

変異導入受容体を利用したプロスタノイド受容体
リガンド認識構造の解明

(研究課題番号 : 09670125)

平成9年度～平成10年度科学研究費補助金
(基盤研究C) 研究成果報告書

平成12年3月

研究代表者 牛 首 文 隆
(旭川医科大学医学部 教授)

変異導入受容体を利用したプロスタノイド受容体
リガンド認識構造の解明

(研究課題番号：09670125)

平成9年度～平成10年度科学研究費補助金
(基盤研究C) 研究成果報告書

平成12年3月

研究代表者 牛 首 文 隆
(旭川医科大学医学部 教授)

はしがき

この冊子は平成9、10両年度に文部省より科学研究費補助金基盤研究(C)を得て行った研究の成果をまとめたものである。この研究は、京都大学医学研究科においてなされたものであり、以下の方々の協力によって成った。ここに謝意を表したい。

小林 拓也

平田 雅一

成宮 周

研究組織

研究代表者：牛 首 文 隆（旭川医科大学・医学部・教授）

研究経費

平成 9年度	1, 800千円
平成10年度	1, 700千円
計	3, 500千円

研究成果の要約

プロスタノイドは、プロスタグランジン (PG) とトロンボキサン (TX) より成る生理活性物質である。これらの物質は、生体内において非常に多彩な作用を示すが、それは標的細胞表面に存在する各プロスタノイドに特異的な受容体を介して発揮されている。これらの受容体は、各々PGD、PGE、PGF、PGI、TXAの受容体であるDP、EP、FP、IP、TPより成り、EPには4種類のサブタイプ受容体であるEP₁、EP₂、EP₃、EP₄が存在する。これらの受容体は7回膜貫通構造を持ちG蛋白質と連関するロドプシン型受容体に属する。また、これらの受容体では膜貫通領域を中心に共通のアミノ酸が保存されており、これらの部位がリガンドであるプロスタノイド分子の結合領域を形成していると考えられている。しかし、これらの受容体のリガンド結合領域の詳細は不明である。一方、プロスタノイド受容体が非常に構造の似通ったリガンドを識別し、受容体間でリガンド結合領域と想定される部位での相同性が高いことから、リガンド認識を行う受容体構造は比較的限定されていることが予想される。この予想を基に本研究は、変異導入受容体を用いてプロスタノイド受容体のリガンド認識構造を解明することを目指した。

実際には、DP/IP キメラ受容体を用いた解析を行い、リガンド結合親和性を比較することにより、リガンドの特異的結合を決定する受容体領域の同定を試みた。その結果、プロスタノイド分子の五員環構造の認識には受容体の第3膜貫通領域が、側鎖構造の認識には第6、7膜貫通領域がそれぞれ関与していることを解明した。さらに、五員環構造の認識に関与する領域をさらにしぼり込むために、より詳細に構成されたキメラ受容体やアミノ酸変異受容体を作成して解析を進めた。その結果、第2膜貫通領域を中心に存在する4個のアミノ酸が、五員環構造の認識に重要であることを明らかにした。

研究発表

(1) 学会誌等

1. Kobayashi, T., Kiriya, M., Hirata, T., Hirata, M., Ushikubi, F. and Narumiya, S. Identification of domains conferring ligand binding specificity to the prostanoid receptor; Studies on chimeric prostacyclin/prostaglandin D receptors. *J. Biol. Chem.* **272**, 15154-15160, 1997.
2. Sugimoto, Y., Yamasaki, A., Segi, E., Tsuboi, K., Aze, Y., Nishimura, T., Oida, H., Yoshida, N., Tanaka, T., Katsuyama, M., Hasumoto, K., Murata, T., Hirata, M., Ushikubi, F., Negishi, M., Ichikawa, A. and Narumiya, S. Failure of parturition in mice lacking the prostaglandin F receptor. *Science*, **277**, 681-683, 1997.
3. Murata, T., Ushikubi, F., Matsuoka, T., Hirata, M., Yamazaki, A., Sugimoto, Y., Ichikawa, A., Aze, Y., Tanaka, T., Yoshida, N., Ueno, A., Oh-ishi, S. and Narumiya, S. Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor. *Nature*, **388**, 678-682, 1997.
4. Kiriya, M., Ushikubi, F., Kobayashi, T. and Narumiya, S. Ligand binding specificities of the eight types and subtypes of the mouse prostanoid receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Br. J. Pharmacol.*, **122**, 217-224, 1997.
5. Oida, H., Hirata, M., Sugimoto, Y., Ushikubi, F., Ohishi, H., Mizuno, N., Ichikawa, A. and Narumiya, S. Expression of messenger RNA for the prostaglandin D receptor in the leptomeninges of the mouse brain. *FEBS Lett.*, **417**, 53-56, 1997.
6. Ushikubi, F., Hirata, M. and Narumiya, S. Platelet prostaglandin receptors. *Handbook Exp. Pharmacol.*, **126**, 135-154, 1997.
7. Fujita, A., Saito, Y., Ishizaki, T., Maekawa, M., Fujisawa, K., Ushikubi, F. and Narumiya, S. Integrin-dependent translocation of p160^{rock} to cytoskeletal complex in thrombin-stimulated human platelets. *Biochem. J.*, **328**, 769-775, 1997.
8. Segi, E., Sugimoto, Y., Yamasaki, A., Aze, Y., Oida, H., Nishimura, T., Murata, T., Matsuoka, T., Ushikubi, F., Fukumoto, M., Tanaka, T., Yoshida, N., Narumiya, S. and Ichikawa, A. Patent ductus arteriosus and neonatal death in prostaglandin receptor EP4-deficient mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **246**, 7-12, 1998.
9. Suda, M., Tanaka-K, Yosoda, A., Natsui, K., Sakuma, Y., Tanaka, I., Ushikubi, F., Narumiya, S. and Nakao, K. Prostaglandin E₂ (PGE₂) autoamplifies its production through EP₁ subtype of PGE receptor in mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Calcif. Tissue Int.*, **62**, 327-331, 1998.
10. Ushikubi, F., Segi, E., Sugimoto, Y., Murata, T., Matsuoka, T., Kobayashi, T., Hizaki, H., Tsuboi, K., Katsuyama, M., Ichikawa, A., Tanaka, T., Yoshida, N. and Narumiya, S. Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP₃. *Nature*, **395**, 281-284, 1998.

(2) 口頭発表

1. 松岡俊行、村田隆彦、平田雅一、牛首文隆、吉田進昭、成宮 周：
トロンボキサンA₂受容体欠損マウスの解析
第70回日本薬理学会年会、1997. 3.22-25.
2. 村田隆彦、松岡俊行、吉田進昭、平田雅一、牛首文隆、成宮 周：
プロスタサイクリン受容体欠損マウスの解析
第70回日本薬理学会年会、1997. 3.22-25.
3. 小林拓也、桐山通隆、平田雅一、牛首文隆、成宮 周：
プロスタノイド受容体のリガンド結合領域の解析
第70回日本薬理学会年会、1997. 3.22-25.
4. 牛首文隆、松岡俊行、村田隆彦、平田雅一、瀬木恵里、杉本幸彦、市川 厚、
吉田進昭、成宮 周：
プロスタノイド受容体欠損マウスの解析と創薬
第70回日本薬理学会年会、1997. 3.22-25.
4. 牛首文隆、村田隆彦、松岡俊行、小林拓也、成宮 周：
プロスタノイド受容体欠損マウスと炎症・免疫・発熱反応
第71回日本生化学会大会、1998. 10.14-17.
3. 小林拓也、牛首文隆、成宮 周：
プロスタノイド受容体のリガンド結合領域の解析
第71回日本生化学会大会、1998. 10.14-17.

(3) 出版物

1. 牛首文隆、成宮 周：
トロンボキサン受容体の構造、機能と分布
血小板と血管細胞のシグナル伝達 pp53-pp62, 1997
2. 牛首文隆、成宮 周：
Prostaglandin F₂ α receptor (FP), prostaglandin I₂ receptor (IP)
ノックアウトマウス・データブック pp416-pp418, 1997.