

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：11101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K15639

研究課題名(和文)プロスタノイドシグナルの新規解析技術の開発

研究課題名(英文)The development of novel detection system for prostanoid signaling

研究代表者

麓 敏雄 (Fumoto, Toshio)

弘前大学・医学研究科・助教

研究者番号：80463206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：プロスタノイドTxA2、PGI2は、血管緊張と血小板活性化の制御に重要な役割を果たすが、これらのシグナルの活性化状態の正確な評価は行えていなかった。そこで、TxA2、PGI2の受容体TxA2 receptor(TP)、PGI2 receptor(IP)の立体構造の変化を感知することでこれらのシグナルの活性化状態を捉えるバイオセンサーを作成した。TPについては3種類のantagonistに対する良好な反応性が見られるバイオセンサーを、IPについては2種類のagonistに対する良好な反応性が見られるバイオセンサーを得られた。今後さらに検証を進め、研究成果を積極的に発信していく必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プロスタノイドTxA2、PGI2は、血管緊張と血小板活性化の制御に重要な役割を果たしており、そのバランスの破綻は様々な血管障害の原因となる。TxA2、PGI2をターゲットとした治療には、生理的な止血を阻害しない範囲で、過剰な血管収縮と血小板活性化を抑制するという精巧な治療薬剤の開発が必要であり、そのためには、薬剤のシグナルに対する効果の正確な評価が不可欠である。本研究は、TxA2、PGI2をターゲットとした治療の開発の基盤となるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Prostanoid TxA2 and PGI2 play important roles in the regulations of vascular tone and platelet activation. However, precise evaluations of these signaling had been difficult. This study aimed to develop novel biosensors to evaluate the activation status of these signaling by detecting structural changes of these receptors. Here we obtained a TxA2 biosensor which responds to three TxA2 receptor antagonists and two PGI2 biosensor which respond to two TxA2 receptor agonists, although further validation is needed.

研究分野：分子生物学

キーワード：バイオセンサー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プロスタノイド TxA_2 、 PGI_2 は、血管緊張と血小板活性化の制御に重要な役割を果たしており、そのバランスの破綻は様々な血管障害の原因となる。そのため、これらをターゲットとした治療法の開発が早くから進められ、多くの薬剤が開発されてきた。しかし、臨床応用されてきた薬剤の適用は限られており、その効果は顕著なものとは言い難いものであった。

TxA_2 、 PGI_2 をターゲットとした治療には、生理的な止血を阻害しない範囲で、過剰な血管収縮と血小板活性化を抑制するという精巧な治療薬剤の開発が必要である。そのためには、正確な病態の把握と、薬剤のシグナルに対する効果の正確な評価が不可欠である。しかし、 TxA_2 、 PGI_2 の半減期が非常に短く、これらの受容体 TxA_2 receptor (TP)、 PGI_2 receptor (IP)は TxA_2 、 PGI_2 以外の複数の因子により活性化され、またP、IPの下流では複数のシグナル伝達経路が活性化されるため、シグナルの活性化状態の評価自体が行えていなかった。

2. 研究の目的

TxA_2 、 PGI_2 シグナルは、上流および下流に複数のシグナル伝達経路が存在するため、その活性化状態を正確に知ることは難しい。しかし、これらのシグナルはreceptor において収束するため、receptorの活性化状態を正確に感知することで、これらのシグナルの活性化状態を評価できる。TP、IPの属するGタンパク質共役受容体には異なる種類のリガンドに応答するものがあるが、それがagonistかantagonistかにより、またそれぞれのリガンドの強さにより異なる立体構造変化を示すことが報告されている。そのため、receptorの立体構造の変化を感知することでその活性化状態を捉えることが可能であると考えられる。そこで、プロスタノイドシグナルの活性化状態の正確な評価を可能にするため、高感度のバイオセンサーを作成した。

3. 研究の方法

SDラットのThymusおよびSpleenより、Thromboxane A2 receptor (TP)およびProstaglandin I2 receptor (IP)をクローニングした。

TPのC末端にEYFP遺伝子を、細胞内ループ領域1にRluc遺伝子を挿入したプラスミドを作成した。同様に、C末端にEYFP、細胞内ループ領域2にRlucを挿入したプラスミドを作成した。さらに、C末端にEYFP、細胞内ループ領域3の異なる位置にRlucを挿入した2種類のプラスミドを作成した。また、TPのC末端にRluc遺伝子を、細胞内ループ領域3にEYFP遺伝子を挿入したプラスミドを作成した。一方、IPのC末端またはC末端細胞内領域にEYFP遺伝子を挿入したプラスミドを作成した。この2種のプラスミドの細胞内ループ領域1にRluc遺伝子を挿入した。同様に、細胞内ループ領域2にRlucを挿入したプラスミド、細胞内ループ領域3の異なる位置にRlucを挿入したプラスミドを作成した。またIPのC末端にRluc遺伝子をつなげたプラスミド、C末端細胞内領域にRluc遺伝子を挿入したプラスミドを作成し、この2種のプラスミドの細胞内ループ領域3にEYFP遺伝子を挿入した。これらの発現ベクターをリポフェクションによって293T細胞に導入し、TPについてはBRET assayによって、1種類のantagonistに対する応答性を、IPについては1種類のagonistに対する応答性を検討した。

TPの細胞内ループ領域3にRlucを挿入したプラスミドを元に、Rlucの位置をさらに1アミノ酸ずつ前後にずらしたプラスミド4種類を作成し、antagonistに対する応答性をさらに検討した。一方、IPのC末端にEYFP遺伝子を、細胞内ループ領域1、2にRluc遺伝子を挿入したプラスミドを各1種、細胞内ループ領域3の異なる位置にRlucを挿入した2種類のプラスミドを再度作成した。これらの発現ベクターをリポフェクションによって293T細胞に導入し、BRET assayによって、1種類のagonistに対する応答性を検討した。さらに、IPの細胞内ループ領域3にRlucを挿

入したプラスミドを元に、Rlucの位置をさらに1アミノ酸ずつ前後にずらしたプラスミド4種類を作成し、agonistに対する応答性をさらに検討した。

TPのC末端にEYFP遺伝子を、細胞内ループ領域3の異なる位置にRluc遺伝子を挿入した5種類のプラスミドを、リポフェクションによって293T細胞に導入した後、BRET assayによって3種類のantagonistに対する応答性を検討した。IPのC末端にEYFP遺伝子を、細胞内ループ領域3の異なる位置にRlucを挿入した5種類のプラスミドを、リポフェクションによって293T細胞に導入した後、BRET assayによって1種類のagonistに対する応答性を検討した。

TPのC末端にEYFP遺伝子を、細胞内ループ領域3の異なる位置にRluc遺伝子を挿入したプラスミドを用い定常発現株を作成した。

4. 研究成果

TPのC末端にEYFP遺伝子を、細胞内ループ領域3にRluc遺伝子を挿入し1種類のプラスミドが、antagonistに対する強く量依存的な応答性を示した。一方、細胞内ループ領域2にRlucを挿入したプラスミドは応答性が見られず、細胞内ループ領域1および細胞内ループ領域3の異なる位置にRlucをプラスミドは、antagonistに対する反応が弱かった。そこで、良好な応答性を示したプラスミドを元に、Rlucの位置をさらに1アミノ酸ずつ前後にずらしたプラスミド4種類を作成し、antagonistに対する応答性をさらに検討した。その結果、さらに良好な反応性が見られるレポータを見出した。さらにこのプラスミドは他の2種類のantagonistに対しても最も良好な反応性が見られた。そこで、このプラスミドを用い定常発現株を作成した。

IPのC末端またはC末端細胞内領域にEYFP遺伝子を、細胞内ループ領域1、2、3にRluc遺伝子を挿入したベクターのagonistに対する応答性を検討したところ、C末端細胞内領域にEYFP遺伝子を挿入したプラスミドは応答性が見られず、C末端にEYFP遺伝子を挿入したプラスミドはagonistに対して弱い反応しか見られなかった。そこで、IPのC末端にEYFP遺伝子を、細胞内ループ領域1、2にRluc遺伝子を挿入したプラスミドを各1種、細胞内ループ領域3の異なる位置にRlucを挿入した2種類のプラスミドを再度作成し、agonistに対する応答性を検討した。その結果、細胞内ループ領域3にRlucを挿入したプラスミドの一つに良好な反応性が見られた。そこで、このプラスミドを元に、Rlucの位置をさらに1アミノ酸ずつ前後にずらしたプラスミド4種類を作成し、agonistに対する応答性をさらに検討した。その結果、さらに良好な反応性が見られるレポータを二つ見出した。さらにこのプラスミドは他のagonistに対しても最も良好な反応性が見られた。

今後、得られたバイオセンサーの検証をさらに進め、研究成果を積極的に発信していく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----