

学 位 論 文 題 名

5-HT₃ 受容体 A サブユニットの動物種差の検討 および種差に関与する受容体分子内部位の同定

学位論文内容の要旨

1. はじめに

5-HT₃ 受容体(5-HT₃R)はセロトニン(5-hydroxytryptamine, 5-HT)をアゴニストとするリガンド作動性受容体イオンチャネルであり、いくつかの生理的反応(嘔吐、ストレス性の便排出異常等)に関与している。実際、臨床において 5-HT₃R 選択的アンタゴニストは、ガン化学療法や放射線療法により引き起こされる嘔吐の抑制剤として用いられている。また、5-HT₃R 選択的アゴニストには便排出促進作用などが期待されている。

5-HT₃R は薬理学的に魅力あるターゲットであるものの、この受容体の動物種差が大きい点は創薬の障害となっている。このため、各種 5-HT₃R の特徴を分子生物学的側面から明らかにしていくことは、創薬の点から非常に重要である。

本研究ではもっとも単純化された系として、クローン化された 5-HT₃R A サブユニット(5-HT_{3A}R)に注目し、この受容体における動物種差を明らかにするとともに、種差に関与する受容体部位の同定を試みた。各受容体は *Xenopus oocytes* または HEK293 細胞に発現させ、電気生理的に機能解析をおこなった。ツール化合物としては、5-HT₃ 受容体選択的アゴニスト meta-chlorophenylbiguanide (mCPBG)、2-methyl-5-hydroxytryptamine (2-Me-5-HT) および内在性のアゴニスト 5-HT を用いた。

2. ヒトおよびラット 5-HT_{3A}R の機能解析

Xenopus oocytes でヒトおよびラットの 5-HT_{3A}R を検討した結果、2 つの顕著な薬理的違い、すなわち、mCPBG のポテンシーがラットの方がヒトより 13 倍高い点と、2-Me-5-HT がヒトではフルアゴニスト活性をラットではパーシャルアゴニスト活性(5-HT に対して 44%)を示した点、が明らかとなった。

ヒト、ラットおよびフェレット 5-HT_{3A}R 間で、キメラおよびミュータント受容体を作成・検討し、システマティックな手順で薬理的差に影響を与える領域を絞り込むことができた。その結果、mCPBG のポテンシーには 5-HT_{3A}R の第 1 膜貫通部位(M1)近傍 N 末側細胞外領域(ラットにおいて Phe²²⁰-Ser²³³ に相当する領域)が強く関与しており、また、2-Me-5-HT のエフィカシーには、ポテンシーの領域とは異なる N 末側細胞外領域(ラットにおいて N 末側 - Ile²⁰⁹ に相当する領域)が強く関与していることが明らかとなった。ポテンシーに関与する領域については、HEK293 細胞を用いた系でも検討し、この領域はポテンシーに強く関与し、エフィカシーやカインेटクスには、顕著な影響をおよぼさないことが明らかとなった。

3. イオンチャネルとしての基本特性

ヒト 5-HT₃R のイオンチャネルとしての基本的特性はわかっていなかったことから、HEK293 細胞に発現させ検討した。アルカリ金属イオンの透過性順序は $\text{Li}^+ > \text{Rb}^+ = \text{Cs}^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+$ ($P_{\text{Li}}/P_{\text{Na}}: 1.16$, $P_{\text{Rb}}/P_{\text{Na}}: 1.11$, $P_{\text{Cs}}/P_{\text{Na}}: 1.11$, $P_{\text{K}}/P_{\text{Na}}: 1.04$)となり、これはマウス神経芽細胞腫 N18 やラット副腎髄質由来親クロム性細胞種 PC12 に発現している、内在性 5-HT₃R における透過性順序と異なっているものの、相対的透過性値の差は小さかった。Ca²⁺および Mg²⁺はヒト 5-HT_{3A}R を透過するとともに ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}: 0.49$, $P_{\text{Mg}}/P_{\text{Na}}: 0.37$)、電流応答を電位非依存的に阻害した。また、全細胞電流の揺らぎ解析により求めた単一チャネルコンダクタンスは 790 fS であった。2 価イオンによる電位非依存的阻害作用や、単一チャネルコンダクタンスがサブピコシーメンスである点は、マウス 5-HT_{3A}R と類似している。

4. フェレット 5-HT_{3A}R のクローニングおよび機能解析

フェレットは 5-HT₃ 受容体関連の実験動物として利用されており、5-HT₃R アンタゴニストの制吐作用やアゴニストの便排出作用の評価に利用されている。しかし、フェレット 5-HT₃R の分子の実体は不明であったため、これをクローニングし機能解析を行った。フェレット腸より単離した 5-HT_{3A}R cDNA がコードする蛋白質は 5-HT_{3A}R のショート型スプライスバリエントに匹敵しており、ロング型スプライスバリエントは RT-PCR 法では検出されなかった。他動物種 5-HT_{3A}R とのアミノ酸配列のホモロジーは高く 80%以上であった。

次に、HEK293 細胞に発現させ機能解析を行った。電気生理的解析では、アゴニストポテンシーの序列は $\text{mCPBG} \geq 2\text{-Me-5-HT} > 5\text{-HT}$ であったが、その差は小さかった。また、mCPBG はパーシャルアゴニストであり、2-Me-5-HT はほぼフルアゴニストであった。フェレットの内在性 5-HT₃R において報告されている 5-HT や 2-Me-5-HT のポテンシーおよび 2-Me-5-HT のエフィカシーは、クローン化されたフェレット 5-HT_{3A}R と同程度であることから、今回単離したフェレット 5-HT_{3A}R は内在性受容体の特徴を良く反映していると言える。ヒト内在性 5-HT₃R の性質は良くわかっていないが、少なくともフェレットとヒト 5-HT_{3A}R では、3つのアゴニストのポテンシーに大きな差がないこと、および mCPBG や 2-Me-5-HT のエフィカシーの点で類似していることが明らかとなった。

5. まとめ

- 1) ヒトおよびラット 5-HT_{3A}R 間で薬理的に差があった。
- 2) ヒト 5-HT_{3A}R のイオン透過性はマウス、ラットの内在性 5-HT₃R とは異なったが、その差は小さかった。2 価イオンによる阻害作用や単一チャネルコンダクタンスは、マウス 5-HT_{3A}R と同程度であった。
- 3) ヒトおよびラット 5-HT_{3A}R 間でのキメラおよびミュータント受容体、およびフェレット 5-HT_{3A}R のミュータント受容体を利用し、M1 近傍 N 末側領域(ラット Phe²²⁰-Ser²³³ に相当する領域)がアゴニストポテンシーに強く関与することを明らかにした。またこの領域は、アゴニストのエフィカシーや、カインेटクスに対して顕著な影響をおよぼさなかった。
- 4) 2-Me-5-HT のエフィカシーには、3)とは異なる、N 末側領域(ラット N 末側 - Ile²⁰⁹ に相当する領域)が強く関与することを明らかにした。
- 5) 5-HT₃ 受容体の *in vivo* 実験に用いられるフェレットから、5-HT_{3A}R cDNA を単離した。
- 6) フェレットおよびヒト 5-HT_{3A}R でアゴニストに対する特性が似ていた。したがって、フェレットは 5-HT₃R 関連の実験に適当な動物であることが、受容体レベルで明らかとなった。

学位論文審査の要旨

主査	教授	加茂直樹
副査	教授	野村靖幸
副査	助教授	三宅教尚
副査	助教授	柏柳誠

学位論文題名

5-HT₃ 受容体Aサブユニットの動物種差の検討 および種差に関与する受容体分子内部位の同定

本学位論文は、第1章 ヒトおよびラット 5-HT_{3A} 受容体の薬理学的特徴およびこれに関与する受容体分子内部位の同定、第2章 ヒト 5-HT_{3A} 受容体のイオンチャネルとしての基本的特徴、第3章 フェレット 5-HT_{3A} 受容体のクローニングおよび機能解析、および、総括の4つの部分からなる120ページの論文である。

5-HT はセロトニン (5-hydroxytryptamine) であり、この神経伝達物質の受容体は7種類が知られており、このうち 5-HT_{3A} 受容体はリガンド作動性イオンチャネルであり、5-HT 刺激により細胞の早い脱分極応答を引き起こす。この受容体は、嘔吐、不安、認知、ストレス性の排便などに関与する事が報告されている。臨床においては、5-HT₃ 受容体選択的阻害剤が、ガン化学療法や放射線療法により引き起こされる嘔吐の抑制剤として用いられている。また、受容体選択的アゴニストは排便促進作用が期待されている。この受容体の一次構造は、マウス、ラット、モルモット、ヒトで明らかにされている。しかし、種々のアゴニストおよびアンタゴニストに対する感受性が異なり、これらの機能的差異と受容体上の領域との対応は十分に明らかにされていない。本受容体は薬理学的に魅力あるターゲットであるものの、動物種差が大きい点は創薬の障害となっている。このため、各動物種 5-HT_{3A} 受容体の機能的特徴を分子生物学的側面から明らかにしていく事は、創薬の点から非常に重要であると、申請者は考え、本研究を行なっている。

オーサイトの卵母細胞または培養 HEK293 細胞に受容体または変異受容体を発現させ、電位生理学的手法を用いて、各受容体の機能的特徴を明らかにしている。得られた結果はつぎのように要約出来る。1) クローン化された受容体間でも動物種差があり、アゴニストのポテンシーおよびエフィカシー、あんたゴニストのポテンシー、およびカイネティクスが動物間で異なる

ことを電気生理的機能解析で明らかにした。2) キメラおよび変異受容体の解析から、N 末細胞外領域がアゴニストのポテンシーに関与し、エフィカシーおよびカインेटィクスには影響を与えない。3) 2とは異なる N 末細胞外領域が、2-Me-5-HT のエフィカシーに関与する。4) 非特異的阻害剤である (+)-tubocurarine のポテンシーが動物種によって大きく異なる理由として、受容体の広範囲な部分を認識している事が示唆された。5) イオンチャネルとしての性質は、詳細な部分で種差が有るものの、本質的には種差はない。6) 5-HT₃ 受容体関連の *in vivo* 研究に用いられるフェレットから、5-HT_{3A} 受容体をクローニングした。7) フェレット 5-HT_{3A} 受容体に対するリガンド結合実験および電気生理学的機能解析を行なった。その結果、フェレット 5-HT_{3A} 受容体における、アゴニストのポテンシーおよびエフィカシー、およびカインेटィクスの特徴がヒト 5-HT_{3A} 受容体の薬理学的特徴をよく反影していた。従って、フェレットは 5-HT₃ 受容体研究、特にアゴニスト研究において、妥当な動物である事が受容体レベルで示された。

以上のように、実験は精緻を極め、はじめて種差に関する分子内部位を同定したものであり、今後の創薬研究に多大の貢献をすると考えられ、本研究は薬学博士の称号を授与するに十分であると認めた。