

本研究では EP4 発現亢進の分子機序を解明するため、胚や稚魚が透明であり、蛍光タンパクによる EP4 プロモーター活性の可視化が可能なゼブラフィッシュを使用して、EP4-EGFP レポーターゼブラフィッシュを作製した。ヒト EP4 に相当するゼブラフィッシュ EP4b の上流 2084 bp について検索プログラムを用いてプロモーター領域を検索し、既報のヒト EP4 プロモーター領域 (Scira et al., *Pharmacol Res Perspect*, 2018) と相同性のある領域を含むようプライマーを作製した。長さの異なるインサート DNA (1246 bp, 315 bp) をクローニングした後、Tol2 ベクターに導入してコンストラクトを作製し、野生型ゼブラフィッシュ受精卵に導入したところ、受精後 1 日および 4 日に EGFP 発現が見られた。これらの結果より、ゼブラフィッシュ EP4b のプロモーター領域がヒト EP4 のプロモーター領域と近い位置にあることが示唆された。今後は、この遺伝子改変ゼブラフィッシュを用いて、EP4 発現を亢進する分子機序を検討してゆく予定である。

16.

TRPM7 チャンネル阻害薬 2-APB は N 末端領域に作用して効果を発揮する

(細胞生理学分野)

○井上 華、水本 遼、横山 詩子

(順天堂大学医学部薬理学教室)

村山 尚、小林 琢也

TRPM7 チャンネルは Mg^{2+} 透過性の陽イオンチャンネルで、細胞増殖や遊走において重要な役割を果たしている。いくつかの癌細胞ではその発現量の増加が病態を悪化させることが報告されていることから、TRPM7 チャンネルの阻害は癌治療の標的となり得るが、現在までのところ、TRPM7 特異的阻害薬は存在していない。そこで本研究では、TRPM7 を阻害する既存の化合物 2-aminoethyl diphenylborinate (2-APB) の作用部位を明らかにし、チャンネルゲートの動作原理を予測することにより、より特異性の高い阻害薬を設計できると考えた。TRPM7 の N 末端、C 末端領域は共に細胞質に存在し、C 末端領域にはセリン/スレオニンキナーゼ活性のあるキナーゼドメインがある。我々はまず始めにキナーゼドメインを欠損した TRPM7- Δ kinase 変異体を作製し HEK293

細胞に発現させ、パッチクランプ法により TRPM7- Δ kinase 電流を測定した。細胞外に 2-APB を添加すると、チャンネル電流は有意に抑制されたことから (201.9 ± 27.1 pA/pF and 42.8 ± 7.57 pA/pF, before and after 2-APB application, respectively, $n = 5$)、キナーゼドメインは 2-APB のターゲットではないことが示された。次に N 末端領域の寄与を調べるため、TRPM7 のホモログで 2-APB により活性化される TRPM6 の N 末端領域を用いてキメラチャンネル (M6NTR-TRPM7) を作製した。M6NTR-TRPM7 電流は 2-APB により抑制されなかった (57.3 ± 4.7 pA/pF and 60.3 ± 4.7 pA/pF, before and after 2-APB application, respectively, $n = 5$)。これらの結果は 2-APB の作用部位が TRPM7 の N 末端領域内であり、かつ TRPM6 の N 末端領域とホモロジーの低い部位であることを示唆している。

17.

小胞体ストレス応答の破綻による糖尿病発症機構の解明

(未来医科学研究寄付講座、医学総合研究所運動器科学研究部門)

○藤田 英俊、中島 利博

(疾患モデルセンター)

熊谷 勝義

(未来医科学研究寄付講座)

荒谷 聡子

(生化学)

平本 正樹

(分子病理学)

金蔵 孝介、黒田 雅彦

(医学総合研究所運動器科学研究部門)

松本 滉平

ウォルフラム症候群は、常染色体劣性遺伝性疾患であり、日本における患者数はおよそ 200 人である。代表的な遺伝性の一型糖尿病であり、いまだその根本的な治療法が確立していない疾患でもある。若年で糖尿病が発症し、その原因遺伝子として、Wolfram syndrome 1 (WFS1) が 1998 年に同定されている。WFS1 は主に細胞内小器官である小胞体に存在する膜タンパク質として、小胞体ストレスの減弱に機能していると考えられている。これまでの研究