

# AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

現代医療 (1995.07) 27巻7号:1873～1886.

プロスタグランジン受容体

牛首文隆、平田雅一、平田多佳子、中村健一、村田隆彦、  
小林拓也、成宮周

# プロスタグランジン受容体

牛首文隆, 平田雅一, 平田多佳子, 中村健一  
 村田隆彦, 小林拓也, 成宮周\*  
 京都大学医学部 薬理 (\*教授)

## はじめに

PGは生理的あるいは病理的な刺激に伴い種々の細胞によって合成される生理活性物質である。PGはその合成直後に細胞外に放出されるが、その生物学的半減期が短いために、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いている。また、PGは生体内において非常に多彩な作用を示すが、それらは各PGに特異的な受容体を介して発揮されている。

従来PG受容体は多くのバイオアッセイ系において、多種類のPGsやその類似物質を用いて、薬理的に研究されてきた。これらの研究を基にColemannらは、PG受容体の薬理的な分類を行っている<sup>1)</sup>。彼らはTX, PGI, PGE, PGF, PGDの特異的受容体を各々TP, IP, EP, FP, DP受容体と名付けた。彼らはさらにEP受容体をEP 1, EP 2, EP 3受容体の3種類のサブタイプに分類した。これらのEP受容体サブタイプは全てPGE<sub>2</sub>を生理的なアゴニストとするが、種々のPGE<sub>2</sub>類似物質に対する反応性が異なっている。また、彼らは最近4番目のEP受容体サブタイプとなるEP 4受容体の存在を報告している<sup>2)</sup>。この受容体はEP 2受容体と同様にアデニレート・サイクラーゼを刺激するが、ある種のリガンドに対する反応性がEP 2受容体とは異なっている。

一方、PG受容体は生化学的にも研究されてきた。その結果、いくつかのPG受容体のリガンド結合の特徴が明らかとなり、受容体がりガンド結合に伴いG蛋白質を活性化することが示唆された。最近になってPG受容体としては初めて、TP受容体がヒト血小板より精製され<sup>3)</sup>、つづいてそのcDNAがクローン化された<sup>4)</sup>。この結果、TP受容体は7回膜貫通構造を持ち、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。さらにホモロジー・クローニングによって、マウスの7種類のPG受容体(TP, IP, EP 1, EP 3, EP 4, FP, DP受容体)の構造が解明された<sup>5~11)</sup>。これらの成果を基にマウス以外の種においてもこれら受容体のホモログがクローン化された。その中には、ヒトおよびラットIP受容体<sup>12~15)</sup>、ヒトEP 1受容体<sup>16)</sup>、ヒトおよびラットEP 4受容体<sup>17~19)</sup>(オリジナルにはEP 2受容体として報告された。下記参照)、ヒト、ラット、ウサギ、ウシEP 3受容体<sup>20~25)</sup>、ヒト、ウシ、ラットFP受容体<sup>26~28)</sup>、ヒトEP 2受容体<sup>29)</sup>が含まれる。

現在まで2種類のクローンがEP 2受容体として報告された。一つは、最初に本田ら<sup>7)</sup>により報告されたマウスのクローンで、つづいてヒトおよびラットで報告されたものである<sup>17~19)</sup>。他方は、Reganら<sup>29)</sup>によって最近報告されたヒトのクローンである。本田ら<sup>7)</sup>は最初アデニレート・サイク

II

DP -----XRCQTSWVGRGSAATMGAVLFGAGLLGNLALVLARSGL--GSGRPGLHP--PPSVFVVCGLT  
 IP MKMNASDGHPPSVTPGSPLSAGGREGWQMGSCWNIITVQDSVGPASTLMFVAGVGNCEALGILG-----ARRRS-----HPSAFVAVTVGLA  
 EP4 MAEVGOTIPRNLQRCVLLTTTIMSPGVNAS-FSSRPERLNSPVTIPAVMFIKGVVGNLVAVIVLV-----CKRKEQ-----KETTFTVVCGLA  
 EP3 -----MAS-----MWAPESHSAHSNLS-ST-TDCCGSVSAAPITMVTGFCVGNALMMLVSR-----SYRRESK-----RKKSFLICIGWLA  
 EP1 -----MSPCGLNLSLDADEAACTAPRFRPVSUPLT-GDNGTSPALPFSMTGAVSNVLAALALAQ-----VAGRRRR-----SAATFLLFVASLL  
 TP -----MWPNGT--SLGACFRPVNHT--LQ-ERRAIA SPWFAASFCALGNSLALSVLAG-----RRPGAG-----PRSSFLALCGLV  
 FP -----MSMNSKQPVSPAAGLIANT-C-QT-ENRL-SVFFSIIFMTVGLLSNLSAIAIMK-----AYQRFRQKS-----KASFLLASGLV

III

DP VTDLLGKCLISPMVLAALAQNSLKEKLLPASGNQCEETPAPLMSFFGLASTQLLARAVERCWLISLGHFFVQRHVTLRRGVLPVVAAFCLAEALPFA  
 IP VTDLLGTCFLSPAVFAVARNSSLLGL-ANGGMNCDTFAAMTFFGLASTLILFRAXVERCIALSHPLYAQLDGPCCRRFALLPSYAFCCFLCSLPPL  
 EP4 VTDLLGTLVSPVTIATYKMGQW-----PG-DQALCDYSTIFLFFGLSGLSIIICAMSERYAIANHAYFHYVDRKRLAGLTLFAIYASNVLFCALPNM  
 EP3 VTDLVGQLTSPVIVLWLSQRRWEQL-DPSG-RECTFFGLTMTVFGLSLVAARRAVERALIRAPHWYASHMK-TTRTPVLLGVWLSVLAFAILPVL  
 EP1 AIDLAGHVIPGALVRLYTAGRA-----PAG-GACHFLGCMVFVFGFLGLLGCCHAVRVCVGTOPLIHAARVSAARRLALAVLAMALVALPLV  
 TP LTDPLGLLVGAIVASQHAALLDW-RATDPC-RECYMGVAMVFFGLCLLGLGARASERFVGTIRPPFSRPTATS-RRQWATVGLVVAAGALGILPPL  
 FP ITDFFGHLINGGIAVFWASDKDWIRFDQ-SNI-LCSIFGISMVFSGLCPLFLGSARAIERCICGVNPIFHS TKITSKHKMILSGVCMFAVFAVAVLPIL

IV

DP GFGKRF-VQYCGTWCFFIQMHEKER-----SFSVICFSLVYSSLMALLVLA TVVCRMGAMNMLYDMHRQR-HYP-----HRCRDRAQSGS  
 IP GIGER-QQYCGSWCFIRMSAQP-----GCCAFSLAYSLLMALLVTSIFFCNCSTVLSYHYMYQQRH-----HGSFVPTSRARE-----  
 EP4 GIGSRKQY-PGTWCFFIDWTNV-----TAYAFSYMKGFSFLIILATVLCVLCGALLRMRQFMRRTSLGTEQHAAAAAASVACRHAGA  
 EP3 HVCYSVQW-PGTWCFFISGPAGNETDPAAREPGSVAFAFAFLGLLALVTVFACTAKAVSRCRA-----  
 EP1 HGRYELQY-PGTWCFFISLGRPG-----GWRQALLAGLGLGLAALLAALVCLNSGLALRARWRRRRRFRKTAGPDRDRRRGSRGPRLASASS  
 TP GIGYSVQY-PGWCFFLTGT-----QRGDVFFGLIFLGLLGSVGLSLLINPVSVATL--CR-----  
 FP GHRDYQIA-SRTWCFFYN--TEHI-----EDWEDRPFYLLPFFSFLGLLALGVSPFSNAVTGVTLELVKFRSQHRQGR-----

V

DP -----DYRHGSLHPLELDHFVLEALMTVLTMCISIPLIY-----RAYYG--AFKLENKARGDSEDLQALRFLSVLSIVDPMLFIFR  
 IP -----DEVYHLILALMTVIMAVCSIPLEMI-----RGFTAAPDS--REMGD--LAFRFRNAPFILDPPWVILFR  
 EP4 SPALQRLSDF-----RRRRFRRIAGAIOMVILMATSILVILICSIPLV-----RVFINOLYQPNVVKDISRNPDLCAIRIASVFIPLDPHILFR  
 EP3 -----KAAVSQSSAOWGRI-TETAIQMGINCMVUSCIPLV-----LMMMLKMIPOMSVQCTMGKKEKCNFLIARVRLASNCIILDPWVYLLR  
 EP1 ASSITSATATLRSRGGARRVHADVEMVGOVIMVUSCICWSPPLV-----LVVLAIGWNSNLQRPV-LIARVRLASNCIILDPWVYLLR  
 TP -----VYHTREATQRDRCEVMNVQVGVIMVAVCVWMPPLVFMQTLITPPVVSFGQLLRATE-HQLIYLRVATWNCIILDPWVYLLR  
 FP -----SHLEMIIOQLAIMCVSVCWSPPLV-----TMANIANGNNSPTVCTE-TT-LEALRMA TWNCIILDPWVYLLR

VII

DP TSWFEMLE-FH-KVF-TRPLIYRNWSHSHSQSNVSTL.....  
 IP KAWFQRKFWLCCLCARSVHGDLQAPLSPASGRDRPPAPPSLQAKEGSVPLSSWGTQVAPLTAVPLTGDDGCSVGFPSKSEAIAACS LC.....  
 EP4 KTWJSKAIEKIKCLFCRIGSGRDSQAHCSESRRTSSAMSGHRSFLARELKEISSTSQTLLYPDLTTESELGRRNLLPFGSHGMGLTQADTTSRLRI  
 EP3 KILBERK-----FCQI-----RDHTNYASSTSPLCPGSSALMWSDDQER.....  
 EP1 QAMLRQLRLLPLRVSA-----KGGPTELGTLKSAWEASLRSRSHSGFSHL.....  
 TP RSVLRRL--HP--RFSSQL-QAV-SLRPPAQAMLGGP.....  
 FP KAVLRNLYKLASRCCGVNIISLH IWELSIKNSLKVAA ISESPAAEKESQASSEAGL.....

EP4 SETSDSSQGQDSESVLLVDEVSGSHREEPASKGNSLQVTFPSETLKLSEKCI

図 1. マウス・プロスタノイド受容体のアミノ酸配列

マウスの PGD 受容体 (DP), PGI 受容体 (IP), 3 種類の PGE 受容体 サブタイプ (EP1, EP3, EP4), TXA 受容体 (TP), PGF 受容体の 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良く保存されたアミノ酸を白抜き強調して示す。

レーザーを刺激するこのクローンをEP 2 受容体としたが、この受容体はEP 2 受容体アゴニストであるブタプロストに対して反応しなかった。一方、Reganら<sup>29)</sup>の報告したものはブタプロストに対して反応した。さらに、最近本田らの報告した受容体がEP 4 受容体特異的リガンドであるAH 23848に反応することが明らかとなった(未発表データ)。これらの結果、我々は本総説において、以前にEP 2 受容体と報告されたもの<sup>7,17-19)</sup>をEP 4 受容体と呼び、Reganらの報告したもの<sup>29)</sup>をEP 2 受容体とする。

以上の研究の結果、すべてのPG 受容体がロドプシン型受容体スーパーファミリーに属し、さらにその中で新しい一つのサブファミリーを形成していることが明らかとなった。本総説ではPG 受容体の構造、機能、分布に関して、最近の研究の進歩をふまえて概説する。

## I. PG 受容体の構造

### 1. ロドプシン型受容体としてのPG 受容体

分子生物学的研究によって現在までに8種類のPG 受容体の一次構造が解明された。その中にはTP, IP, FP, DP 受容体と4種類のEP 受容体サブタイプが含まれる。図1にはマウスDP, IP, EP 1, EP 3, EP 4, TP, FPの各受容体のアミノ酸配列を示す。これらの受容体には他の動物種のものも含めて、細胞膜貫通領域を形成すると考えられる7個の疎水性部位が存在する。この結果、PG 受容体は7回膜貫通構造を示すロドプシン型受容体スーパーファミリーに属することが明らかとなった。PG 受容体と他のロドプシン型受容体とのホモロジーは高くなく、たとえばアドレナリンやムスカリン受容体とのホモロジーは10~20%程度であるが、PG 受容体はロドプシン型受容体としての共通の構造上の特徴を持っている。まず、N-グリコシレーション部位と想定されるアスパラギン残基の存在が挙げられる。これは、すべてのPG 受容体の細胞外アミノ基末端とDP, IP, EP 2 受容体の第一細胞外ループおよび

EP 3, EP 4 受容体の第二細胞外ループに認められる。このような残基のグリコシレーションは精製TP 受容体の解析により証明されている<sup>4)</sup>。精製TP 受容体の分子量(約57 kDa)とアミノ酸組成より計算された分子量(約37 kDa)の差は受容体のグリコシレーションに起因している<sup>30)</sup>。つぎに、多くのロドプシン型受容体では、第一および第二細胞外ループにシステイン残基が保存されている。これらはすべてのPG 受容体においても保存されており、ジスルフィド結合を形成することにより受容体の立体構造の保持に役立っていると考えられる。また、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PG 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PG 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<sup>31)</sup>受容体の脱感作に関与していると考えられている。

このようにPG 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持っているが、一方PG 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1)。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という良く保存された配列が存在する。また、第二細胞外ループと第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。これらの領域は他の種のPG 受容体でも良く保存されており、リガンドであるPG 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のPG 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ル結合部位であるLys<sub>296</sub>との類推からPG 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ている<sup>4,32)</sup>。この仮説を支持する事実として、このアルギニン残基に点突然変異を導入したヒトTP 受容体ではリガンド結

合の消失が認められる<sup>33)</sup>ことが挙げられる。これらの結果 PG 受容体が全体としてロドプシン型受容体スーパーファミリーの中で、新しい受容体サブファミリーを形成していることが明らかとなった。

## 2. PG 受容体の種差

PG 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ホモロジーは 20~30% であり高くはない。しかし、いろいろな種の受容体ホモログ間のホモロジーはかなり高い。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ホモロジーは各々 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。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アミノ酸末端の細胞外部位の長さに差が認められる。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。

PG の作用に種差があることは良く知られている。たとえば PGI 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<sup>34)</sup>。また、ウサギ血小板は TX 類縁体である CTA<sub>2</sub> や PTA<sub>2</sub> 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<sup>35)</sup>。また、TP 受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<sup>36)</sup>。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、受容体の構造上の差異に起因していると思われる。

## 3. PG 受容体の遺伝子構造とアイソフォーム

マウス TP, EP 3, EP 4 受容体の染色体マッピングによって、各々の受容体は第 10, 3, 15 染色体上に位置することが明らかとなった<sup>37)</sup>。一方、PG 受容体の遺伝子構造は、TP 受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 膜貫通領域の終りの部分に位置する 2 個のイントロンによって隔てられた 3 個のエクソンより成ることが明らかとなった<sup>38)</sup>(図 2)。このエクソン-イントロンの関係はマウス DP 受容体<sup>11)</sup>、マウス EP 1 受容体、ヒト EP 3 受容体<sup>23)</sup>でも認められ、PG 受容体で種をこえて保存されている。また、いくつかの PG 受容体においてはカル

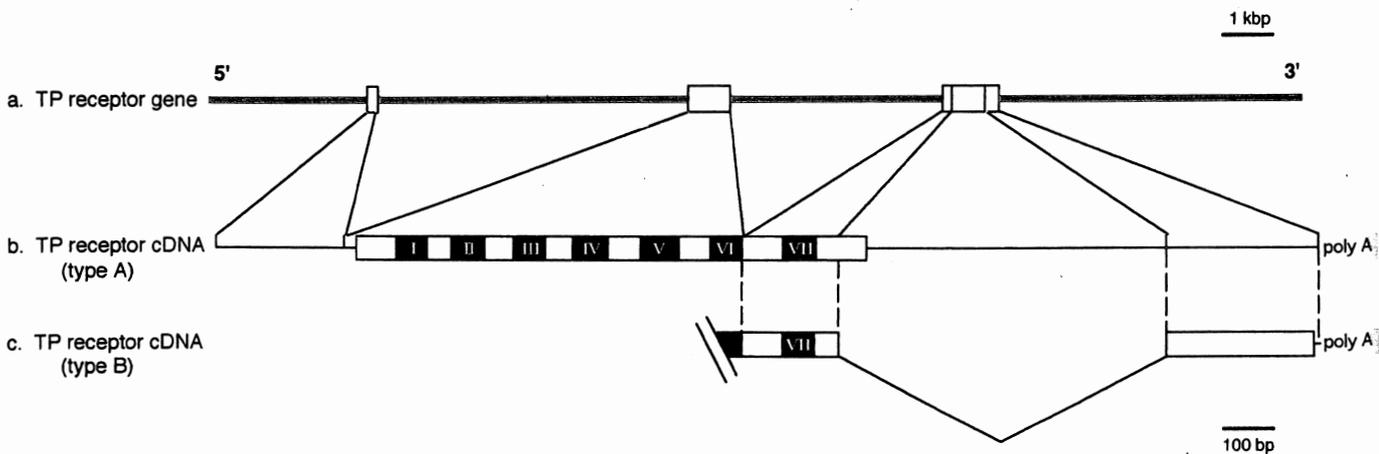


図 2. ヒト TP 受容体遺伝子と cDNA の構造模式図

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 と 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。

ボキシル末端にさらにエクソンが存在し、これらのエクソンの alternative splicing によって受容体アイソフォームが生成する(図2)。これは最初にマウス、ウシ、ウサギ、ヒト EP 3 受容体で見いだされ<sup>20,23~25,39~41)</sup>、最近ヒト TP 受容体でも報告された<sup>42)</sup>。この alternative splicing は第7膜貫通部位の直後で起き、カルボキシル末端の構造のみ異にするさまざまな受容体アイソフォームが形成される。EP 3 および TP 受容体アイソフォーム間では各々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 受容体アイソフォームは各々異なる G 蛋白と関連し異なった情報伝達を行う<sup>20)</sup>。さらに、マウス EP 3 受容体アイソフォームはその G 蛋白との関連の効率や、アゴニストによって誘導される脱感作の感受性に差が認められる<sup>39,40)</sup>。このようなアイソフォーム間での差は、TP 受容体アイソフォームではまだ報告されていない。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強い<sup>23)</sup>。一方、二つのヒト TP 受容体アイソフォームのカルボキシル末端の構造はマウス TP 受容体のものと異なることから、TP 受容体にも他のアイソフォームが存在する可能性がある。現在までアイソフォームの存在は EP 3 および TP 受容体でのみ報告されているが、他の PG 受容体においても存在する可能性は否定できない。

#### 4. PG 受容体の分子進化

PG 受容体は機能的に弛緩性、収縮性および抑制性受容体の3種類に分類できる。弛緩性受容体には IP, DP, EP 2, EP 4 受容体が含まれ、cAMP の上昇を介して平滑筋の弛緩を来す。一方、収縮性受容体は TP, FP, EP 1 受容体より成り、Ca<sup>2+</sup> イオンの上昇を介して平滑筋の収縮を惹起する。また、抑制性受容体として EP 3 受容体があり、cAMP 上昇の抑制を介して平滑筋の弛緩を抑制

する。これらの機能的に同一のグループに所属する受容体間でのアミノ酸配列のホモロジーは異種グループの受容体間のホモロジーより高い。たとえばマウス IP と DP 受容体、マウス DP と EP 4 受容体、ヒト EP 2 と IP 受容体の全体のホモロジーは各々39, 32, 44%であり、収縮性受容体の膜貫通領域のホモロジーは約50%である。また、抑制性受容体である EP 3 受容体と他のグループの受容体とのホモロジーは30%以下である。さらに、EP 受容体のサブタイプ間でのホモロジーは各サブタイプ受容体とその所属するグループの受容体とのホモロジーより低いことは注目に値する。これらの結果は PG 受容体の分子進化としてまず EP 受容体の各サブタイプ受容体が共通のプロトタイプに相当する EP 受容体から進化し、ついでさらに機能的に関連する受容体群を形成するように進化してきたことを示唆している。

## II. PG 受容体の機能

### 1. リガンド結合

クローン化されたマウス PG 受容体とヒト EP 2 受容体のリガンド結合の特徴を表1にまとめて示す。各受容体とその固有なリガンドとの結合の *K<sub>d</sub>* 値は1.3-40 nM である。一方、ほとんどの PG はその固有な受容体以外の PG 受容体にクロスして結合するが、通常その結合の親和性は固有の受容体に対するものより100倍以上弱い。しかし、複数の PG 受容体に対して強い結合を示すリガンドがいくつか存在する。たとえばよく知られた IP 受容体アゴニストであるイロプロストは EP 1 受容体に対して PGE<sub>2</sub> とほぼ同程度の親和性を示す<sup>8)</sup>。この結果は PGI<sub>2</sub> やイロプロストを含めた何種類かの IP 受容体アゴニストがいくつかの組織において EP 1 受容体を介した平滑筋の収縮を引き起こすという報告<sup>34,43)</sup> と一致する。逆に PGE<sub>1</sub> は IP 受容体アゴニストであるカルバサイクリンよりも強く IP 受容体に結合する<sup>10)</sup>。これらの結果は、複数の PG 受容体を含む組織において PG の作用を検討する際に常にこのような交叉反

表 1. クローン化されたプロスタノイド受容体のリガンド結合の特徴

Type	Subtype	Kd(nM) ligand	Rank order of binding affinity <sup>+</sup>
Tp		1.2 [ <sup>3</sup> H]S-145	S-145>ONO-3708>STA <sub>2</sub> >PGD <sub>2</sub> >PGE <sub>2</sub> , PGF <sub>2</sub> α
EP	EP <sub>1</sub>	21 [ <sup>3</sup> H]PGE <sub>2</sub>	PGE <sub>2</sub> ≥iloprost>PGE <sub>1</sub> >PGF <sub>2</sub> α>PGD <sub>2</sub> 17-phenyl-PGE <sub>2</sub> >sul*≫AH*, buta*
	EP <sub>2</sub>	40(?) [ <sup>3</sup> H]PGE <sub>2</sub>	PGE <sub>2</sub> =PGE <sub>1</sub> ≫PGD <sub>2</sub> , PGF <sub>2</sub> α 11-deoxy-PGE <sub>1</sub> =16, 16-dimethyl-PGE <sub>2</sub> >buta> AH-13205, 19(R)-OH* > 1-OH*, M&B≫sul=0
	EP <sub>3</sub>	3 [ <sup>3</sup> H]PGE <sub>2</sub>	PGE <sub>2</sub> =PGE <sub>1</sub> ≫iloprost>PGD <sub>2</sub> >PGE <sub>2</sub> α M&B≫buta, SC-19220=0
	EP <sub>4</sub>	11 [ <sup>3</sup> H]PGE <sub>2</sub>	PGE <sub>2</sub> =PGE <sub>1</sub> ≫PGD <sub>2</sub> , PGF <sub>2</sub> α, iloprost 11-deoxy-PGE <sub>1</sub> >misoprostol, M&B>AH 23848≫sul, buta=0
FP		1.3 [ <sup>3</sup> H]PGF <sub>2</sub> α	PGF <sub>2</sub> α>9 α, 11 β-PGF <sub>1</sub> α>PGD <sub>2</sub> >STA <sub>2</sub> > PGE <sub>2</sub> >iloprost
IP		4.5 [ <sup>3</sup> H]iloprost	cicaprost>iloprost>PGE <sub>1</sub> >carbacyclin>PGD <sub>2</sub> , PGE <sub>2</sub> , STA <sub>2</sub> >PGF <sub>2</sub> α
DP		40 [ <sup>3</sup> H]PGD <sub>2</sub>	PGD <sub>2</sub> >BW 245 C>BWA 868 C>STA <sub>2</sub> >PGE <sub>2</sub> > iloprost>PGF <sub>2</sub> α

\*種々のリガンドの受容体に対する親和性は結合競合実験によって決定された。

EP 受容体サブタイプの項目では、上段が“標準”のプロスタノイドの、下段が種々の類縁体の結合のランク・オーダーを示す。

\*sul : sulprostone, M&B : M&B-28767, AH : AH-6809, buta : butaprost, 19(R)-OH : 19(R)-OH-PGE<sub>2</sub>, 1-OH : 1-OH-PGE<sub>1</sub>

応の存在を考慮する必要があることを示している。クローン化された4種類のEP受容体サブタイプのリガンド結合の特性については多種類のリガンドを用いて詳細に検討され、その結果は薬理学的な実験からのものと良く一致している<sup>1)</sup>。たとえばEP1受容体はPGE<sub>2</sub>やイロプロストに対してPGE<sub>1</sub>より約10倍強い親和性を示すが、他の三つのサブタイプはPGE<sub>1</sub>とPGE<sub>2</sub>に対してほぼ同じ親和性を示し、イロプロストに対する親和性はかなり弱い。また、PG類似物質では17-phenyl-PGE<sub>2</sub>とM&B-28767がそれぞれEP1およびEP3受容体に最も強い親和性を示し、11-deoxy-PGE<sub>1</sub>はEP2およびEP4受容体に対する最良のリガンドである。これらの結果EP2およびEP4受容体は両者とも薬理的に定義された“弛緩性PGE受容体”に類似したリガンド結合特異性を示す。しかし、この両者にはそのリガンド結合の特異性にいくつかの違いが存在する。一

つはブタプロストに対するものであり、EP2受容体はブタプロスト感受性であるが、EP4受容体は非感受性である。一方、クローン化されたEP4受容体はよく知られたEP2受容体アゴニストであるミソプロストールとEP4受容体アンタゴニストであるAH 23848に対して感受性を示す。ミソプロストールのEP2受容体に対する親和性に関してはまだ報告がない。

## 2. 情報伝達

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ネイティブな受容体を用いて解析されたが、こ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的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

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			G <sub>q</sub> , G <sub>i</sub> , G <sub>12</sub> , G <sub>13</sub>	PI response, cAMP ↓	
EP	EP <sub>1</sub>		G(?)	Ca <sup>2+</sup> ↑	
	EP <sub>2</sub>		G <sub>s</sub> (?)	cAMP ↑	
	EP <sub>4</sub>		G <sub>s</sub>	cAMP ↑	
	EP <sub>3</sub>	EP <sub>3A</sub>		G <sub>i</sub>	cAMP ↓
		EP <sub>3B</sub>		G <sub>s</sub>	cAMP ↑
		EP <sub>3C</sub>		G <sub>s</sub>	cAMP ↑
		EP <sub>3D</sub>		G <sub>i</sub> , G <sub>s</sub> , G <sub>q</sub>	cAMP ↓, cAMP ↑, PI response
FP			G <sub>q</sub>	PI response	
IP			G <sub>s</sub> , G <sub>q</sub>	cAMP ↑, PI response	
DP			G <sub>s</sub>	cAMP ↑	

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たものを示す。TP と EP<sub>2</sub> 受容体はヒト、EP<sub>3</sub> 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。

G<sub>q</sub><sup>44</sup>, G<sub>q</sub> と未同定の 85 kD の G 蛋白質<sup>45</sup>, G<sub>q</sub> と G<sub>12</sub><sup>46</sup>, G<sub>12</sub> と G<sub>13</sub><sup>47</sup> が含まれる。一方、いくつかの薬理学的研究は種々の組織<sup>48,49</sup> においてのみならず単一の細胞である血小板<sup>50,51</sup> 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、最近見いだされた TP 受容体変異<sup>52</sup> は興味深い。この変異はヒト血小板 TP 受容体の Arg<sup>60</sup> 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 A<sub>2</sub> の活性化は可能である<sup>53</sup>。

EP<sub>1</sub> 受容体に連関する G 蛋白質は不明である。EP<sub>1</sub> 受容体は CHO 細胞において PGE<sub>2</sub> による Ca<sup>2+</sup> イオンの上昇を仲介する。この細胞内 Ca<sup>2+</sup> イオンの上昇は細胞外 Ca<sup>2+</sup> 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<sup>6</sup>。この結果は、EP<sub>1</sub> 受容体は未同定の G 蛋白質を介して Ca チャンネルの制御をしている可能性を示唆している。EP<sub>2</sub> と EP<sub>4</sub> 受容体は G<sub>s</sub> 蛋白質と連関し、細胞内 cAMP 濃度の上昇を惹起する。EP<sub>3</sub> 受容体の主要な情報伝達経路は G<sub>i</sub> 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 EP<sub>3</sub> 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、ある受容体アイソフォームは 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 EP<sub>3A</sub> 受容体は G<sub>i</sub> 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、EP<sub>3B</sub> と EP<sub>3C</sub> 受容体は G<sub>s</sub> 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、EP<sub>3D</sub> 受容体は G<sub>i</sub> および G<sub>s</sub> 蛋白質に加えて G<sub>q</sub> 蛋白質とも連関して百日咳毒素非感受性の PI 代謝回転を惹起する<sup>20</sup>。一方、ウシ EP<sub>3C</sub> 受容体は通常受容体機能である G 蛋白質(G<sub>s</sub>)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 G<sub>o</sub> 蛋白質の GDP に対する親和性が上昇し、G<sub>o</sub> 蛋白質の機能が抑制される<sup>54</sup>。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 EP<sub>3</sub> 受容体を介する情報伝達経路の多様性<sup>1,55,56</sup> 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、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<sup>10)</sup>。この結果はいくつかの培養細胞においてPGI<sub>2</sub>が細胞内Ca<sup>2+</sup>イオン濃度の上昇を引き起こすという報告<sup>57,58)</sup>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G<sub>s</sub>蛋白質と関連し、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代謝回転は認められない。

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、イロprostはIP受容体を発現したCHO細胞においてEC<sub>50</sub>値100 pMでcAMP濃度の上昇を引き起こす。同様に、PGE<sub>2</sub>はEP3受容体を発現したCHO細胞においてIC<sub>50</sub>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各々の結合の*Kd*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<sup>34)</sup>、またイヌ腎臓の皮質集合管ではPGE<sub>2</sub>はpMオーダーでcAMP濃度を低下させバソプレシンの作用に拮抗する<sup>59)</sup>。一方、このような効率の違い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、受容体発現系においてイロprostによって刺激されるPI代謝回転のEC<sub>50</sub>値は100 pMであり、この値はイロprostによって刺激されるcAMP濃度の上昇のEC<sub>50</sub>値より1000倍程度高い<sup>10)</sup>。

分子生物学的手法を用いた研究によってプロスタノイド受容体の多くの特徴が解明されてきているが、いくつかの受容体機能に関しては不明な点

が残されている。たとえば、成長因子の情報伝達経路には蛋白質のチロシンリン酸化が関与し、これが細胞の増殖や形質転換に重要な役割を果たすことはよく知られている<sup>60)</sup>。いくつかのプロスタノイドも培養細胞において増殖反応を惹起することが報告されている。それらの報告には、TXA<sub>2</sub><sup>61-63)</sup>、PGI<sub>2</sub><sup>58)</sup>、PGF<sub>2α</sub><sup>64)</sup>が含まれる。さらにTXA<sub>2</sub>アゴニストが血小板において数種類の蛋白質のチロシンリン酸化を惹起し<sup>65)</sup>、p72<sup>src</sup>を活性化する<sup>66)</sup>ことが報告されている。同様にPGF<sub>2α</sub>はNIH-3T3細胞においてp125<sup>FAK</sup>を含む数種の蛋白質のチロシンリン酸化を引き起こす<sup>67)</sup>。これらの結果はプロスタノイドによって惹起される細胞増殖反応の情報伝達経路においても蛋白質のチロシンリン酸化が関与している可能性を示唆している。この情報伝達機構の詳細については不明であるが、これらも近い将来解明されることが期待される。

### III. PG受容体の分布

従来の薬理的・生化学的研究は、PG受容体が生体の多くの組織に存在することを見いだしてきた。しかし、一般的にPG受容体の発現レベルが低いことや、一つの組織に複数のPG受容体が発現していることが多いことから、各PG受容体の詳細な分布や細胞内の局在については不明のままであった。分子生物学はこの問題の解決手段を提供し、その結果ノーザン・ブロット解析や*in situ* hybridization解析によってPG受容体の分布に関する新たな知見が得られつつある。

#### 1. ノーザン・ブロット解析

PG受容体mRNAの発現をノーザン・ブロット解析により検討し明らかとなったヒトとマウスのPG受容体の組織分布を表3に示す。これらの解析の結果、各PG受容体は生体内でそれぞれ特異的な分布を示し、その発現量は各組織によって異なることが明らかとなった。

これらの知見の一部は従来の研究結果と良く一致するが、まったく新しい受容体分布も見いだし

表 3. ヒトおよびマウスの種々の組織におけるプロスタノイド受容体 mRNA の発現分布

Organs	Expression level of mRNA*										
	mDP	mTP	mIP	hIP	mEP <sub>1</sub>	hEP <sub>2</sub>	mEP <sub>3</sub>	hEP <sub>3</sub>	mEP <sub>4</sub>	hEP <sub>4</sub>	mFP
Brain	±	+	-	-	-	-	±	-	-	±	-
Heart	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-
Lung	+	++	+	++	+	+	+	-	++	++	-
Thymus	-	+++	+++	-	-	n.d.*	-	-	++	+	-
Liver	-	-	-	++	-	±	-	-	-	-	-
Stomach	+	-	-	n.d.	-	n.d.	+++	n.d.	+	n.d.	-
Spleen	-	++	++	±	-	n.d.	±	-	++	+	-
Kidney	-	+	+	++	++	±	+++	+++	-	++	++
Ileum	+++	-	-	+	-	n.d.	-	-	+++	++	-
Testis	±	-	-	n.d.	-	n.d.	-	-	-	+	-
Uterus	+	+	-	n.d.	-	n.d.	++	n.d.	+	+	-
Ovary	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	+++

\*発現量は-, ±, +, ++, +++の順に多くなっている。

\*n.d.: not determined

れ、これが種々の組織における PG の作用の解析を促進した。たとえば、TP 受容体はマウスでは胸腺に最も多く発現しているが、胸腺での TX の作用はまったく知られていなかった。ついで行われた放射性リガンドを用いた結合実験により、TP 受容体の発現量は未熟な胸腺細胞である CD 4<sup>-</sup> 8<sup>-</sup> や CD 4<sup>+</sup> 8<sup>+</sup> 細胞に最も多く、それが T 細胞の成熟とともに減少していることが明らかとなった。さらに、TP 受容体アゴニストが未熟胸腺細胞にアポトーシスによる細胞死を誘導することが示された<sup>68)</sup>。この結果は、TP 受容体がよく知られた心血管系や呼吸器系での役割以外に胸腺細胞の分化や成熟に何らかの役割を持つことを示唆している。

表 3 に示すように、いくつかの受容体ではその組織分布に種差が存在する。たとえば、IP 受容体の発現量はマウスにおいては胸腺で最も多くついで脾臓で多い。しかしヒトのこれらの組織での IP 受容体の発現は認められない。同様の種差は IP, EP 3, EP 4 受容体の各々肝臓, 心臓, 腎臓での発現においても認められる(表 3)。これらの結果は、従来薬理学的研究によって見いだされていたプロスタノイドの作用における種差<sup>69)</sup>の一部がこのような PG 受容体の分布の種差に起因している可能性を示唆する。

## 2. *In situ* hybridization 法を用いた解析

いくつかのクローン化受容体に対して *in situ* hybridization 法による解析が実施され、PG 受容体の臓器あるいは組織内の詳細な発現分布が明らかにされてきている。そうした解析の結果はいくつかのよく知られたプロスタノイドの作用を組織学的に説明する基盤を提供した。たとえば、腎臓における PGE 受容体の発現分布を *in situ* hybridization 法によって解析した結果<sup>70,68)</sup>、EP 3 受容体はおもに腎髄質の尿細管上皮に、EP 1 受容体は乳頭部の集合管に、EP 4 受容体は腎糸球体に発現していた。そして、これらの発現分布はそれぞれ PGE<sub>2</sub> によるイオン輸送、水の再吸収、糸球体濾過の調節に関係していると考えられる。また、神経系における同様の解析により脊髄後根神経節の小型ニューロンに EP 3 受容体が多く発現していることが明らかにされた<sup>69)</sup>。この結果は、PGE<sub>2</sub> によって惹起される痛覚過敏反応に EP 3 受容体が関与することを示唆している。また、表 2 に示すように TP 受容体以外に IP および EP 4 受容体が胸腺に最も多く発現している。さらに *in situ* hybridization 法による解析によって、これらの受容体は胸腺内でそれぞれ異なった発現分布をしていることが明らかとなった。つまり、これらの受容体はすべて胸腺細胞に発現していたが、TP

受容体は胸腺の皮質に、IP 受容体は胸腺の髄質<sup>10)</sup>に最も多く発現しており、EP 4 受容体は胸腺全体に広汎に発現していた。

ノーザン・ブロット解析や *in situ* hybridization 法によって PG 受容体の詳細なあるいは新たな発現分布が解明されてきたが、これらの方法では細胞のどの部位に受容体が存在するかは解析することはできない。この細胞における局在の解明は、神経細胞や極性を持った細胞にとっては重要な意義を持っている。PG 受容体の一次構造が解明された現在、それをもとに抗受容体抗体を作成することが可能になっている。したがって、近い将来このような抗体を用いた免疫組織化学的な研究によって、PG 受容体の組織あるいは細胞レベルでのより詳細な発現分布が解明されると思われる。

#### おわりに

分子生物学的研究によって PG 受容体の構造、機能、分布が明らかとなってきたが、プロスタノイドの生体における生理的あるいは病態生理的役割を十分理解するためにはまだ多くの未解決の問題が残されている。また、現在までにクローン化された PG 受容体は薬理的に同定された受容体タイプやサブタイプと一致している、しかし EP 受容体サブタイプや EP 3 受容体アイソフォームのようにさらに新規の受容体タイプやサブタイプが発見される可能性が残されている。また、PG 受容体の新しい機能も *in situ* hybridization 法や免疫組織化学的な研究による受容体の発現分布の解明に伴って発見されてくると考えられる。一方、キメラ受容体や変異受容体の解析によって PG 受容体のリガンド結合部位や情報伝達部位の解明がなされると思われる。さらに近い将来、受容体欠損マウスを用いた解析によって各 PG 受容体の生体における生理的あるいは病態生理的役割が解明されることが期待される。

#### 文 献

- 1) Coleman, R.A., Kennedy, I., Humphrey, P.P.A., Bunce, K. and Lumley, P.: Prostanoids and their receptors. *In*: Comprehensive Medicinal Chemistry, Vol. 3: Membranes and Receptors, ed. by Emmett, J.C., pp. 643-714, Pergamon Press, Oxford, UK, 1990.
- 2) Coleman, R.A., Grix, S.P., Head, S.A., Louttit, J.B., Mallett, A. and Sheldrick, R.L.G.: A novel inhibitory receptor in piglet saphenous vein. *Prostaglandins*, **47**:151-168, 1994.
- 3) Ushikubi, F., Nakajima, M., Hirata, M., Okuma, M., Fujiwara, M. and Narumiya, S.: Purification of the thromboxane A<sub>2</sub>/prostaglandin H<sub>2</sub> receptor from human blood platelets. *J. Biol. Chem.*, **264**: 16496-16501, 1989.
- 4) Hirata, M., Hayashi, Y., Ushikubi, F., Yokota, Y., Kageyama, R., Nakanishi, S. and Narumiya, S.: Cloning and expression of cDNA for a human thromboxane A<sub>2</sub> receptor. *Nature*, **349**: 617-620, 1991.
- 5) Namba, T., Sugimoto, Y., Hirata, M., Hayashi, Y., Honda, A., Watabe, A., Negishi, M., Ichikawa, A. and Narumiya, S.: Mouse thromboxane A<sub>2</sub> receptor; cDNA cloning, expression and northern blot analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **184**: 1187-1203, 1992.
- 6) Sugimoto, Y., Namba, T., Honda, A., Hayashi, Y., Negishi, M., Ichikawa, A. and Narumiya, S.: Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP3 subtype. *J. Biol. Chem.*, **267**: 6463-6466, 1992.
- 7) Honda, A., Sugimoto, Y., Namba, T., Watabe, A., Irie, A., Negishi, M., Narumiya, S. and Ichikawa, A.: Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP2 subtype. *J. Biol. Chem.*, **268**: 7759-7762, 1993.
- 8) Watabe, A., Sugimoto, Y., Honda, A., Irie, A., Namba, T., Negishi, M., Ito, S., Narumiya, S. and Ichikawa, A.: Cloning and expression of cDNA for a mouse EP1 subtype of prostaglandin E receptor. *J. Biol. Chem.*, **268**: 20175-20178, 1993.
- 9) Sugimoto, Y., Hasumoto, K., Namba, T., Irie, A., Katsuyama, M., Negishi, M., Kakizuka, A., Narumiya, S. and Ichikawa, A.: Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin F receptor. *J. Biol. Chem.*, **269**: 1356-1360, 1994.
- 10) Namba, T., Oida, H., Sugimoto, Y., Kakizuka, A., Negishi, M., Ichikawa, A. and Narumiya, S.: cDNA cloning of a mouse prostacyclin

receptor ; multiple signalling pathways and expression in thymic medulla. *J. Biol. Chem.*, **269** : 9986-9992, 1994.

- 11) Hirata, M., Kakizuka, A., Aizawa, M., Ushikubi, F. and Narumiya, S. : Molecular characterization of a mouse prostaglandin D receptor and functional expression of the cloned gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91** : 11192-11196, 1994.
- 12) Boie, Y., Rushmore, T.H., Darmon-Goodwin, A., Grygorczyk, R., Slipets, D.M., Metters, K. M. and Abramovitz, M. : Cloning and expression of a cDNA for the human prostanoid IP receptor. *J. Biol. Chem.*, **269** : 12173-12178, 1994.
- 13) Katsuyama, M., Sugimoto, Y., Namba, T., Irie, A., Negishi, M., Narumiya, S. and Ichikawa, A. : Cloning and expression of a cDNA for the human prostacyclin receptor. *FEBS Lett.*, **344** : 74-78, 1994.
- 14) Nakagawa, O., Tanaka, I., Usui, T., Harada, M., Sasaki, Y., Itoh, H., Yoshimasa, T., Namba, T., Narumiya, S. and Nakao, K. : Molecular cloning of human prostacyclin receptor cDNA and its gene expression in cardiovascular system. *Circulation*. **90** : 1643-1647, 1994.
- 15) Sasaki, Y., Usui, T., Tanaka, I., Nakagawa, O., Sando, T., Takahashi, T., Namba, T., Narumiya, S. and Nakao, K. : Cloning and expression of a cDNA for rat prostacyclin receptor. *Biochim. Biophys. Acta*, **1224** : 601-605, 1994.
- 16) Funk, C.D., Furci, L., FitzGerald, G.A., Grygorczyk, R., Rochette, C., Bayne, M.A., Abramovits, M., Adam, M. and Metters, K.M. : Cloning and expression of a cDNA for the human prostaglandin E receptor EP<sub>1</sub> subtype. *J. Biol. Chem.*, **268** : 26767-26772, 1993.
- 17) An, S., Yang, J., Xia, M. and Goetzl, E.J. : Cloning and expression of the EP<sub>2</sub> subtype of human receptors for prostaglandin E<sub>2</sub>. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **197** : 263-270, 1993.
- 18) Bastien, L., Sawyer, N., Grygorczyk, R., Metters, K.M. and Adam, M. : Cloning, functional expression, and characterization of the human prostaglandin E<sub>2</sub> receptor EP<sub>2</sub> subtype. *J. Biol. Chem.*, **269** : 11873-11877, 1994.
- 19) Sando, T., Usui, T., Tanaka, I., Mori, K., Sasaki, Y., Fukuda, Y., Namba, T., Sugimoto, Y., Ichikawa, A., Narumiya, S. and Nakao, K. : Molecular cloning and expression of rat prostaglandin E receptor EP<sub>2</sub> subtype. *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. and Narumiya, S. : Alternative splicing of C-terminal tail of prostaglandin E receptor subtype EP<sub>3</sub> determines G-protein specificity. *Nature*, **365** : 166-170, 1993.
- 21) Takeuchi, K., Abe, T., Takahashi, N. and Abe, K. : Molecular cloning and intrarenal localization of rat prostaglandin E<sub>2</sub> receptor EP<sub>3</sub> subtype. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **194** : 885-891, 1993.
- 22) Yang, J., Xia, M., Goetzl, E.J. and An, S. : Cloning and expression of the EP<sub>3</sub>-subtype of human receptors for prostaglandin E<sub>2</sub>. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **198** : 999-1006, 1994.
- 23) Regan, J.W., Bailey, T.J., Donello, J.E., Pierce, K.L., Pepperl, D.J., Zhang, D., Kedzie, K.M., Fairbairn, C.E., Bogardus, A.M., Woodward, D.F. and Gil, D.W. : Molecular cloning and expression of human EP<sub>3</sub> receptors ; evidence of three variants with differing carboxyl termini. *Br. J. Pharmacol.*, **112** : 377-385, 1994.
- 24) Breyer, R.M., Emeson, R.B., Tarng, J.L., Breyer, M.D., Davis, L.S., Abramson, R.M. and Ferrenbach, S.M. : Alternative splicing generates multiple isoforms of a rabbit prostaglandin E<sub>2</sub> receptor. *J. Biol. Chem.*, **269** : 6163-6169, 1994.
- 25) Adam, M., Boie, Y., Rushmore, T.H., Müller, G., Bastien, L., McKee, K.T., Metters, K.M. and Abramovitz, M. : Cloning and expression of the human EP<sub>3</sub> prostanoid receptor. *FEBS Lett*, **338** : 170-174, 1994.
- 26) Abramovitz, M., Boie, Y., Nguyen, T., Rushmore, T.H., Bayne, M.A., Metters, K.M., Slipets, D.M. and Grygorczyk, R. : Cloning and expression of a cDNA for the human prostanoid FP receptor. *J. Biol. Chem.*, **269** : 2632-2636, 1994.
- 27) Sakamoto, K., Ezashi, T., Miwa, K., Okuda-Ashitaka, E., Houtani, T., Sugimoto, T., Ito, S. and Hayaishi, O. : Molecular cloning and expression of a cDNA of the bovine prostaglandin F<sub>2α</sub> receptor. *J. Biol. Chem.*, **269** : 3881-3886, 1994.
- 28) Kitanaka, J., Hashimoto, H., Sugimoto, Y., Negishi, M., Aino, H., Gotoh, M., Ichikawa, A. and Baba, A. : Cloning and expression of a cDNA for rat prostaglandin F<sub>2α</sub> receptor. *Prostaglandins*, **48** : 31-41, 1994.
- 29) Regan, J.W., Bailey, T.J., Pepperl, D.J., Pierce, K.L., Bogardus, A.M., Donello, J.E., Fairbairn, C.E., Kedzie, K.M., Woodward, D.F. and Gil, D.W. : Cloning of a novel human prostaglandin

- receptor with characteristics of pharmacologically defined EP<sub>2</sub> subtype. *Mol. Pharmacol.*, **46** : 213-220, 1994.
- 30) Mais, D.E., True, T.A. and Martinelli, M.J. : Characterization of the human thromboxane A<sub>2</sub>/prostaglandin H<sub>2</sub> receptor ; evidence for N-glycosylation. *Eur. J. Pharmacol.*, **227** : 267-274, 1992.
  - 31) Hausdorff, W.P., Caron, M.G. and Lefkowitz, R.J. : Turning off the signal : desensitization of  $\beta$ -adrenergic receptor function. *FASEBJ.*, **4** : 2881-2889, 1990.
  - 32) Narumiya, S., Hirata, M., Namba, T., Hayashi, Y., Ushikubi, F., Sugimoto, Y., Negishi, M. and Ichikawa, A. : Structure and function of prostanoicid receptors. *J. Lipid Mediators*, **6** : 155-161, 1993.
  - 33) Funk, C.D., Furci, L., Moran, N. and Fitzgerald, G.A. : Point mutation in the seventh hydrophobic domain of the human thromboxane A<sub>2</sub> receptor allows discrimination between agonist and antagonist binding sites. *Mol. Pharmacol.*, **44** : 934-939, 1993.
  - 34) Armstrong, R.A., Lawrence, R.A., Jones, R.J., Wilson, N.H. and Collier, A. : Functional and ligand binding studies suggest heterogeneity of platelet prostacyclin receptors. *Br. J. Pharmacol.*, **97** : 657-668, 1989.
  - 35) Burke, S.E., Lefer, A.M., Nicolaou, K.C., Smith, G.M. and Smith, J.B. : Responsiveness of platelets and coronary arteries from different species to synthetic thromboxane and prostaglandin endoperoxide analogues. *Br. J. Pharmacol.*, **78** : 287-292, 1983.
  - 36) Narumiya, S., Okuma, M. and Ushikubi, F. : Binding of a radioiodinated 13-azapinane thromboxane antagonist to platelets : correlation with antiaggregatory activity in different species. *Br. J. Pharmacol.*, **88** : 323-331, 1986.
  - 37) Taketo, M., Rochelle, J.M., Sugimoto, Y., Namba, T., Honda, A., Negishi, M., Ichikawa, A., Narumiya, S. and Seldin, M.F. : Mapping of the genes encoding mouse thromboxane A<sub>2</sub> receptor and prostaglandin E receptor subtypes EP<sub>2</sub> and EP<sub>3</sub>. *Genomics*, **19** : 585-588, 1994.
  - 38) Nüsing, R.M., Hirata, M., Kakizuka, A., Eki, T., Ozawa, K. and Narumiya, S. : Characterization and chromosomal mapping of the human thromboxane A<sub>2</sub> receptor gene. *J. Biol. Chem.*, **268** : 25253-25259, 1993.
  - 39) Sugimoto, Y., Negishi, M., Hayashi, Y., Namba, T., Honda, A., Watabe, A., Hirata, M., Narumiya, S. and Ichikawa, A. : Two isoforms of the EP<sub>3</sub> receptor with different carboxyl-terminal domains : identical ligand binding properties and different coupling properties with G<sub>i</sub> proteins. *J. Biol. Chem.*, **268** : 2712-2718, 1993.
  - 40) Negishi, M., Sugimoto, Y., Irie, A., Narumiya, S. and Ichikawa, A. : Two isoforms of prostaglandin E receptor EP<sub>3</sub> subtype. *J. Biol. Chem.*, **268** : 9517-9521, 1993.
  - 41) Irie, A., Sugimoto, Y., Namba, T., Harazono, A., Honda, A., Watabe, A., Negishi, M., Narumiya, S. and Ichikawa, A. : Third isoform of the prostaglandin E receptor EP<sub>3</sub> subtype with different C-terminal tail coupling to both stimulation and inhibition of adenylate cyclase. *Eur. J. Biochem.*, **217** : 313-318, 1993.
  - 42) Raychowdhury, M.K., Yukawa, M., Collins, L. J., McGrail, S.H., Kent, K.C. and Ware, J.A. : Alternative splicing produces a divergent cytoplasmic tail in the human endothelial thromboxane A<sub>2</sub> receptor. *J. Biol. Chem.*, **269** : 19256-19261, 1994.
  - 43) Dong, Y.J. and Jones, R.L. : Effects of prostaglandin and thromboxane analogues on bullock and dog iris sphincter preparations. *Br. J. Pharmacol.*, **76** : 149-155, 1982.
  - 44) Shenker, A., Goldsmith, P., Unson, C. and Spiegel, A. : The G protein coupled to the thromboxane A<sub>2</sub> receptor in human platelets is a member of the novel G<sub>q</sub> family. *J. Biol. Chem.*, **266** : 9309-9313, 1991.
  - 45) Knezevic, I., Borg, C. and Le Breton, G.C. : Identification of G<sub>q</sub> as one of the G proteins which copurify with human platelet thromboxane A<sub>2</sub>/prostaglandin H<sub>2</sub> receptors. *J. Biol. Chem.*, **268** : 26011-26017, 1993.
  - 46) Ushikubi, F., Nakamura, K. and Narumiya, S. Functional reconstitution of platelet thromboxane A<sub>2</sub> receptor with G<sub>q</sub> and Gi2 in phospholipid vesicles. : *Mol. Pharmacol.*, **46** : 808-816, 1994.
  - 47) Offermanns, S., Laugwitz, K.L., Spicher, K. and Schultz, G. : G proteins of the G<sub>12</sub> family are activated via thromboxane A<sub>2</sub> and thrombin receptors in human platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91** : 504-508, 1994.
  - 48) Halushka, P.V., Mais, D.E., Mayeux, P.R. and Morinelli, T.A. : Thromboxane, prostaglandin and leukotriene receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **10** : 213-239, 1989.
  - 49) Ogletree, M.L. and Allen, G.T. : Interspecies differences in thromboxane receptors : studies with thromboxane receptor antagonists in rat and guinea-pig smooth muscles. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **260** : 789-794, 1992.

- 50) Dorn, G.W. : Distinct platelet thromboxane A<sub>2</sub>/prostaglandin H<sub>2</sub> receptor subtypes : a radioligand binding study of human platelets. *J. Clin. Invest.*, **84** : 1883-1891, 1989.
- 51) Takahara, K., Murray, R., FitzGerald, G.A. and Fitzgerald, D.J. : The response to thromboxane A<sub>2</sub> analogues in human platelets : discrimination of two binding sites linked to distinct effector systems. *J. Biol. Chem.*, **265** : 6836-6844, 1990.
- 52) Hirata, T., Kakizuka, A., Ushikubi, F., Fuse, I., Okuma, M. and Narumiya, S. : Arg60 to Leu mutation of the human thromboxane A<sub>2</sub> receptor in a dominantly inherited bleeding disorder. *J. Clin. Invest.*, **94** : 1662-1667, 1994.
- 53) Fuse, I., Mito, M., Hattori, A., Higuchi, W., Shibata, A., Ushikubi, F., Okuma, M. and Yahata, K. : Defective signal transduction induced by thromboxane A<sub>2</sub> in a patient with mild bleeding disorder : Impaired phospholipase C activation despite normal phospholipase A<sub>2</sub> activation. *Blood*, **81** : 994-1000, 1993.
- 54) Negishi, M., Namba, T., Sugimoto, Y., Irie, A., Katada, T., Narumiya, S. and Ichikawa, A. : Opposite coupling of prostaglandin E receptor EP<sub>3c</sub> with G<sub>s</sub> and G<sub>o</sub> : stimulation of G<sub>s</sub> and inhibition of G<sub>o</sub>. *J. Biol. Chem.*, **268** : 26067-26070, 1993.
- 55) Goureau, O., Tanfin, Z., Marc, S. and Harbon, S. : Diverse prostaglandin receptors activate distinct signal transduction pathways in rat myometrium. *Am. J. Physiol.*, **263** : C257-C265, 1992.
- 56) Negishi, M., Ito, S. and Hayaishi, O. : Prostaglandin E receptors in bovine adrenal medulla are coupled to adenylate cyclase via G<sub>i</sub> and to phosphoinositide metabolism in a pertussis toxin-insensitive manner. *J. Biol. Chem.*, **264** : 3916-3923, 1989.
- 57) Watanabe, T., Yatomi, Y., Sunaga, S., Miki, I., Ishii, A., Nakao, A., Higashihara, M., Seyama, Y., Ogura, M., Saito, H., Kurokawa, K. and Shimizu, T. : Characterization of prostaglandin and thromboxane receptors expressed on a megakaryoblastic leukemia cell line, MEG-01s. *Blood*, **78** : 2328-2336, 1991.
- 58) Vassaux, G., Gaillard, D., Ailhaud, G. and Negrel, R. : Prostacyclin is a specific effector of adipose cell differentiation. *J. Biol. Chem.*, **268** : 11092-11097, 1992.
- 59) Perez, A.G. and Smith, W.L. : Apical-basolateral membrane asymmetry in canine cortical collecting tubule cells. *J. Clin. Invest.*, **74** : 63-74, 1984.
- 60) Hunter, T. and Cooper, J.A. : Protein tyrosine kinases. *Annu. Rev. Biochem.*, **54** : 897-930, 1985.
- 61) Hanasaki, K., Nakano, T. and Arita, H. : Receptor-mediated mitogenic effect of thromboxane A<sub>2</sub> in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Pharmacol.*, **40** : 2535-2542, 1990.
- 62) Nigam, S., Eskafi, S., Roscher, A. and Weitzel, H. : Thromboxane A<sub>2</sub> analogue U46619 enhances tumor cell proliferation in HeLa cells via specific receptors which are apparently distinct from TXA<sub>2</sub> receptors on human platelets. *FEBS Lett.*, **316** : 99-102, 1993.
- 63) Ruiz, P., Rey, L., Spurney, R., Coffman, T. and Viciano, A. : Thromboxane augmentation of alloreactive T cell function. *Transplantation*, **54** : 498-505, 1992.
- 64) Quarles, L.D., Haupt, D.M., Davidai, G. and Middleton, J.P. : Prostaglandin F<sub>2α</sub>-induced mitogenesis in MC3T3-E1 osteoblasts ; role of protein kinase C-mediated tyrosine phosphorylation. *Endocrinology*, **132** : 1505-1513, 1993.
- 65) Nakashima, S., Koike, T. and Nozawa, Y. : Genistein, a protein tyrosine kinase inhibitor, inhibits Thromboxane A<sub>2</sub>-mediated human platelet responses. *Mol. Pharmacol.*, **39** : 475-480, 1990.
- 66) Maeda, H., Taniguchi, T., Inazu, T., Yang, C., Nakagawara, G. and Yamamura, H. : Protein-tyrosine kinase p72syk is activated by thromboxane A<sub>2</sub> mimetic U44069 in platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **197** : 62-67, 1993.
- 67) Watanabe, T., Nakao, A., Emerling, D., Hashimoto, Y., Tsukamoto, K., Horie, Y., Kinoshita, M. and Kurokawa, K. : Prostaglandin F<sub>2α</sub> enhances tyrosine phosphorylation and DNA synthesis through phospholipase C-coupled receptor via Ca<sup>2+</sup>-dependent intracellular pathway in NIH-3T3 cells. *J. Biol. Chem.*, **269** : 17619-17625, 1994.
- 68) Ushikubi, F., Aiba, Y., Nakamura, K., Namba, T., Hirata, M., Mazda, O., Katsura, Y. and Narumiya, S. : Thromboxane A<sub>2</sub> receptor is highly expressed in mouse immature thymocytes and mediates DNA fragmentation and apoptosis. *J. Exp. Med.*, **178** : 1825-1830, 1993.
- 69) Coleman, R.A. and Sheldrick, R.L.G. : Prostanoid-induced contraction of human bronchial smooth muscle is mediated by TP-receptors. *Br. J. Pharmacol.*, **96** : 688-692, 1989.
- 70) Sugimoto, Y., Namba, T., Shigemoto, R., Negishi, M., Ichikawa, A. and Narumiya, S. : Dis-

tinct cellular localization of mRNAs for three subtypes of prostaglandin E receptor in kidney. *Am. J. Physiol.*, **266** : F823-F828, 1994.

71) Breyer, M.D., Jacobson, H.R., Davis, L.S. and

Breyer, R.M. : hybridization and localization of mRNA for the rabbit prostaglandin EP<sub>3</sub> receptor. *Kidney Int.*, **43** : 1372-1378, 1993.