プロスタグランジン受容体とヒスタミン合成酵素に
関する生物薬学的研究

市川 厚

京都大学大学院薬学研究科, 生体情報制御学講座,
〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町 46-29

Molecular Biology of Prostaglandin Receptor and L-Histidine Decarboxylase

Atsushi ICHIKAWA

*Department of Physiological Chemistry, Graduate School of
Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Shimoadachi-cho,
Yoshida, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan*

(Received May 31, 1999)

This review summarizes our studies on the molecular biology of prostaglandin (PG) receptors and L-histidine decarboxylase (HDC).

Regarding PG receptors, we have cloned five basic PG receptors (DP, EP, FP, IP, TP) and four EP subtypes (EP1-EP4). The PG receptors are divided into three families related to signal transduction systems of the receptors; Gs-couple group (IP, DP, EP2 and EP4), Gq-couple group (TP, FP and EP1), and Gi-couple group (EP3 and its isoform). EP3 isoforms having different C-terminal peptides can couple to distinct G proteins (Gi, Gs, Gq). Tissue specific expression of EP subtype mRNAs was observed in various organs. The phenotypic changes of mice deficient in each receptor are; the abnormal labor in FP-deficient mice, the failure of febrile response in EP3-deficient mice, the abnormal closure of ductus arteriosus after birth in EP4-deficient mice, and the impaired inflammatory swelling and pain responses in IP-deficient mice.

Regarding HDC, we have purified mouse HDC from mastocytoma cells, which is a dimer of 53 kDa subunit, and then cloned its cDNA. The size of a cDNA-deduced HDC is 74 kDa. In the rat mast cell line, the endogenous 74 kDa form of HDC was translated in the cytosol and then translocated to the ER, where it was post-translationally processed to the 53 kDa form. On the other hand, the cytosolic 74 kDa form was rapidly degraded by an ATP/ubiquitin-dependent proteasome system. The 74 kDa form without an N-terminal signal sequence is inserted into the ER membrane with a C-terminal segment.

Key words—prostaglandin receptor; histidine decarboxylase; structure; signal transduction; histamine synthesis; knock-out mice

はじめに

プロスタグランジン (PG) 及びヒスタミンは, ホルモンや神経伝達物質と同様に特定の細胞

で産生・分泌され、外来性のシグナルとして標的細胞の機能を修飾するとともに、生体のホメオスタシスに働く生理活性物質であり、ホメオスタシスの乱れは病態の進行と深く関わっている。実際、PG産生を阻害する非ステロイド性抗炎症剤あるいはヒスタミン受容体(H1, H2)拮抗剤は、炎症やアレルギーの治療に有効であるが、それらの不適切な使用は正常生理を乱し副作用を起こす。PGやヒスタミン等の作用はその合成反応と受容体反応との間のバランスにおいて発揮される。これまで、PGに関してはその合成反応が、また、ヒスタミンに関してはその受容体反応が明らかにされており、それらの反応を標的とする医薬品も数多く開発されている。しかし、PG受容体とヒスタミン合成酵素の精製は困難であったため、これらの反応に関する研究は少なく、関連医薬品の開発は遅れている。

しかしながら、近年の分子生物学の技術と知識の進展により、薬物分子と生体分子との直接的な相互作用の情報に基づいて医薬品を創製することが可能となった。我々は、このような観点から生物薬学的手法により、PG受容体の構造と機能及びヒスタミン合成酵素の活性発現機構について研究を進めている。本稿では我々の研究成果を中心に、この領域での最近の知見について紹介する。

1. プロスタグランジン受容体の分子生物学

1-1. プロスタグランジン受容体構造の特徴 PGは、アラキドン酸がシクロオキシゲナーゼによって酸素添加されて生成する一群の生理活性脂質の総称である。産生される主要なPGはPGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, PGI₂ (プロスタサイクリン), TXA₂ (トロンボキサン)の5種類である。産生されたPGは細胞外に速やかに放出され、近傍の細胞にある受容体と結合する。受容体は、バイオアッセイ系によるアゴニスト・アンタゴニスト作用の解析から、それぞれのPGに対応する5種類の受容体(EP, DP, FP, IP, TP)、及びEPにある4種類のサブタイプ(EP1, EP2, EP3, EP4)に分類されている。^{1,2)}しかし、PG受容体は構造の近似した複数のリガンドと交叉結合すること、また、多種類の受容体が細胞に混在していること等がわかってくるにつれ、これまでの薬理学的なバイオアッセイを基盤とするリガンドの創製方法には限界があると考えられ、分子レベルで受容体の構造と機能を理解し、その情報に基づいて高選択性、高親和性のリガンドを創製することが期待されるようになった。

受容体の分子生物学的な研究は、成宮 周研究室(京大・医・薬理)において、1989年にヒト血小板のTPの精製が行われ、さらに1991年にはヒトTP遺伝子cDNAがクローニングされたことを契機として急速な進展をした。当時、我々は、肥満細胞のヒスタミン分泌反応がPGE₂刺激で産生されるcAMPにより抑制されるという現象を見出し、そのメカニズムをマウス癌化肥満細胞(mastocytoma P-815細胞株)を用いて検討している過程で、この細胞が各種PG受容体を高レベルに発現していることを見出していた。そこで、ヒトTP cDNAの情報に基づきマウスTPのcDNAを単離し、以後、ホモロジースクリーニングによりマウス癌化肥満細胞のcDNAライブラリー等からPG受容体cDNAをクローニングした。³⁻¹³⁾cDNAから推定される受容体の一次構造をアミノ酸の一字表記でFig. 1に示す。PG受容体は7回膜貫通ペプチドのG蛋白質共役型ロドプシン型受容体である。しかし、PG受容体間で比較すると、相互のホモロジーは20—30%程度とあまり高くはないが、PG受容体に共通して保存されている配列(図中の太字アルファベット)が第7細胞膜貫通領域、第2細胞外ループ、第3細胞膜貫通領域に存在する。これらは生物種間でも高く保存されている部位であり、リガンドの共通構造である1位のカルボン酸、15位の水酸基、2つのアルキル鎖等を認識している可能性が高い。なかでも、PG受容体すべてに共通して保存されている第7細胞膜貫通領域にあるArg

		I	II		
mDP		MNESYRCQSTWVERGSSATMGAVLFGAGLLGNLLALVLLARSGLGSCRPGPLHPPP-SVFYVLVC	65		
mEP2		MDNFLNDSKLMEDCKSRQWLLSGESPAISSVMFSAVLGNLLIALALLARRWRGDTGCCSAGSRTSISLPHVLVT	73		
mIP	MKMMASDGHPPSPVTPGSPLSAGGREWQGMAGGCWNITVQDSVGPATSTLMFVAGVVGNGLALGIL-----GARRRSH-PS---AFAVLVT	84			
mEP4	MAEVGGTIPRNSRELQRCVLLTTTIMSIPGVNASFSSTPERLNSPVITPAVMFIFGVGNLVAIVVL-----CKSRKEQKET---TFYTLVC	84			
mEP3 α	MASMWAPHSAAEHSNLS-STDDCGSVSVAFPIITMVTGFVGNALAMLLVRSY---RRRESKRKK---SFL-LCI	69			
mEP1	MSPCGNLNLSLADEAATCATPRLPNTSVVLPDGTNGTSPALPIFSMTLGAVSNVLALALLAQVAGRMRRRSAA-----TFLLFVA	80			
mFP	MSMNSSKQPVSPAAGLIANTTCTQENRSLVFFSIIIFTVGLSLSLATAILMKAYQRF-RQKSKA-----SFLLLAS	71			
mTP	MWPNGTSLGACFRPVNIT--LQERRAISPWFASFALGLGSNLLALSVLAGA-----RPGAGPRS---SFLALLC	67			
		III	IV		
mDP		G-LTVTDLLGKCLISPMVLAAYAQNQSLKELLPASGNQLCETFAFLMSFFGLASTLQLLAMAVECWLGLGHFFFYQRHVTL-RRGVLVAPVVA	157		
mEP2		E-LVLTDLGLGTCLISPVVLASYSRNQTLVALAPES--HACTYFAFTMTFFSLATMLMLFAMALERYLSIGYPYFYRRHLSR-RGGLAVLPVIYG	165		
mIP		G-LAVTDLLGTCFLSPAVFVAY--G-LAHGGT-M-----LCDTDFAMTFFDLASTLILFAMAVERCCLALSHFYLAQLDGP-PCARFALPSIYA	175		
mEP4		G-LAVTDLLGTLVSPVTIATYMKG-QWPGDQ-A-----LCDYSTFILLFFGLSGLSIIICAMSIERYLAINHAYFYSHYVDK-RLAGLTLFAIYA	170		
mEP3 α		GWLALTDLVGQLLTSEVVLVYLSQRRWEQLD-PSGR-LCTFFGLTMTVFGLSLLLVASAMAVERALAIRAPHWYASHMKT-R-ATPVLLGVWL	159		
mEP1		S-LLAIDLAGHVIPGALVLRLYTAGRA-PAGG-A-----CHFLGGCMVFGLCCPLLGCMAVERCVCVGTQPLIHAARVSVAR-ARLALVLA	165		
mFP		G-LVITDFFGLHNGGIAVVFVYASDKDWIRFD-QSNI-LCSIFGISMVFSGLCPLFLGSAMAIERCIGVTNPIFHSKTKTSKH-VKMILSGVCM	161		
mTP		G-LVLTDFLGLLVGTGAVASQHAALLDWRATD-PSGR-LCYFMGVAMVFFGLCPLLGAAMASERFVGITRPFSPRTATSR-R-AWATVGLVWV	156		
		V			
mDP		FCLAFCALPFAFGKFEVQVCPGTWCFFIQMIHKERS-----FSVIGFSVLVYSSLMALLVLTAVVCNLGAMYNLYDMHRRHRHYPHRCSDRAQ-	244		
mEP2		ASLLFCSLPLLYNGEYVQVCPGTWCFFIRHGR-----TAYLQLYATMLLLIIVAVLACNLSVILNLIRMHRRSRRCGLSGSSLR-	243		
mIP		FCCLFCSLPLLLGLGEHQVQVCPGSWCFI-RMR--SAP-----GCCLFSLAYASLMALLVTSIFFCNGSVTLISLYHMYRQRRRHGSGFVP-	255		
mEP4		SNVLFCALENMGLGRSERQVPGTWCFIDWTT--NVT-----AYAAFSSMYAGFSSFLILATVLCNVLVCGALLRMHRQFMRRTSLGTEQHAA	256		
mEP3 α		SVLAFALPVLGVGRYSVQVPGTWCFISTGPAGNETDPAREPGSVAFASACGLLALVVTFACNLATIKALVSR-----	235		
mEP1		MALAVALLPLVHVGRYELQVPGTWCFISLGRG-----GWR-QALLAGLFAAGLAAALLVLCNTLSGLALLRA-RWRRRSRFRKTAGPD	251		
mFP		FAVFVAVLPILGHRDQYIQASRTWCFFYNTEHIE-----DWE-DRFYLLFFSPLGLLALGVSFSCNAVGTGVTLLRV-KF--RSQ-----	235		
mTP		AAGALGLPLGLGRYSVQVPGSWCFILTGT-----QRGDVVGGLFALLGSASVGLSLLNTVSV-ATL-----	220		
		VI			
mDP		-----SGSDYRHGSLHPLEELDHFVLLALMTVLFMCSLPLTIYRAYYGAFKLENKAEG--D-----SE--	300		
mEP2		-----GPGSRRRGERTSMAETDHLILLAIMTITFAICSLPPTIFAYMDETSSL-----KEKW-	298		
mIP		-----TSRAREDEVYHLILLALMTVIMAVCSLPLMIRGFTQAIAPDS-----REMG-	301		
mEP4		AAAAVASVACRGHAGASPALQRLSDF-----RRRRSFRRIRAGAEIQMVILLIATSLVLVLCISPLVVRVFINQLYQFNVV--KDIS--RNP	338		
mEP3 α		-----CRAKAASVSQ-----SAQWGRI--TTETAQLMGIMCVLSVCWSPLLIMMLKMFNQMSVEQCKTQMGKEKCN	303		
mEP1		DRRRWGRGPRLASASSASSITSATATLRSSRGGSARRVHAHDVEMVQGLVGMVVCISCSPLLVVLVLAIGGW-NSNSL-Q-----RPL-	336		
mFP		-----QHRQGRSHHLEMIQLLATIMCVSCVCSPLVMTMANIAINGNNSPVTC-----E--T	285		
mTP		-----CRVYHT-----R--EATQRPRDCEVEMVQVGVIMVAVTVCWMLLVFIMQTLTQTPPVMSFSQQLLRATEHQ-	286		
		VII			
mDP		DLQALRFLSVISIVDPWIFIIPTTSVFRMLFHKVFTTRPLIYRNWSSSHSQSNVESTL	357		
mEP2		DLRALRFLSVNSIIDPWVFAILRPVLRMLRSVLCRTSLRTQEAQQTSCSTQSSASKQTDLCGQL	362		
mIP		DLALFRFNAFNPILDPWVILFRKAVFQRLKFWLCCLCARSVHGDLQAPLBRPASGRDDPPAPTSLQAKEGSWVPLSSWGTVQA(30)	417		
mEP4		DLQATRIASVNPILDPWVYILLRKTIVLSKAIEKIKCLFCRIGSGSRSSAQHCSESRTSSAMSGHSRSLFRELKEISSTSQT(90)	513		
mEP3 α		FLIAVRLASLNQILDPWVYLLLRKILLRKFCQIRDHNTYASSSTSLPCPGSSALMWSQLER	365		
mEP1		FL-AVRLASVNPILDPWVYILLRQAMLRQLRLPLRVSAKGGPTELGLTKSAWEASSLRSSRHSGFSLH	405		
mFP		TLFALRMATWNQILDPWVYILLRKAFLRLNLYKLASRCCGVNIIISLHIWELSSIKNSLKVAATSESAPAEKESQASSEAGL	366		
mTP		LLIYLRVATWNQILDPWVYILLRFRSVLRRLHPRFSSQLQAVSLRRPPAQAMLSGP	341		

Fig. 1. Amino Acid Sequence Alignment of the Eight Types and Subtypes of Mouse Prostaglandin Receptors

Amino acid residues shared by more than five receptors are shown by thick letters. Putative transmembrane domains are indicated by lines above the sequences.

残基は、アゴニストの1位カルボン酸との結合部位と同定されている。

1-2. プロスタグランジン受容体の遺伝子構造 マウスのPG受容体遺伝子が存在する染色体が同定されており、DP, EP1, EP3, EP4, FP, IP, TPはそれぞれ第14, 8, 3, 15, 3, 7, 10染色体に存在する。^{14, 15)} PG受容体の遺伝子は、共通して2つのイントロンにより隔てられた3つのエキソンから構成されている。第1エキソンは5'-非翻訳領域をコードし、第2エキソンは第6細胞膜貫通領域の終わりまで、第3エキソンはC末端までコードしている。EP3ではC末端鎖にさらにエキソンが存在し、これらのエキソンはスプライシングにより複数のアイソフォームを生成する。

1-3. プロスタグランジン受容体の構造と情報伝達 PG受容体の生化学的諸性質をTable 1に示す。Ca²⁺動員系に共役する受容体はTP, FP, EP1である。TPとFPはGqに共役し、ホスホリパーゼCを活性化してIP3を産生する。TPはGiとも共役しアデニル酸シクラーゼを抑制する。^{7, 16, 17)} EP1はG蛋白を介して細胞膜上のCa²⁺透過性チャンネルを活性化し、細胞外からCa²⁺流入を引き起こす。細胞内に流入したCa²⁺はCキナーゼを活性化し作用するが、Cキナーゼは受容体をリン酸化し細胞を短期脱感作にするとともに、EP1のmRNAの

Table 1. Biochemical Characteristics of Mouse Prostaglandin Receptors

Receptor	Mw	K_d value (nM)	PG binding potency	G protein	Effector
TP	37 K	3.3	$T > D_2 > F_2 > E_2$	Gq, Gi	PLC, AC
FP	40 K	1.32	$F_2 > F_1 > D_2 > T > E_2 > I_2$	Gq	PLC
EP1	42 K	21	$E_2 > I_2 > E_1 > F_2 > D_2$	unknown	Ca^{2+} -channel
DP	40 K	40	$D_2 \gg T > E_2 > I_2 > F_2$	Gs	AC, Ca^{2+} -channel
IP	45 K	4.6	$I_2 > E_2 > D_2 > T > E_2 > F_2$	Gs, Gq	AC, PLC
EP2	40 K	26.7	$E_2 = E_1 \gg F_2 = D_2$	Gs	AC
EP4	56 K	11	$E_2 = E_1 > I_2 > F_2 > D_2$	Gs	AC
EP3	40 K	2.9	$E_2 = E_1 > I_2 > F_2 > D_2$	Gi, Gs	AC, PLC

AC: adenylate cyclase, PLC: phospholipase C.

Fig. 2. Structures and G Protein Couplings of the Mouse and Bovine EP3 Isoforms

* Isoforms having constitutive activity.

不安定を起こすことにより、EP1の分子数の低下による長期脱感作が起こる。^{3, 4)}

アデニル酸シクラーゼを活性化する受容体はDP, IP, EP2, EP4である。DPはcAMPの上昇作用に加え、IP₃の産生を伴わずにCa²⁺チャンネルを活性化し、細胞内Ca²⁺の上昇を起こす。¹²⁾ IPはGsとGqに共役しcAMPの上昇とIP₃の産生を起こすが、Gsとの共役の方が効率が高い。^{10, 13)} EP2^{10, 19)}とEP4^{5, 6)}はEPサブタイプであるが、ともにGsと共役しアデニル酸シクラーゼを活性化する。しかし、2つのサブタイプは活性の調節機構において異なる。EP4はC末端鎖に受容体キナーゼによるリン酸化部位のコンセンサス配列が多数存在する。さらに、第3細胞内ループとC末端鎖に2つずつAキナーゼのリン酸化部位が存在する。一方、EP2にはこれらリン酸化部位は存在しない。その結果、アゴニストの前処理によりEP4は短期の同種

脱感作を受けるが、EP2 は全く受けない。さらに、EP2 は PGE2 の代謝産物 (15-keto PGE2, 13, 14-dihydroxy 15-keto PGE2) に対して弱い Gs 活性を示すが、EP4 は示さない。これらのことから、EP4 は PGE2 の一過性の作用を発揮する受容体で、EP2 は持続的な作用を発揮する受容体であると考えられる。⁶⁾

アデニル酸シクラーゼを抑制する受容体は EP3 受容体のみである。EP3 は Gi を活性化し、Gi α サブユニットを介してアデニル酸シクラーゼを抑制する。さらに、 $\beta\gamma$ サブユニットを介して PI 代謝を活性化し、細胞内 Ca²⁺ 濃度の増加を起こす。¹¹⁾ EP3 には、選択的 RNA スプライシングにより C 末端鎖の構造のみが異なる多くのアイソフォームが存在し (Fig. 2), 多彩な生理作用の発現の原因となっている。^{7, 20)} マウスでは 3 種類 (EP3 α , EP3 β , EP3 γ),^{7, 21, 22)} ウシでは 4 種類 (EP3A, EP3B, EP3C, EP3D),^{20, 23)} ヒトでは 6 種類が知られている。アイソフォーム間ではリガンド結合の親和性と特異性は同じであるが、共役する情報伝達系が異なる。マウスの場合、EP3 α と EP3 β は Gi のみと共役するが、EP3 γ は低濃度で Gi, 高濃度で Gs と共役する。Gi 活性の強さは EP3 α > EP3 β > EP3 γ の順である。しかし、EP3 γ は PGE2 が結合する以前から Gi を活性化する、いわゆる常在性 Gi 活性 (constitutive Gi activity) が非常に大きい。この活性は EP3 α に弱く認められるが、EP3 β にはない。また、スプライシング部位で C 末端鎖を欠損した変異受容体は常在性 Gi 活性化型であり、アゴニスト依存性を全く示さない。このことから、EP3 では Gi の活性化部位は C 末端鎖以外の受容体本体、おそらく第 2 もしくは第 3 細胞内ループにあり、C 末端鎖はその活性化部位をアゴニスト依存的に抑制していると推察される。さらに、その抑制程度は C 末端鎖の構造によっても異なり、EP3 β の C 末端鎖が最も強い抑制

Table 2. Interaction between α -Carboxylic Acid of PGE2 and Arginine Residue in Seventh Transmembrane Domain of EP3

	EP3 agonist	EP3 receptor - 7th TM	Gi activity	
			TEI3356	TEI4343
Binding			+	+
Activity			+	+
			+	+
			-	-

Arg-309 in the seventh transmembrane domain of EP3 α receptor is a putative binding site of carboxylic acid group of PGE2. The positively charged Arg-309 of EP3 α was mutated to the polar but uncharged Gln and Asn, and to the non-polar Leu. Binding activities of wild-type and each mutated type of EP3 were examined towards TEI3356 with a negatively charged carboxylic acid, and TEI4343 with an uncharged but polar group. Arrows indicate: $\leftarrow$ hydrogen donor type hydrogen bonding, $\rightarrow$ hydrogen acceptor type hydrogen bonding, $\leftrightarrow$ ionic bonding. (+) a high affinity binding, (-) a low binding affinity.

を示し、次いで EP3 α の C 末端鎖、そして EP3 γ の C 末端鎖はほとんど抑制を示さない。^{23, 24)}

1-4. プロスタグランジン受容体のリガンド結合部位 第7細胞膜貫通領域にある Arg 残基は、プロスタグランジンの共通の構造であるカルボン酸の結合部位と考えられている。ところで、EP アゴニストの中にはカルボン酸が修飾され、非解離型で強いアゴニスト活性を示すものが多く存在する。これらの修飾された構造を調べると、イオン結合はできないが、すべて水素受容体としての水素結合が可能である。EP3 サブタイプの Arg 残基を、水素供与受容型の水素結合のできる Gln, Asn 残基、及びイオン結合、水素結合ともにできない Leu 残基に置換し、^[3H] PGE2 に対する結合親和性を見ると、Arg 残基のみならず Gln, Asn 残基の受容体ともに高親和性を示したのに対し、Leu 残基の受容体は低親和性であった (Table 2)。さらに、解離型カルボン酸を持つ EP3 特異的アゴニスト TEI-3356 とそのカルボン酸をメチルエステル化し、水素受容型水素結合の可能な TEI-4343 をリガンドに用いてアゴニスト活性を調べたところ、Arg, Gln, Asn 残基の受容体に対して両アゴニストは全く同じ Gi 活性を示したが、Leu 残基の受容体ではほとんどアゴニスト活性を示さなかった。このことから、アゴニストのカルボン酸と EP3 受容体の Arg 残基とのイオン結合は受容体活性化に必須の結合様式ではなく、水素結合で十分であることがわかった。また、この性質は PGE 受容体の4つのサブタイプ (EP1, EP2, EP3, EP4) に共通に見られる特性であることもわかった。²⁵⁻²⁷⁾ しかし、すべてのプロスタグランジン受容体に Arg 残基は保存されており、この高い保存性と受容体の活性化に水素結合で十分であるという化学的性質は一致しない。そこで、複数の G 蛋白質 (Gi, Gs, Gq) と共役でき、多彩な情報伝達の可能な EP3D アイソフォームの活性におけるアゴニストのカルボン酸と受容体の Arg 残基との結合の役割を調べた。その結果、EP3D 受容体の Arg 残基とアゴニストのカルボン酸との結合で、Gi 活性においては水素結合で十分であるが、Gs 及び Gq 活性にはイオン結合が必須であり (Table 3)、共役する G 蛋白質の種類により結合の化学的性質が異なっていることがわかった。²⁸⁻³⁰⁾ このように、複数の情報伝達系に共役する受容体では、結合の化学的性質の違いにより G 蛋白質の種類の特異性をコントロールしていることが考えられる。

1-5. プロスタグランジン受容体の組織分布 クローニングされた受容体 cDNA を用いたノザンブロットや *in situ* hybridization 法により、従来の薬理学的手法では検出困難な部位での受容体の存在が予想できる。Table 4 は、マウスの各臓器における PG 受容体 mRNA の発現パターンを比較したものである。³¹⁾ 従来知られていなかった発現部位の例は、TP と IP が胸腺

Table 3. Effect of Interaction between α -Carboxylic Acid of PGE2 and Arginine Residue in Seventh Transmembrane Domain of EP3D on the Activities of Gi, Gs, and Gq

Receptor	Arginine residue in 7th transmembrane	α -Carboxylic acid of PG	Gi activity	Gs activity	Gq activity
EP3D	Arginine ⁺	—COO ⁻	+	+	+
	Arginine ⁺	—COOCH ₃	+	—	—
EP3D-R332Q	Glutamine	—COO ⁻	+	—	—
	Glutamine	—COOCH ₃	+	—	—

Arg-309 in the seventh transmembrane domain of bovine EP3D receptor (EP3D) was mutated to Gln-309 (EP3D-R332Q). Wild and mutant receptors were treated with TEI3356 (abbreviation —COO⁻) or TEI4343 (abbreviation —COOCH₃), and assayed Gi activity (decrease of forskolin-induced cAMP level), Gs (increase of cAMP level), and Gq activity (increases of inositol 1,3,4-trisphosphate and Ca²⁺ levels). +: effective, -: ineffective.

Table 4. Distribution of mRNAs of Prostaglandin Receptors in Various Mouse Organs Determined by Northern Blot

Tissue	IP	DP	EP2	EP4	TP	FP	EP1	EP3
Brain	—	±	±	—	+	—	—	+
Heart	+	—	—	+	+	—	—	—
Lung	+	+	+	+	+	—	—	+
Thymus	≡	—	+	+	≡	—	—	—
Liver	—	—	+	—	—	—	—	—
Stomach	—	+	+	+	—	—	+	≡
Spleen	+	—	+	+	+	—	—	±
Kidney	+	—	—	+	+	+	≡	≡
Ileum	—	≡	+	+	—	—	—	—
Uterus	—	+	+	≡	+	—	—	+
Ovary	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	≡	n.d.	n.d.

The levels of mRNAs of each prostaglandin receptor in various organs were determined, and the relative strength of expression is depicted by mark in the following order; ≡ > + > ± > —. n.d.: not detectable.

に高い発現を示したことである。IP は胸腺の髄質に、TP は皮質に発現しており、T 細胞の分化を調節していると考えられる。^{32, 33)} DP は肺、胃、子宮に発現が見られ、また、中枢で脊髄と脳を包む軟髄膜に発現しており、その発現部位は PGD 合成酵素のそれとよく一致し、PGD2 の睡眠作用との関係が興味深い。³⁴⁾ FP は卵巣に高い発現が見られ、顆粒膜細胞が黄体細胞に分化した後に誘導され、黄体細胞のアポトーシスに寄与していると考えられる。^{35, 36)} EP サブタイプの発現は幅広い組織にあるが、発現パターンはサブタイプによりかなり異なっている。例えば、腎臓において (Fig. 3), EP3 は髄質外部のヘンレ・ループと皮質集合管に局在し、遠位尿細管の上行脚での NaCl の再吸収や集合管での水やイオンの再吸収を抑制していると考えられる。EP1 は腎皮質から乳頭部にかけての集合管上皮細胞に発現しており、その部位での水やイオンの再吸収を抑制している。EP4 は糸球体に発現しており、濾過率の制御を行っていると考えられる。³⁷⁾ 脳神経系においては EP3 が最も高く発現しており、EP1, EP4 がわずかに発現している。EP3 は脳内で嗅球、大脳皮質、海馬、視床、視床下部、脳幹等広範な部位に発現し、その発現はニューロンに特異的である。^{38, 39)} 消化器において (Fig. 4), EP3 は胃体部の粘膜層の上皮細胞に発現しており、胃酸分泌と消化酵素の分泌に関与する。EP4 は幽門部を中心とする粘膜細胞に発現し、胃の保護作用に関与するとともに、回腸の腺上皮にも発現し、水や電解質の輸送調節に関与する。EP1 は胃から腸にかけての粘膜筋板に発現している。EP3 は縦走筋のほか、筋間神経叢のニューロンにも大量に発現しており、神経支配のレベルにおいて消化管運動の調節を行っている。⁴⁰⁾ 子宮において、EP2 は受精卵の着床時期に管腔上皮細胞に一過性に強く発現し、受精卵の着床に関与する。EP3 は子宮の外縦平滑筋に発現しているが、着床時期には内輪平滑筋に強く発現するようになる。ここでの EP3 は、それぞれ精子の運動と受精卵のスペーシングに機能すると考えられる。EP4 は管腔上皮細胞に発現しているが、着床時期に内膜の実質細胞に強く発現するようになり、脱落膜化細胞の分化に働くと考えられる。^{41, 42)}

1-6. プロスタグランジン受容体欠損マウスによる生物作用の解析 各プロスタグランジン受容体とそのサブタイプ cDNA がすべてクローニングされ、それらを個々に発現した細胞を用いることにより、新規な特異性の高い薬物を開発することが可能となった。しかし、創薬の観点からは、受容体の作用と個体レベルでの生理・病態との関係を明らかにすることが大事である。これには、受容体欠損マウスによる生物作用の解析が有効な手段である。現在、我々

Fig. 3. Distribution of EP Subtypes in Mouse Kidney

Upper panel; photomicrographs showing hybridization signals for EP subtype mRNAs. Lower panel; schematic depiction of the distribution of EP subtype mRNA signals. EP2 signals were not significantly observed.

は8種類のPG受容体・サブタイプの欠損マウスを個々に作製し、これらの生理・病態の解析を行っている (Fig. 5).

(1) **FP欠損マウス**: FP欠損マウスの雌は正常に排卵、受精、着床を行うが、妊娠した変異マウスの胎児は成長するものの分娩されず、子宮内死亡を起こす。⁴³⁾ FP欠損マウスの解析により、PGF2 α は妊娠時における黄体退縮、黄体ホルモンの血中濃度低下、オキシトシン受容体の発現、平滑筋収縮を順次に起こし、分娩誘導に必須の役割を果たしていることを明らかにした。一方、PG合成酵素のCOX-2欠損マウスでは、排卵、受精、着床、脱落膜化等の妊娠初期の生理現象に異常のあることが見出されている。^{44, 45)}

(2) **EP4欠損マウス**: EP4欠損マウスは胎生後期までは成育するものの、そのほとんどが出

Fig. 4. Distribution of EP Subtypes in Mouse Gastrointestinal Tract

Schematic depiction of the distribution of mRNA signals of EP1, EP3 and EP4 are based on the photomicrographs showing hybridization signals for EP subtype mRNAs. EP2 signals were not significantly observed.

生後3日以内に死亡する。^{46, 47)} EP4は胎児循環維持に必須の動脈管 (Ductus Arteriosus) に COX-2 とともに発現し、それにより胎児肺への過剰な血圧負荷が起こらないよう働いている。実際、野生株マウスの動脈管は出生後数時間以内に閉鎖するが、欠損マウスでは動脈管が閉鎖せず開存状態にあって肺障害の原因と考えられているが、個体の死に至るメカニズムは不明である。

(3) EP3欠損マウス: EP3欠損マウスは、PGE2の脳室内投与、IL-1 β の脳室内あるいは静脈内投与、及びLPSの静脈内投与のいずれによる発熱反応も起こさないことから、EP3は発熱に関与すると考えられている。⁴⁸⁾ よく知られているアスピリン等の非ステロイド性抗炎症剤の解熱作用は主にEP3によることを示唆するものである。

(4) EP2欠損マウス: EP2欠損マウスは、排卵及び受精不全により出産数が減少する。解析の結果、EP2は卵成熟に重要な役割を果たす卵丘細胞に発現し、ゴナドトロフィン刺激で産生したPGE2によりEP2-cAMP系を介して、卵-卵丘細胞複合体のcumulus expansionと呼ばれる形態や機能の維持に働いていることがわかった。⁴⁹⁾

(5) IP欠損マウス: IP欠損マウスは、血圧上昇の抑制、血栓の形成阻害に加え、カラゲニン惹起滲出反応をインドメタシンによる効果と同程度にまで抑制することから、炎症反応に働くことが予想される。⁵⁰⁾

2. ヒスタミン合成酵素 (ヒスチジン脱炭酸酵素) の分子生物学

2-1. ヒスチジン脱炭酸酵素の精製とそのcDNAクローンの単離 ヒスタミンはL-ヒスチジンに特異的で、かつ高親和性のL-ヒスチジン脱炭酸酵素 (L-histidine decarboxylase (HDC), EC 4.1.1.2) により産生される。この酵素は肥満細胞、好塩基球細胞、胃のECL細胞、あるタイプの神経細胞等に多く含有されている。本酵素はラット胎児肝臓から最初の精製がなされたが、⁵¹⁾ 蛋白の一次構造を解析するまでには至らなかった。我々は、マウス癌化肥満細胞 (mastocytoma P-815細胞) が、少ないヒスタミン含有量にもかかわらず高いHDC活性を有し

PG	Receptor	Physiological Action	Effect of Aspirin-like Drugs
PGI₂	IP	Hyperalgesia Hypotension Inhibition of Platelet Aggregation	Analgesia Hypertension Thrombophilia
PGE₂	EP2	Ovulation & Fertilization	Reduced Fertility
PGE₂	EP3	Pyrexia	Anti-pyretic Effect
PGE₂	EP4	Closure of Ductus Arteriosus	Constriction of Ductus Arteriosus
PGF_{2α}	FP	Induction of Parturition	Delayed Parturition

Fig. 5. Schematic Depiction of Phenotypic Changes of Mice Deficient in Each of Prostaglandin Receptors

Upper table shows the relationship between physiological actions of each prostaglandin receptor and known clinical effects of aspirin-like drugs if administrated in the body.

ていることに着目して、約 2000 匹のマウスの腹腔細胞として回収した癌化肥満細胞から HDC を精製した。酵素は分子量 110 kDa で、分子量 53 kDa のサブユニットの二量体であり、L-histidine のみを基質とし、補酵素として pyridoxal phosphate を必要とする。⁵²⁾ 精製酵素のアミノ酸配列をもとに、癌化肥満細胞の cDNA ライブラリーからマウス HDC cDNA のクローンを単離した。単離した cDNA は全長 2371 塩基対からなり、翻訳領域 (1896 塩基) の塩基配列から推定されるアミノ酸の残基数は 662 個で、そこから計算される HDC 蛋白の分子量は 74071 (74 kDa) であり、⁵³⁾ HDC のサブユニット 53 kDa よりも 21 kDa 大きいことがわかった。サザンブロット解析から、マウス HDC mRNA は 2.7 kb の単一バンドであり、HDC mRNA は 1 種類しか存在しないと考えられること、また、精製酵素の全アミノ酸配列の部分ペプチドを作製して N 末端から順次に解析すると、74 kDa 分子種の C 末端部分が 53 kDa 分子種において欠落していることがわかった。これらのことから、74 kDa 分子種の HDC は前駆体であり、その C 末端側部分にある約 20 kDa サイズのペプチドが翻訳後に消失した結果、53 kDa 分子種の二量体が生成すると推定された。⁵⁴⁾ 通常、このような酵素の翻訳後プロセッシングは、活性発現あるいは細胞内局在性に必要な反応と考えられている。

2-2. 74 kDa 分子と 53 kDa 分子の肥満細胞での代謝 肥満細胞株であるラット好塩基球

Fig. 6. Interconversion of 74 kDa Form of L-Histidine Decarboxylase into Its 53 kDa Form in Rat Basophilic Leukemia Cells (RBL-2H3 Cells)

(A) RBL-2H3 cells labeled with [35 S]methionine for various times were fractionated, and [35 S]methionine labeled HDCs were immunoprecipitated with anti-GST fusion HDC antiserum, and immunoprecipitated were analyzed by SDS-PAGE. (B) cells were pulsed for 10 min with [35 S]methionine and then chased for the time periods indicated with excess amount of non-labeled methionine. The immunoprecipitation with antiserum and fractionation by SDS-PAGE were the same as described above. The 74 kDa form and 53 kDa form are indicated by arrows. The results of figures of A and B are described in under panels, respectively.

細胞株 (RBL-2H3) において, [35 S] メチオニンで新生 HDC を標識後, HDC の N 末端に対する抗体を用いる免疫沈降法と SDS-PAGE 法により, [35 S] メチオニン標識 74 kDa 分子種は同標識 53 kDa 分子種へと変換すること, また, 前者の代謝回転は数分以内と速く, 後者のそれは非常に遅いことがわかった (Fig. 6).⁵⁵⁾

2-3. 74 kDa 分子と 53 kDa 分子の肥満細胞での局在性 HDC はすべて組織・細胞ホモジェネートの遠心上清画分から精製されていることから, これまでサイトゾル酵素とみなされていた. 我々は, 以下に示すいくつかの実験結果から, 肥満細胞の HDC はサイトゾルと顆粒の両方に存在し, サイトゾルの HDC は 74 kDa 分子種で, 顆粒の HDC は 53 kDa 分子種ではないかと考えた. まず, RBL-2H3 細胞を streptolysin-O で処理し, 形質膜のみを選択的に破壊してサイトゾル成分の大部分を細胞外に流出させたところ, 約 40% の HDC 活性が漏出し, その分子サイズは 74 kDa であった. この条件下で細胞側に残留した HDC は 53 kDa 分子種と 74 kDa 分子種であった. 次に, Percoll を用いた密度勾配遠心分画法の検討から, サイトゾルには 74 kDa 分子種が存在し, 顆粒成分の小胞体・ゴルジ画分及びヒスタミン顆粒には 53 kDa 分子種が存在していた. さらに, 蛍光抗体法を用いた検討から, HDC は顆粒成分とサイトゾルに局在し, 顆粒成分に認められる HDC 抗体の蛍光像は小胞体マーカーである protein disulfide isomerase (PDI) と一致し, HDC が小胞体膜内腔側に存在すると推定された (Fig. 7).⁵⁵⁾

Fig. 7. Confocal Microscopic Observation of Co-existence of HDC and PDI in the ER of RBL-2H3 cells

Cells were double-stained with anti-GST fusion HDC antiserum (A) and with anti-PDI (protein-disulfide isomerase) antibody. The fluorescent images were observed with a confocal microscopy.

2-4. HDCのプロセッシングによる分子変換 74 kDa 分子種に特異的に作用して 53 kDa 分子種を産生するプロセッシング酵素を見出した.⁵⁶⁾ この反応はセリンプロテアーゼ阻害剤の DFP (diisopropyl fluorophosphate) とベンザミジン (benzamidine) の添加により阻害されることから、プロセッシング酵素はベンザミジン感受性のセリンプロテアーゼの一種と推定し、それをマウス癌化肥満細胞のホモジェネートから部分精製した.⁵⁷⁾

2-5. 74 kDa 分子種の小胞体移送シグナル HDC の N 末端には通常の分泌蛋白に見られる典型的な小胞体移送シグナルはなく、HDC は遊離リボソーム上で翻訳されると考えられる。74 kDa 分子種が小胞体サイトゾル側に、また、53 kDa 分子種が lumen 側に多く存在することから、74 kDa 分子種の C 末端側に小胞体移送シグナルがあり、lumen で 53 kDa 分子種へのプロセッシングが起こることが想定される。我々は、HDC の C 末端側 21 kDa ペプチドを断片化し、それぞれと glutathione S-transferase (GST) とを co-fusion させて COS-7 細胞に発現させ、小胞体への移送シグナルを検索した。その結果、C 末端から 10 kDa のペプチド部分 (578—662)、なかでも 20 アミノ酸 (588—607) に小胞体移送シグナルがあることを明らかにした。⁵⁸⁾

2-6. 74 kDa 分子種のサイトゾルでの速い代謝回転 74 kDa 分子種は非常に速い代謝回転をしている。我々は、ubiquitin-proteasome 系がこの速い代謝回転に関与していると仮説した。RBL-2H3 細胞の 74 kDa の代謝分解が proteasome に特異的な阻害剤で抑制されること、また、74 kDa は ubiquitin 修飾を受け ATP 依存的に分解することを見出した。⁵⁹⁾

2-7. HDC の分子変換によるヒスタミン生合成の調節 これまでの結果をもとに、HDC によるヒスタミン生合成の調節を模式的に示した (Fig. 8)。74 kDa 分子種は遊離リボソームで合成されたのち、何らかの機構で小胞体 lumen に移送され、プロセッシングを受けて 53 kDa 分子種に変換する。53 kDa 分子種は顆粒内でヒスタミンを生成し、それを貯留する。一方、74 kDa 分子種はサイトゾルでヒスタミンを生成し、それを細胞外に放出するが、ubiquitin-proteasome により ATP 依存的に速やかに分解される。これにより、生体には、前者により半減期の長いヒスタミンプールが、後者により半減期の短いヒスタミンプールが存在することになる。前者は肥満細胞や好塩基球細胞における脱顆粒による即時型反応において、また、後者は好塩基球やリンパ球における遅延型反応において作用するヒスタミンに相当すると考えられる。

2-8. HDC mRNA の誘導と HDC 遺伝子の転写活性 培養癌化肥満細胞をグルココルチ

Fig. 8. Schematic Depiction of Activation and Translocation of HDC in RBL-2H3 Cells

コイド+12-*O*-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA), 及びカルシウムイオノフォア (A23187) + dibutyl cAMP のそれぞれで 12 時間処理すると, HDC mRNA と酵素活性が増大し転写レベルで HDC の発現が調節されることが明らかになった.^{60, 61)} さらに, マウス HDC 遺伝子のプロモーター領域の転写調節領域で, 転写開始点の 27 base 上流に TATA-box に類似した配列 (TAAATAA) と 61 base 上流に GC-box があること, さらにその上流には GATA 配列や GRE, γ IFN-RE, NF-IL-6/PEA-3 のコンセンサス配列と一致する配列があることを見出した. また, CAT アッセイにより, これらの配列を含む HDC 遺伝子のプロモーター領域が HDC 活性の増大に関わっていることを確認した. グルココルチコイドによる誘導には HDC 遺伝子の -267 から -132 の領域が, また, TPA による誘導には典型的な AP-1 結合配列がない -132 から -53 の領域が必要であること, さらに, グルココルチコイド+TPA の相乗作用の応答領域は -267 から +91, cAMP+A23187 のそれは -267 から -53 であること等を明らかにした.⁶²⁾ ヒト遺伝子は全長 24 kb で, 12 個のエクソンと 11 個のイントロンから構成されている.^{63, 64)} 我々はヒト HDC の基本転写因子を解析し, 転写開始点より上流 520 bp の位置に結合する c-Myb や, 855 bp の位置に結合する正の調節因子がヒスタミン産生細胞において HDC の発現を促進し, 821 bp の位置に結合する負の調節因子がそれ以外の細胞で HDC の発現を抑制していることを示唆した.⁶⁵⁾

おわりに

PG 受容体のこれまでの成果のほとんどは遺伝子レベルでの情報であり, 蛋白レベルでの受容体研究はこれからである. 各受容体発現細胞は特異性の高いアゴニスト・アンタゴニストの開発に貢献するが, そこで得られる結果を組織レベル, 個体レベルでの作用に演繹する方法はまだない. 受容体ノックアウトやトランスジェニックマウスを用いた研究成果は, 生理・病態作用の解析に非常に役立つのみならず, 既存の抗炎症薬の評価や, 今後開発されるであろう薬剤の開発に必要な評価系となりうる. 一方, ヒスタミン合成酵素についての研究は, どのような刺激で誘導され, 活性化されるかについての情報が蓄積しつつある. アレルギーの遅延過程に見られる好塩基球などで, 産生後速やかに放出されるヒスタミンの制御を目的とする薬物の開発が期待される. また, ヒスタミン合成酵素のノックアウトマウスの作製も進められており, これまで H1/H2 阻害剤の研究で予測された生体作用に加え, 未知のヒスタミンの生理作用の

発見が期待される。

謝辞 これらの研究は京都大学薬学部衛生化学講座に在籍された、また、在籍中の共同研究者との成果であり、ここに心から謝意を表します。また、終始暖かい激励をして戴いた京都大学名誉教授の富田謙吉先生、PG研究で多大のご協力を戴いた共同研究者、京都大学医学研究科の成宮 周教授と教室員諸氏、ノックアウトマウスの作製にご協力戴いた大阪府立母子保健総合医療センターの吉田進昭教授に深甚の謝意を表します。

引用文献

- 1) Coleman R. A., Kenedy I., Humphrey P., Bunce K., Lumpley P., *Comprehensive Medicinal Chemistry*, **3**, 643—714 (1989).
- 2) Coleman R. A., Grix S. P., Shelfrick R. L. G., *Prostaglandins*, **47**, 152—168 (1994).
- 3) Watabe A., Sugimoto Y., Honda A., Namba T., Negishi M., Ito S., Narumiya S., Ichikawa A., *J. Biol. Chem.*, **268**, 20175—20178 (1993).
- 4) Katoh H., Sugimoto Y., Ichikawa A., Negishi M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1244**, 41—48 (1995).
- 5) Honda A., Sugimoto Y., Negishi M., Ichikawa A., *J. Biol. Chem.*, **268**, 7759—7762 (1993).
- 6) Nishigaki N., Negishi M., Narumiya S., Ichikawa A., *FEBS Lett.*, **364**, 339—341 (1995).
- 7) Sugimoto Y., Namba T., Honda A., Hayashi Y., Negishi M., Ichikawa A., Narumiya S., *J. Biol. Chem.*, **267**, 6463—6466 (1992).
- 8) Ushikubi F., Nakajima M., Hirata M., Okuma M., Fujiwara M., Narumiya S., *J. Biol. Chem.*, **264**, 16496—16501 (1989).
- 9) Hirata M., Hayashi Y., Ushikubi F., Nakanishi S., Narumiya S., *Nature (London)*, **349**, 617—620 (1991).
- 10) Katsuyama M., Nishigaki N., Sugimoto Y., Morimoto K., Negishi M., Narumiya S., Ichikawa A., *FEBS Lett.*, **372**, 151—156 (1995).
- 11) Sugimoto Y., Hasumoto K., Namba T., Irie A., Katsuyama M., Negishi M., Kakizuka A., Narumiya S., Ichikawa A., *J. Biol. Chem.*, **269**, 1356—1360 (1994).
- 12) Hirata M., Kakizuka A., Aizawa M., Ushikubi F., Narumiya S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 11192—11196 (1994).
- 13) Negishi M., Ito S., Narumiya S., Ichikawa A., *J. Biol. Chem.*, **268**, 20175—20178 (1993).
- 14) Ishikawa T. O., Tamai Y., Rochelle J. M., Hirata M., Namba T., Sugimoto Y., Ichikawa A., Narumiya S., Taketo M., Seldin M. F., *Genomics*, **32**, 285—288 (1996).
- 15) Taketo M., Rochelle J. M., Sugimoto Y., Namba T., Negishi M., Ichikawa A., Narumiya S., Seldin M. F., *Genomics*, **194**, 885—891 (1994).
- 16) Namba T., Sugimoto Y., Hirata H., Hayashi Y., Honda A., Watabe A., Negishi M., Ichikawa A., Narumiya S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **184**, 1197—1203 (1992).
- 17) Ito S., Sakamoto K., Mochizuki-Oda N., Ezashi T., Miwa K., Okuda-Ashitaka E., Schevchenko V. I., Kiso Y., Hayaishi O., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **200**, 756—763 (1994).
- 18) Namba T., Oida H., Sugimoto Y., Kakizuka A., Negishi M., Ichikawa A., Narumiya S., *J.*

- Biol. Chem.*, **269**, 9986—9992 (1994).
- 19) Sando T., Usui T., Tanaka I., Mori K., Sasaki Y., Fukuda Y., Namba T., Sugimoto Y., Ichikawa A., Narumiya S., Nakao K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **200**, 1329—1333 (1994).
 - 20) Namba T., Sugimoto Y., Negishi M., Irie A., Ushikubi F., Kakizuka A., Ito S., Ichikawa A., Narumiya S., *Nature (London)*, **365**, 166—170 (1993).
 - 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) 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).
 - 23) Negishi M., Sugimoto Y., Irie A., Narumiya S., Ichikawa A., *J. Biol. Chem.*, **268**, 9517—9521 (1993).
 - 24) Irie A., Sugimoto Y., Ichikawa A., Negishi M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **204**, 303—309 (1994).
 - 25) Hasegawa H., Negishi M., Ichikawa A., *J. Biol. Chem.*, **271**, 1857—1860 (1996).
 - 26) Chang C-S., Negishi M., Nishigaki N., Ichikawa A., *Prostaglandins*, **54**, 437—446 (1997).
 - 27) Chang C-S., Negishi M., Nishigaki N., Ichikawa A., *Biochem. J.*, **322**, 597—601 (1997).
 - 28) Negishi M., Irie A., Sugimoto Y., Namba T., Ichikawa A., *J. Biol. Chem.*, **270**, 16122—16127 (1995).
 - 29) Negishi M., Harazono A., Sugimoto Y., Hazato A., Kurozumi S., Ichikawa A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **212**, 279—285 (1995).
 - 30) Negishi M., Harazono A., Sugimoto Y., Hazato A., Kurozumi S., Ichikawa A., *Prostaglandins*, **48**, 275—283 (1994).
 - 31) Oida H., Tanabe T., Sugimoto Y., Ushikubi F., Ohishi H., Ichikawa A., Narumiya S., *Br. J. Pharmacol.*, **116**, 2828—2837 (1995).
 - 32) Namba T., Sugimoto Y., Hirata M., Hayashi Y., Honda A., Watabe A., Negishi M., Ichikawa A., Narumiya S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **184**, 1187—1203 (1992).
 - 33) Ushikubi F., Aiba Y., Nakamura K., Namba T., Hirata M., Mazda O., Katsura Y., Narumiya S., *J. Exp. Med.*, **178**, 1825—1830 (1993).
 - 34) Oida H., Hirata M., Sugimoto Y., Ushikubi Y., Ohishi H., Mizuno N., Ichikawa A., Narumiya S., *FEBS Lett.*, **417**, 53—56 (1997).
 - 35) Hasumoto K., Sugimoto Y., Yamasaki A., Morimoto K., Kakizuka A., Negishi M., Ichikawa A., *J. Reprod. Fertil.*, **109**, 45—51 (1997).
 - 36) Hasumoto K., Sugimoto Y., Gotoh M., Segi E., Yamasaki A., Yamauchi M., Honda H., Hirai H., Negishi M., Kakizuka A., Ichikawa A., *Genes to Cells*, **2**, 571—580 (1997).
 - 37) Sugimoto Y., Namba T., Shigemoto R., Negishi M., Ichikawa A., Narumiya S., *Am. J. Physiol.*, **266**, F823—F828 (1994).
 - 38) Sugimoto Y., Shigemoto R., Namba T., Negishi M., Mizuno N., Narumiya S., Ichikawa A., *Neuroscience*, **62**, 919—928 (1994).
 - 39) Oida H., Namba T., Sugimoto Y., Ushikubi F., Ohishi H., Ichikawa A., Narumiya S., *Br. J. Pharmacol.*, **116**, 2828—2837 (1995).

- 40) Morimoto K., Sugimoto Y., Katsuyama M., Oida H., Tsuboi K., Ishii K., Kinoshita Y., Negishi M., Chiba T., Narumiya S., Ichikawa A., *Am. J. Physiol.*, **272**, G681—G687 (1997).
- 41) Katsuyama M., Sugimoto Y., Morimoto M., Negishi M., Narumiya S., Ichikawa A., *Endocrinol.*, **138**, 344—350 (1997).
- 42) Katsuyama M., Nishigaki N., Sugimoto Y., Morimoto M., Negishi M., Narumiya S., Ichikawa A., *FEBS Lett.*, **344**, 74—78 (1995).
- 43) Sugimoto Y., Yamasaki A., Segi E., Tsuboi K., Aze Y., Nishimura T., Oida H., Yoshida N., Tanaka T., Katsuyama M., Hasumoto K., Murata T., Hirata M., Ushikubi F., Negishi M., Ichikawa A., Narumiya S., *Science*, **277**, 681—684 (1997).
- 44) Dinchuck J. E., Car B. D., Focht R. J., Johnston J. J., Jaffee B. D., Covington M. B., Contel N. R., Eng V. M., Collins R. J., Czeerniak S. A., Gorry S. A., Trazaskos J. M., *Nature* (London), **378**, 406—409 (1995).
- 45) Lim H., Paris B. C., Das S. K., Dinchuck J. E., Langenbach R., Trazaskos J. M., Dey S. K., *Cell*, **91**, 197—208 (1997).
- 46) Nguyen M. T., Camenisch T., Snouwaert J. N., Hicks E., Coffman T. M., Anderson P. A. W., Malouf N. N., Koller B. H., *Nature* (London), **390**, 78—81 (1997).
- 47) Segi E., Sugimoto Y., Yamasaki A., Aze Y., Oida H., Nishimura T., Murata T., Matsuoka T., Ushikubi F., Hirose M., Tanaka T., Yoshida N., Narumiya S., Ichikawa A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **246**, 7—12 (1998).
- 48) Ushikubi F., Segi E., Sugimoto Y., Murata T., Matsuoka T., Kobayashi T., Hizaki H., Tsuboi K., Katsuyama M., Ichikawa A., Tanaka T., Yoshida N., Narumiya S., *Nature* (London), **395**, 281—284 (1998).
- 49) Hizaki H., Segi E., Sugimoto Y., Hirose M., Ushikubi F., Matsuoka T., Noda Y., Tanaka T., Yoshida N., Narumiya S., Ichikawa A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, (in press).
- 50) Murata T., Ushikubi F., Matsuoka T., Hirata M., Yamasaki A., Sugimoto Y., Ichikawa A., Aze Y., Tanaka T., Yoshida N., Ueno A., Oh-ishi S., Narumiya S., *Nature* (London), **388**, 678—682 (1997).
- 51) Taguchi Y., Watanabe T., Kubota H., Hayashi H., Wada H., *J. Biol. Chem.*, **259**, 5214—5221 (1984).
- 52) Ohmori E., Fukui T., Imanishi N., Yatsunami K., Ichikawa A., *J. Biochem.*, **107**, 834—839 (1990).
- 53) Yamamoto J., Yatsunami K., Ohmori E., Sugimoto Y., Fukui T., Ichikawa A., *FEBS Lett.*, **276**, 214—218 (1990).
- 54) Yamamoto J., Fukui T., Suzuki K., Tanaka S., Yatsunami K., Ichikawa A., *Biochim. Biophys. Acta*, **1216**, 431—440 (1993).
- 55) Tanaka S., Nemoto K., Yamamura E., Ichikawa A., *J. Biol. Chem.*, **273**, 8177—8182 (1998).
- 56) Tanaka S., Fukui T., Yamamoto J., Shima Y., Kume T., Ohgo M., Ichikawa A., *Biochim. Biophys. Acta*, **1253**, 9—12 (1995).
- 57) Ichikawa A., Funakoshi E., Tanaka S., Nemoto K., Fukui T., *Inflamm. Res.*, **47**, S46—S47 (1998).
- 58) Suzuki S., Tanaka S., Nemoto K., Ichikawa A., *FEBS Lett.*, **437**, 44—48 (1998).

- 59) Tanaka S., Nemoto K., Ohmura S., Ichikawa A., *FEBS Lett.*, **417**, 203—207 (1997).
- 60) Miyazaki T., Ohgoh M., Emoto S., Ohmori E., Imanishi N., Yatsunami K., Ichikawa A., *Biochim. Biophys. Acta*, **1133**, 179—186 (1992).
- 61) Kawai H., Ohgoh M., Emoto S., Ohmori E., Imanishi N., Yatsunami K., Ichikawa A., *Biochim. Biophys. Acta*, **1133**, 172—178 (1992).
- 62) Ohgoh M., Yamamoto J., Kawata M., Yamamura I., Fukui T., Ichikawa A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **196**, 1113—1119 (1993).
- 63) Yatsunami K., Tsuchikawa M., Kamada M., Hori K., Higuchi D., *J. Biol. Chem.*, **269**, 1554—1559 (1994).
- 64) Yatsunami K., Ohtsu H., Tsuchikawa M., Higuchi T., Ishibashi K., Shida A., Shima Y., Nakagawa A., Yamauchi K., Yamamoto M., Hayashi N., Watanabe T., Ichikawa A., *J. Biol. Chem.*, **270**, 30813—30817 (1995).
- 65) Nakagawa S., Okaya Y., Yatsunami K., Tanaka S., Ohtsu H., Fukui T., Watanabe T., Ichikawa A., *J. Biochem.*, **121**, 935—940 (1997).