

AMCoR

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

現代医療 (1999.01) 31巻1号:298～306.

【エイコサノイド】
トロンボキサン受容体と血小板機能異常

牛首文隆、成宮 周

トロンボキサン受容体と血小板機能異常

牛 首 文 隆¹⁾, 成 宮 周²⁾

1) 旭川医科大学医学部 薬理 (教授)

2) 京都大学大学院医学研究科 神経・細胞薬理 (教授)

はじめに

トロンボキサン(TX)はプロスタグランジン(PG)とともにプロスタノイドと総称される生理活性物質群を構成する。従来 TX は、強力な血小板活性化能や血管・気管支平滑筋の収縮能を持つことが知られていた。TX の生合成は、刺激を受けた細胞内で活性化されたホスホリパーゼ(PL)A₂ が細胞膜リン脂質からアラキドン酸を遊離することに始まる。遊離したアラキドン酸はシクロオキシゲナーゼ(PGH₂ 合成酵素)によって PGG₂ を経て PGH₂ に変換され、ついで TX 合成酵素によって TX が合成される。TX 合成酵素は、血小板や種々の組織に存在するマクロファージ系の細胞に発現している。一方、TX は合成された直後に細胞外に放出され、標的細胞上に存在する特異的な受容体に働いてその作用を発揮する。また、TX は生理条件下では非常に不安定であり、半減期約 30 秒で非酵素的に TXB₂ へと不活化されることから、オートコイドとして合成局所のホメオスタシスの維持に働いていると考えられる。

TX 受容体は、ヒト血小板よりプロスタノイド受容体として始めて精製され¹⁾、ついでその

cDNA がクローニングされた²⁾。この結果、TX 受容体は、7 回膜貫通構造をもち G 蛋白質と関連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(図 1)。

本稿では、まず TX 受容体の構造と機能に関して概説し、ついで TX 受容体の変異によって惹起される家族性血小板機能異常症について述べたい。

TX 受容体とその遺伝子の構造

現在までに、ヒト²⁾、ウシ³⁾、ラット⁴⁾、マウス⁵⁾ TX 受容体の cDNA クローニングが行なわれ、その一次構造が解明されている(図 2)。各々の TX 受容体は、それぞれ 343(β タイプは 407)、343、341、341 個のアミノ酸より成り、7 回膜貫通構造を持つロドプシン型の受容体である。ウシ受容体のアミノ酸配列のヒト受容体 α タイプと β タイプに対する相同性は、それぞれ 84% と 81% である。また、ラットとマウス受容体のアミノ酸配列の相同性は 93% と高く、ヒト受容体 α タイプに対する相同性はそれぞれ 72% と 76% である。

これらの TX 受容体は、ロドプシン型受容体によく認められる構造上の特徴を持っている

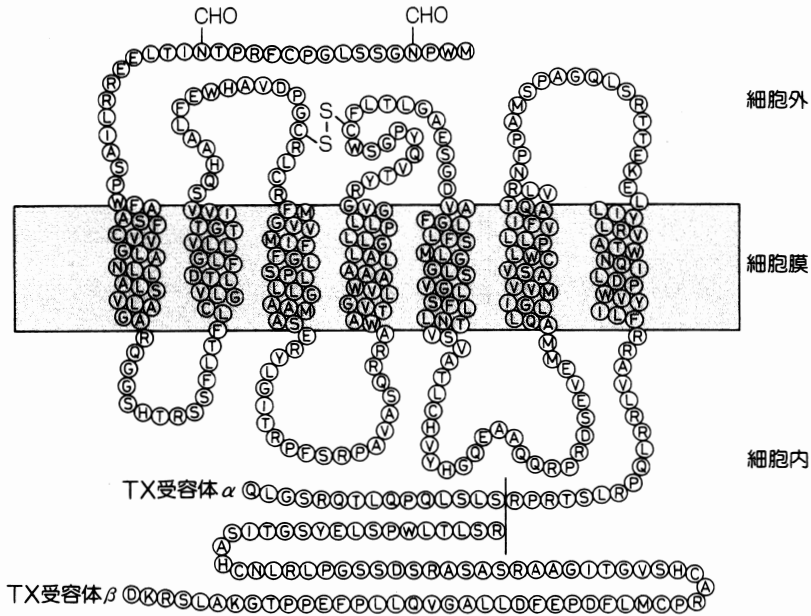


図 1. TX 受容体の構造模式図

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。

(図 1). 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。実際にヒト TX 受容体では、この残基のグリコシレーションに精製受容体の分子量(約 57 kDa)とアミノ酸組成より計算された分子量(約 37 kDa)の差が起因することが証明されている⁶⁾。つぎに、受容体の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おり、これがジスルフィド結合を形成していることが挙げられる。これは受容体の立体構造の保持に役立っており、還元薬や酸化薬の存在下では TX 受容体のリガンド結合能が変化するという報告⁷⁾と一致する。実際にヒト TX 受容体で、この残基をセリンに置換した変異受容体(C102S または C183S)がリガンド結合能を失うことが示された⁸⁾。また、TX 受容体の細胞内ドメインにはリン酸化部位と想定されるセリンとスレオニン残基が広範に分布している。これらの残基

のリン酸化は、受容体の脱感作現象に関与すると考えられている(下記参照)。

一方、プロスタノイド受容体に共通してよく保存されているアミノ酸配列領域が、受容体の膜貫通領域を中心としていくつか認められ、これが PG 分子間の基本構造を認識する結合領域を形成していると考えられている。このなかで第 7 膜貫通領域に存在するアルギニン残基は、すべてのプロスタノイド受容体で保存されており、この残基がロドプシンのレチナル結合部位である Lys²⁹⁶ 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。実際、このアルギニン残基に点突然変異を導入したヒト TX 受容体ではリガンド結合の消失が認められることが報告されている⁹⁾。これらの結果プロスタノイド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

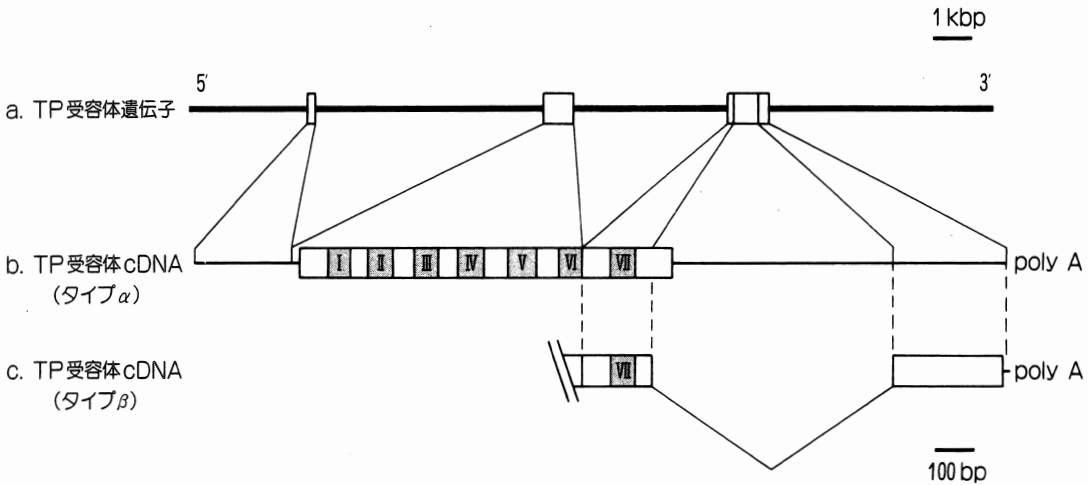


図 3. ヒト TP 受容体遺伝子と cDNA の構造模式図

- 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 受容体の二種類のアイソフォームの構造. 非翻訳領域を直線で示し, 翻訳領域をボックスで示す. 青色部分は膜貫通領域を数字とともに示す.

のみ異なる 2 種類の受容体アイソフォームが形成される。現在、ヒト以外の種の TX 受容体アイソフォームの報告はないが、このカルボキシル末端の構造はウシではヒト受容体 α タイプに相当するが、マウス、ラットではヒト受容体 α および β タイプのいずれにも相当しない (図 3)。この結果、ウシにおいてはヒト受容体 β タイプに相当するアイソフォームが存在する可能性があると考えられる。

TX 受容体の機能

TX は化学的に不安定なため、TX 受容体の解析には安定な類似物質が用いられる。従来、薬理的には主として血小板や血管・気管支平滑筋の TX 受容体が解析された。また、生化学的に放射性リガンドを用いて、種々の組織・細胞において TX 受容体の同定がなされた。これらには、血小板、血管平滑筋細胞、血管内皮細胞、肝類洞内皮細胞、腎系球体メサンギウム細胞、単球、T 細胞、培養アストロサイトーマ細

胞、培養巨核芽球系細胞 (HEL, MEG) が含まれる。これらの結果、TX 受容体はヒト血小板には約 2,000 個、マウス幼若 T 細胞には約 10,000 個と最も多く発現していた。また、クローン化 TX 受容体発現細胞を用いて受容体のリガンド結合の特異性が解析された²⁻⁵⁾。種々のリガンドの TX 受容体に対する結合親和性は、I-BOP, S-145 > ONO-3708 > SQ-29548, STA₂ > U-46619 > PGD₂ > PGE₂, PGF_{2 α} , PGI₂, TXB₂ の順であり、I-BOP や S-145 の結合解離定数 (K_d 値) は数 nM であった。一方、TX 受容体の 2 種類のアイソフォームのリガンド結合特異性には差が認められないが、その情報伝達経路や脱感作機構には違いがある (下記参照)。

TX 受容体は、非常に多様な情報伝達経路を持っている。たとえば、TX 受容体は G 蛋白質と関連し、PLC を活性化することが知られている¹⁵⁾。また、TX は血小板において PLA₂ を活性化するが、これに関与する G 蛋白質は PLC を活性化するものとは異なることが報告されてい

表 1. ヒト TX 受容体の情報伝達

受容体アイソフォーム	連関する G 蛋白質	標的分子
α タイプ	G _q	PLC β 活性化
	G _s	アデニレートシクラーゼ活性化
	G ₁₂ , G ₁₃ *	rho GEF 活性化ほか
β タイプ	G _q	PLC β 活性化
	G _i	アデニレートシクラーゼ抑制
	G ₁₂ , G ₁₃ *	rho GEF 活性化ほか

*TX 受容体と G₁₂, G₁₃との連関は知られているが、どちらかのアイソフォームのみか両者ともに連関するのかについては不明である。

る¹⁶⁾。TX が細胞外からの Ca²⁺ の流入を促進することも知られている。さらに、TX が血小板のアデニレート・シクラーゼを抑制するという報告がある¹⁷⁾。このような情報伝達経路の多様性は、何に起因するものであろうか。まず、受容体レベルでの多様性によるものが考えられる。実際、いくつかの薬理学的研究では、血小板における 2 種類の TX 結合部位の存在と、これらがそれぞれ独立して血小板の形態変化と凝集・放出反応を惹起する可能性を報告をしている^{18,19)}。つぎに、TX 受容体と連関する G 蛋白質レベルでの多様性によるものが考えられる。TX 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²⁰⁻²³⁾。これらには G_q, G₁₂, 未同定の 85 kD の G 蛋白質, G₁₂, G₁₃ が含まれる。最近、ヒト TX 受容体アイソフォームの情報伝達機構が解析された。TX 受容体の 2 種類のアイソフォームは血小板に発現しているが、この両者はともに G_q を介して PLC を活性化した。しかし、各アイソフォームはそれぞれアデニレート・シクラーゼに対して刺激的あるいは抑制的に作用した。つまり、 α タイプの受容体は G_q, G_s と連関し、 β タイプのものは G_q, G_i と連関することが明らかとなった²⁴⁾。このように、TX 受容体を介する情報伝達経路の多様性は、少なくとも受容体と

それに連関する G 蛋白質の両者の多様性に起因していると考えられる(表 1)。

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。一方、TX が培養細胞において増殖反応を惹起することが報告され²⁵⁾、さらに TX 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、p72^{syk} を活性化することが報告されている²⁶⁾。これらの結果は TX 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、最近血小板において TX アゴニストの U-46619 が PKC を介して Ras を活性化し²⁷⁾、G₁₃ が p115 Rho GEF を直接活性化して Rho の情報伝達経路に関与することが示された²⁸⁾。

TX 受容体の生体内分布

従来の薬理的・生化学的研究は、TX 受容体が生体のいくつかの組織に発現していることを見いだしてきたが、受容体の発現レベルの低い組織での解析や受容体の組織内・細胞内での局在の解析は困難であった。最近になってノーザンブロット解析や *in situ* ハイブリダイゼー

ション解析などの分子生物学的手法や抗受容体抗体を用いた免疫組織化学的手法が導入され、TX 受容体の分布に関する新たな知見が得られた。マウス TX 受容体 mRNA のノーザンブロット解析⁵⁾では胸腺に最も発現が多く、ついで脾臓、肺に多く発現していた。また、腎臓、子宮、脳、心臓でも比較的多く発現しており、肝臓、胃、回腸、精巣にも少量の発現が認められた。TX 受容体 mRNA の *in situ* ハイブリダイゼーション解析では、マウス胸腺では皮質に、ラット腎臓では糸球体メサングウム細胞、血管平滑筋および腎杯の移行上皮に特異的に発現していた。抗ラット TX 受容体抗体を用いた検討では、精巣に発現が認められたが、この発現は精子の分化の一段階であるスペルマチド細胞においてのみ認められ、その発現も細胞のアクロゾームに局限していた²⁹⁾。

これらの知見の一部は従来の研究結果とよく一致するが、まったく新しい受容体分布も見いだされ、これが種々の組織における TX の生理作用の解明に役立つことが期待される。たとえば、TX 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、TX 受容体の発現量は未熟な胸腺細胞である CD4⁻8⁻ や CD4⁺8⁺ 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 TX 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³⁰⁾。また、従来精巣における TX 受容体の発現についても知られていなかった。これらの結果は、TX 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・成熟あるいは精子の分化や受精機能に何らかの役割を持つことを示唆しており、その解明が期待される。

TX 受容体の発現調節と脱感作機構

TX 受容体の機能は、その遺伝子発現の活性化や抑制あるいは発現受容体の異種あるいは同種脱感作の機構によって調節されている。

ヒト TX 受容体遺伝子のプロモータ領域にはいくつかの転写因子反応領域が存在している。それらには、ホルボールエステル反応領域、グルココルチコイド反応領域そして3種類の急性期反応領域が含まれる¹³⁾。実際、ホルボールエステルは HEL 細胞や CHRF-288 細胞などの巨核芽球系細胞において TX 受容体を発現誘導することが示された^{31,32)}が、グルココルチコイドや IL-1, IL-6, lipopolysaccharide (LPS), CRP, TNF α などの急性期反応惹起物質は HEL 細胞において TX 受容体の発現を誘導しなかった。ラット TX 受容体遺伝子のプロモータ領域にはホルボールエステル反応領域、グルココルチコイド反応領域、NF- κ B 結合領域、GATA box, shear stress 反応領域などが含まれている。また、HEL 細胞と異なり、培養ラット血管平滑筋細胞においては、ホルボールエステル以外にグルココルチコイドや IL-6 が TX 受容体を発現誘導することが示された³³⁾。一方、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。実際、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³⁴⁾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³⁵⁾が示された。

同種脱感作現象では、まず TX 受容体と連関する G 蛋白質との解離が起き、ついで受容体の細胞膜からの消失が起こる。この TX 受容体の internalization の機構による消失は、CHRF-288 細胞³⁶⁾や K562 細胞などの巨核芽球系細胞で観察された。この同種脱感作には、他のロドプシン型受容体の脱感作機構にみられるように、受容体キナーゼによる TX 受容体のリン酸

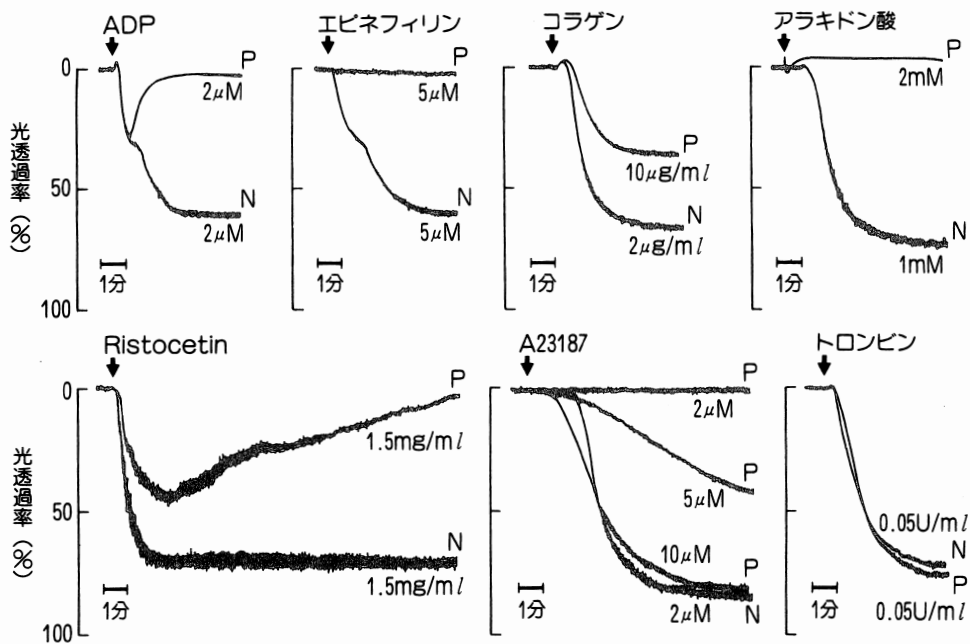


図 4. 家族性血小板機能異常症の 1 例にみられた血小板凝集反応

化が関与するものと考えられる。実際、ヒト血小板ではアゴニスト依存的な TX 受容体のリン酸化が報告されており³⁷⁾、受容体発現系を用いた解析ではこのリン酸化が α および β タイプの両者に認められた³⁸⁾。一方、TX 受容体の異種脱感作現象は、血小板がプロテインキナーゼ (PK)C や PKA を活性化するような刺激を受けた時に認められる。この現象には、これらのキナーゼによる TX 受容体のリン酸化が関与するものと考えられている。これに関連して、PKC と PKA が TX 受容体の細胞内カルボキシル末端のセリンスレオニン残基をリン酸化することが報告されている³²⁾。

TX 受容体変異によって惹起される

家族性血小板機能異常症

家族性血小板機能異常症発見の契機となった症例は、56 才男性で真性多血症の診断を受けていた。この症例では、皮下出血斑や歯肉出血

が頻回に認められ、多量の痔出血による輸血の既往があった。また、真性多血症による赤血球、白血球、血小板の増多と肝脾腫が認められ、出血時間の延長を認めたが、凝固系の異常はなかった。血小板凝集反応を解析したところ、この患者血小板は TX に対し特異的に凝集反応が欠失していたが、shape change は認められた (図 4)。また、血小板 TX 受容体のリガンド結合能はアゴニスト、アンタゴニストに対して正常であったが、アゴニスト刺激によるホスファチジン酸の生成や蛋白質リン酸化反応が著明に低下していた。この結果、この患者の TX 受容体はリガンドが結合は正常であるが、その情報伝達過程に異常が存在することが明らかとなった³⁹⁾。また、この患者血小板においてはアゴニスト刺激による GTPase 活性の上昇が著減しており、TX 受容体と G 蛋白質との関連に障害があった。さらに、アゴニスト刺激によって惹起される受容体のダウンレギュレーションが患

者血小板で認められないことから、TX 受容体自体に異常が存在すると考えられた⁴⁰⁾。一方、同様の TX 受容体異常を示す別の家系も報告され、この患者血小板ではアゴニスト刺激による PLC の活性化が障害され、PLA₂ の活性化は正常であった⁴¹⁾。

最近、上記の血小板機能異常を示す 2 家系において、原因と考えられる同一の TX 受容体変異が見いだされた⁴²⁾。この変異は、ヒト TX 受容体の第一細胞内ループに存在する Arg⁶⁰ の Leu への点変異によるものであった。この Arg⁶⁰ は、ウシ、ラット、マウスでも保存されている(図 2)。この変異 TX 受容体 α タイプを CHO 細胞に発現させ解析した。その結果、この変異受容体は正常なリガンド結合能を示したが、アゴニスト刺激後のセカンドメッセンジャーである IP₃ の増加が欠失していた。さらに、血小板には α および β タイプの TX 受容体が存在し、両者にこの変異が認められた。この両変異受容体はともに G_q を介する PLC の活性化が欠失しており、 α タイプの変異受容体と G_s との連関も認められなかった。しかし、 β タイプの変異受容体と G_i との連関は正常であった²⁴⁾。この変異の結果、上記の患者血小板で認められたように、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 PLA₂ の活性化を惹起することは可能と考えられた。これらの結果から、TX 受容体の β タイプ・アイソフォームに関連する G_i 蛋白質が血小板の形態変化や PLA₂ の活性化に関与し、両方のアイソフォームに関連する G_q 蛋白質が PLC の活性化を介して血小板凝集に関与することが示唆された。

このような変異 TX 受容体と G₁₂、G₁₃ などの連関の異常の有無や、この変異に伴う他の器官における異常の発生などについては今後の解析が必要と考えられる。

おわりに

最近になって TX 受容体の構造やその遺伝子の構造が解明されたり、受容体アイソフォームの存在が発見されるなど、TX 受容体研究にも大きな進展が認められる。一方、TX が従来知られていた血小板や心血管系でのみならず、免疫系の臓器を含む多くの組織や臓器において作用を示すことが明らかになるにつれ、その生理的・病態生理学的役割の解明がますます重要と考えられる。今後は、TX 受容体欠損マウスを用いた解析などを通して、このような問題が解明されることが期待される。

文 献

- 1) Ushikubi F *et al* : J Biol Chem **264** : 16496, 1989.
- 2) Hirata M *et al* : Nature **349** : 617, 1991.
- 3) Muck S *et al* : Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol **357** : 10, 1998.
- 4) Abe T *et al* : J Clin Invest **96** : 657, 1995.
- 5) Namba T *et al* : Biochem Biophys Res Commun **184** : 1187, 1992.
- 6) Mais DE *et al* : Eur J Pharmacol **227** : 267, 1992.
- 7) Dorn GW II : J Biol Chem **265** : 4240, 1990.
- 8) Chiang N *et al* : Arch Biochem Biophys **334** : 9, 1996.
- 9) Funk CD *et al* : Mol Pharmacol **44** : 934, 1993.
- 10) Ushikubi, F *et al* : J Lipid Mediat Cell Signall **12** : 343, 1995.
- 11) Dorn GW II *et al* : J Biol Chem **272** : 12399, 1997.
- 12) Taketo M *et al* : Genomics **19** : 585, 1994.
- 13) Nüsing, RM *et al* : J Biol Chem **268** : 25253, 1993.
- 14) Raychowdhury MK *et al* : J Biol Chem **269** : 19256, 1994.
- 15) Brass LF *et al* : J Biol Chem **263** : 5348, 1988.
- 16) Fuse I *et al* : Biochem Biophys Res Commun **146** : 659, 1987.
- 17) Halushka PV *et al* : Annu Rev Pharmacol Toxicol **29** : 213, 1989.
- 18) Dorn GW II : J Clin Invest **84** : 1883, 1989.
- 19) Takahara K *et al* : J Biol Chem **265** : 6836,

- 1990.
- 20) Shenker A *et al* : J Biol Chem **266** : 9309, 1991.
- 21) Knezevic I *et al* : J Biol Chem **268** : 26011, 1993.
- 22) Ushikubi F *et al* : Mol Pharmacol **46** : 808, 1994.
- 23) Offermanns S *et al* : Proc Natl Acad Sci USA **91** : 504, 1994.
- 24) Hirata T *et al* : J Clin Invest **97** : 949, 1996.
- 25) Hanasaki K *et al* : Biochem Pharmacol **40** : 2535, 1990.
- 26) Maeda H *et al* : Biochem Biophys Res Commun **197** : 62, 1993.
- 27) Shock DD *et al* : Biochem J **321** : 525, 1997.
- 28) Hart MJ *et al* : Science **280** : 2112, 1998.
- 29) Takahashi N *et al* : Endocrinology **136** : 4143, 1995.
- 30) Ushikubi F *et al* : J Exp Med **178** : 1825, 1993.
- 31) Nakajima M *et al* : Biochem Biophys Res Commun **158** : 958, 1989.
- 32) Kinsella BT *et al* : J Biol Chem **269** : 29914, 1994.
- 33) Takahashi N *et al* : Biochem Biophys Res Commun **244** : 489, 1998.
- 34) Matsuda K *et al* : Am J Physiol **265** : E928, 1993.
- 35) Ajayi AA *et al* : Circulation **91** : 2742, 1995.
- 36) Dorn GW II : Am J Physiol **262** : C991, 1992.
- 37) Okwu AK *et al* : Biochim Biophys Acta **1221** : 83, 1994.
- 38) Habib A *et al* : J Biol Chem **272** : 7191, 1997.
- 39) Ushikubi, F *et al* : Thromb Haemostas **57** : 158, 1987.
- 40) Ushikubi F *et al* : Thromb Haemostas **67** : 144, 1992.
- 41) Fuse I *et al* : Blood **81** : 994, 1993.
- 42) Hirata T *et al* : J Clin Invest **94** : 1662, 1994.