



Molecular Cloning and Expression of Multiple Isoforms of Human Prostaglandin E Receptor EP3 Subtype Generated by Alternative Messenger RNA Splicing: Multiple Second Messenger Systems and Tissue-Specific Distributions

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 小谷, 仁人 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1064

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 2 1 1 号	学位授与年月日	平成 8 年 3 月 2 6 日
氏 名	小 谷 仁 人		
論文題目	Molecular Cloning and Expression of Multiple Isoforms of Human Prostaglandin E Receptor EP₃ Subtype Generated by Alternative Messenger RNA Splicing: Multiple Second Messenger Systems and Tissue-Specific Distributions (選択的スプライシングにより生じる複数のヒトプロスタグランジンE受容体 EP₃ サブタイプの分子クローニングと発現：細胞内情報伝達系の多様性と組織特異的分布)		

博士(医学) 小 谷 仁 人

論文題目

Molecular Cloning and Expression of Multiple Isoforms of Human Prostaglandin E Receptor EP₃ Subtype Generated by Alternative Messenger RNA Splicing: Multiple Second Messenger Systems and Tissue-Specific Distributions

(選択的スプライシングにより生じる複数のヒトプロスタグランジン E 受容体 EP₃ サブタイプの分子クローニングと発現; 細胞内情報伝達系の多様性と組織特異的分布)

論文の内容の要旨

プロスタグランジン (PG) は、アラキドン酸の代謝産物であり、その中でも、PGE₂ は、体液電解質平衡、平滑筋の収縮弛緩、神経伝達物質分泌調節等多様な生理活性を有することが知られている。PGE₂ の受容体は、現在薬理学的に 4 種のサブタイプが知られ、EP₁、EP₂、EP₃、EP₄ と分類されている。本研究では、この中で、体内で最も広く分布すると言われている EP₃ サブタイプの、ヒトにおける cDNA クローニングを行い、その細胞内情報伝達系と組織分布について検討した。

『対象と方法』ヒト腎 cDNA ライブラリーより、マウス EP₃ cDNA を用いて単離したクローンの塩基配列を決定し、これらを COS-7 細胞及び Chinese hamster ovary (CHO) 細胞に導入し、発現した受容体の PGE₂ との結合特性を検討し、3'、5'-アデノシン-リン酸(cAMP)及び1',4',5'-イノシトール三リン酸 (IP₃) を測定し細胞内情報伝達系を検討した。さらにノザンプロット解析、Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) を行ないヒトにおける組織分布を検討した。

『結果』5 種の異なるヒト EP₃ 受容体 cDNA クローンを単離した。ヒトゲノムサザンプロット解析の結果ヒト EP₃ 遺伝子は単一遺伝子から成り、5 種の cDNA は選択的スプライシングにより生じることが示唆された。5 種のうち 2 種の cDNA は 3' 非翻訳部のみ異なり、5 種の cDNA クローンは結果として 390、388、365、374 アミノ酸から成る 4 種の蛋白質をコードしていた。これらは、N 端部より 359 アミノ酸が共通で、この部分に 7 つの疎水性配列を含み、C 端部のみ異なっていた。この共通部分はマウス EP₃ 受容体とアミノ酸レベルで 80.8% と高い相同性を認めた。以上より、これら 4 種の蛋白質は、7 回膜貫通型受容体のヒト PGE₂ 受容体 EP₃ サブタイプの 4 種のアイソフォームと考え、それぞれ EP₃₋₁、EP₃₋₂、EP₃₋₃、EP₃₋₄ と名づけた。

単離した cDNA クローンをそれぞれ COS-7 細胞と CHO 細胞に発現させ、その膜分画を用いて結合実験を行った。いずれのアイソフォームを発現した膜分画も、PGE₂ と EP₃ 選択的アゴニストである M&B28767 に対し高親和性を示し、K_d 値は 3.0-5.0 nM とほぼ同様の親和性を示した。4 種のアイソフォームを発現させた細胞に対して M&B28767 を用いて細胞内情報伝達系を検討した。M&B28767 は、4 種全てのアイソフォームを発現した細胞において、forskolin 刺激による cAMP 濃度増加を抑制し、EP₃₋₂、EP₃₋₄ を発現した細胞においては cAMP 濃度を増加させ、また、EP₃₋₁、EP₃₋₃ を発現させた細胞においては IP₃ 濃度を増加させた。以上より、4 種の EP₃ 受容体アイソフォームは、C 端部の違いにより、異なる複数の G 蛋白質と共役する可能性が示唆された。

ノザンプロット解析を行い組織分布を検討した。EP₃ メッセンジャー RNA (mRNA) は、約 7.5、5.0、4.5、2.5、1.9 kilobase の大きさで検出され、それぞれの大きさの EP₃ mRNA の遺伝子発現は臓器特異的であった。EP₃ mRNA は腎において最も多くの発現を認め、続いて脾、子宮、肝、骨格

筋、精巣、卵巣、小腸、大腸において発現を認め、心、胎盤、肺、胸線、前立腺、甲状腺、副腎においても少量の発現を認めた。5種のEP₃cDNAの3則の特異的な配列の部分にてRT-PCRを行った結果、5種のEP₃mRNAの発現は臓器特異的であり、腎皮質、腎髄質、脳、脾、子宮にて、5種全てのEP₃mRNAの発現を認めた。

『結語』選択的スプライシングにより転写される5種のヒトPGE₂受容体EP₃サブタイプのcDNAクローニングに成功し、ヒトEP₃受容体はC端部のアミノ酸配列の違いで異なるG蛋白質と共役する可能性が示唆された。また組織分布を検討し、ヒトにおいては少なくとも5種のEP₃mRNAが臓器特異的に分布していることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

多くの神経伝達物質受容体、ホルモン受容体は薬理学的に更に複数のサブタイプに分類されている。個々のサブタイプの実体を明らかにし、いずれの細胞応答に如何なるシグナル伝達機構を介して関与するかを解析しようとする試みが現在世界中で行われている。体液電解質平衡の維持、平滑筋の収縮弛緩、神経伝達物質分泌調節等多彩な作用を持つプロスタグランジンE₂ (PGE₂) の受容体は、EP₁、EP₂、EP₃、EP₄の4種のサブタイプに分類されており、cDNAクローニングによりいずれもG蛋白質共役型受容体であることが明らかにされている。申請者が所属する共同研究グループは、既にマウスEP₁、EP₃、EP₄、およびウシEP₃のcDNAクローニングに成功し、この過程でEP₃サブタイプは更に3-4種のアイソフォーム（マウスではEP_{3α}、EP_{3β}、EP_{3γ}の3種、ウシではEP_{3A}、EP_{3B}、EP_{3C}、EP_{3D}の4種）として存在することを見出している。これらアイソフォームはC末端部分のみ異なることから alternative mRNA splicing により生じると推定された。

以上の背景の下に、申請者はヒトでのEP₃アイソフォームの検索、およびそれぞれのアイソフォームの組織分布の検討、シグナル伝達系機構の解析を目的として本研究を行い、以下の結果を得た。(1)マウスEP₃cDNAの断片をプローブとしてヒト腎cDNAライブラリーよりEP₃cDNAをクローン化した。塩基配列の決定により、C末端部のみ異なる4種のアイソフォーム (EP₃₋₁、EP₃₋₂、EP₃₋₃、EP₃₋₄) に対応すると判断される5種のcDNAクローンが同定された(2種のcDNAクローンは3'非翻訳部のみ異なっていた)。ゲノムのサザンブロット解析よりヒトEP₃遺伝子は他動物の場合と同じく単一と推定された。4種のアイソフォームのうち、EP₃₋₁、EP₃₋₂、EP₃₋₃は本研究中にAdamらおよびReganらによって発表されたヒトEP₃アイソフォームと同一であったが、EP₃₋₄はヒトにも他動物にも見出されていない新しいものであった。(2)COS-7細胞とCHO細胞に発現させた各アイソフォームのリガンド結合特性は類似しており、親和性の順序はM&B28767 (EP₃選択的アゴニスト) > PGE₂ ≥ PGE₁ >> PGF_{2α} ≥ PGD₂であった。(3)これらアイソフォームを発現させた細胞にM&B28767を作用させた時あるいはフォルスコリンとM&B28767を同時に作用させた時のcAMPや1、4、5-イノシトール三リン酸(IP₃)の挙動を指標としたシグナル伝達機構の解析の結果、いずれのアイソフォームもG_iと相互作用してアデニル酸シクラーゼを抑制する外、EP₃₋₁とEP₃₋₂はIP₃を介するシグナル伝達系と、高濃度(>10⁻⁷M)のM&B28767により刺激した時にはEP₃₋₂とEP₃₋₄はcAMPを介するシグナル伝達系とも共役することが示唆された。(4)ノザンブロット解析とRT-PCRによる検索の結果、5種のEP₃mRNAは多くの臓器に検出されたが、なかでも腎、脾、子宮で多量に発現していた。

本研究に関して次のような質疑、試問を行った。

- 1) 得られた18個の cDNA グローンの内訳 (それぞれ何個の pEPR-Ia、pEPR-Ib、pEPR-II、pEPR-III、pEPR-IVが得られたか)
- 2) EP₃アイソフォームの IP₃を介するシグナル伝達系認識部位と cAMP の上昇をもたらす機構の認識部位は C 末端細胞内部分にあると考えても良いか、その場合、それぞれ EP₃₋₁と EP₃₋₂の間、EP₃₋₃と EP₃₋₄の間に全アイソフォームに共通の R350-Q359以外の共通配列がないことをどう解釈するか
- 3) 脂質である PGE₂を結合する受容体上の部位、および結合様式について
- 4) CHO あるいは COS-7 細胞へのプラスミドの移入に DEAE-デキストラン法を用いた理由
- 5) たとえば EP₃₋₁に対応する cDNA を細胞に発現させた時、確かに EP₃₋₂のみが発現していたか
- 6) CHO 細胞、COS-7 細胞における cAMP の基底レベルおよびフォルスコリンによるその上昇についての実測値
- 7) EP₃₋₁と EP₃₋₄は $10^{-11} \sim 10^{-10}$ M の M&B28767を加えるとフォルスコリンによる cAMP の上昇を抑制し、 $> 10^{-7}$ M の M&B28767では cAMP レベルを上昇させるという二面的な現象の解釈、これら EP₃アイソフォームの M&B28767に対する K_dが約 10^{-9} Mと測定されていることとの関連
- 8) ノザンプロット解析におけるバンドの濃さは各臓器におけるそれぞれの EP₃アイソフォームの濃度を表すと解釈しても良いか、特に脳の場合にはノザンプロット解析で得たバンドと RT-PCR で得たバンドの濃さが著しく異なる理由
- 9) 死後の臓器中の mRNA の安定性
- 10) EP₃アイソフォームの脳内分布

これらの質問に対する申請者の答えは適切であり、問題点をよく把握していることを示した。本研究が競争の激しい分野を生き抜いて新しいヒト EP₃₋₄アイソフォームを見出し、且つ一つの G 蛋白質共役受容体が複数のシグナル伝達系と相互作用することを示唆する興味深い観察を行った立派なものであることと合わせて、本論文は博士（医学）の学位授与に値すると論文審査委員全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 市 山 新

副査 教授 梶 村 春 彦 副査 教授 高 田 明 和

副査 教授 寺 川 進 副査 助教授 小 出 幸 夫