI, TXA に特異的な受容体は、各々 DP, EP, FP, IP, TP) と名付けられ、EP 受容体には 4 種類のサブタイプ (EP 1, EP 2, EP 3, EP 4) が存在する。プロスタノイド受容体は、7 回膜貫通構造を持つロドプシン型受容体ファミリーに属する。平滑筋に対する機能の面から、収縮性受容体 (EP 1, FP, TP), 弛緩性受容体 (DP, EP 2, EP 4, IP), 抑制性受容体 (EP 3) に分類される。同一グループの受容体が、他のグループの受容体に比べアミノ酸相同性が高いことから、同一グループの受容体が近縁関係にあることがわかる。

PG は、プロスタノ酸を基本構造とし、五員環の 9, 11 位に存在する官能基 (oxo-, hydroxyl-基) と側鎖の二重結合数によって分類される。即ち、五員環構造より D, E, F, I の 4 タイプとオキサン環を持つ TX に、側鎖構造の二重結合数より 1, 2, 3 の 3 シリーズに分類される。受容体はこの僅かな構造の違いを識別するが、どのアミノ酸残基が識別しているのか全く分かっていない。そこで、プロスタノイド受容体のリガンド結合特異性を決定するアミノ酸残基を同定することを目的とし、キメラ受容体とアミノ酸変異受容体を作成し、PGD₂, PGE₁, PGE₂, PGF_{2α} および PGI₂ アナログである iloprost の結合親和性を比較した。キメラ受容体作成には、同じ弛緩性受容体に属し、比較的アミノ酸配列の相同性が高い DP, IP を選択した。DP は D 型の五員環構造 (PGD₂) にのみ高い結合親和性を示す。一方、IP は I 型と E 型の五員環構造 (iloprost, PGE₁) に高い結合親和性を示すが、PGE₂ の結合親和性は低い。即ち、IP は PGE₁ と PGE₂ の側鎖構造の違いを識別する五員環構造識別の選択性が低い受容体である。

キメラ受容体を用いた解析により、側鎖構造と五員環構造を識別する部位は別々に存在していることが明らかとなった。五員環構造の識別には第 1 ~ 3 膜貫通領域が、側鎖構造の識別には第 6, 7 膜貫通領域が各々関与していることが示唆された (Kobayashi, T. et al. J. Biol. Chem., 272, 15154-15160, 1997)。次に、五員環構造識別部位を限定するために、さらにキメラ受容体を作成した。その結果、五員環構造の識別には第 1 膜貫通領域から第 1 細胞外ループが関与していることを明らかにした。また、DP の第 2 膜貫通領域と第 1 細胞外ループを IP に置き換えると、iloprost のみ結合した。次に、このキメラ受容体を用いてアミノ酸変異受容体を作成した。機能的に同一のグループに属する DP, EP 2, IP のアミノ酸配列を比較した。DP と EP 2 で共通で IP と異なるアミノ酸残基に注目し、DP の第 2 膜貫通領域の Leu⁸³ と Lys⁷⁵ が各々 iloprost 結合を排除し、PGD₂ の結合親和性を高めることが明らかとなった。また、IP と EP 2 で共通で DP と異なるアミノ酸残基に注目し、IP の第 1 膜貫通領域の Ser⁵⁰ が五員環構造識別の選択性の低さに関与していることが明らかとなった。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

プロスタグランジン (PG) は、プロスタノ酸を基本構造とし、五員環の 9, 11 位に存在する官能基 (oxo-, hydroxyl-基) と側鎖の二重結合数によって分類される。即ち、五員環構造より D, E, F, I の 4 タイプとオキサン環を持つトロンボキ

サンに、側鎖構造の二重結合数より1, 2, 3の3つのシリーズに分類される。これらの物質は、細胞膜に存在し7回膜貫通ドメインを持つ受容体に結合し、その作用を発揮する。これらの受容体は、PGの五員環構造を特異的に認識するほか、一部側鎖構造の認識も行う。

本研究は、PGDを選択的に結合するPGD受容体(DP)とPGIを結合するPGI受容体(IP)を用い、キメラの作成とアミノ酸変異により、PG受容体のリガンド結合特異性に関与する構造を同定したものである。IPは、側鎖に特徴的な立体構造を有するPGIを認識するが、キメラ受容体の解析により、この側鎖認識は、第6、第7の細胞膜貫通ドメインにより行われていることが明らかとなった。また、同様の手法により、五員環構造の識別には、第1、第2の細胞膜貫通ドメインが関与していることが明らかとなった。さらに、アミノ酸変異受容体の解析により、DPの第2膜貫通領域のLeu⁸³とLys⁷⁵が各々PGI₂アナログであるiloprostの結合を排除し、PGD₂の結合親和性を高めることが明らかとなった。また、IPの第1膜貫通領域のSer⁵⁰がIPの五員環構造識別の選択性の低さに関与していることが明らかとなった。

以上の研究は、プロスタノイドと受容体の結合様式の解明に貢献し、プロスタノイドの薬理学に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成12年8月24日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。