

| | |
|----------|---|
| 氏名 | はし 橋 もと 本 ひとし 均 |
| 学位(専攻分野) | 博 士 (薬 学) |
| 学位記番号 | 論 薬 博 第 482 号 |
| 学位授与の日付 | 平 成 5 年 5 月 24 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 | 癌化肥満細胞のプロスタグランジン I ₂ と E 受容体に関する研究 |

論文調査委員 (主 査) 教授 市川 厚 教授 川 寄 敏 祐 教授 佐 藤 公 道

論 文 内 容 の 要 旨

プロスタグランジン (PG) は、微量で強い薬理・生理活性を有する一群の生理活性物質である。生体内では、細胞の膜リン脂質から遊離したアラキドン酸から合成され、細胞外に放出され周辺の細胞に作用してその機能を調節する。また、一部の PG およびその誘導体はすでに医薬品として利用されているが、今後益々医薬への応用が期待されている。ところで、これら PG 開発において早急な解決を求められている問題は、その作用機構を明らかにすることである。大部分の PG は、細胞膜にある受容体に結合して情報伝達系を刺激し、その産物であるセカンドメッセンジャーの作用を介して、細胞機能を調節すると考えられている。この PG 受容体 - 情報伝達系は、しかし、PG が化学的に不安定、PG アンタゴニストがほとんど開発されていない、PG 受容体の量が少なく不安定なため精製が困難である、などの理由で未解決の問題が多々ある。そこで著者は、マウス癌化肥満細胞において、PGI₂ と PGE₁ 受容体が多量に存在することに着目し、PG の中でも従来ほとんど研究されていない PGI₂ 受容体 - 情報伝達系を解析すると共に、PGE₁ の受容体刺激に対する細胞の脱感作機構に関して解析した。

第 1 章 癌化肥満細胞の PGI₂ 受容体の同定とその情報伝達系の解析

放射性標識 PGI₂ 誘導体を用いて、培養細胞やその細胞膜に結合蛋白が存在することがこれまでも報告されているが、これらの実験に用いられたリガンドの安定性や特異性を考慮すると不明な点が多い。著者は、マウス癌化肥満細胞において、PGI₂ が PGE₁ よりも強く細胞内 cAMP 量を増大させることから、PGI₂ に対して特異的な受容体の存在を予想し、PGI₂ の安定誘導体を用い、受容体 - 情報伝達系を解析した。

1) PGI₂ の受容体結合反応と促進性 G 蛋白 (G_s) を介するアデニル酸シクラーゼ活性化の解析: まず PGI₂ の安定誘導体である [³H] イロプロストを用い、細胞膜の結合能を測定した。その結果、温度、pH および 2 価カチオンに依存的で、可逆的かつ飽和性の特異的結合が認められた。Scatchard 解析の結果、K_d が 10.4 nM、B_{max} が 1.1 pmol/mg protein であることが分かった。種々の PG 誘導体による結合阻害実験から、この [³H] イロプロスト結合は、PGI₂ に特異的な結合であることを明らかにした。また PGI₂

の受容体結合は、促進性G蛋白 (Gs) の α サブユニット上での GDP-GTP 交換反応を介してアデニル酸シクラーゼを活性化することを明らかにした。さらにこの際、 α サブユニットが膜から遊離する事実を発見し、その機構を解析した。

2) PGI₂ 受容体の同定: PGI₂ 受容体を膜から精製することは困難であったので、光親和性標識化合物を用いてそれを同定することを試みた。種々検討の結果、PGI₂ 安定誘導体であるイソカルバサイクリンの19位にアジドフェニル基が導入されて [³H] 標識体、[15-³H₁]-19-(3-azidophenyl)-20-norisocabacyclin ([³H]APNIC と略) が、イソカルバサイクリンよりも強く膜受容体に結合し、Gs を介してアデニル酸シクラーゼを活性化することが分かった。そこで、照射により [³H]APNIC を癌化肥満細胞膜受容体に結合し、結合体を SDS に溶解後、SDS-ゲル電気泳動法で、分子サイズ 43kDa の PGI₂ 受容体を分離・同定した。この [³H]APNIC の光親和性結合は、GTP 依存的で PGI₂ に対し特異性が高いことを確認した。さらに、PGI₂ 受容体の存在が知られている血小板膜に、同様なサイズの受容体を同定した。PGI₂ 受容体の同定は本実験が最初である。

3) PGI₂ 受容体反応の多様性: 癌化肥満細胞は、トロンビンあるいは ATP 刺激で細胞内 Ca²⁺ 動員を起こす。トロンビンは、百日咳毒素 (PT) 感受性G蛋白を介しホスホリパーゼCを活性化し、その結果細胞内 Ca²⁺ 動員をする。一方、ATP は PT 非感受的に細胞外 Ca²⁺ の取り込みを高め細胞内 Ca²⁺ 動員をすることが分かった。そこで、これら Ca²⁺ 動員機構の異なる刺激反応に対する PGI₂ 受容体の作用を検討した。その結果、イロプロストはトロンビンによる Ca²⁺ 動員を抑制したが、逆に ATP による Ca²⁺ 動員を促進した。イロプロストの作用は細胞内 cAMP の増大を介して発現することが分かった。現在、この異なる調節の機構は不明であるが、PGI₂ 受容体反応の多様性を示唆するものである。

第2章 癌化肥満細胞の PGE 受容体刺激に対する脱感作の解析

細胞は、持続的に刺激する生理活性物質に対して、自身の受容体あるいは情報伝達系を修飾し、刺激に対する応答を減じる機構を持つ。これを細胞の脱感作と呼び、生理活性物質の細胞作用を考える場合重要である。PG 刺激に対する脱感作機構は不明である。著者は、癌化肥満細胞に PGE₁ を作用させると細胞内 cAMP 量は1分以内に最大となるが、すぐにもとのレベルに戻る、脱感作現象を見出した。この際の細胞における PGE₁ の挙動を解析した。そのため、細胞ホモジネートの 10,000xg から 100,000xg 沈殿膜画分と [³H]PGE₁ をインキュベートし結合反応を調べると、経時的に PGE₁ と GTP γ S 処理で解離しない安定に結合した [³H]PGE₁ 結合量が増大する。この安定な PGE₁-受容体結合体を 6%ジギトニンで可溶化し、種々のカラムクロマトグラフィー (AcA-44, WGA-agarose, phenyl-Sepharose CL-4B) により部分精製した。得られた画分には [³⁵S]GTP γ S の結合活性があり、[¹⁴C]5'-*p*-fluorosulfonylbenzoylguanosine により標識される分子量 60kDa の新規な GTP 結合蛋白質が検出された。この結果から、PGE₁ 受容体結合体は脱感作した状態に移行する際、未知の機能をもつ GTP 結合蛋白質と会合することが示唆された。

以上、本研究では、まず光親和性標識安定 PGI₂ 誘導体を開発し、それをを用いて初めて PGI₂ 受容体を癌化肥満細胞膜上に同定し、その諸性質を明らかにした。また、PGE₁ 受容体刺激をモデルに、PG に対する脱感作機構を解析し、その機構に新規の GTP 結合蛋白質が関与することを初めて明らかにした。こ

の成果は、PGの作用機構を考える上で重要な基礎知見となるものである。

論文審査の結果の要旨

プロスタグランジン (PG) 受容体に関する研究成果は、広く生物の情報伝達系の解明に寄与するのみならず、PG 関連医薬品の応用開発の基礎知識として重要である。本論文は、強い抗血小板凝固活性を示すプロスタサイクリン (PGI_2) の受容体について、情報伝達系との共役機構、機能の発現機構、受容体の同定等を行い、併せて細胞のPGに対する脱感作機構に関して新事実を発見したものである。

まず、 PGI_2 受容体を多量に発現している細胞を検索しマウス癌化肥満細胞を選択した。ついで本細胞の PGI_2 受容体を介する情報伝達系を検討し、アゴニスト結合は促進性G蛋白を活性化し、GTP-GDP 交換反応でG蛋白から遊離した G_{sa} がアデニル酸シクラーゼを活性化し、cAMPの生成を促進するという順次反応を証明した。さらに PGI_2 により生成したcAMPは、トロンビン受容体刺激による細胞内遊離カルシウムの増大を抑制するが、ATP受容体を介する細胞内遊離カルシウムの増大を反対に促進することを発見した。この結果は、 PGI_2 受容体を介する多様な機能発現を実験的に初めて示唆したものである。

PG受容体は膜蛋白で精製は困難であるが、最近 TXA_2 と PGE_2 受容体の一次構造が遺伝子 cDNA から類推された。しかし、 PGI_2 受容体は微量かつ不安定であり、また遺伝子 cDNA もクローニングされていない。そこで著者は光親和性標識技術を応用して PGI_2 受容体の同定を試みた。検討の結果、有効な光標識化合物として、安定な PGI_2 誘導体であるイソカルバサイクリンにアジドフェニル基を導入した、19-(3-azidophenyl)-20-norisocarbacyclin (APINC と略) を合成することに成功した。 $[^3\text{H}]$ 標識 APINC は、 PGI_2 受容体に特異的結合し促進性G蛋白共役型のアゴニスト活性を示すが、 PGE 、 PGD 、 PGF 各受容体に対しては結合親和性を示さない選択的な化合物であった。そこで $[^3\text{H}]$ 標識 APINC を用いて癌化肥満細胞膜および血小板膜の PGI_2 受容体の同定を行い、その分子量は、各々 43kDa と 51kDa であることを初めて明らかにした。

著者は細胞が連続する細胞外刺激に対して応答を減弱あるいは停止する機構である脱感作反応が、 PGE_1 刺激癌化肥満細胞のアデニル酸シクラーゼ活性化反応において起こることを発見し、その機構は脱感作時にリガンド結合 PGE_1 受容体が分子量 60kDa の新規の GTP 結合蛋白と安定な複合体を形成する事実をその複合体を精製することにより明らかにした。これは脱感作に GTP 結合蛋白が関与することを示唆した最初の発見である。

以上、本研究は PG 受容体の構造と機能、および脱感作機構に関しいくつかの重要な発見を行ったもので、本論文が博士(薬学)の学位論文として価値あるものと判断いたします。更に、平成5年5月7日論文内容とそれに関連した試問を行った結果、優秀と認定した。