プロスタノイド受容体の構造と機能

牛首文隆*

review article

JAPANESE JOURNAL OF INFLAMMATION

Structure and function of the prostanoid receptors

Prostanoids, which consist of the prostaglandins (PGs) and the thromboxanes (TXs), exert a variety of actions in the body, which are mediated via specific cell surface receptors. They consist of five types of receptors named the TP, IP, EP, FP and DP receptors. The EP receptor have four subtypes, the EP₁, EP₂, EP₃ and EP₄ receptors. However, none of the receptors had been isolated and cloned until the TXA₂ receptor was purified from human blood platelets and its cDNA cloned. By homology screening in mouse cDNA libraries, the structures of all of the mouse prostanoid receptors have been identified.

These studies have clearly shown that all of the prostanoid receptors belong to the G-protein-coupled, rhodopsin-type receptor superfamily, and that they constitute a new subfamily of receptors. On the other hand, their ligand binding characteristics and signal transduction were studied using the expression system of the cloned receptors. These studies have clarified the structure and function of the prostanoid receptors.

Rec. 10/22/1998, pp 393~404

Fumitaka Ushikubi*

key words : prostanoid, prostanoid receptors, prostaglandin, thromboxane

プロスタグランジン (PG) と トロンボキサン (TX) よりなるプロスタノイドは、炭素数 20 個の不飽和脂肪酸からサイクロオキシゲナーゼ (COX) によって合成される生理活性物質である (図 1)。プロスタノイドはその合成直後に細胞外に放出される。PGI₂, TXA₂ は化学的に不安定であり、生理的条件下では 30 秒から数分の半減期で不活性な物質に変化する。それ以外の PG は化学的には比較的安定であるが、その代謝は迅速である。たとえば、これらの PG は、肺を 1 回通過することによって、その大部分が不活化される。プロスタノイドの示すこの性質から、プロスタノイドは合成された局所で作用し、そのホメオスタシスの維持に働くと考えられる。

プロスタノイドは、おのおのに特異的な受容体

を介してその作用を発揮する。これは、種々の組織を用いたバイオアッセイ系における多くのプロスタノイドやその類似化合物の効力の比較検討によって明らかにされた。Coleman らは、これらの研究から得られた情報をもとにプロスタノイド受容体の総括的な分類を提唱した^{1,2)}。彼らは、TX, PGI, PGE, PGF, PGD に特異的な受容体を提唱し、おのおの TP, IP, EP, FP, DP 受容体と名付け、さらに EP 受容体を EP 1, EP 2, EP 3, EP 4 受容体の 4 種類のサブタイプに分類した。しかし、最近になって TXA₂ 受容体がヒト血小板より精製され³⁾、その cDNA がクローン化されるまで⁴⁾、プロスタノイド受容体の本態は全く不明であった。これらの研究の結果、TXA₂ 受容体は 7 回膜貫通構造をもち、G 蛋白質と連関するロドプシン型の受容体であることが明らかとなった。さらにホモロジックローニングによって、マウスの 8 種類

* Department of Pharmacology, Asahikawa Medical College 旭川医科大学薬理学教室

図1 プロスタノイドの生合成

細胞が刺激を受けると、ホスホリパーゼ A₂(PLA₂)が活性化され、膜リン脂質よりアラキドン酸が遊離される。ついで、サイクロオキシゲナーゼによって PGG₂ を経て PGH₂ が合成される。最終的には、各細胞に存在する各々のプロスタノイドに特異的な合成酵素によって、生理的に重要な PGD₂、PGE₂、PGF₂α、PGI₂、TXA₂ の5種類のプロスタノイドが合成される。

のプロスタノイド受容体(TP, IP, EP 1, EP 2, EP 3, EP 4, FP, DP 受容体)の一次構造が解明された。ついで、種々の培養細胞系を用いて発現された均一な受容体標本に対して、そのリガンド結合の特異性や情報伝達機構が詳細に解析された。この総説では、これらのプロスタノイド受容体に関する知見をその構造と機能に焦点をあてて紹介したい。

1. プロスタノイド受容体とその遺伝子の構造

ロドプシン型受容体としてのプロスタノイド受容体

ヒト TXA₂受容体の構造模式図をプロスタノイド受容体の代表として図2に示す。この受容体は343個のアミノ酸よりなる蛋白質であり、親水性の解析から七つの疎水性領域が存在することが

明らかとなった。これらの領域と他のロドプシン型受容体の膜貫通領域の間には強くはないが有意なアミノ酸配列の相同性が認められることから、この領域が TXA₂受容体の膜貫通領域と考えられる。

一方、ヒト血小板より精製された TXA₂受容体の分子量は約 57 kDa であり、アミノ酸組成より計算された分子量は約 37 kDa である。この差は受容体のグリコシレーションに起因している。TXA₂受容体のN末端には2カ所のN-グリコシレーション部位が想定される(Asn¹⁴, Asn¹⁶)。実際、精製 TXA₂受容体のN末端アミノ酸配列の解析では、この二つの部位が修飾を受けていた⁴⁾。さらに、精製 TXA₂受容体をN-グリカネースで処理すると分子量が約 37 kDa に低下することが示された⁵⁾。

クローン化されたマウス・プロスタノイド受容

図 2 ヒト TXA₂ 受容体 (TP) の構造模式図

ヒト TXA₂ 受容体の構成アミノ酸の疎水性の解析によって得られた情報をもとに作成された構造模式図を示す。アミノ酸を一文字表記で、N-グリコシレーション部位を CHO で、ジスルフィド結合を S-S で示す。

体のアミノ酸配列を図 3a に示す。ここでは、想定された七つの膜貫通領域の相同性をもとに 8 種類の受容体を配置した。この膜貫通領域やその近傍には計 28 個の、すべてのプロスタノイド受容体で保存されたアミノ酸残基が存在している。その中で、8 アミノ酸残基は他のロドプシン型受容体においてもよく保存されており、これらはロドプシン型受容体一般の構造や機能の保持に重要な役割を果たすと考えられる。たとえば、第二膜貫通領域に存在する Asp はプロスタノイド受容体でも保存されているが、他のロドプシン型受容体においてリガンドが受容体に結合してから G 蛋白質の活性化に至る過程に必須であることが示されている⁹⁾。第一および第二細胞外ループに存在する 2 個の Cys 残基はプロスタノイド受容体でも保存されている。この残基はジスルフィド結合することにより、受容体の構造保持やリガンド結合に重要と考えられている。この点に関しては、プロスタノイド受容体においても検討されている。プロスタノイド受容体にはこれらの保存されたアミノ

酸以外にもロドプシン型受容体としてのいくつかの特徴がある。まず、1 個ないし 2 個の N-グリコシレーションを受けると想定される配列 (Asn-X-Ser/Thr) が N 末端細胞外領域に存在する。この配列は DP, IP, EP 2 受容体の第一細胞外ループや EP 3, EP 4 受容体の第二細胞外ループとも存在する。つぎに、多くのロドプシン型受容体にみられるように、リン酸化部位と考えられるセリンとスレオニン残基がすべてのプロスタノイド受容体の細胞内ドメインに広範に分布している。これらの残基のリン酸化については、プロスタノイド受容体ではまだ十分に検討されていないが、他のロドプシン型受容体にみられるように⁷⁾ 受容体の脱感作に関与していると考えられている。

一方、ある種のロドプシン型受容体では C 末端細胞内領域に存在する Cys 残基がパルミチン化され、この部位で膜に結合することによって第 4 細胞内ループを形成している。このパルミチン化の想定配列は Leu-X-Cys-(X)_n-Arg/Lys であり、Cys 残基は第 7 膜貫通領域の終りから 11 ない

DP	MMESV---RCQTSTWVERGSAHMGAVLFGAGLLGNLALVLLA-ARSGLS	I
EP2	MDNFLNDKLMEDCKSRQMLLSGEAIISSVMPFSAEVLGMLLALL-ARRMRGD	
IP	---MAG---SCNITIVQDSVGTATSTLTFVAGVGVGMLVAVLGLGARR---	
EP4	MAEVGGTTPKSNKIELQRCVLLTITSTISFVGNASTPFLRSTVFAVFIQVGGHVRVGLCKSR---	
EP3	MAASHWA---PMSAASXNSLSTTDDCGS--VSVAFPIITMMVTGFGVNAELMLLSVRSYRRRE	
EP1	MSFCGLNLSLASE---AATCATPALPNTSVLFTGDNSTALPIFMMTGVASNVLEALDAQVAGMR	
TP	MPNNGTSLGACFR---PVN---ITLQERRAIAASMPAASFCALGSLNLSVLAGARPGAG	
FP	MSMNSSKQ-----PVSFAAGLIANTTC---QTEMNARASVFPFSIIFMTVGIILSNLAIIMKAYQRF	II
DP	---CRPGKLPSPSVTVVTCGGTIVTDLLGKGLISPMVLAAYV	II
EP2	TGCSAGS--RTSISLVNVTGELVITDILGCTGLISPMVLAAYV	
IP	---RSHPSAFVLTGELAVTDLLGCTGLISPMVLAAYV	
EP4	---KEQKETTFYVLTGELAVTDLLGCTGLISPMVLAAYV	
EP3	S---KRKK--SFLCIGGMLALIDLVGQLLTSPTVTVLVLSKQRWEQLDPSGR--LCITFGLTHTVFGLSLIVASANAVERA	
EP1	R---RRSAATFLVFLVSLALIDLAGHVFGLVLTATAGRA---PAGG---LACHFVGGMVFFGLCGLGCGHNAVERC	
TP	P---RSL---FLALCGLVLTDFLGLLVITGAILVLSQMAALDWRATDPSGR--LCYFMGVAMVFFGLCGLGCGHNAVERC	
FP	Q-----K-SKASFLAASGLVITDFFGMLINGGIAVAVVMSASDKDMIRFDQSNL--LCISIFGISHVFSGLCGLFLGSANAIERC	III
DP	LSLGMFPFYQQRNVTJAKGVLVAFVVAACFLAFCALFLAFLGKXVQICPGHCTPQ	V
EP2	LSIGXPFIIRRNLSRGGALVAFVIGASLLFCALFLAFLGKXVQICPGHCTPQ	
IP	LALSMEFYXALQDGPCCARFALPSIYAFCCFLCFLFLGLGEM-QQYCPGHCNCFR---MNRSAQPGGCA--FSLAYASIMAL	
EP4	LAINHAFYXSHYVDMKLCGLTLFAIXASNVLAFCALFLHGLGERSQV-PGHCNCFR---MNRSAQPGGCA--FSLAYASIMAL	
EP3	LAIARAHPYASNMKT--RATPVLLGVWLSVLAFCALFLHGLGERSQV-PGHCNCFR---MNRSAQPGGCA--FSLAYASIMAL	
EP1	LVGTPQLIMHAAARVSVARALALAVLAAMALAVLFLVNVGKXELQY-PGHCNCFR---MNRSAQPGGCA--FSLAYASIMAL	
TP	VGITRPF--FSRPTATSRXWATVGLVMVAAGALGLFLGLGERSQV-PGHCNCFR---MNRSAQPGGCA--FSLAYASIMAL	
FP	IGVTMPIFMSTKITSKNVKMIISGVCMPFAFVAVLPIIGMRDYQIA-SGHCNCFR---MNRSAQPGGCA--FSLAYASIMAL	
DP	LVLATVVCNGLGANYNIDNM---MRQRQNYPMGCSRDRAQ---SGS---	IV
EP2	LIVAVLACNISVILNLIIRM---MRSRR--SGCSGSGSLRGFGS---	
IP	LVTISFFCNGSVTLSEYHM---YRQRRMHGF---VFTS---	
EP4	LILATVLCNVLVCGALNLM---MRQFMR--RISLGTGEMHAAAASVACGAGASPALQRLSDPFRKSFRRAGAE	
EP3	ALVVTFACNLATIKALVENCRAKAAVQSOSAQNGRIT---RSMG---	
EP1	ALLAALVCNTLSGLALL--RAMERRRSRRKKTAGPDDRRWGRGRRLAASASSITSATATLRSXGGSARRVMAND	
TP	SVGLSLNLTVSATLQ---RVXMTREATQRPDC---	
FP	ALGVSPSCNAVTGVTLL---RVKFSQGNRQGE---	
DP	LDMFVILALMTVLFTNCSLIPILIRAYYGAFKLEN---	VI
EP2	TDLILILALMTITFAICSLIPILIRAYYGAFKLEN---	
IP	VXKILILALMTVIMAVCSLIPILIRAYYGAFKLEN---	
EP4	IQMVLILALMTVIMAVCSLIPILIRAYYGAFKLEN---	
EP3	---ETAIQLMGIMCVLSVCNCSLIPILIRAYYGAFKLEN---	
EP1	VENMGQLVGIMCVLSVCNCSLIPILIRAYYGAFKLEN---	
TP	VENMVOQLVGIMCVLSVCNCSLIPILIRAYYGAFKLEN---	
FP	LEMIIQLLAIMCVLSVCNCSLIPILIRAYYGAFKLEN---	
DP	VTRPLIYRNWSSNQGNVSESTL	VII
EP2	LCGRSLRITQXEQQTSCNQSASAKQTDLOGQ	
IP	LCCCLCARVNGDLQATLAPASGRDDPAPTSLQAKESNVPLSSWGTQGVAPLTAFLTGGDGCSSVGNPSKKAIAAACSLLC	
EP4	KIKCLFCRIGGSGRDSQAQCSERRTSSAMSGHRSPLAKELKEISSTSQTLXLPLDTESSLGGRNLLPSSGNMGLTQAD(61)	
EP3	HTNXASSTSLFCFSGSALMWSQDLER	
EP1	PLVASAKGGGTLEGLTKANWANSLS--RHSQFSML	
TP	SQQAASLRPPPAQAMLSGP	
FP	---ASRCGGVNIISL--NINESSIKNSLKVAAISSEFAAKKESQQASSEAGL	

図 3a プロスタノイド受容体のアミノ酸配列

マウスの PGD₂ 受容体 (DP), PGE₂ 受容体 (IP), 4 種類の PGE₂ 受容体サブタイプ (EP1, EP2, EP3, EP4), TXA₂ 受容体 (TP), PGE₂ 受容体 (FP) のアミノ酸配列を相同性が最も高くなるように並べた。横線は細胞膜貫通領域を示し、プロスタノイド受容体間でよく保存されたアミノ酸を白抜き強調して示す。

human		I															
bovine		MKETRGYGGDAPFCTRLNHSYTGWAPERSAEARGNLTRPPGSGEDCGSVSAFPITMLITGFVGNALAMLLVSRYSRRRESKRKKSFL															90
rabbit	A	DHAS-	F	DP	I	A	AV	PN	L	EPS	SM	MI	IT	K	G	89	
rat	D			P						P		I			V	86	
mouse				MA	V	H	V	HS	QSSAA	---DG		MV				67	
				MAS		H	HS	SSTT	---DD		I	MV				67	
		II															
human		CIGWLALTDLVGQLLTTPVIVVYLSKQWEHIDPSGRLCTFFGLTMTVFGLSSLFIASAMAVEALAIRAPHWYASHMKTRATRAVLIG															180
bovine	M	S	L	H	QL								T	S	SV	179	
rabbit		L			QL											176	
rat	S	L	L	QR	QL						LV				P-	156	
mouse	S	L	L	QR	QL						LV				P-	156	
		III															
human		V															
bovine		VWLAVLAFALLPVLGVGYTVQWPGTWCFTISTGRGGNGTSSSHNWGNLFFASAFALGLLALTVTFSCNLATIKALVSRCAKATASQSS															270
rabbit	I		P	N	RQ	V	I	S	V	A						269	
rat	I		D				T		AI	A					A	266	
mouse	S	R	S	PA	E	D	AREP	SVA	C	V	A				A	246	
	S	R	S	PA	E	DPAREP	SVA		C	V	A				AV	246	
		VI															
human		AOWGRITTEAIQLMGIMCVLSVCWSPLLIMMLKMFNQTSVEHCKTHTEKQKECNFFLIAVRLASLNQILDPMVYLLLRKILLRKFCQI															360
bovine			H	Y	N	D									Q	L	359
rabbit																	356
rat																	336
mouse																	336
		VII															
human		RYHTNNYASSSTSLPCQCSSTLMWSDHLER															390
bovine		LKGHSYGLDTEGGTENKDKEMKENLYISNLSRFFILLGHFTFARRGRGHIYLTLEHQ															417
rabbit			TH														
rat	D	-	P	V	Q												365
mouse	D	-	PG	A	Q												365

図 3b EP3 受容体のアミノ酸配列
ヒト, ウシ, ウサギ, ラット, マウス EP3 受容体のアミノ酸配列を示す。EP3 受容体に認められる C 末端のみ構造を異にするスプライシング・バリエーションのうち、ヒトの A タイプに相当するものを示した。ただし、ウシではこれに相当するバリエーションの報告がなく A タイプのものを示した。ヒト以外の種では、ヒトの EP3 受容体と異なるアミノ酸のみを表記した。

し 16 アミノ酸のところに存在する。この想定配列はプロスタノイド受容体には認められないが、IP, EP 2, EP 4 受容体ではこの部位に Cys 残基が存在している。

プロスタノイド受容体は他のロドプシン型受容体と共通の構造上の特徴をもつ一方、プロスタノイド受容体に特異的に保存された部位がいくつか存在している(図 3 a)。たとえば第 7 膜貫通領域には L-X-A-X-R-X-A-S/T-X-N-Q-I-L-D-P-W-V-Y-I-L-R というよく保存された配列が存在する。また、第 2 細胞外ループと第 3 膜貫通領域には各々 G-R-Y-X-X-Q-X-P-G-T/S-W-C-F と M-X-F-F-G-L-X-X-L-L-X-X-X-A-M-A-X-E-R という配列が保存されている。これらの領域は、マウス以外の他の種のプロスタノイド受容体でもよく保存されており、リガンドであるプロスタノイド分子間の共通構造を認識する結合部位の形成に関与していると考えられる。また、第 7 膜貫通領域に存在するアルギニン残基はすべてプロスタノイド受容体において保存されており、この残基がロドプシンのレチナール結合部位である Lys²⁹⁶ との類推からプロスタノイド分子に存在するカルボキシル基の結合部位であることが提唱され^{4,8)}、この部位に変異を加えた受容体を用いた解析がなされた。膜貫通領域のアミノ酸配列に比較して細胞内領域のアミノ酸配列はその組成や長さがプロスタノイド受容体間で異なっており、その相同性の解析は困難である。しかし、いくつかの保存されたアミノ酸残基は注目になる。たとえば、すべてのプロスタノイド受容体において第 1 細胞内ループのほぼ同一の部位に Arg 残基が保存されている。この Arg 残基の突然変異が出血傾向を示す患者の TP 受容体で見出され、この変異がこの疾患の病因であることが同定されている⁹⁾。

プロスタノイド受容体間で保存された領域は存在するが、それぞれの受容体全般のアミノ酸配列の相同性は 20~30% であり高くはない。ことに、PGE 受容体の 4 種類のサブタイプ受容体間の相同性も同程度に低く、これらの受容体と他のプロスタノイド受容体のアミノ酸配列を比較すること

によって、受容体のリガンド結合領域を推定することは困難である。しかし、いろいろな種を受容体ホモログ間の相同性はかなり高い。たとえばヒトとマウスの IP, TP, EP 1, EP 3, EP 4, FP 受容体を比較すると、その相同性はおおの 79, 76, 84, 84, 88, 89% であり、ヒト、ウシ、ウサギ、ラット、マウスの EP 3 受容体のホモロジーは 84~97% である(図 3 b)。一方、いくつかの受容体においては、その翻訳開始部位が種によって異なっており、これによって受容体の N 末端細胞外部位の長さには差が認められる。たとえばヒト、ウシ、ウサギの EP 3 受容体のこの領域は、ラットやマウスのものより 20 アミノ酸長く、逆にヒト IP 受容体ではラットやマウスのものより 30 アミノ酸短い。一方、プロスタノイドの作用に種差があることはよく知られている。たとえば PGI₂ の類縁体である EP-157 はヒトやウマ血小板に対してはアゴニストとして作用するが、ブタやラット血小板に対してはアンタゴニストとして作用する¹⁰⁾。また、ウサギ血小板は TX 類縁体である CTA₂ や PTA₂ に対する反応が、ヒト、ネコ、イヌ血小板のものとは異なっている¹¹⁾。また、TP 容体アンタゴニストである ONO-11120 のウサギ血小板に対する効力はヒト血小板に対するものより 100 倍弱いことが知られている¹²⁾。このような種差は受容体ホモログ間の高いホモロジーにもかかわらず、受容体の構造上のわずかな差異に起因していると思われる。実際、ヒトとラット TP 受容体の I-BOP に対する反応性の差が起因する構造の差を両受容体のキメラ受容体を用いて解析されている¹³⁾。

プロスタノイド受容体の遺伝子構造とアイソフォーム

プロスタノイド受容体の遺伝子構造は、最初にヒト TP 容体について解析された。その結果 TP 受容体遺伝子は 5' 側非翻訳領域と第 6 膜貫通領域の終りに位置する 2 個のイントロンによって隔てられた 3 個のエクソンよりなることが明らかとなった¹⁴⁾(図 4)。このエクソン-イントロンの関係は、一般的にプロスタノイド受容体間で種を超え

図 4 ヒト TP 受容体遺伝子と cDNA の構造模式図

a : ヒト TP 受容体遺伝子の構造。エクソンをボックスで示す。

b・c : ヒト TP 受容体の 2 種類のスプライシング・バリエントの構造。非翻訳領域を直線で示し、翻訳領域をボックスで示す。黒塗部分は膜貫通領域を数字とともに示す。

て保存されている。報告されたプロスタノイド受容体遺伝子構造では、第 1 イントロンは転写開始の ATG コドンより上流に位置する。唯一の例外はマウス EP 4 受容体遺伝子であり、これでは第 1 イントロンは転写開始点より 16 bp 下流に位置する¹⁵⁾。また、いくつかのプロスタノイド受容体においては、カルボキシル末端にさらにエクソンが存在し、このエクソンの alternative splicing によって受容体アイソフォームが生成する(図 4)。これはマウス、ラット、ウサギ、ウシ、ヒト EP3 受容体¹⁶⁻²⁴⁾、ヒト TP 受容体²⁵⁾、ヒツジ FP 受容体²⁶⁾で報告されている。この alternative splicing は第 7 膜貫通領域の直後で起き、カルボキシル末端の構造のみ異なるさまざまな受容体アイソフォームが形成される。EP 3, FP, TP 受容体アイソフォーム間ではおのおのそのリガンド結合の特異性に関してほとんど差が認められない。しかし、ウシ EP 3 受容体とヒト TP 受容体アイソフォームはおのおの異なる G 蛋白質と関連し異なった情報伝達を行う^{16,27)}。さらに、マウス EP3 受容体アイソフォームはその G 蛋白との関連の効率²¹⁾、アゴニストによって誘導される脱感作の感受性²²⁾、受容体の constitutive activity の程度^{28,29)}などに差が認められる。

また、受容体の constitutive activity の程度の差は、ヒト EP 3 受容体³⁰⁾やヒツジ FP 受容体²⁶⁾のアイソフォーム間でも認められる。また、いくつかの EP 3 受容体アイソフォームのカルボキシル

末端の構造は種を超えて保存されているが、あるものは他の種に存在しないことから、少なくとも 7 種類の EP 3 受容体アイソフォームが一つの種において存在する可能性が指摘された¹⁸⁾。実際、ヒト EP 3 受容体には 8 種類のアイソフォームが存在することが最近報告された²⁴⁾。一方、マウスやラット TP 受容体カルボキシル末端の構造は二つのヒト TP 受容体アイソフォームのいずれとも異なり、ウシ TP 受容体のカルボキシル末端構造はヒト受容体アイソフォームの α タイプに相当する。このことから、TP 受容体にはさらに他のアイソフォームが存在する可能性が考えられる。

最近、ラット EP 1 受容体において異なったタイプの受容体アイソフォームの存在が報告された。このアイソフォーム受容体は、通常の第 6 膜貫通領域における splicing が起きず、その結果他のプロスタノイド受容体でよく保存されている第 7 膜貫通領域とは異なった構造の第 7 膜貫通領域をもつに至ったと考えられる。この受容体を培養細胞に発現させ解析したところ、EP 1 受容体としてのリガンド結合特異性を示した。しかし、リガンド結合後の情報伝達が欠失しており、他の EP 受容体サブタイプの情報伝達を阻害することが示された³¹⁾。このように、受容体アイソフォームが EP 1, EP 3, FP, TP 受容体に認められ、DP, EP 2, EP 4, IP 受容体には認められないことは、受容体の分子進化からみてこの両グループが異なった発生系統に属することと一致している。

プロスタノイド受容体遺伝子の上流や第1イントロンの解析によって、受容体の発現調節に関与する転写調節因子応答領域が明らかにされてきた。これらの結果、種々の因子がおのおののプロスタノイド受容体遺伝子プロモーター領域に存在する特異的な転写調節領域に働いて受容体の発現調節を行っていることが示唆された。実際、ヒトとラット TP 受容体遺伝子のプロモーター領域には TRE が存在し、ホルボールエステルが HEL 細胞^{32,33}や CHRF-288 細胞³⁴などの巨核芽球系細胞あるいはマウス培養血管平滑筋細胞³⁵において TP 受容体を発現誘導することが示された。

一方、ヒト TP 受容体遺伝子のプロモーター領域には GRE や APRE が存在するが、グルココルチコイドおよび IL-1, IL-6, LPS, CRP, TNF α などの急性期反応惹起物質は HEL 細胞において TP 受容体の発現を誘導しなかった³³。しかし、HEL 細胞と異なり培養ラット血管平滑筋細胞においては、グルココルチコイドや IL-6 が TP 受容体を発現誘導した³⁵。このような受容体の発現調節の違いが種差によるのか細胞種の違いによるのかは不明である。また、テストステロンは、蛋白同化ステロイドを乱用した青年陸上選手にみられる血栓性疾患の危険因子として知られていた。これを裏付ける結果として、テストステロンが HEL 細胞において TX 受容体の発現を誘導すること³⁶や、テストステロンの人体投与によって血小板 TX 受容体数が増加し、血小板凝集反応が亢進すること³⁷があげられる。巨核芽球におけるヒト IP 受容体の発現は、ホルボールエステル, IL-1, IL-3, IL-6, GM-CSF, トロンボポエチン, TNF- α によって誘導された³⁸。また、プロスタノイド受容体のホルボールエステルによる発現調節が単球系とリンパ球系の細胞を用いて解析された³⁹。その結果、ホルボールエステル処理によりヒト EP 4 受容体の発現は単球系細胞の THP-1, U 937 細胞などや B 細胞系の Raji 細胞で増加したが、T 細胞系の MOLT-4, Jurkat 細胞などでは逆に減少した。このホルボールエステルの THP-1 細胞に対する効果は EP 4 受容体に特異的であり、EP 1, EP 2, EP 3, IP, DP 受容体の発現は変

化しなかった。また、マウス EP 4 受容体は NIH3T3 細胞やマクロファージ系の細胞である RAW264.7 細胞において各々血清と LPS によって発現誘導された¹⁵。これらの結果は、プロスタノイド受容体の遺伝子発現が生体内において種々の生理的・病態生理的条件下で調節されていることを示唆しているが、実際に生体内でどのような状況下でどの程度これらの調節がなされているかは不明であり、その生理的意義についても今後の検討が必要であろう。

2. プロスタノイド受容体の機能

リガンド結合特異性と受容体アゴニスト・アンタゴニスト

プロスタノイド受容体の8種類のタイプ・サブタイプ受容体はおのおの特異的なリガンド結合特異性を示し、この特異性によってその分類が可能である。従来、このリガンド結合特異性は、主に選択的な受容体アゴニスト・アンタゴニストやプロスタノイド類似化合物の一群のバイオアッセイ系での効力を比較検討して評価されてきた。実際、薬理学的手法は非常に正確なプロスタノイド受容体の分類に成功した。しかし、これらの研究は受容体のリガンド結合特異性に関しては定性的であり、定量性に欠けていた。それは一つにはほとんどのバイオアッセイ系には複数の受容体が存在しており、薬物の効果はこれら複数の受容体への作用の総和として評価されること、また薬物の効力が用いられたバイオアッセイ系によって変動することが理由と考えられる。さらに、プロスタノイド受容体に作用する薬物の中には、その効力に種差を生ずるものがあることがあげられる。

一方、プロスタノイド受容体のクローニングによって、一つの種の均一な受容体を発現させ、各プロスタノイド受容体のリガンド結合特異性やプロスタノイド・リガンドの受容体選択性を詳細に解析することが可能となった。桐山ら⁴⁰は、33種類のプロスタノイドやその類似化合物を用いてすべてのマウス・プロスタノイド受容体のリガンド結合特異性を系統的に解析した。現在、マウス以

外の種ではこのような系統的な解析の報告はない。これらの結果を表1にまとめて示す。

情報伝達機構

プロスタノイド受容体の情報伝達経路を表2にまとめて示す。これらはクローン化された個々の受容体を発現した培養細胞や生体の組織に発現するネイティブな受容体を用いて解析されたが、これらの結果は以前のもっと粗い実験系によって得られた生化学知見を再確認するとともに、いくつかの新たな知見をもたらした。

TP受容体を介する情報伝達には数種類のG蛋白質が関与することが報告されている。これらはGq⁴¹⁾、Gqと未同定の85 kDのG蛋白質⁴²⁾、GqとGi₂⁴³⁾、Gi₂とGi₁₃⁴⁴⁾が含まれる。一方、いくつかの薬理学的研究は種々の組織^{45,46)}においてのみならず単一の細胞である血小板^{47,48)}においても異種のTP受容体の存在を示唆する報告をしている。これらの結果は、TP受容体のアイソフォームの存在と併せてTP受容体を介する情報伝達経路の多様性を説明するものと考えられる。この点に関連して、最近見出されたTP受容体変異⁹⁾は興味深い。この変異は、ヒト血小板TP受容体のArg⁶⁰⁾の点変異によるものであり、この結果TXは血小板凝集を起こすことができないが、血小板のshape changeやホスホリパーゼA₂の活性化は可能である⁴⁹⁾。

EP1受容体に連関するG蛋白質は不明である。EP1受容体はCHO細胞においてPGE₂によるCa²⁺イオンの上昇を仲介する。この細胞内Ca²⁺イオンの上昇は細胞外Ca²⁺イオンに依存しており、そのときPI代謝回転はほとんど検出できない⁵⁰⁾。この結果は、EP1受容体は未同定のG蛋白質を介してCaチャネルの制御をしている可能性を示唆している。EP2、EP4受容体はGs蛋白質と連関し、細胞内cAMP濃度の上昇を若起する。EP3受容体の主要な情報伝達経路はGi蛋白質を介したアデニレート・サイクラーゼの抑制である。しかし上記のようにEP3受容体にはスプライシング・バリエーションが存在し、それぞれ異なった情報伝達を行ったり、ある受容体アイソホームは

G蛋白質の活性化ではなく機能の抑制をすることなどは注目に値する。たとえば、ウシEP3A受容体はGi蛋白質に連関しアデニレート・サイクラーゼを抑制するが、EP3BとEP3C受容体はGs蛋白質に連関しアデニレート・サイクラーゼを活性化する。また、EP3D受容体はGiおよびGs蛋白質に加えてGq蛋白質とも連関して百日咳毒素非感受性のPI代謝回転を若起する¹⁶⁾。一方、ウシEP3C受容体は通常受容体機能であるG蛋白質(Gs)の活性化に加えて、まったく新しいタイプの受容体—G蛋白質の相互作用機構を示す。つまり、アゴニストがこの受容体に結合するとGo蛋白質のGDPに対する親和性が上昇し、Go蛋白質の機能が抑制される⁵¹⁾。これらの知見は、受容体のカルボキシル末端が連関するG蛋白質の特異性や情報伝達機構を決定するのに重要であることを示しており、この結果は、従来報告されてきたEP3受容体を介する情報伝達経路の多様性^{1,52,53)}を説明するのみではなく、ロドプシン型受容体全般の情報伝達機構を考えるうえでも示唆を与えるものと考えられる。

IP受容体は、アデニレート・サイクラーゼを刺激することが知られていた。しかし、クローン化受容体の発現系を用いた解析によると、IP受容体はcAMP濃度の上昇を引き起こすだけでなく、PI代謝回転も惹起することが明らかとなった⁵⁴⁾。この結果は、いくつかの培養細胞系においてPGI₂が細胞内Ca²⁺イオン濃度の上昇を引き起こすという報告^{55,56)}と一致する。CHO細胞におけるIP受容体を介するPI代謝回転は百日咳毒素やコレラ毒素で阻害されないことから、この反応にはGq蛋白質が関与していることが示唆される。

DP受容体は、Gs蛋白質と連関し、細胞内cAMP濃度の上昇を惹起する。DP受容体を介する情報伝達においてはPI代謝回転の関与は報告されていない。

興味深いことに、いくつかのプロスタノイドはクローン化受容体の発現系において、その結合のKd値よりかなり低い濃度で作用を示すことが明らかとなった。たとえば、iloprostはIP受容体を発現したCHO細胞においてEC₅₀値100 pMで

表 1 プロスタノイドおよびその類似化合物のマウス・プロスタノイド受容体に対する結合親和性

Ligands	K _i values (nM)							
	DP	IP	TP	FP	EP ₁	EP ₂	EP ₃	EP ₄
PGD ₂	21 (17–28)			47 ' (34–66)			280 (180–430)	
BW245C	250 (160–380)			1700*				
BW868C	220 (150–340)							
Cicaprost		10 (8.2–13)				1300*	170 (130–210)	
Iloprost		11 (8.7–15)			21 (17–26)	1600*	22 (17–30)	2300*
Carbacyclin		110 (85–130)		1200*		1600*	31 (22–42)	2300*
Isocarbacyclin		15 (12–18)				1000*	31 (25–38)	
Beraprost		16 (13–21)					110 (91–130)	
ONO-1301		47 (38–57)					740 (460–1200)	
S-145			0.68 (0.47–0.97)					
I-BOP			0.56 (0.44–0.72)	100 (73–140)		220 (160–310)	100 (84–130)	
GR-32191			12 (9.9–16)					
STA ₂	1600 (590–4600)		14 (11–17)	97 (73–130)		220 (150–340)	23 (18–28)	350 (240–510)
SQ-29548			13 (9.6–18)					
U-46619			67 (48–93)	1000 (560–1600)				
PGF _{2α}				3.4 (2.8–4.2)	1300*		75 (53–110)	
Fluprostenol				3.8 (3.1–4.8)				
PGE ₂				100 (73–140)	20 (15–26)	12 (9.2–15)	0.85 (0.69–1.1)	1.9 (1.5–2.5)
PGE ₁		33 (25–42)			36 (27–48)	10 (7.8–13)	1.1 (0.91–1.4)	2.1 (1.5–3.1)
17-Phenyl-PGE ₂				60 (47–77)	14 (11–18)		3.7 (2.8–4.9)	1000*
Sulprostone				580 (360–930)	21 (17–25)		0.60 (0.44–0.81)	
M&B-28767			1300*	124 (123–124)	120 (110–150)		0.68 (0.53–0.87)	500 (300–850)
16,16-Dimethyl-PGE ₂				350 (250–480)		17 (13–23)	1.9 (1.5–2.5)	43 (32–58)
11-Deoxy-PGE ₁		1000*			600*	45 (37–54)	1.5 (1.2–1.8)	23 (16–32)
GR-63799X							1.9 (1.6–2.4)	480 (320–720)
19R(OH)-PGE ₂				1000*				
misoprostol					120 (94–150)	250 (190–340)	67 (53–89)	67 (45–99)
Butaprost						110 (83–140)		
1-OH-PGE ₁							330 (240–460)	190 (120–280)
AH-13205						240 (150–400)	82 (57–120)	
AH-6809						350 (250–500)		
SC-19220								
8-Epi-PGE _{2α}								

数字は結合置換実験の結果をコンピューター解析することによって得られた K_i 値とその 95% 信頼域(カッコ内)を示す。空欄は、その化合物の 10 μ M の濃度における各受容体特異的な放射性リガンドの置換率が 50% 以下であることを示す。* コンピューターによるデータ解析が不能であるため、得られた IC₅₀ 値より計算された K_i 値を示す。

表 2 プロスタノイド受容体の情報伝達

Type	Subtype	Isoform	G-protein	Second messenger
TP		TP α	Gq, Gs	PI response, cAMP $\uparrow$
		TP β	Gq, Gi	PI response, cAMP $\downarrow$
EP	EP ₁	EP _{3A} EP _{3B} EP _{3C} EP _{3D}	G(?)	Ca ²⁺ $\uparrow$
	EP ₂		Gs	cAMP $\uparrow$
	EP ₃		Gs	cAMP $\uparrow$
	EP ₄		Gi	cAMP $\downarrow$
			Gs	cAMP $\uparrow$
			Gs	cAMP $\uparrow$
			Gi, Gs, Gq	cAMP $\downarrow$, cAMP $\uparrow$, PI response
FP			Gq	PI response
IP			Gs, Gq	cAMP $\uparrow$, PI response
DP			Gs	cAMP $\uparrow$

この表は種々の動物のプロスタノイド受容体より得られたデータをまとめて示す。TP 受容体アイソフォームはヒト, EP3 受容体アイソフォームはウシ, それ以外はマウスの受容体である。

cAMP 濃度の上昇を引き起こす。同様に, PGE₂は EP 3 受容体を発現した CHO 細胞において IC₅₀ 値 100 pM で cAMP 濃度の上昇を抑制する。これらの値は, それぞれおのおのの結合の K_d 値より 45 倍および 30 倍低い。このような差が生じる理由は不明であるが, この事実は受容体のリガンド結合後の情報伝達の効率が細胞種によって異なっていることを示している。実際に IP 受容体の情報伝達効率はいくつかの動物種よりの血小板間では異なっており¹⁰⁾, またイヌ腎臓の皮質集合管では PGE₂は pM オーダーで cAMP 濃度を低下させバゾプレシンの作用に拮抗する⁵⁷⁾。一方, このような効率の違いには同一の受容体を介する異なった種類の情報伝達経路間においても認められる。たとえば, IP 受容体発現系において iloprost によって刺激される PI 代謝回転の EC₅₀ 値は 100 nM であり, この値は iloprost によって刺激される cAMP 濃度上昇の EC₅₀ 値より 1000 倍程度高い⁵⁴⁾。

おわりに

最近になって, プロスタノイド受容体のクローニングに伴い, 受容体の構造, 機能やその生体内分布の解析は飛躍的に進展した。本稿では, これらの結果を総括的に提示した。また, おおの

プロスタノイド受容体を欠損するマウスの作出と解析によって, プロスタノイドの生体内における役割の解明がなされつつある。今後はプロスタノイドの多くの臓器・器官で果たす生理的・病態生理的な役割の解明が期待される。

文 献

- 1) Coleman, RA, Kennedy I, Humphrey, PPA, Bunce, K, Lumley P : J. C. Emmett (Ed.), Comprehensive Medicinal Chemistry, Vol. 3 : Membranes and Receptors. Pergamon Press, Oxford, 1990, p 643-714.
- 2) Coleman RA, Grix SP, Head, SA, Louttit JB, Mallett A, Sheldrick RLG : Prostaglandins, 47 : 151-168, 1994.
- 3) Ushikubi F, Nakjima M, Hirata M, Okuma M, Fujiwara M, Narumiya S : J. Biol. Chem. 264 : 16496-16501, 1989.
- 4) Hirata M, Hayashi Y, Ushikubi F, Yokota Y, Kageyama R, Nakanishi S, Narumiya S : Nature 349 : 617-620, 1991.
- 5) Mais DE, True TA, Martinelli MJ : Eur. J. Pharmacol. 227 : 267-274.
- 6) Savarese TM, Fraser CM : Biochem. J. 283 : 1-19, 1992.
- 7) Hausdorff WP, Caron MG, Lefkowitz RJ : FASEB J 4 : 2881-2889, 1990.
- 8) Narumiya S, Hirata M, Namba T, Hayashi Y, Ushikubi F, Sugimoto Y, Negishi M, Ichikawa A : J. Lipid Mediators 6 : 155-161, 1993.
- 9) Hirata T, Kakizuka A, Ushikubi F, Fuse I, Okuma M, Narumiya S : J. Clin. Invest. 94 : 1662-1667, 1994.

- 10) Armstrong RA, Lawrence RA, Jones RJ, Wilson NH, Collier A : Br. J. Pharmacol. 97 : 657-668, 1989.
- 11) Burke SE, Lefer AM, Nicolaou KC, Smith GM, Smith JB : Br. J. Pharmacol. 78 : 287-292, 1983.
- 12) Narumiya S, Okuma M, Ushikubi F : Br. J. Pharmacol. 88 : 323-331, 1986.
- 13) Dorn GW, II, Davis MG, D'Angelo DD : J. Biol. Chem. 272 : 12399-12405, 1997.
- 14) Nusing RM, Hirata M, Kakizuka A, Eki T, Ozawa K, Narumiya S : J. Biol. Chem. 268 : 25253-25259, 1993.
- 15) Arakawa T, Laneuville O, Miller CA, Lakkides KM, Wingerd BA, Dewitt DL, Smith WL : J. Biol. Chem. 271 : 29569-29575, 1996.
- 16) Namba T, Sugimoto Y, Negishi M, Irie A, Ushikubi F, Kakizuka A, Ito S, Ichikawa A, Narumiya S : Nature 365 : 166-170, 1993.
- 17) Takeuchi K, Abe T, Takahashi N, Abe K : Biochem. Biophys. Res. Commun. 194 : 885-891, 1993.
- 18) Regan JW, Bailey TJ, Donello JE, Pierce KL, Pepperl DJ, Zhang D, Kedzie KM, Fairbairn, CE, Bogardus AM, Woodward DF, Gil DW : Br. J. Pharmacol. 112 : 377-385, 1994.
- 19) Breyer RM, Emeson RB, Tarng JL, Breyer MDL, Davis S, Abromson RM, Ferrenbach SM : J. Biol. Chem. 269 : 6163-6169, 1994.
- 20) Adam M, Boie Y, Rushmore TH, Muller G, Bastien L, Mckee KT, Metters K M, Abramovitz M : FEBS Lett. 338 : 170-174, 1994.
- 21) Sugimoto Y, Negishi M, Hayashi Y, Namba T, Honda A, Watabe A, Hirata M, Narumiya S, Ichikawa A : J. Biol. Chem. 268 : 2712-2718, 1993.
- 22) Negishi M, Sugimoto Y, Irie A, Narumiya S, Ichikawa A : J. Biol. Chem. 268 : 9517-9521, 1993.
- 23) Irie A, Sugimoto Y, Namba T, Harazono A, Honda A, Watabe A, Negishi M, Narumiya S, Ichikawa A : Eur. J. Biochem. 217 : 313-318, 1993.
- 24) Kotani M, Tanaka I, Ogawa Y, Usui T, Tamura N, Mori K, Narumiya S, Yoshimi T, Nakao K : Genomics 40 : 425-434, 1997.
- 25) Raychowdhury MK, Yukawa M, Collins LJ, McGrail SH, Kent KC, Ware JE : J. Biol. Chem. 269 : 19256-19261, 1994.
- 26) Pierce KL, Bailey TJ, Hoyer PB, Gil DW, Woodward DF, Regan J W : J. Biol. Chem. 272 : 883-887, 1997.
- 27) Hirata T, Ushikubi F, Kakizuka A, Okuma M, Narumiya S : J. Clin. Invest. 97 : 949-956, 1996.
- 28) Hasegawa H, Negishi M, Ichikawa A : J. Biol. Chem. 271 : 1857-1860, 1996.
- 29) Negishi M, Hasegawa H, Ichikawa A : EFBS Lett. 386 : 165-168, 1996.
- 30) Jin J, Mao GF, Ashby B : Br. J. Pharmacol. 121 : 317-323, 1997.
- 31) Okuda-Ashitaka E, Sakamoto K, Ezashi T, Miwa K, Ito S, Hayaishi O : J. Biol. Chem. 271 : 31255-31261, 1996.
- 32) Nakajima M, Yamamoto M, Ushikubi F, Okuma M, Fujiwara M, Narumiya S : Biochem. Biophys. Res. Commun. 158 : 958-965, 1989.
- 33) Kinsella BT, O'Mahony DJ, Fitzgerald GA : J. Biol. Chem. 269 : 29914-29919, 1994.
- 34) Dorn GW, II, Davis MG, D'Angelo DD : Am. J. Physiol. 266 : C1231-C1239, 1994.
- 35) Takahashi N, Takeuchi K, Sugawara A, Taniyama Y, Kato T, Wilcox CS, Abe K, Ito S : Biochem. Biophys. Res. Commun. 244 : 489-493, 1998.
- 36) Matsuda K, Mathur R, Duzic E, Halushka PV : Am. J. Physiol. 265, E928-E934, 1993.
- 37) Ajayi AA, Mathur R, Halushka PV : Circulation 91 : 2742-2747, 1995.
- 38) Sasaki Y, Takahashi T, Tanaka I, Nakamura K, Okuno Y, Nakagawa O, Narumiya S, Nakao K : Blood 90 : 1039-1046, 1997.
- 39) Mori K, Tanaka I, Kotani M, Miyaoka F, Sando T, Muro S, Sasaki Y, Nakagawa O, Ogawa Y, Usui T, Ozaki S, Ichikawa A, Narumiya S, Nakao K : J. Mol. Med. 74 : 333-336, 1996.
- 40) Kiriya M, Ushikubi F, Kobayashi T, Hirata M, Sugimoto Y, Narumiya S : Br. J. Pharmacol. 122 : 217-224, 1997.
- 41) Shenker A, Goldsmith P, Unson C, Spiegel A : J. Biol. Chem. 266 : 9309-9313, 1991.
- 42) Knezevic I, Borg C, Le Breton GC : J. Biol. Chem. 268 : 26011-26017, 1993.
- 43) Ushikubi F, Nakamura K, Narumiya S : Mol. Pharmacol. 46 : 808-816, 1994.
- 44) Offermanns S, Laugwitz KL, Spicher K, Schultz G : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 : 504-508, 1994.
- 45) Halushka PV, Mais DE, Mayeux PR, Morinelli T A : Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 10 : 213-239, 1989.
- 46) Ogletree ML, Allen GT : J. Pharmacol. Exp. Ther. 260 : 789-794, 1992.
- 47) Dorn GW, II : J. Clin. Invest. 84 : 1883-1891, 1989.
- 48) Takahara K, Murray R, Fitzgerald GA, Fitzgerald DJ : J. Biol. Chem. 265 : 6836-6844, 1990.
- 49) Fuse I, Mito M, Hattori A, Higuchi W, Shibata A, Ushikubi F, Okuma M, Yahata K : Blood 81 : 994-1000, 1993.
- 50) Watabe A, Sugimoto Y, Honda A, Irie A, Namba T, Negishi M, Ito S, Narumiya S, Ichikawa A : J. Biol. Chem. 268 : 20175-20178, 1993.
- 51) Negishi M, Namba T, Sugimoto Y, Irie A, Katada T, Narumiya S, Ichikawa A : J. Biol. Chem. 268 : 26067-26070, 1993.
- 52) Goureau O, Tanfin Z, Marc S, Harbon S : Am. J. Physiol. 263 : C257-C265, 1992.
- 53) Negishi M, Ito S, Hayaishi O : J. Biol. Chem. 264 : 3916-3923, 1989.
- 54) Namba T, Oida H, Sugimoto Y, Kakizuka A, Negishi M, Ichikawa A, Narumiya S : J. Biol. Chem. 269 : 9986-9992, 1994.
- 55) Watanabe T, Yatomi Y, Sunaga S, Miki I, Ishii A, Nakao A, Higashihara M, Seyama Y, Ogura M, Saito H, Kurokawa K, Shimizu T : Blood 78, 2328-2336, 1991.
- 56) Vassaux G, Gaillard D, Ailhaud G, Negrel R : J. Biol. Chem. 268, 11092-11097, 1992.
- 57) Perez A G, Smith WL : J. Clin. Invest. 74 : 63-74, 1984.