

氏 名	はせがわ ひろし 長谷川 潤
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	薬 博 第 447 号
学位授与の日付	平成 12 年 3 月 23 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 EP 3 受容体アイソフォームの機能的多様性に関する研究

論文調査委員 (主 査) 教 授 市 川 厚 教 授 川 寄 敏 祐 教 授 伊 藤 信 行

論 文 内 容 の 要 旨

プロスタグランジン (PG) E_2 は全身の様々な臓器で産生され、多彩な薬理作用を持つ生理活性脂質である。PGE の受容体は薬理学的に 4 つのサブタイプ、EP 1, EP 2, EP 3, EP 4 に分類される。中でも EP 3 受容体は腎臓における水、Na イオンの再吸収の調節作用をはじめ、子宮平滑筋収縮、胃酸分泌の抑制、神経伝達物質の遊離抑制など、多彩な生理作用を介達すると考えられている。近年、著者の所属する研究室に於いてマウス EP 3 受容体の cDNA がクローニングされ、EP 3 受容体が 7 回膜貫通構造を持つ G 蛋白質共役型受容体であり、更に選択的 RNA スプライシングにより生じる C 末端部位のみが異なる 3 種のアイソフォーム (α , β , γ) が存在することが明らかとなった。また、同研究室に於いて EP 3 受容体が三量体 G 蛋白質の中で G_i 及び G_{13} に共役することも報告された。著者はこれらアイソフォームの細胞内情報伝達機構と受容体 C 末端領域の役割に関して検討を行い、3 種のアイソフォームの存在意義について考察した。

第一章 EP 3 受容体アイソフォームの G_i 活性に於ける多様性

マウス EP 3 受容体各アイソフォームを安定発現させた CHO 細胞に於いて、EP 3 β 受容体が完全にアゴニスト依存的な G_i 活性を示したのに対し、EP 3 α 受容体は約 50% が、EP 3 γ 受容体は約 80% がアゴニスト非存在下で G_i 活性を示した。EP 3 受容体の C 末端領域を欠失した変異受容体 T-335 はアゴニスト非存在下で完全に活性を持っていたことから、受容体 C 末端領域は EP 3 受容体の G_i 活性を抑制する働きを持ち、アイソフォームの C 末端鎖の構造により、その抑制レベルが異なると考えられた。そこで、最も抑制活性の強い EP 3 β 受容体の C 末端領域を漸次的に欠損させた変異受容体を用いた実験より、C 末端領域のうち、アミノ酸残基 340 番目から 347 番目の領域に G_i 活性を抑制する働きがあることが明らかとなった。

第二章 EP 3 受容体アイソフォームの Rho 活性化経路に於ける多様性

百日咳毒素非感受性の G 蛋白質である G_{13} は低分子量 G 蛋白質 Rho を活性化することが明らかとなっている。そこで、EP 3 受容体各アイソフォームを MDCK 細胞に安定発現させ、最も典型的な Rho の機能であるストレスファイバーの形成を指標に G_{13} の活性化を検討した。その結果、 G_i 活性同様、EP 3 β 受容体は完全にアゴニスト依存的であったのに対し、EP 3 α 及び EP 3 γ 受容体はアゴニスト非存在下でも活性を持っており、EP 3 受容体アイソフォームは G_{13} の活性化に於いてもアゴニスト非依存的活性が異なっていることが明らかとなった。これら EP 3 受容体によるストレスファイバー形成は Rho 特異的阻害剤であるボツリヌス C 3 毒素により阻害された。また、T-335 もアゴニスト非依存的活性を持っていたことから、受容体 C 末端領域は EP 3 受容体による G_{13} の活性化を抑制しているものと考えられた。

第三章 上皮細胞に於ける EP 3 受容体による情報伝達の解析

上皮細胞は細胞-細胞間接着機構の 1 つである密着結合により生体内外の水溶性物質の透過を制御し、生体のホメオスタシスを保つ役割を担っている。EP 3 受容体各アイソフォームを発現させた MDCK 細胞を用いて、上皮細胞の物質透過性を検討したところ、EP 3 β 発現細胞に於いてアゴニスト依存的にイオンと中性物質の透過性がそれぞれ異なる方向に調節された。これは百日咳毒素非感受性であり、また、常時活性型 Rho の発現により再現されたことから、EP 3 受容体は G_{13} -Rho 活

性化経路を介して細胞間の物質透過性を制御していると推定された。一方、EP3 α 発現細胞のイオン透過性は無処理下で野生型 MDCK 細胞より若干低く、アゴニスト処理による変化は観察されなかったのに対し、EP3 γ 発現細胞は無処理下でも非常に低いイオン透過性を示し、アゴニスト処理により逆にイオン透過性が増大した。このことから EP3 受容体は上皮細胞の物質透過性に於いて、各アイソフォームにより質的に異なる調節を行っていることが明らかとなった。

以上、著者は EP3 受容体アイソフォームは Gi 及び G₁₃ の活性化に於いてアゴニスト非依存的活性レベルが異なり、C 末端領域が EP3 受容体によるこれら G 蛋白質の活性化を抑制的に制御していることを明らかにした。また、上皮細胞に於いて EP3 受容体が G₁₃-Rho 活性化経路を介して細胞-細胞間の物質透過性を物質の性質依存的に調節していること、並びに各アイソフォームは細胞-細胞間接着を異なった機構で調節していることを明らかにした。本研究は EP3 受容体の複雑な情報伝達機構を明らかにしたものであり、PGE の多彩な生理作用解明に寄与するものである。

論文審査の結果の要旨

プロスタグランジン受容体 EP3 サブタイプの多彩な生体作用は、C 末端鎖を異にする複数のアイソフォームの働きを介して発揮されると考えられているが、詳細はこれまで不明であった。本論文は、アイソフォームの働きの多様性を解析することを目的として、マウスに存在する 3 種類の EP3 アイソフォームの細胞内情報伝達機構とその C 末端鎖の役割について、生物薬学的手法を駆使して解明したものである。

第一章では、3 種類のアイソフォームを安定発現させた CHO 細胞の Gi 活性について検討した結果、EP3 β 受容体は完全にアゴニスト依存的な Gi 活性を示し、EP3 α 受容体は約 50% が、また、EP3 γ 受容体は約 80% がアゴニスト非存在下で Gi 活性を示すこと、さらに、EP3 受容体の C 末端鎖を欠失した変異受容体は完全にアゴニスト非依存的な Gi 活性を示すことを見出した。これより、C 末端鎖は EP3 受容体の Gi 活性を抑制するという働きを持ち、アイソフォームの C 末端鎖の構造によりその抑制程度が異なるという結論を導き出した。実際に、EP3 β 受容体のアミノ酸残基 340-347 の領域に Gi 活性を抑制する働きのあることを明らかにした。

第二章では、MDCK 細胞に発現させた EP3 受容体アイソフォームが百日咳毒素非感受性の G₁₃ と共役し低分子量 G 蛋白 Rho を活性化することを、Rho の機能であるストレスファイバーの形成を指標に明らかにした。さらに、アイソフォーム間では EP3 β 受容体は完全にアゴニスト依存的であるのに対し、EP3 α 受容体および EP3 γ 受容体はアゴニスト非依存的に G₁₃ を活性化すること、また、C 末端鎖を欠失した変異受容体も完全にアゴニスト非依存的に活性化することなどから、EP3 受容体の C 末端領域は受容体による G₁₃ の活性化を抑制していることを明らかにした。

第三章では、MDCK 細胞が上皮細胞であることに着目して、細胞-細胞間接着機構の一つである密集結合での EP3 受容体アイソフォームの働きを解析した。実験は、各アイソフォームを安定に発現した MDCK 細胞のイオンと中性物質の透過性におけるアゴニスト依存性・非依存性を比較検討した。その結果、EP3 β 受容体は、アゴニスト依存的および百日咳毒素非感受性的に G₁₃-Rho 活性化経路を介してイオンと中性物質の透過性をそれぞれ異なる方向に制御していることを見出した。さらに、EP3 α 受容体はそれ自体イオン透過性を抑制的に制御するが、反対に、EP3 γ 受容体はアゴニスト依存的にイオン透過性を促進することも明らかにした。

以上、著者は、EP3 受容体アイソフォームは Gi および G₁₃ の活性化においてアゴニスト非依存性活性が異なり、C 末端鎖領域が EP3 受容体によるこれら G 蛋白の活性化を抑制的に制御していることを明らかにした。また、上皮細胞モデルの MDCK 細胞において EP3 受容体が G₁₃-Rho 活性化経路を介して細胞-細胞間の物質透過性を調節していること、およびアイソフォームはそれらを異なった機構で制御していることを明らかにした。これらの研究成果は、EP3 サブタイプの多彩な生体作用の発現機構を分子レベルで明らかにしたものであり、選択的なアゴニスト・アンタゴニストの開発に必要な基礎的知見として貢献するものである。

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。

さらに、平成 12 年 3 月 1 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。