

| | |
|----------|--|
| 氏名 | たばたひろゆき 田畑裕幸 |
| 学位(専攻分野) | 博士(薬学) |
| 学位記番号 | 薬博第518号 |
| 学位授与の日付 | 平成15年3月24日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 研究科・専攻 | 薬学研究科生命薬科学専攻 |
| 学位論文題目 | プロスタグランジン E ₂ 受容体サブタイプ EP1 の細胞内カルシウムイオンの作用に関わる情報伝達機構の解析 |
| 論文調査委員 | (主査) 教授市川厚 教授佐藤公道 教授川崎敏祐 |

論文内容の要旨

プロスタグランジン (PG) E₂ は4種類の PGE 受容体サブタイプ (EP1, EP2, EP3, EP4) と結合することにより, 産生局所において多彩な生理作用を示す生理活性脂質である。これまでの解析から EP2, EP4 受容体, および EP3 受容体はそれぞれ Gs あるいは Gi 蛋白質と共役することにより細胞内 cAMP レベルを調節することが知られている。一方, EP1 受容体は細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇を引き起こすが, 関与する G 蛋白質をはじめ, その情報伝達系の詳細な機構は明らかでない。しかし, EP1 受容体は細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇を介して平滑筋収縮, 腎における水の再吸収, 痛覚伝達や大腸ポリープ形成などの生理・病態に関与することが知られており, EP1 を介した細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇機構を明らかにすることがこれらの生体反応を理解する上で非常に重要である。そこで, 著者は EP1 受容体を介した細胞内情報伝達機構を解明することを目的として, ヒト胎児腎由来細胞 (HEK293 細胞) およびアフリカツメガエル卵母細胞 (X. oocyte) の各発現系を用いて細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇機構の解析を, さらに, EP1 受容体 mRNA が腎臓において最も豊富に発現していることに着目し, DNA マイクロアレイ法により EP1 シグナルによって発現が制御されている遺伝子の同定を行った。

第一章 HEK293 細胞発現系における PGE₂ による EP1 受容体を介した細胞内カルシウムイオン濃度の上昇機構の解析

マウス EP1 を一過性に強制発現させた HEK293 細胞を用いて, PGE₂ 刺激による EP1 を介する細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇は二相性であり, 一過性の上昇に加えて持続的な細胞外からの Ca²⁺ 流入が関与することを明らかにした。次いで, EP1 を介する一過性の細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇は細胞外 Ca²⁺ 非存在下においても認められ, 小胞体 Ca²⁺-ATPase 阻害剤である thapsigargin 処理, イノシトール 1,4,5-トリスリン酸 (IP₃) 受容体阻害剤である 2-aminoethoxydiphenyl borate (2APB) 処理, およびホスホリパーゼ C 阻害剤である U73122 処理によって抑制されたことから, 本機構は細胞内 Ca²⁺ ストアに依存することを示唆した。一方, PGE₂ 刺激後に細胞外 Ca²⁺ を添加することにより観察されるアゴニスト依存的な Ca²⁺ 流入は非特異的な Ca²⁺ チャネル阻害効果を有する La³⁺ および受容体活性化型 Ca²⁺ チャネル (RACC) 阻害剤である SKF96365 によって抑制されたことから本機構には HEK293 細胞内在性の受容体型活性化型 Ca²⁺ チャネルの関与が示唆された。また, EP1 を介する細胞外 Ca²⁺ 流入は U73122 処理および HEK293 細胞内在性ストア枯渇型 Ca²⁺ チャネル (SOC) 阻害剤である Gd³⁺ 処理によっても抑制されたことから, 本機構は細胞内 Ca²⁺ ストアに依存することを明らかにした。

第二章 アフリカツメガエル卵母細胞発現系における EP1 受容体と TRP5 との機能的共役に関する解析

EP1 が共役可能な Ca²⁺ チャネルおよび G 蛋白質について検討することを目的として, アフリカツメガエル卵母細胞 (X. oocyte) を用いて電気生理学的な解析を行った。卵母細胞に RACC の候補の一つである mouse transient receptor potential5 (mTRP5) をマウス EP1 と共発現させたところ, mTRP5 を介した細胞外 Ca²⁺ 流入による電流応答が観察され, この応答は PGE₂ 刺激に依存的であった。また, 同様の検討を卵母細胞の内在性 Gq/11 蛋白質に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド前処理後に行ったところ, PGE₂ 刺激による電流応答は有意に抑制されたが, mTRP5 の活性化に伴う電流

応答は有意に抑制されなかったことから、卵母細胞において EP1 は、Gq/11 蛋白質を介して細胞内ストアから Ca^{2+} を放出させるが、Gq/11 蛋白質に依存しないシグナルを介して mTRP5 を活性化をする可能性が考えられた。

第三章 マウス腎臓における EP1 受容体を介した遺伝子発現の制御に関する解析

EP1 受容体 mRNA は腎皮質から腎盂に至る集合管において特異的な発現が見いだされている。そこで、EP1 受容体の活性化により腎臓においてどのような遺伝子発現が制御されているかを、DNA チップアレイ解析で行った。in vivo で腎臓の EP1 を介する薬理的な反応が EP3 欠損マウスに EP1 および EP3 の選択的作動薬である sulprostone を投与後 6 時間で発現することを利用して、この時期の腎臓での遺伝子発現の変化を DNA マイクロアレイ法により解析した。その結果、EP1 は平滑筋の収縮に関与する calmodulin 関連蛋白質および集合管での Na^+ 放出に関与する Na^+/K^+ -ATPase の遺伝子発現を増加させ、水の再吸収に関わる細胞内 cAMP レベルの上昇を引き起こす PGI_2 合成酵素の遺伝子発現を減少させた。この結果は EP1 が腎臓での水と Na^+ の再吸収を抑制する薬理作用を反映するものである。

以上、著者はマウス EP1 が細胞内ストアからの Ca^{2+} の放出および RACC を介した細胞外 Ca^{2+} の流入に依存した細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇作用を示すことを明らかにし、前者には Gq/11 蛋白質、後者には TRP family が関与することを示唆した。さらに、マウス腎臓において EP1 が Na^+/K^+ -ATPase の発現誘導および細胞内 cAMP 産生因子の抑制を介して水と Na^+ の再吸収を抑制する可能性を示した。本研究は、これまで不明であった EP1 による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇機構の情報伝達機構を明らかにしたものであり、EP1 に選択的な作動薬および拮抗薬の臨床開発研究に寄与する知見と考える。

論文審査の結果の要旨

プロスタグランジン E2 受容体サブタイプ EP1 は、細胞内 Ca^{2+} の上昇を介して平滑筋収縮、腎における水の再吸収、痛覚伝達や大腸ポリープ形成などに関与すると考えられている受容体である。しかしながら EP1 受容体による細胞内での Ca^{2+} 上昇機構はほとんどわかっていない。本論文は、 Ca^{2+} 上昇機構を明らかにすることを目的に、1) HEK293 細胞における Ca^{2+} 上昇に至る情報伝達系の解析、2) アフリカツメガエル卵母細胞発現系における EP1 と共役する G タンパク質の同定、3) 腎臓における EP1- Ca^{2+} 上昇系と共役して発現が制御される遺伝子の網羅的解析を行ったものである。

著者はまず、HEK293 において EP1 は PGE_2 刺激により二相性の細胞内 Ca^{2+} 上昇反応を起こすこと、さらにその第一相反応は細胞外 Ca^{2+} の非存在下、あるいは小胞体 Ca^{2+} -ATPase 阻害剤やホスホリパーゼ C 阻害剤の存在下、ストア枯渴型 Ca^{2+} チャネル (SOC) 阻害剤などで抑制されたことから、細胞内 Ca^{2+} ストアに依存した機構であると結論した。さらに、第二相反応は非特異的な Ca^{2+} チャネル阻害剤や受容体活性化型 Ca^{2+} チャネル (RACC) 阻害剤で抑制されることから、受容体活性化型 Ca^{2+} チャネルにより起こると結論した。これらの成果は EP1 活性化における二相性の細胞内 Ca^{2+} 上昇機構を分子レベルで初めて明らかにしたものとして評価できる。

次いで、著者は EP1 が共役可能な Ca^{2+} チャネルと G 蛋白質を同定するため、アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて電気生理学的な解析を行った。その結果、卵母細胞に共発現させたマウスの transient receptor potential 5 (mTRP5) と EP1 は PGE_2 刺激と mTRP の活性化に反応して細胞外 Ca^{2+} 流入を起こし、一方、Gq/11 蛋白質に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドで卵母細胞を前処理すると、 PGE_2 による反応は抑制されるが mTRP の活性化による反応は抑制されなかった。これらのことは、EP1 が Gq/11 蛋白質を介して細胞内ストアから Ca^{2+} を放出させる一方で、Gq/11 蛋白質に依存しないシグナルを介して TRP を活性化する反応をも起こすことを示唆するものであり、新たな事実である。

著者はさらに、EP1 受容体の活性化と機能との関係を解析するために、EP1 の作用が知られている腎臓を用いて、EP1- Ca^{2+} 上昇系と共役して発現が制御される遺伝子を DNA チップアレイを用いて網羅的に検索した。その結果、EP1 は平滑筋の収縮に関与するカルモジュリン関連蛋白質および集合管での Na^+/K^+ -ATPase の遺伝子発現を増加させ、水の再吸収に関わる細胞内 cAMP レベルの上昇に関わる遺伝子発現を減少させた。このことは、EP1 が腎臓での水と Na^+ の再吸収を抑制するという薬理作用に関連する遺伝子の発現変動から示唆したものであり、今後の遺伝子解明の進展に貢献する研究成果として評価できるものである。

以上、著者はマウス EP1 による細胞内ストアからの Ca^{2+} の放出、および RACC を介した細胞外 Ca^{2+} 流入に依存した細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇作用を明らかにし、前者には Gq/11 蛋白質、後者には TRP が関与することを示唆した。本論文は、

これまで不明であった EP1 による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇機構の情報伝達機構を解明したものであり、EP1 に選択的な作動薬および拮抗薬の臨床開発研究に寄与する知見である。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

さらに、平成15年2月25日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。