

氏 名	すきもと ゆきひこ 杉 本 幸 彦
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	論 薬 博 第 513 号
学位授与の日付	平 成 6 年 5 月 23 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	プ ロ ス タ グ ラ ン ジ ン E 受 容 体 の 構 造 と 機 能 に 関 す る 研 究

(主 査)  
論文調査委員 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、強い生理・薬理作用をもつアラキドン酸の酸素添加代謝物の総称であり、中でも PGE<sub>2</sub> は全身のあらゆる臓器で産生され、産生局所において多種多様な生理活性作用を示す。その多岐にわたる作用の中には、例えば血管や気管支の平滑筋の収縮ならびに弛緩、ホルモンや神経伝達物質の遊離の促進ならびに抑制など、相反するものもあり、これらは作用発現の解析を複雑かつ困難なものとしている。ところで、PGE<sub>2</sub> の作用は、アゴニスト、アンタゴニストの特異性から少なくとも3種の PGE 受容体サブタイプ、EP 1、EP 2、EP 3 により介達されることが知られ、PGE<sub>2</sub> の多彩な作用は、これら複数の受容体サブタイプにより介達されると考えられている。しかしながら、サブタイプ特異リガンドが乏しいことや各 PG 間の交差反応性などの理由により、機能ならびに局在の解析が困難であり、その詳細については明らかではなかった。最近、著者はこれら3種の PGE 受容体サブタイプの cDNA の単離に成功し、これらを用いて PGE 受容体の機能の解析を目的として以下の知見を得た。

#### 第1章 プロスタグランジン E 受容体サブタイプの構造と機能に関する研究

##### (1) EP 1 受容体

マウスの腎臓 cDNA ライブラリーから単離した cDNA より、EP 1 受容体は 405 個のアミノ酸残基よりなる分子量 42,966 のペプチドであり、7つの細胞膜貫通ドメインを有するロドプシン型の受容体であることが判明した。EP 1 受容体の [<sup>3</sup>H] PGE<sub>2</sub> に対する K<sub>d</sub> は 21 nM で、各種 PG に対する結合特異性は PGE<sub>2</sub> > iloprost > PGE<sub>1</sub> > PGF<sub>2α</sub> > U-46619 > PGD<sub>2</sub> の順であった。CHO 細胞に発現した EP 1 受容体は PGE<sub>2</sub> 刺激により [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> が 10 秒以内に増加した。EP 1 受容体 mRNA は腎、肺に多く発現しており腎機能や気管支収縮への密接な関与が示唆された。

##### (2) EP 2 受容体

マウスの癌化肥満細胞 cDNA ライブラリーから単離した cDNA から、EP 2 受容体は 513 個のアミノ酸からなる分子量 56,157 の 7 回膜貫通型受容体であることが判明した。EP 2 受容体の [<sup>3</sup>H] PGE<sub>2</sub> に対す

る Kd は 11 nM で、各種 PG に対する結合特異性は  $PGE_2 = PGE_1 > \text{iloprost} > PGF_{2\alpha} > PGD_2$  の順であった。CHO 細胞に発現した EP 2 受容体は  $PGE_2$  刺激により Gs を介してアデニル酸シクラーゼを活性化し、cAMP を産生した。EP 2 受容体 mRNA は、胸腺、回腸をはじめ、肺、脾臓、心臓、子宮など、広い範囲にわたり発現していた。

### (3) EP 3 受容体

マウスの癌化肥満細胞 cDNA ライブラリーから単離した cDNA より、EP 3 受容体は 365 個のアミノ酸残基からなる分子量 40,077 の 7 回膜貫通型受容体であることが判った。EP 3 受容体の  $[^3H] PGE_2$  に対する Kd は 2.9 nM で、各種 PG に対する結合特異性は  $PGE_2 = PGE_1 > \text{iloprost} > PGF_{2\alpha} > PGD_2$  の順であった。また、本受容体は他の受容体と異なり、GTP 添加により結合親和性が上昇することが判った。CHO 細胞に発現した EP 3 受容体は、 $PGE_2$  刺激により、フォルスコリン刺激による cAMP 産生を強く抑制した。この抑制は百日咳毒素感受性の G タンパク質を介して起こるが、その共役の強さは  $Gi1 = Gi2 > Gi3 > Go$  の順であった。EP 3 受容体 mRNA は、腎、子宮、胃をはじめ、脳、胸腺、肺、心臓に多く発現していた。

### 第 2 章 EP 3 受容体イソフォームの C 末端の構造と機能に関する研究

著者はまた、マウス EP 3 受容体に RNA の選択的スプライシングにより生じる少なくとも 2 種のイソフォームが存在することを見出した。2 種の受容体イソフォーム (EP 3 $\alpha$ , EP 3 $\beta$ ) は、335 番目のアミノ酸までは全く同じ配列を持つが、以降の C 末端ペプチド配列を異にしていた。PCR 解析の結果、どの臓器においても両者の発現を認めた。各受容体イソフォームを CHO 細胞に発現し、その性質を解析した結果、両者は全く同じリガンド結合特異性をもつが、G タンパク質解離時の結合親和性、情報伝達の効率、脱感作の機構において性質が異なることが判明した。すなわち、EP 3 $\alpha$  は  $\beta$  に比べて効率よくその情報を伝達するが、脱感作を起こし、その作用が一過性であるのに対し、EP 3 $\beta$  は脱感作を起こさず、作用の持続性が期待される受容体であると推察された。このように、選択的スプライシングにより生じた異なる C 末端が EP 3 の機能に重要な意味を持つことが示唆された。

### 第 3 章 腎臓における 3 種の PGE 受容体サブタイプの機能的局在に関する研究

$PGE_2$  は、腎臓において、腎血流量、糸球体濾過量、水・Na イオンの再吸収の調節に関与していることが知られているが、その作用機構ならびに介在する受容体の種類とその発現部位については不明である。そこで著者は、腎における各 EP 受容体の発現部位を同定するため、in situ ハイブリダイゼーションを行った。その結果、各 EP 受容体 mRNA について、EP 1 は皮質から乳頭部までの集合管に、EP 2 は糸球体 (メサンギウム細胞) に、EP 3 はヘンレのループ上行脚と遠位尿細管、皮質集合管にそれぞれ発現が認められた。以上により、EP 1 は集合管において水の再吸収を抑制し、EP 2 は糸球体におけるメサンギウム細胞の収縮を抑制し、EP 3 は遠位尿細管における水・Na イオンの再吸収の抑制、緻密斑におけるレニンの遊離調節にも関与している可能性が示唆され、各 EP 受容体が機能に応じて腎内に局在していることが判明した。

以上、著者は PGE 受容体の 3 種の受容体の構造と機能をはじめて明らかにすると共に、EP 3 にはさらに選択的スプライシングにより生じる機能的に異なるイソフォームが存在すること、各 EP 受容体は腎臓

において、その機能に応じて局在していることを見いだした。本研究は、従来不明であった PGE<sub>2</sub> の複雑な作用機構を分子レベルで解明したものであり、PG の医薬品開発に必要な基礎知見として寄与するものである。

### 論文審査の結果の要旨

本論文は平滑筋の収縮・弛緩を指標とするプロスタグランジン (PG) E 受容体アゴニスト、アンタゴニストの研究から想定されていた三種類の受容体サブタイプ (EP 1, EP 2, EP 3) の各遺伝子 cDNA を初めて単離し、その構造と機能を明らかにしたものである。著者は、先にヒト血小板トロンボキサン A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) 受容体の部分アミノ酸配列から単離された遺伝子 cDNA に着目し、PGE 受容体を多量に発現しているマウス癌化肥満細胞の cDNA ライブラリーからホモロジー・スクリーニングで PGE 受容体遺伝子 cDNA の単離を試みた。動物種と PG の違いを考慮し、まず、ヒト血小板 TXA<sub>2</sub> 受容体 cDNA をもとにマウス肺の TXA<sub>2</sub> 受容体 cDNA を単離し、次いでマウス PGE 受容体サブタイプ cDNA を単離することに成功した。いずれの PGE 受容体サブタイプも、7つの細胞膜貫通ドメインを有するロドプシン型の受容体であり、各々の分子量は 42, 56, 40 kDa, [<sup>3</sup>H] PGE<sub>2</sub> に対する K<sub>d</sub> は 21, 11, 2.9 nM であった。EP 1, EP 2, EP 3 受容体 cDNA を各々 CHO 細胞に発現させ、EP 1 は [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の増大を、EP 2 は G<sub>s</sub> と共役し、cAMP の増大を、EP 3 は G<sub>i</sub> と共役し、ホルスコリン刺激による cAMP の増大を阻害する働きをもつ受容体であることを明らかにした。さらに、ノザンプロットティングにより EP 1 受容体 mRNA は腎臓、肺に多く発現し、腎機能や気管支収縮に、EP 2 受容体 mRNA は胸腺、回腸、肺、脾臓、など免疫、炎症に関与する組織に広く発現し、EP 3 受容体 mRNA は腎臓に特に多く発現し、水・Na<sup>+</sup> の調節に、次いで子宮と胃に多く、子宮平滑筋収縮と胃酸分泌調節に、あるいは脳、胸腺、肺、心臓などに広く発現し機能していることを明らかにした。

著者はまた、マウス EP 3 受容体に RNA スプライシングにより生じる C 末端ペプチドのみが異なる少なくとも 2 種の受容体イソフォーム (EP 3 $\alpha$ , EP 3 $\beta$ ) の存在を発見し、それらを CHO 細胞に発現させ性質を検討した。その結果、両者は全く同じリガンド結合特異性をもつが、G タンパク質解離時の結合親和性、情報伝達の効率、脱感作の機構において性質を異にすることを明らかにし、PGE 作用の多様性を説明した。

著者は、in situ ハイブリダイゼーションにより腎臓において多く発現している三種の PGE 受容体サブタイプの機能的局在を検討し、EP 1 は皮質から乳頭部までの集合管に、EP 2 は糸球体 (メサンギウム細胞) に、EP 3 はヘンレのループ上行脚管と遠位尿管、皮質集合管にそれぞれ発現が認められたことから、EP 1 は集合管において水の再吸収抑制、EP 2 は糸球体メサンギウム細胞の収縮抑制、EP 3 は遠位尿管において水・Na<sup>+</sup> イオンの再吸収抑制、緻密斑におけるレニンの遊離調節に関与している可能性を示唆し、各 PGE サブタイプ受容体が機能に応じて腎内に局在していることを明らかにした。

以上、著者は PGE 受容体の 3 種のサブタイプ、その一つ EP 3 サブタイプの少なくとも 2 種のイソフォームの構造と機能を明らかにし、各受容体は腎臓において、その機能に応じて存在していることを示した。本研究は、従来不明であった PGE の複雑な作用機構を分子レベルで解明したものであり、PG の選

択的な医薬品開発に必要な基礎知見として寄与するものである。

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。

更に、平成6年4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。