

ゼブラフィッシュ Gs 共役型プロスタノイド受容体の同定と 初期発生における生理機能の解明

医療薬学専攻 HIGO プロプログラム 4 年コース 薬学生化学分野 告 恭史郎

プロスタノイドは、主に 4 種のプロスタグランジン (PG)、PGD₂、PGE₂、PGF_{2α}、PGI₂ と、1 種のトロンボキサン (TX)、TXA₂ からなる生理活性脂質の総称であり、アラキドン酸を基質、シクロオキシゲナーゼ (COX) を律速酵素として産生される。産生されたプロスタノイドは、細胞外に放出され、近傍の細胞膜上に存在する 8 種の G タンパク質共役型受容体 (PGD₂ 受容体 : DP、PGE₂ 受容体 : EP1、EP2、EP3、EP4、PGF_{2α} 受容体 : FP、PGI₂ 受容体 : IP、TXA₂ 受容体 : TP) を介して、多彩な生理・病態作用を発揮する。アスピリンに代表される非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) は、COX の特異的阻害剤であり、プロスタノイドの生合成を抑制することで、解熱・鎮痛・抗炎症作用を発揮する。一方で、妊婦の服用により、腎奇形など様々な胎児毒性が引き起こされ、このことはプロスタノイドが初期発生に重要な役割を担うことを示唆するが、その作用機序は不明であった。そこで、著者は、初期発生研究のモデル生物としてゼブラフィッシュに着目し、プロスタノイドの初期発生における役割・作用機序の解明を試みた。

ゼブラフィッシュ Gs 共役型プロスタノイド受容体の同定と性状解析

ゼブラフィッシュを用いたプロスタノイド研究基盤を確立するため、未同定であったゼブラフィッシュ Gs 共役型受容体型プロスタノイド受容体の同定と性状解析を行った。まず、データベースからヒト Gs 共役型プロスタノイド受容体 (IP、EP2、EP4、DP) と高い相同性を有する 6 種類の候補遺伝子を抽出し、その cDNA を単離した。リガンド結合実験と細胞内 cAMP 量定量解析の結果、ゼブラフィッシュには、IP 受容体が 1 種、EP2 受容体が 2 種 (EP2a、EP2b)、EP4 受容体が 3 種 (EP4a、EP4b、EP4c) 存在することを見出した。DP 受容体は見出せなかった。また、哺乳類で開発されたサブタイプ選択的作動薬・拮抗薬のうち、ゼブラフィッシュ Gs 共役型プロスタノイド受容体において利用可能なものを同定した。遺伝子発現分布解析の結果、同種の受容体サブタイプであっても、ゼブラフィッシュ Gs 共役型プロスタノイド受容体の発現パターンはそれぞれユニークであり、固有の発現制御を受け、独自の機能・役割を担う可能性が示唆された。特に、IP 受容体は、発生初期胚の腎臓部位で選択的に高発現しており、

腎臓形成・機能との関連が考えられた。以上より、ゼブラフィッシュにおけるGs 共役型プロスタノイド受容体研究の遺伝学的、薬理的解析基盤を確立した (Tsuge, K. *et al.* 2013)。

ゼブラフィッシュ腎臓形成における PGI₂-IP 受容体の生理的意義の解明

著者の確立した遺伝学的、薬理的な研究基盤をもとに、ゼブラフィッシュ初期発生における IP 受容体の生理機能を解析した。まず、ゼブラフィッシュ発生初期胚における IP 受容体の発現部位を調べた結果、IP 受容体は未分化な腎尿細管が各機能性ネフロンユニット（糸球体、近位尿細管、遠位尿細管、排泄腔）へと分節化（ネフロン分節化）される過程を通して、主に近位尿細管で発現していた。そこで、ゲノム編集を用いて IP 受容体欠損ゼブラフィッシュ系統 (IPKO) を樹立したところ、IPKO では受精後 4 日に腎臓形成・機能不全時によく観察される心膜部位の浮腫が生じ、実際、腎排泄される分子量の蛍光標識デキストランを用いた解析から腎排泄能が低下していることが明らかとなった。そこで、IPKO の腎尿細管ネフロン分節化パターンを調べた結果、IPKO では近位尿細管の短縮と遠位尿細管の伸長を伴うネフロン分節化異常を呈していた。これらの表現型は近位尿細管分化に決定的な役割を担うレチノイン酸 (RA) の合成を阻害した際に見られるものと類似していたことから、RA の近位尿細管分化作用における IP 受容体経路の寄与を想定し、検証を行った。その結果、RA 合成阻害剤の処理により野生型で誘導された近位尿細管の短縮は、RA、IP 受容体作動薬 iloprost、膜透過性 cAMP 類似体 (dbcAMP) の各試薬の共処理によっていずれもキャンセルされた。一方、IPKO における近位尿細管短縮に対しては RA 合成阻害剤は影響せず、RA、iloprost はともに作用を示さなかったが、dbcAMP がレスキュー効果を示した。従って、RA 経路の下流で PGI₂-IP 受容体-cAMP 経路が近位尿細管分化、および、適切なネフロンの分節化に寄与することで、正常な腎臓機能が発揮されると考えられた。興味深いことに、PGI 合成酵素欠損マウスにおいても、腎形成異常が報告されており、腎臓の発生における PGI₂-IP 受容体-cAMP 経路の役割は種を超えて哺乳類でも保存されている可能性が考えられた。本知見は、これまでほとんど不明であった腎形成における PGI₂ の役割とその分子機構を初めて明らかにしたものであり、NSAIDs による胎児腎毒性の作用機序の理解に貢献するものである。

Reference

Tsuge, K. *et al.* Molecular and pharmacological characterization of zebrafish 'relaxant' prostanoid receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **436**, 685-690 (2013)