

AMCoR

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

現代医療 (1999.02) 31巻増刊1:579~611.

【プロスタグランジンとその周辺】
プロスタノイド受容体とその遺伝子ノックアウトマウス

牛首文隆, 成宮周

プロスタノイド受容体とその遺伝子 ノックアウトマウス

牛首文隆¹⁾, 成宮 周²⁾

1) 旭川医科大学 薬理学 (教授) 2) 京都大学医学部 薬理学 (教授)

はじめに

プロスタグランジン (PG) とトロンボキサン (TX) より成るプロスタノイドは、炭素数20個の不飽和脂肪酸からシ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)。PGは5員環を含み、これに α と ω の二つの側鎖がついた構造を持つ。PGは5員環の修飾基の差によってAからIまでの9種類のタイプに分類される。このうち、A、BおよびCタイプのものは自然には存在せず、組織からの抽出過程で人為的に生成する。PGGとPGHは同じ5員環構造を持つが、PGGはC15位にヒドロペルオキシ基を、PGHはヒドロキシ基を持つ。もう一つのCOX産物であるTXは5員環ではなくオキサン環を持っている。さらに、プロスタノイドは、側鎖に含まれる二重結合の数によって三つのシリーズに分類される。1シリーズのプロスタノイドは13-トランス、2シリーズは5-シスと13-トランス、3シリーズは5-シス、13-トランスおよび17-シスの二重結合を持つ。1、2および3シリーズのプロスタノイドはそれぞれ γ -homolinolenic acid (8, 11, 14-eicosatrienoic acid), arachidonic acid (5,

8, 11, 14-eicosatetraenoic acid) および5, 8, 11, 14, 17-eicosapentaenoic acid から合成される。ヒトを含めた哺乳類では、これらプロスタノイドの前駆物質となる脂肪酸の中で arachidonic acid が圧倒的に多いため、生体においてはおもに2シリーズのプロスタノイドが合成される。また、これらの脂肪酸は種々の生理的・病理的な刺激に応じて活性化されたホスホリパー-A₂ (PLA₂) の作用によって膜リン脂質より遊離し、プロスタノイドが合成される。プロスタノイドはその合成直後に細胞外に放出される。PGG, PGH, PGI, TX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。また、プロスタノイドは生体内において種々の組織や細胞に働き非常に多彩な作用を示す。最も代表的なものは、種々のタイプの平滑筋の収縮や弛緩作用である。また、プロスタノイドは神経伝達

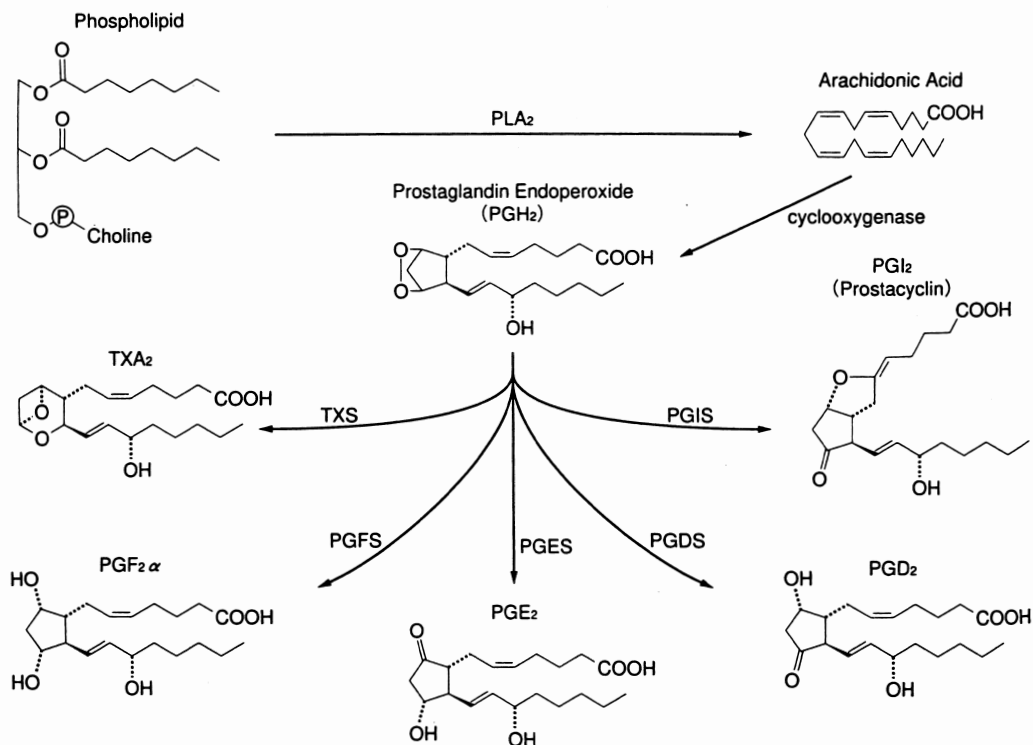


図 1. プロスタノイドの合成

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、PGF_{2α}、PGI₂、TXA₂ の 5 種類のプロスタノイドが合成される。

物質遊離を抑制あるいは刺激し、知覚神経の侵害刺激に対する感受性を亢進して神経系の活動を調整するが、それ自身で発熱や睡眠・覚醒作用も示す。さらに、消化管の運動や分泌、肝臓におけるイオンや水の輸送を調整する。また、プロスタノイドは血小板の機能を調節し、血管のホメオスタシスの維持や止血にも重要な役割を果たす。また、プロスタノイドは細胞のアポトーシス、分化・増殖あるいは発癌などにも関与する。

プロスタノイドは脂肪酸より合成され通常脂溶性物質と見なされる。このため以前にはプロスタノイドは細胞膜に組み込まれ、膜の流動性を変えることによって作用すると考えられた。その後、プロスタノイド受容体の概念がいくつかの研究を通して徐々に現れてきた。まず、プロスタノイドは従来考えられていたほどには脂溶性が強くなく、

細胞膜に取り込まれたり、膜を通過したりできないことが明らかにされた(1)。ついで、各々のプロスタノイドは固有の作用プロファイルを持ち他のプロスタノイドのものとは異なることから、プロスタノイドは各々特異的な作用部位をもつことが示された。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となった。これらの研究は肺や血小板など一つの組織に複数のプロスタノイド受容体が存在することを示し(2~4)、これがプロスタノイド受容体の分類の提唱へと繋がった(5)。さらに、種々の TXA₂ アゴニストやアンタゴニストが開発され、薬理的にこれらの化合物の競合部位としての TXA₂ 受容体が同定された(6)。また、プロスタノイド受容体の存在は生化学的にも示された。実際、多

くの研究者によりプロスタノイドの作用がセカンドメッセンジャーの変動を伴うことが報告された。まず、プロスタノイドの作用がcAMPの変動に相関することが知られ(7), 続いてPI代謝回転や細胞内カルシウムイオンの変動とも相関することが報告された。また、放射標識プロスタノイドの使用によって、多くの組織や細胞にはプロスタノイドに対する特異的な高親和性結合部位が存在することが示された(8~10)。Colemanらは、これらの研究から得られた情報を基にプロスタノイド受容体の総括的な分類を提唱した(11)。彼らは、TX, PGI, PGE, PGF, PGDに特異的な受容体を提唱し、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EP1, EP2, EP3, 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ナチュラルリガンドであるPGE₂に反応するが、いくつかのリガンドに対する結合能や反応性に差が認められる。また、彼らは後に4番目のEP受容体サブタイプになるEP4受容体を報告した。この受容体はEP2受容体と同様に、アゴニスト刺激によってcAMPの上昇を仲介するが、両受容体はある種のリガンドに対する反応性に違いがあった(12)。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(13), そのcDNAがクローン化されるまで(14), 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8種類のプロスタノイド受容体(TP, IP, EP1, EP2, EP3, EP4, 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。さらに、プロスタノイド受容体mRNAの発現分布がノーザンプロット解析や*in situ*ハイブリダイゼーション法を用いて明らかにされつつある。これらの知見と、従来COX

阻害剤や種々のプロスタノイド類似化合物を用いて蓄えられてきた薬理学的研究成果を対比させることは、各々のプロスタノイド受容体の作用を確定したり、プロスタノイドの新たな作用を解明するのに非常に有効と考えられる。また、ごく最近になって、各々のプロスタノイド受容体を欠失するノックアウトマウスが遺伝子ターゲティング法により作出され、種々の生理的・病態生理的な状況においてプロスタノイドが果たす役割が解析・評価されつつある。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総合して紹介するとともに、ノックアウトマウスの解析によって現在までに明らかになったプロスタノイドの果たす生理的・病態生理的役割について概説したい。

I. プロスタノイド受容体とその遺伝子の構造

1. 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個のアミノ酸より成る蛋白質であり、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57kDaであり、アミノ酸組成より計算された分子量は約37kDa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(14)。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37kDaに低下することが示された(15)。

TXA₂受容体のアミノ酸配列に基づくホモロジー・クローニングによって、種々の種において8種類

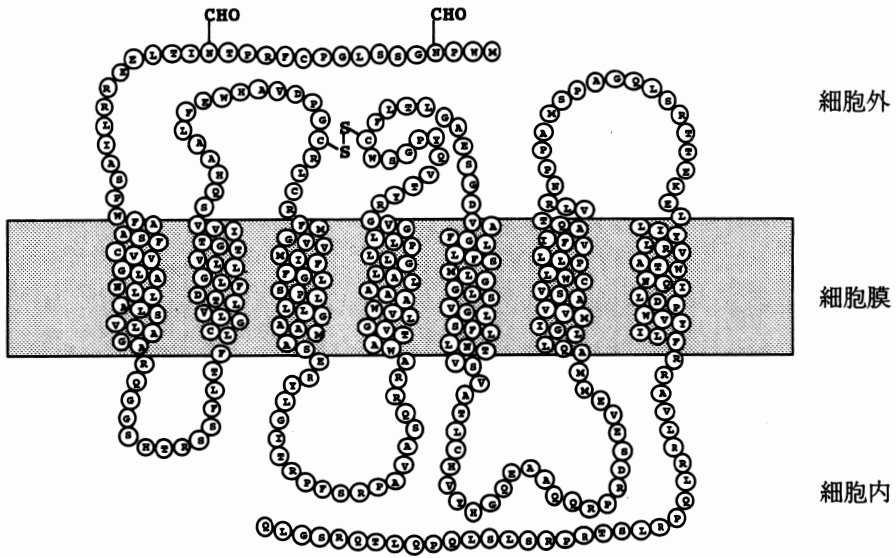


図 2. ヒトTXA₂受容体(TP)の構造模式図

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基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。

の薬理的に想定されたプロスタノイド受容体のタイプ・サブタイプの全てがクローン化された。その中には、ヒト、マウス DP 受容体(16, 17), マウス, ラット, ヒト EP1 受容体(18~20), マウス, ヒト EP2 受容体(21, 22), マウス, ラット, ウサギ, ウシ, ヒト EP3 受容体(23~29), マウス, ラット, ヒト EP4 受容体(30~33) (オリジナルには EP2 受容体として報告された。下記参照), マウス, ラット, ヒツジ, ウシ, ヒト EP 受容体(34~38), マウス, ラット, ヒト IP 受容体(39~43), マウス, ラット, ウシ TP 受容体(44~46)が含まれる。

現在まで 2 種類のクローンが EP2 受容体として報告された。一つは、最初に本田ら(30)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も報告されたものである(31~33)。他方は、Regan ら(21)によって報告されたヒトのクローンである。本田ら(30)は最初アデニレート・サイクラーゼを刺激するこのクローンを EP2 受容体とした。しかし、この受容体は EP2 受容体特異的アゴニストである butaprost に対して反応せ

ず、この点で薬理的に定義された EP2 受容体(11)とは異なっていた。同時期にアデニレート・サイクラーゼを刺激するもう一つの PGE 受容体サブタイプである EP4 受容体の存在が薬理的に示唆された(12)。さらに、本田らの報告した‘EP2’受容体がこの EP4 受容体に特異的なリガンドである AH23848B に反応することが明らかとなった(47)。また、Regan ら(21)の報告したヒト受容体のマウスのホモログがクローン化され、これが薬理的に定義された EP2 受容体の特徴を持つことが示された(22)。これらの結果、最初に本田ら(30)によりついで他の研究者により報告された受容体(31~33)は、EP2 受容体ではなく EP4 受容体であることが明らかになった。

クローン化されたマウス・プロスタノイド受容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基に 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、全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



図 3(a). 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), PGI₂ 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), PGF_{2α} 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良く保存されたアミノ酸を白抜き強調して示す。

て良く保存されており、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2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(48)。第1および第2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(II 3 参照)。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(Asp-X-Ser/Thr)がN末端細胞外領域に存在する。この配列はDP, IP, EP2受容体の第1細胞外ループやEP3, EP4受容体の第2細胞外ループにも存在する。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全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(49)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膜貫通領域の終わりから11ないし16アミノ酸の所に存在する。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、EP2、EP4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持つ一方、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3a)。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良く保存されており、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全ての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(14, 50)、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(II 3参照)。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値する。たとえば、全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(II 3参照)。

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。殊に、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、EP1、EP3、EP4、FP受容体を比較するとこの相同性は各々79、76、84、84、88、89%であり、ヒト、ウシ、ウサギ、ラット、マウスのEP3受容体のホモロジーは84~97%である(図3b)。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差が認められる。たとえばヒト、ウシ、ウサギのEP3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(51)。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(52)。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(53)。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

		I										
human	MKETRGYGGDAPFCTRLNHSYTGHWAPERSAEARGNLTRPPGSGEDCGSVSVAFPITMLLTGFVGNALAMLLVSRYSRRRESKRKKSFL											90
bovine	A DHAS-- F DP I A AV PN L EPS							SM MI			IT K G	89
rabbit	D P							I			V	86
rat	-----MA V H V HS QSSAA---DG							MV			V	67
mouse	-----MAS H HS SSTT---DD							I MV				67
	II					III						
human	CIGWLALTDLVGQLLTPPVIVVYLSKQRWEHIDPSGRLCFFGLTMTVFGLSLFIASAMAVERALAIRAPHWYASHMKTRATRAVLLG											180
bovine	M S L H QL									T S SV	179	
rabbit	S L QL										176	
rat	S L QR QL										156	
mouse	S L QR QL						LV			P-	156	
	IV					V						
human	VWLAVLAFALLPVLGVGQYTVQWPGTNCFISTGRGGNGTSSSHMGNLFFASAFAPLGLLALTVTFSCNLATIKALVSRCAKATASQSS											270
bovine	I P N RQ V I S V A										269	
rabbit	I D T AI A									A	266	
rat	S R S PA E D AREP SVA C V A									A	246	
mouse	S R S PA E DPAREP SVA C V A									AV	246	
	VI					VII						
human	AQNGRITTETAIQLMGIMCVLSVCWSPLLIMMLKMFNQTSVEHCKRTHTEKQKECNFFLIIVRLASLNQILDPPVYLLLRKILLRKFQCI											360
bovine	H Y N D									Q L	359	
rabbit	DTG										356	
rat	M Q QMG E										336	
mouse	M Q QMG E										336	
human	RYHTNMYASSSTSLPCQCSSTLWSDHLER 390											
bovine	LKGHSYGLDTEGGTENKDKEMKENLYISNLSRFFILLGHFTEARRGRGHYIHLTLEHQ 417											
rabbit	TH 389											
rat	D - P V Q										365	
mouse	D - PG A Q										365	

図 3(b). 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.

メラ受容体を用いて解析されている(II 3 参照).

2. プロスタノイド受容体の遺伝子構造とアイソフォーム

ヒトとマウスにおいてプロスタノイド受容体遺伝子の染色体マッピングが行われた. マウス DP, EP1, EP3, EP4, FP, IP, TP 受容体遺伝子は各々第14, 8, 3, 15, 3, 7, 10 染色体上に位置する(54, 55). また, ヒト EP1, EP3, EP4, FP, IP, TP 受容体遺伝子は各々染色体バンド 19p13.1, 1p31.2, 5p13.1, 1p31.1, 19q13.3, 19p13.3 に位置する(56, 57). ヒト DP 受容体遺伝子およびマウス, ヒト EP2 受容体遺伝子のマッピングはまだされていない. これらの結果, TP, EP1, EP4, IP 受容体遺伝子は従来マウスとヒトで相同と考えられていた染色体部位に存在することが明らかとなった(58~60). また, EP3 と FP 受容体遺伝子はヒトとマウスの両方で非常に近接した部位に存在しており, これはマウスの第

3 染色体遠位部はヒト第 1 染色体短腕に相当することおよび EP3 と FP 受容体遺伝子が遺伝子複製機構によって進化したことを示唆している.

プロスタノイド受容体の遺伝子構造は, 最初にヒト 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 膜貫通領域の終わ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になった(56) (図 4). このエクソン-イントロンの関係はマウス, ヒト DP 受容体(16, 17), マウス EP1 受容体(61), ヒト EP3 受容体(27), マウス, ヒト EP4 受容体(62, 63), ヒト IP 受容体(64)でも認められ, プロスタノイド受容体間で種をこえて保存されている. 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 EP4 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

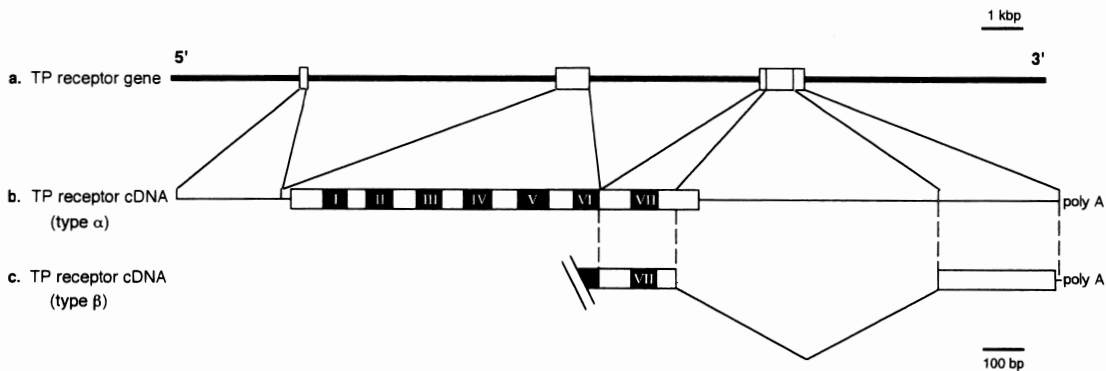


図 4. ヒト TP 受容体遺伝子と cDNA の構造模式図

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. と c. ヒト TP 受容体の 2 種類のスプライシング・バリエーションの構造. 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.

16bp 下流に位置する(63). 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(24, 25, 27~29, 65~68), ヒト TP 受容体(69), ヒツジ FP 受容体(38)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様々な受容体アイソフォームが形成される. EP3, FP, 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 EP3 受容体とヒト TP 受容体アイソフォームは各々異なる G 蛋白質と関連し異なる情報伝達を行う(24, 70). 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(65), アゴニストによって誘導される脱感作の感受性(66), 受容体の constitutive activity の程度(71, 72)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 EP3 受容体(73)やヒツジ FP 受容体(38)のアイソフォーム間でも認められる. また, いくつかの EP3 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 EP3 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(27). 実際, ヒト EP3 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(68). 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 EP1 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良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 膜貫通領域を持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, EP1 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(19). このように, 受容体アイソフォームが EP1, EP3, FP, TP 受容体に認められ DP, EP2, EP4, 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。TATA box や CCAAT box など基本的なプロモーター・モチーフはいくつかのプロスタノイド受容体遺伝子の転写開始点のすぐ上流に見出される。たとえば、マウス EP4, ヒト EP3, ヒト EP4 受容体遺伝子の上流には各々1個の TATA box, 1個の TATA 様box, 2個の CCAAT box が存在する。しかし、ヒト TP, ヒト IP, マウス EP1 受容体遺伝子ではこれらの配列は認められない。ヒト TP 受容体遺伝子のプロモーター領域には SP-1, AP-2, ホルボールエステル応答領域 (TRE), 急性期反応調節領域 (APRRE), c-myc 結合モチーフ, グルココルチコイド応答領域 (GRE) が存在する (56)。ラット TP 受容体遺伝子のプロモーター領域には TRE, GRE, NF- κ B 結合領域, GATA box, shear stress 応答領域等が含まれる (74)。ヒト IP 受容体遺伝子のプロモーター領域には AP-1, AP-2, SP-1, APRRE, GRE, ヒトポリオーマウイルス JC プロモーター領域 (JCV), c-myb 結合モチーフが存在する (64)。マウス EP1 受容体遺伝子のプロモーター領域には AP-1, AP-2 が含まれる。ヒト EP3 受容体のプロモーター領域には AP-2, Ebox, c-myb 結合モチーフ, SIF, インターフェロン- γ 応答領域, GCbox が存在する (68)。ヒト EP4 受容体遺伝子のプロモーター領域には NF-IL6, NF- κ B, H-apf-1 などの炎症に関連する因子に応答する領域や AP-1, AP-2, Ybox が存在する (62)。マウス EP4 受容体遺伝子のプロモーター領域には AP-1, AP-2, SP-1, NF- κ B, Ebox, NFIL-6 応答領域, GRE, Pit-1 配列が含まれる (63)。

これらの解析の結果、種々の因子が各々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を示唆している。ヒトとラッ

ト TP 受容体遺伝子のプロモーター領域には上記のように TRE が存在する。そして実際、ホルボールエステルが HEL 細胞 (75, 76) や CHRF-288 細胞 (77) 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 (74) 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上記のように GRE や APRRE 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 (76)。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 (74)。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。従来テストステロンは、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 (78) 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 (79) が挙げられる。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 (80)。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 (81)。その結果、ホルボールエステル処理によりヒト EP4 受容体の発現は単球系細胞の THP-1, U937 細胞などや B 細胞系 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 EP4 受容体に特異的であり、EP1, EP2, EP3, IP, DP 受容体の発現は変化しなかった。また、マウス EP4 受容体は NIH3T3 細胞やマクロファージ系の細胞である RAW 264.7 細胞において各々血清と LPS によって発現誘導された (63)。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。

3. PG 受容体の分子進化

現時点においてプロスタノイド受容体は、各々異なった遺伝子によってコードされる8種類のタイプあるいはサブタイプ受容体より成る。これらの受容体はその平滑筋に対する作用あるいはその情報伝達機構の特性によって弛緩性、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, EP2, EP4受容体が含まれ、cAMPの上昇を介して平滑筋の弛緩をきたす。一方、収縮性受容体はTP, FP, EP1受容体より成り、カルシウム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EP3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(詳細はII 2参照)。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。たとえば弛緩性受容体の中では受容体全体のホモロジーは32~44%であり、収縮性受容体の膜貫通領域のホモロジーは50%であるのに対し、抑制性受容体であるEP3受容体と他のグループに属する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。一方、藤らは(82)コンピュータプログラムを用いてプロスタノイド受容体のアミノ酸配列を詳細に比較検討した。かれらはこの解析にヒト、モルモットPAF受容体やヒト・リポキシンA受容体などの脂質受容体を加えている。この結果、プロスタノイド受容体はロドプシン型受容体の中で独立群を形成していること、またPAFやリポキシンA受容体はタキキニン、ブラディキニン、エンドセリンなど

のペプチド受容体が形成する別の受容体群に属することが明らかとなった。さらに、プロスタノイド受容体は三つのクラスターに分割された。クラスター1には弛緩性受容体であるIP, DP, EP2, EP4受容体が、クラスター2には収縮性受容体であるTP, FP, EP1受容体、そしてクラスター3にはEP3受容体が含まれる。同様の系統発生樹は他の研究者によっても報告されている(27, 40)。これらの結果は、プロスタノイド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PGE受容体から進化し、ついで機能的に関連する受容体群が遺伝子重複機構によって形成され進化してきたことを示唆している。また、プロスタノイド受容体の分子進化は他の脂質メディエータ受容体のものとは独立していることが示された。最近、ロイコトリエンB₄受容体のcDNAがクローン化された(83)。この受容体は以前にケモアトラクタント受容体としてクローン化されていたがそのリガンドは不明であった。そのアミノ酸配列はリポキシンA受容体、ソマトスタチン、IL-8受容体などのペプチド受容体のアミノ酸配列と相同性が認められたが、プロスタノイド受容体のアミノ酸配列とはやはり相同性が認められなかった。これらの結果は、シクロオキシゲナーゼ経路とリポキシゲナーゼ経路は各々独立して進化し、アラキドン酸カスケードに統合されてきたことを示唆している。

II. プロスタノイド受容体の機能

1. 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各々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おも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、各プロスタノイド受容体は最初5種類の生理的プロ

スタノイドの中でどれが一番良く反応するかによって同定され、ついであるプロスタノイドの作用を選択的に模倣あるいは抑制するように合成されたプロスタノイド類似化合物を用いて薬理的に同定されてきた。EP 受容体を例に挙げると、最初 EP 受容体はモルモット回腸・胃底部、イヌ胃底部、ニワトリ回腸、ネコ気管においてプロスタノイドの中で PGE₂ が最も強い効力を示す結合部位として同定された(5)。ついで、EP 受容体は SC-19220 のアンタゴニスト活性に対する感受性を基に二つに分類された。一つは EP1 受容体と呼ばれモルモット回腸・胃底部、イヌ胃底部で作用を示し、他方はニワトリ回腸、ネコ気管に存在した。さらにニワトリ回腸、ネコ気管の EP 受容体は 11-deoxy-PGE₂ と sulprostone に対する感受性の違いにより EP2 と EP3 受容体に分類された(84)。4 番目の EP 受容体である EP4 受容体はブタ大伏在静脈の PGE₂ による弛緩を仲介する受容体として発見され、AH13205 の効力が弱いことと AH23848 による拮抗によって EP2 受容体とは異なることが示された(12)。このように、薬理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。それはひと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挙げられる。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(85)は、33種類のプロスタノイドやその類似化合物を用いて全てのマウス・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。

1) DP 受容体と DP リガンド

マウス DP 受容体に対するリガンドの親和性の序列は PGD₂ > BWA868C, BW245C, STA₂ であり、その Ki 値は各々 21, 220, 250, 1600nM である。この序列や Ki 値はクローン化ヒト DP 受容体のもものと異なっている。ヒト DP 受容体では PGD₂, BWA868C, BW245C の Ki 値は各々 1.1, 0.9, 1.7nM である(16)。このような結合親和性の種差にかかわらず、BW245C と PGD₂ のフル・アゴニストとしての効力はマウスとヒトでほぼ同じである。つまり、BW245C と PGD₂ の cAMP 上昇作用の EC₅₀ 値は、マウスでは各々 0.54 と 6.8nM であり、ヒトでは各々 0.7 と 6nM である。DP 受容体アンタゴニストと考えられていた BWA868C は部分的な活性を示し、マウスにおいては partial アゴニストであることが判明した。一方、BWA868C は BW245C によって誘導されたウサギ頸静脈の弛緩を pKB 値 8.7 で抑制した(86)が、その効力はヒト DP 受容体に対する Ki 値と良く一致している。このように、DP 受容体は DP リガンドと見なされるものみに高い親和性を示し、これ以外のプロスタノイドやその類似化合物の DP 受容体に対する親和性はこれらのリガンドより 100 倍以上低い。一方、PGD₂ はマウス FP 受容体に対して Ki 値 47nM と DP 受容体に対する親和性とほぼ同じ値で結合する(表 1)。この結果は PGD₂ が FP 受容体に作用する可能性を示唆する。実際、PGD₂ によって惹起される麻酔下のイヌ気管収縮は FP 受容体を介していることが報告されている(87)。

2) EP1 受容体と EP リガンド

EP1 受容体に対するリガンドの親和性の序列は 17-phenyl-PGE₂, PGE₂ > sulprostone, iloprost > PGE₁ > misoprostol, M & B-28767 > 11-deoxy-PGE₁ > PGF_{2α} であり、その Ki 値は各々 14, 20, 21, 21, 36, 120, 120, 600,

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
 数字は結合置換実験の結果をコンピュータ解析することによって得られたKi値とその95%信頼域(括弧内)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Ki値を示す。

Ligands	DP	IP	Ki values(nM)				EP ₁	EP ₂	EP ₃	EP ₄
			TP	FP						
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-PGF _{2α}										

1300nMである(表1)。16,16-dimethyl-PGE₂, GR-63799X, butaprost, 1-OH-PGE₁, AH-13205などのEPリガンドはEP1受容体には結合しない。従来EP1受容体アンタゴニストとして知られていたSC-19220やAH-6809はマウスEP1受容体には全く親和性を示さず、このリガンドに関しては種差が大きいことが明らかとなった。また、これらのリガンドはあるPGE₂の作用がEP1受容体を介するものかどうかの判定にしばしば用いられることから、マウスの組織でのEP受容体サブタイプの解析には注意が必要であることを示している。一方、17-phenyl-PGE₂は比較的EP1受容体に特異的なリガンドと考えられていたが、これはEP3受容体により高い親和性で結合する(表1)。

3) EP2受容体とEPリガンド

EP1受容体に対するリガンドの親和性の序列はPGE₁, PGE₂ > 16,16-dimethyl-PGE₂ > 11-deoxy-PGE₁ > butaprost > AH13205, misoprostol > AH-6809であり、そのKi値は各々10, 12, 17, 45, 110, 240, 250, 350nMである(表1)。

さらにEP2受容体はTPリガンドであるI-BOPとSTA₂, IPリガンドであるisocarbacyclinを各々Ki値220, 220, 1000nMで結合する。19R(OH)-PGE₂はEP2受容体に特異的なアゴニストであることが報告されている(88)。しかし、このリガンドはEP2受容体には結合せず、FP受容体にのみ弱い親和性を示した。一方、butaprostはEP2受容体にのみ親和性を示し、選択性が非常に高いリガンドである。17-phenyl-PGE₂, sulprostone, M & B-28767, GR-63799X, 1-OH-PGE₁などのEPリガンドはEP2受容体には親和性を示さない。

4) EP3受容体とEPリガンド

EP3受容体に対するリガンドの親和性の序列はsulprostone, M & B-28767, PGE₂, PGE₁, 11-deoxy-PGE₁, GR63799X, 16,16-dimethyl-PGE₂, 17-phenyl-PGE₂ > misoprostol, AH13205 > 1-OH-PGE₁であり、そのKi値は各々0.60, 0.68, 0.85, 1.1, 1.5, 1.9, 1.9, 3.7, 67, 82, 330nM

である(表1)。また、この受容体はIPリガンドであるiloprost, carbacyclin, isocarbacyclin, TPリガンドであるSTA₂をこれらのリガンドがそれぞれ自身の受容体に示す親和性と同等のKi値で結合する。またEP3受容体は他のIPリガンドであるberaprost, cicaprostを各々Ki値110, 170nMで結合する。さらに、この受容体はPGF_{2α}, I-BOP, PGD₂を各々Ki値75, 10, 280nMで結合した。これらの結果は、ウサギ腎皮質集合管で報告された(89)いくつかのリガンドのアゴニスト活性の効力の序例(PGE₂, PGE₁, 16,16-dimethyl-PGE₂ > carbacyclin, PGF_{2α} > PGD₂)と良く一致する。sulprostone, M & B-28767, 16,16-dimethyl-PGE₂, 11-deoxy-PGE₁は他のプロスタノイド受容体にも結合するが、EP3受容体に対して最も高い親和性を示した(表1)。sulprostoneはEP1, FP受容体に親和性を持つ。M & B-28767はEP1およびEP3受容体アゴニストとして知られているがFP受容体にもKi値100nMで結合する。16,16-dimethyl-PGE₂はEPリガンドの中で最も高い親和性をEP2, EP4受容体に対して示した。misoprostolはEP2, EP3受容体アゴニストとして知られているが、EP1, EP2, EP3, EP4受容体にKi値118, 254, 66.8, 66.8nMで結合し、EP受容体サブタイプ間での選択性が弱いことが示された(表1)。EP2受容体アゴニストであるAH-13205はEP3受容体により強く結合した。一方、GR-63799XはEP3受容体にのみ高い親和性を示し、この受容体に選択性が高いリガンドである。

5) EP4受容体とEPリガンド

EP4受容体に対するリガンドの親和性の序列はPGE₂, PGE₁ > 11-deoxy-PGE₁, 16,16-dimethyl-PGE₂, misoprostol > 1-OH-PGE₁, GR63799X, M & B-28767 > 17-phenyl-PGE₂であり、そのKi値は各々1.9, 2.1, 33, 43, 67, 190, 480, 500, 1000nMである(表1)。この序例は以前に報告されたリガンドの効力序列と良く一致する。たとえば、ウサギ胎児動脈管EP4受容体を

介する弛緩効力の序列は $\text{PGE}_2 \gg \text{misoprostol} > \text{GR63799X} > \text{AH13205}$ であり、効力比は各々1, 145, 685, $>100,000$ であった(90)。これらのリガンドの K_i 値の比は各々1, 59, 294, >2000 である(表1)。また、これらのEPリガンド以外に STA_2 は K_i 値350nMでEP4受容体に結合した。

6) FP受容体とFPリガンド

FP受容体は PGF_2 と fluprostenol のみを高い親和性で結合するが、その K_i 値は各々3.4, 3.7nMである(表1)。いくつかのプロスタノイドはFP受容体に結合するが、その親和性はこの二つのリガンドの親和性より少なくとも10倍は低い。また、その親和性の序列は PGD_2 , 17-phenyl- $\text{PGE}_2 > \text{STA}_2$, I-BOP, PGE_2 , M&B-28767 $> 16,16$ -dimethyl- PGE_2 , sulprostone $> \text{U-46619}$, 19R(OH)- PGE_2 であり、その K_i 値は各々47, 60, 97, 100, 100, 124, 350, 580, 1000, 1000nMである(表1)。多くのFPリガンド以外のプロスタノイドやその類似化合物が比較的高い親和性でFP受容体に結合するという結果は、この受容体のリガンド結合特異性は想像以上に低いことを示している。一方、 PGF_2 はEP3, EP1受容体に各々 K_i 値75, 1300nMで結合する。また、fluprostenolはFP受容体にのみ結合する非常に選択性の強いリガンドと考えられる。

7) IP受容体とIPリガンド

IP受容体に対するリガンドの親和性の序列は cicaprost , iloprost, isocarbacyclin $> \text{beraprost}$, $\text{PGE}_1 > \text{ONO1301} > \text{carbacyclin} > 11$ -deoxy- PGE_1 であり、その K_i 値は各々10, 11, 15, 16, 33, 47, 110, 1000nMである(表1)。この結果は、いくつかの種の血小板におけるリガンドの効力序列(51)である cicaprost , iloprost $> \text{carbacyclin}$ に良く一致する。Isocarbacyclin(91), beraprost(92), ONO-1301(93)は以前報告されたようにこの受容体に高い親和性を示す。

興味深いことに、この研究で使用されたIPリガンドは全てEP3受容体に対して K_i 値22から740nMで結合した(表1)。これらのリガンドの

中で iloprost, carbacyclin, isocarbacyclin のEP3受容体に示す親和性はIP受容体に対するものとはほぼ同程度である。この結果は、IPリガンドがEP3受容体に作用する可能性を示唆している。最近、IPリガンドのEP3受容体への交叉作用がモルモットの輸精管の神経節節前に存在するEP3受容体で示唆された(94)。また、carbacyclinがEP3受容体に作用することが報告されている(89)。一方、iloprostのみがEP1受容体に結合するが(表1)、このリガンドのEP1受容体を介する作用は既に報告されており(95)、良く知られている。

8) TP受容体とTPリガンド

TP受容体に対するリガンドの親和性の序列は I-BOP, S-145 $> \text{GR32191}$, SQ29548, $\text{STA}_2 > \text{U-46619}$ であり、その K_i 値は各々0.56, 0.68, 12, 13, 14, 67nMである(表1)。この序列は以前に報告された結果と良く一致する。たとえば、ヒト血小板でのリガンド結合実験ではその序列は I-BOP $> \text{SQ29548} > \text{STA}_2 > \text{U-46619}$ であり各々の IC_{50} 値は2.2, 4.7, 17, 62nMであった(96)。一方、他のプロスタノイド受容体リガンドはM&B-28767を除いてTP受容体には結合しない。M&B-28767はTP受容体に K_i 値1300nMで結合した。また、 PGD_2 や PGF_2 によって惹起されるヒト気管収縮はTP受容体を介することが報告されている(95)。さらに、 PGE_2 や PGF_2 がTP受容体を介してラットの大動脈を収縮されることが報告されている(96)。しかし、マウスにおいては PGD_2 , PGE_2 , PGF_2 はTP受容体に結合しない。

このように、TP受容体はきわめてTPリガンドに対する選択性が強いことがわかる。一方、 STA_2 はEP3, EP2, EP4受容体に各々 K_i 値23, 220, 350nMで結合する(表1)。また、I-BOPはFP, EP3, EP2受容体に各々 K_i 値100, 100, 220nMで結合する(表1)。現在まで STA_2 や I-BOPがこれらの受容体に作用するという報告はないが、これらのリガンドを用いて実験をする場合には、

この結果を念頭に置く必要がある。

9) 8-epi-PGF_{2α} のプロスタノイド受容体への結合

8-epi-PGF_{2α} はいくつかの生物作用を持ち、このうちのあるものは TP 受容体アンタゴニストにより拮抗されることが報告されている(97, 98)。我々は、8-epi-PGF_{2α} のプロスタノイド受容体に対する親和性を、各受容体への放射リガンド結合の阻害活性として検討した。その結果、8-epi-PGF_{2α} は 10 μM の濃度でいくつかのプロスタノイド受容体に結合した放射活性の 50% 以下の遊離を起こすにすぎない(表 1)。このように、8-epi-PGF_{2α} のプロスタノイド受容体に対する親和性はプロスタノイドやその類似化合物に比してかなり低いことがわかった。

2. 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 Gq(99)、Gq と未同定の 85kD の G 蛋白質(100)、Gq と Gi₂(101)、Gi₂ と Gi₃(102)が含まれる。一方、いくつかの薬理学的研究は種々の組織(103, 104)においてのみならず単一の細胞である血小板(105, 106)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(107)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(108)。

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(18)。この結果は、EP1 受容体は未同定の G 蛋白質を介して Ca チャン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 蛋白質と関連し、細胞内 cAMP 濃度の上昇を惹

表 2. プロスタノイド受容体の情報伝達

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。

Type	Subtype	Isoform	G-protein	Second Messenger	
TP		TP α	Gq, Gs	PI response, cAMP ↑	
		TP β	Gq, Gi	PI response, cAMP ↓	
EP	EP1		G(?)	Ca ²⁺ ↑	
	EP2		Gs	cAMP ↑	
	EP4		Gs	cAMP ↑	
	EP3	EP _{3A}	Gi	Gi	cAMP ↓
		EP _{3B}	Gs	Gs	cAMP ↑
		EP _{3C}	Gs	Gs	cAMP ↑
		EP _{3D}	Gi, Gs, Gq	Gi, Gs, Gq	cAMP ↓, cAMP ↑ PI response
FP			Gq	PI response	
IP			Gs, Gq	cAMP ↑, PI response	
DP			Gs	cAMP ↑	

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 EP3A 受容体は Gi 蛋白質に関連しアデニレート・サイクラーゼを抑制するが、EP3B と EP3C 受容体は Gs 蛋白質に関連しアデニレート・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 蛋白質とも関連して百日咳毒素非感受性の PI 代謝回転を惹起する(24)。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(109)。これらの知見は受容体のカルボキシル末端が関連する 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(11, 110, 111)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(39)。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(112, 113)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 100pM で cAMP 濃度の上昇を引き起こす。同様に、PGE₂ は EP3 受容体を発現した CHO 細胞において IC₅₀ 値 100pM 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(51)、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(114)。一方、このような効率の違いは同一受容体を介する異なる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 100nM 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(39)。

3. プロスタノイド受容体のリガンド結合や情報伝達に関する領域

プロスタノイド受容体のリガンド結合や情報伝達に関する領域やアミノ酸残基に関しては、部位特異的変異を導入した変異受容体を作成し解析がなされている。とくに、これらの変異受容体は、プロスタノイド受容体間あるいはロドプシン型受容体一般に保存された領域やアミノ酸残基への変異を中心に作成されている。最初に変異プロスタノイド受容体を用いた解析は、Funk らによってなされた(20)。先に述べたように、プロスタノイド受容体においては第 7 膜貫通領域に L-X-A-X-R-X-A-S/T-X-N-Q-I-L-D-P-W-V-Y-I-L-X-R という非常に良く保存されたモチーフが存在

する。Funkらは、ヒト TP 受容体のこのモチーフに存在する 3 個のアミノ酸残基（1 番目のアミノ酸残基である L291, 5 番目の R295, 9 番目の W299）の役割を解析した。点突然変異を導入した W299L, R295Q, W299R, L291F 受容体は全て、TP 受容体アンタゴニストである [³H]SQ-29548 の結合能を失った。

一方、これらの変異受容体の中で、W299L 受容体以外の 3 個の変異受容体は TP 受容体アゴニストである I-BOP の結合能を失ったが、W299L 受容体は I-BOP や他の TP 受容体アゴニストである U-46619 に対して野性型受容体に匹敵する親和性を示した。この結果は、ヒト TP 受容体のリガンド結合における第 7 膜貫通領域の重要性を示すと同時に、受容体によるアゴニストとアンタゴニストの認識機構が異なっていることを示唆している。また、このモチーフの 5 番目のアミノ酸残基であるアルギニンや第 7 膜貫通領域に存在する電荷を持った他のアミノ酸残基の重要性について、ウサギ EP3 受容体でも解析されている(115)。この解析では、このアルギニン残基に変異を導入した R329A, R329E 受容体は [³H]PGE₂ の結合を失ったが、このモチーフの 14 番目のアミノ酸残基であるアスパラギン酸残基に変異を導入した D338A 受容体ではリガンド結合能に変化は認めなかった。しかし、D338A 受容体では情報伝達の障害が認められ、アゴニストである sulprostone による cAMP 濃度の低下が認められなかった。これらの結果は、プロスタノイド受容体の第 7 膜貫通領域がリガンド結合と情報伝達の両者に関係していることを示している。ヒト TP 受容体の R295 やウサギ EP3 受容体の R329 は、上記の第 7 膜貫通領域に保存されたモチーフの 5 番目のアミノ酸残基であり、全てのプロスタノイド受容体で保存されている。プロスタノイド分子のカルボキシル基の修飾は通常そのアゴニスト活性を低下させる(11)ことを含め、プロスタノイド分子のカルボキシル基はこの保存されたアルギニン残基とはイオン結合をすることが示唆された

(14, 50)。しかし、プロスタノイドおよびその類似化合物分子のカルボキシル基メチルエステル体のプロスタノイド受容体に対する親和性は、各々のプロスタノイド受容体によって異なっており、同じ受容体においても種によって差が認められる。たとえば、PGE₂ のカルボキシル基メチルエステル体のウサギ EP3 受容体への [³H]PGE₂ 結合に対する Ki 値は 780nM であり、PGE₂ の Ki 値である 2.1nM より 370 倍高い(115)。一方、マウス EP3 受容体では、この差はほとんど認められない(116)。この所見は、プロスタノイドとそのカルボキシル基メチルエステル体との受容体に対する結合親和性の差が、単に保存されたアルギニン残基との結合の差によると考えるのは困難であることを示している。この点に関して、ウサギ EP3 受容体を用いてプロスタノイド受容体間で良く保存されている第 2 細胞外ループでのモチーフの変異受容体を解析した報告がある(117)。この Q-W-P-G-T-W-C-F というモチーフの最初のトリプトファン残基 (W199) とスレオニン残基 (T202) が各々アラニンに置換された受容体では、PGE 類似化合物のカルボキシル基メチルエステル体の結合親和性が 100 倍程度上昇し、その結果カルボキシル基が修飾されていない化合物との Ki 値の比率は、野性型受容体における数百倍から変異受容体では 10 倍あるいはそれ以下に低下した。この結果は、プロスタノイドおよびその類似化合物分子のカルボキシル基メチルエステル体のプロスタノイド受容体に対する親和性は、受容体の第 2 細胞外ループによって決定される可能性を示唆している。では、プロスタノイド受容体の第 7 膜貫通領域に保存されたアルギニン残基の役割は何だろうか。Chang らは、この残基がイオン結合と水素結合の両方を形成する可能性を指摘し、この両機構のリガンド結合や情報伝達への関与を EP 受容体を用いて解析した(116)。まず、その C-1 位が陰性荷電を持つ PGE₂、水素供与体である PGE₂ メチルエステル、水素供与体となる 1-OH-PGE₂ を用いて EP 受容体に対する結合と効力を

比較検討した。その結果、PGE₂とPGE₂メチルエステルは4種類のEP受容体サブタイプに対してほぼ同等の効力を示し、1-OH-PGE₂の効力はかなり低いことから、アゴニストの効力を発揮するには水素結合を形成すれば十分であることが示唆された。ついで彼らはこの仮説を確認するために、このアルギニン残基を電荷を持たない極性アミノ酸であるGln, Asnあるいは非極性アミノ酸であるLeuで置換した変異受容体を作成し、これに対するPGE₂やその類似化合物の結合と効力を解析した。その結果、PGE₂の親和性はGln, Asnで置換した変異受容体に対してはほとんど変化しなかったが、Leuで置換した変異受容体に対してはその親和性が約40倍低下した。これらの結果は、保存されたアルギニン残基はイオン結合と水素結合の両方を形成することが可能であるが、イオン結合は必須ではなく水素結合のみでリガンド結合には十分であることを示した。また根岸らは、Gi, Gsと連関するそれぞれのEP3受容体サブタイプに対するPGE₂とsulprostoneの効力を比較した(117)。この結果、sulprostoneはGi活性化受容体においてはPGE₂と同等の効力を示し、Gs活性化受容体ではその効力はPGE₂の10倍以上低いことから、Gsの活性化には水素結合のみでは不十分であることが示唆された。さらに、sulprostoneの結合親和性はGiに連関するEP3受容体サブタイプよりGsに連関するEP3受容体サブタイプに対して低く、PGE₂はGsに連関するEP3受容体の保存されたアルギニン残基の変異体であるR332Q受容体には結合しなかった。これらの結果は、保存されたアルギニン残基が関与するリガンド結合の特性は受容体に連関するG蛋白質の種類によって異なる可能性を示している。

他の問題点として、第1, 第2細胞外ループに保存された2個のシステイン残基が、受容体の構造保持に重要なジスルフィド結合を形成するかどうかが挙げられる。ウサギEP3受容体のこの残基をアラニンで置換したC204A受容体では、PGE₂やその類似化合物の結合親和性に変化は認

められなかった(118)。この結果は、TP受容体で報告された結果(119, 120)と異なっている。これらの報告では、ヒトTP受容体の保存されたシステイン残基をセリン残基で置換した変異受容体を用いて、リガンド結合や情報伝達が解析された。第1細胞外ループのCys105あるいは第2細胞外ループのCys183(ウサギEP3受容体のCys204に相当する)に変異を加えた受容体では、そのリガンド結合能は完全に消失した。また、これらに相当するCys残基は他のロドプシン型受容体においてはジスルフィド結合を形成することが想定されており(121)、TP受容体はDTTによる還元あるいはSH基のアルキル化によってそのリガンド結合能を失う(122)ことから、Cys105とCys183は受容体の構造維持に必要なジスルフィド結合を形成することが示唆された。さらに、Cys102の変異受容体はリガンド結合活性に影響を与え、Cys223変異受容体はリガンド結合能は保持しているがアゴニスト刺激によるカルシウム動員機構に障害があることが明らかにされた。このCys223は、ほとんどの他のプロスタノイド受容体では保存されていないことから、このアミノ酸残基のG蛋白質との連関における役割の評価は困難である。一方、ひとつの保存されたアミノ酸残基がG蛋白質との連関に関与することが、遺伝性疾患の解析によって明らかとなった。平田らは、この出血傾向を示す遺伝性疾患を解析し、それがTP受容体の第1細胞内ループに存在するアルギニン残基(Arg60)のロイシンへの点突然変異によることを解明した(107)。この変異受容体は、正常なリガンド結合能を持つが、そのPI代謝回転惹起能が欠失していた。さらに詳細な解析の結果、この変異がTP受容体の2種類のアイソフォームにおいてGq蛋白質との連関を障害するが、βアイソフォームとGi蛋白質との連関には影響しないことが明らかになった(70)。この結果、この領域が受容体とGq蛋白質との連関に関与するが、Gi蛋白質との連関には関与しないことが示唆された。このアルギニン残基は、他のプロスタノイ

ド受容体の相当する部位にも保存されているが、この残基がこれらの受容体においてもG蛋白質との連関に参与するかどうかは現時点では不明である。

前述したように、プロスタノイド受容体は各々リガンド結合特異性を持っており、ある受容体は種が違っていると異なったリガンド結合特異性を示す。このようなりガンド結合特異性を決定する領域を同定するために、異なった二つの受容体から構成されるキメラ受容体を用いた解析が行われた。上記のように、IP受容体はIPリガンドである iloprost, carbacyclin や PGE₁ に高い親和性を示し、PGE₂ や他のタイプのプロスタノイドは結合しない。一方、DP受容体はDPリガンドのみを特異的に結合する。小林らは、DP・IPキメラ受容体を作成し、IP、DP受容体のリガンド結合領域を解析した(123)。その結果、IP受容体のリガンド結合特異性はプロスタノイド分子の環構造とその側鎖構造を認識する異なった領域によって規定されることが示唆された。また、側鎖構造は基本的に第6から第7膜貫通領域で認識されるのに対し、環構造は別の領域で認識され、この領域はPGI、PGEの環構造のみならずPGDの環構造も認識することが示された。一方、DP受容体のリガンド結合特異性には第3膜貫通領域が重要であることが示唆された。ラットTP受容体は、アゴニストであるI-BOPをヒトTP受容体より10倍高い親和性で結合する。Dornらは、ラット・ヒトTPキメラ受容体を作成し、このリガンド結合の差異に参与する領域を解析した(124)。その結果、N末端から第1膜貫通領域にかけての領域が参与することを明らかにした。さらに、この領域のラットとヒトTP受容体で異なる10個のアミノ酸残基に変異を導入した受容体を解析し、第1膜貫通領域のVal36, Val37, Ala40がこのリガンド結合の特異性に参与することを解明した。

Ⅲ. プロスタノイド受容体の発現分布

従来の薬理学的・生化学的研究は、プロスタノ

イド受容体が生体の多くの組織に存在することを見出してきた。しかし、一般的にプロスタノイド受容体の発現レベルが低いことや、一つの組織に複数の受容体タイプ・サブタイプが発現していることが多いことから、各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。一方、分子生物学的手法であるノーザン・ブロット解析や *in situ* ハイブリダイゼーション法の導入によって、プロスタノイド受容体の分布に関する新たな知見が得られつつある。プロスタノイド受容体 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プロスタノイド受容体の組織分布を表3にまとめて示す。これらの解析により、各々のプロスタノイド受容体が生体において特異的な分布を示し、その発現量も組織によって異なることが明らかになった。

1. DP 受容体

プロスタノイド受容体の中で、DP受容体の発現が最も少ない。マウスでは、DP受容体は回腸においてのみ中等度の発現を認め、肺、胃、子宮で極少量発現している。ヒトにおいても同様であり、その発現は小腸においてのみ認められる。また、睡眠の誘導などPGD₂の中樞作用が知られているが、マウスやヒトの脳ではDP受容体はほとんど発現していない。これらの結果は、DP受容体はいくつかの臓器に発現しているにしても、その特定の領域あるいは細胞に発現していることを示唆している。この点に関して、マウスの脳でのDP受容体 mRNA の発現が *in situ* ハイブリダイゼーション法によって解析された(125)。この結果、DP受容体の発現は脳軟膜に多く、神経細胞や膠細胞にはまったく発現を認めなかった。同様に、分画された脳軟膜と脳実質より調節された mRNA を用いたノーザンブロット解析では、3.5kbのDP受容体メッセージは脳軟膜に強く発現し、脳実質では認められなかった。興味深いことに最近、脳特異的PGD合成酵素の発現が免疫組織学的あるいは *in situ* ハイブリダイゼーション法によって解析され、それが脳軟膜や脈絡叢に

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
 * 発現量は-, +, #, ##の順に多くなっている.
 # n.d.: not determined.

Organs	Expression level of mRNA*											
	mDP	mTP	mIP	hIP	mEP ₁	mEP ₂	hEP ₂	mEP ₃	hEP ₃	mEP ₄	hEP ₄	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.	#

多く発現していることが示された(126). これらの結果, PGD₂を合成する酵素と DP 受容体は脳においてはともに脳軟膜に発現していることが明らかとなり, これは脳軟膜の細胞によって PGD₂が合成され, ついでこれがオートクラインあるいはパラクライン的に脳軟膜の細胞に作用することを示唆している. また, 睡眠誘発作用を解析するために脳の種々の部位に微量注入された PGD₂は, クモ膜下腔に注入された時が脳実質に注入された時よりその睡眠誘発作用が強いことが示された. さらにこの解析の結果, PGD₂の睡眠誘発の作用部位は前脳基底部口側の腹側面であると結論づけられた(127). しかし, DP 受容体はこの部位の脳実質細胞には発現していない. 一方, この部位の脳軟膜は非常に厚く, DP 受容体 mRNA の発現量も多い. これらの結果は, この部位のクモ膜下腔に注入された PGD₂は, 脳軟膜に存在する DP 受容体に作用して睡眠を誘導する可能性を示している. もしこれが真実なら, これらの所見は, 脳軟膜細胞から分泌される液性因子が脳実質に運搬されそこで作用し脳の機能に影響を与えるという新しい脳機能制御機構のモデルを提示するものと考えられる. また, 脳軟膜は末

梢循環と脳の中間に位置する組織であり, このモデルに示された機構によって, サイトカインなど血液中の情報伝達物質を脳に伝える役割を果たす一つの器官と見なされる.

2. EP 受容体

腎臓での EP 受容体の発現は *in situ* ハイブリダイゼーション法で解析され, EP₃ 受容体はおもに髄質の尿細管上皮に, EP₁ 受容体は乳頭部集合管上皮に, EP₄ 受容体は糸球体に発現していることが示された(128, 129). これらの受容体の発現パターンは, 各々 PGE₂によるイオン輸送, 水再吸収, 糸球体濾過の調節に対応していると考えられる. 同様の解析は神経系においても行われ, EP₃ 受容体の発現分布が明らかにされた(130). この結果, EP₃ 受容体は後根神経節の小型神経細胞に多く発現しており, この受容体が PGE₂によって仲介される痛覚過敏反応に関与することが示唆された. また, この受容体の脳における発現はプロスタノイド受容体の中で最も多く, 大脳基底核や視床下部の神経核を含む多くの神経細胞に発現していた. この結果は, 発熱反応やストレス反応などの PGE₂の中枢作用に EP₃ 受容体関与する可能性を示している.

EP3 受容体の各受容体サブタイプのマウス消化管での発現も *in situ* ハイブリダイゼーション法で解析されている(131). EP1 受容体 mRNA は、胃の粘膜筋板に中等度発現しており、発現量は低い食道や小腸の粘膜筋板にも発現を認める。EP1 受容体は消化管の平滑筋層には発現しておらず、この受容体は粘膜局所の運動や形態の保持に働くと考えられる。一方、EP3 受容体 mRNA は、消化管の全体を通して縦走筋の平滑筋細胞に発現しているが、輪状筋での発現は認めない。さらに、EP3 受容体はアウエルバッハ神経叢にある神経筋の神経細胞に強く発現している。これらの結果は、EP3 受容体が直接あるいは神経系を介して間接的に消化管平滑筋の収縮を制御する可能性を示している。また、EP3 受容体は胃底腺の壁細胞と主細胞の両者に発現している。EP3 受容体は胃酸の分泌に関与することが示唆されており、壁細胞にその発現が認められることと一致している。EP4 受容体 mRNA は胃前庭部の腺細胞に多く発現しており、この受容体が胃での粘液分泌に関与することが示唆された。また、EP4 受容体は小腸の絨毛上皮細胞に多く発現している。一方、EP4 受容体の情報伝達は cAMP の上昇を介して行われ、PGE₂ は小腸において cAMP の上昇を介してクロライドイオンの分泌を促し、ナトリウムイオンの吸収を抑制することが知られている。したがって、EP4 受容体の小腸での発現パターンは EP4 受容体がこれらのイオン輸送や PGE₂ によって誘発される下痢に関与することを示唆している。この解析では、EP2 受容体 mRNA は消化管でほとんど認められず、この受容体の発現量は非常に少ないことが明らかとなった。

in situ ハイブリダイゼーション法での解析は、子宮における EP 受容体の各サブタイプ受容体 mRNA の発現解析にも適用された(132)。その結果、EP2、EP3、EP4 受容体 mRNA の発現量や局在が、PMSG と hCG 処理による擬妊娠の経過とともに変化することが明らかとなった。EP2 受容体 mRNA の管腔上皮での発現は、擬妊娠前

にはほとんど認められず擬妊娠 5 日目にピークを示し、その後速やかに消失する。また、この EP2 受容体 mRNA 発現誘導の時間経過は COX-2 mRNA のそれと良く一致し、またそのピークが胚盤胞の着床時期にも重なっている。さらに、この着床がインドメタシン処理によって阻害されることから、EP2 受容体が受精卵の着床に何らかの役割を果たす可能性を指摘している。一方、EP4 受容体 mRNA の発現量は擬妊娠 3 日目より上昇し、5 日目以後も高い発現量が持続する。その発現は当初管腔上皮に限局しているが、次第に子宮内膜の間質細胞や分泌腺上皮での発現が増強してくる。PGE₂ は cAMP の上昇を介して子宮内膜の脱落膜化にともなう変化を惹起することが報告されており(133)、これが発現誘導された EP4 受容体によって仲介されることが示唆された。EP2、EP4 受容体 mRNA が子宮内膜に発現するのに対し、EP3 受容体 mRNA は子宮平滑筋層に発現が認められる。その発現量は、擬妊娠 1 日目には低いのが 5 日目をピークに増加し、その後次第に低下する。また、EP3 受容体 mRNA の局在も擬妊娠の経過とともに変化する。それは、最初縦走筋に発現しているが、擬妊娠 5 日目には輪状筋に発現が移行する。このように、子宮における EP 受容体の発現分布の解析は、プロスタノイド受容体の発現が生理的状況の変化にともなって変動するという興味深い例を提示している。EP 受容体の発現量とその局在の変化は、子宮での受精や着床といった現象にともなう子宮の収縮や内膜の変化に対応するものと考えられる。

3. FP 受容体

リガンド結合実験からもわかるように、FP 受容体 mRNA は卵巣黄体に最も多く発現している。その黄体細胞での発現パターンは、擬妊娠マウスで解析された(134)。PMSG 処理後 48 時間の間、マウス卵巣における FP 受容体 mRNA の発現は認められない。しかし、hCG 処理によって一旦排卵が誘発されるや、排卵後の卵胞顆粒膜細胞は FP 受容体 mRNA を発現し始める。興味深いこ

とに、この発現レベルは黄体細胞がアポトーシスにより死滅するまで増加し続ける。PGF₂は黄体退縮の惹起を介して分娩を誘発することから、黄体におけるFP受容体発現の調節機構の解明が分娩誘導機構の理解にとって重要と考えられる。ノーザンブロット解析では、FP受容体 mRNA は腎臓、心臓、肺、胃などにも発現している。また、*in situ* ハイブリダイゼーション法で解析すると、FP受容体は腎臓において皮質尿細管細胞に限局して発現している(135)。しかし、腎尿細管でのFP受容体の生理機能は不明である。FP受容体はNIH3T3細胞などの線維芽細胞での作用が知られており、PGF₂はこれらの細胞に対してGq-PLC系の情報伝達経路を介して増殖刺激を与える。実際、NIH3T3細胞におけるFP受容体 mRNA の発現が報告されている(63)。

4. IP 受容体

マウスの種々の組織でのIP受容体 mRNA の発現は、*in situ* ハイブリダイゼーション法で解析されている(136)。IP受容体 mRNA は後根神経節の神経細胞に最も多く発現しており、その発現細胞の多くはサブスタンスPの前駆物質であるpreprotachykinin Aを同時に発現している。これは、IP受容体が疼痛の伝達に関与することを示唆している。興味深いことに、後根神経節の一部の神経細胞は、IP受容体といくつかのEP受容体サブタイプを同時に発現している。これは、IPとEP受容体が痛覚の伝達において異なっているが一部重なった役割を果たすことを示唆している。また、IP受容体は巨核球や動脈の平滑筋に多く発現しており、PGI₂の心血管系での作用と良く一致している。一方、IP受容体は静脈には発現していない。腎臓ではIP受容体は糸球体の輸入動脈に発現しており、糸球体濾過率の調節に関与することが示唆されている。また、IP受容体は胸腺の成熟T細胞や脾臓のリンパ球に発現しているが、その機能は不明である。

5. TP 受容体

従来、TP受容体は薬理的には主として血小

板や血管・気管支平滑筋においてその発現が知られていた。また、生化学的には放射性リガンドを用いて、種々の組織・細胞においてTP受容体の発現が同定された。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(137)、腎糸球体メサンジウム細胞(138)、単球(139)などが含まれる。マウスTP受容体 mRNA のノーザンブロット解析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(44)。TP受容体 mRNA の *in situ* ハイブリダイゼーション法による解析では、マウス胸腺では皮質に、ラット腎臓(45)では糸球体メサンジウム細胞、血管平滑筋および腎杯の移行上皮に特異的な発現が認められた。抗ラットTP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限局していた(140)。この結果は、TXA₂が精子の受精機能に何らかの役割を果たすことを示唆するが、その詳細は不明である。一方、マウス胸腺の皮質にTP受容体 mRNA が多く発現していることから、ついで放射性リガンドを用いた結合実験が行われた。その結果、TP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、末梢T細胞である脾臓のT細胞においてもかなりの量の発現が認められた。さらに、TP受容体アゴニストであるSTA₂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(141)。これらの結果、TXA₂は胸腺細胞の分化・成熟あるいは免疫機能の調節に何らかの役割を持つことが示唆された。

IV. プロスタノイド受容体欠損マウスを用いた解析

これまで述べたように、分子生物学的な手法を用いた解析も加わり、現在プロスタノイド受容体の構造、機能およびその生体内分布について多くの知見が得られている。しかし、生体においてプ

ロスタノイドの果たす役割やその意義については十分には解明されていない。また、発熱などの良く知られた PGE_2 の作用にどの受容体サブタイプが関与するかについても必ずしも明らかではない。これらの点のいくつかに関しては、各々のプロスタノイド受容体欠損マウスの解析によって明らかにされつつある。

1. IP 受容体欠損マウスの解析

PGI_2 は血小板活性化の抑制と血管平滑筋の弛緩作用を示す。一方、トロンボキサン A_2 は血小板活性化と血管平滑筋の収縮作用を示すことから、この両者のバランスが血栓傾向や動脈硬化の要因として重要と考えられている(142)。

IP 受容体遺伝子の第 1 および第 2 エクソンの一部をネオマイシン耐性遺伝子で置換し、相同組換えによって IP 受容体を欠損するマウスが作製された(143)。IP 受容体ホモ欠損マウスは正常に発育し、生殖機能にも異常を認めなかった。また、ホモ欠損マウスの血小板や血管平滑筋は PGI_2 アゴニストに対する反応を欠如するが、出血時間や血圧には変化を認めなかった。したがってこれらの血小板や血管平滑筋での作用は、種々の病態時の血小板機能や局所での臓器血流の調節等に関与すると考えられる。つぎに血管内皮障害モデルを用いた血栓形成(144)が検討された。頸動脈の外膜側より塩化第二鉄を添加して血管内皮障害を惹起し、4 時間後に血流と血管組織像が解析された。その結果、ホモ欠損マウスでは著明な血栓形成の増強が認められ、 PGI_2 が血管の内皮障害に起因する血栓形成に重要な役割を果たすことが示された。また、動脈硬化が血管内皮の障害を契機として発症・進展することを考えると、この抗血栓効果が PGI_2 の持つ抗動脈効果の作用機構の一部であると考えられる。

従来、プロスタノイドは炎症のメディエータとしての役割が知られている(145)。なかでも PGE_2 がその中心と考えられ、 PGI_2 の関与は明らかではなかった。そこで、炎症反応の指標として血管透過性の亢進について焦点をあて、外来性

に投与したこれらの PG の作用が解析された。マウスに pontamine skyblue 色素を静注した後、背部皮下に bradykinin 単独あるいは PG と併せて注入し、4 時間後に皮内に漏出した色素を抽出し比色定量した(146)。この結果、野性型マウスでは PGE_2 と PGI_2 はともに bradykinin の血管透過性亢進作用を強く増強し、IP ホモ欠損マウスでは PGI_2 の作用のみが欠失していた。この結果は、 PGE_2 と PGI_2 がともに炎症の場において血管透過性を亢進させる可能性を示唆した。ついで内因性 PG の炎症反応への関与がカラゲニン浮腫モデル(147)を用いて検討された。マウス後肢にカラゲニンを皮下注入し、惹起された炎症反応に伴う血管透過性亢進による浮腫を足趾の体積の変化として解析した。その結果、ホモ欠損マウスでは浮腫の形成が著明に減弱しており、その程度は野性型マウスをインドメタシン処理したものと同程度であった(図 5a)。この結果、予想に反して PGE_2 ではなく PGI_2 がカラゲニン炎症に伴う血管透過性に重要なプロスタノイドであることが明らかとなった。

一方、脊髄後根神経節の神経細胞の約 50% に IP 受容体の発現が認められることから知覚伝達への PGI_2 の関与が示唆されている。そこで、酢酸ライジング(148)を用いた炎症反応に伴う疼痛が解析された。マウス腹腔内に希酢酸を注入し疼痛反応としてのライジングの回数を 30 分間計測した。その結果、野性型マウスでは約 40 回反応が認められるのに対し、IP ホモ欠損マウスでは約 8 回と疼痛反応の著明な減少を認め、その程度は野性型マウスをインドメタシン処理したものと同程度であった(図 5b)。この結果、この系において痛覚の伝達はおもに IP 受容体を介していることが証明された。このように、 PGI_2 は心血管系での抗血栓作用以外に炎症反応の場において血管透過性の亢進や疼痛の伝達等非常に重要な役割を果たしていることが示された。

2. FP 受容体欠損マウスの解析

従来 PGF_2 の作用として、子宮・気管・消化

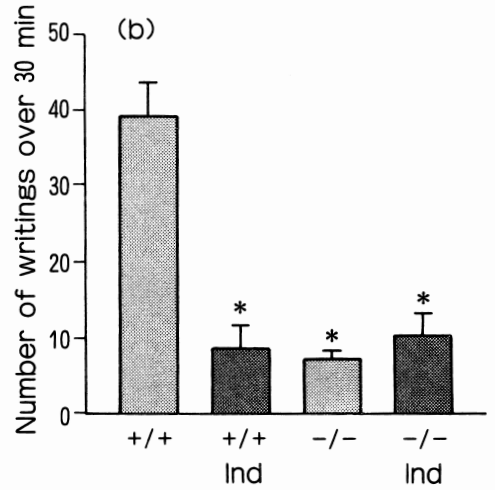
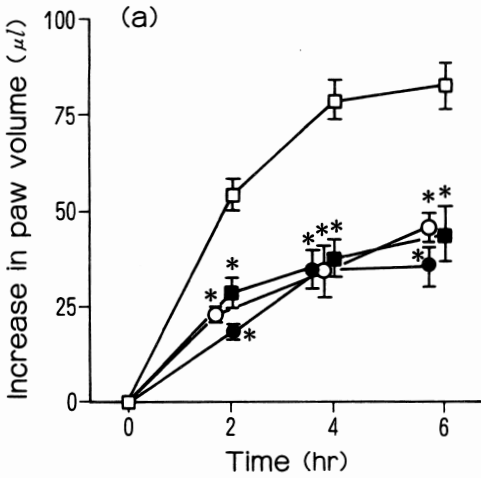


図 5. IP 受容体欠損マウスにおける炎症性浮腫と疼痛感受性

(a)カラゲニン誘発浮腫

2%カラゲニン溶液30 μ lをマウスの右後肢足掌に注入し、足の体積の経時変化を測定した。インドメタシン(10mg/kg)はカラゲニン注入の30分前に腹腔内に投与した。□野生型マウス(n=9), ○IP受容体欠損マウス(n=10), ■インドメタシン処理した野生型マウス(n=8), ●インドメタシン処理したIP受容体欠損マウス(n=7), *p<0.01.

(b)酢酸ライジング試験

0.9%酢酸溶液(5ml/kg)を腹腔内に投与し、30分の間に認められるライジング(疼痛反応)の回数を測定した。インドメタシン処理は図3の説明と同様に行った。+/+野生型マウス, -/-IP受容体欠損マウス, Indインドメタシン処理, n=6~9, *p<0.01.

管平滑筋の収縮作用、黄体退縮作用、眼圧低下作用等が知られている。

FP受容体遺伝子の第2エクソンの一部を β -galactosidaseおよびネオマイシン耐性遺伝子で置換し、相同組換えによってFP受容体を欠損するマウスが作製された(149)。FP受容体ホモ欠損マウスは正常に発育した。従来、ヒツジやブタでは黄体退縮にPGF_{2 α} が必須であることが知られており(150, 151)、実際にマウスの黄体にもFPが多く発現している(34, 134)。しかし、FP受容体ホモ欠損マウスのメスの性周期には異常が認められなかった。また、FP受容体ホモ欠損マウスのメスは妊娠可能であり、その卵巣での黄体数および子宮での着床数は正常であった。この結果は、FPのホモ欠損マウスのメスの排卵、受精、着床は正常であることを示している。

野生型マウスの体重は妊娠20~21日まで増加し、その後分娩に伴い減少する。しかし、ホモ欠

損マウスの体重は妊娠22~23日まで増加し、その後分娩が認められず体重は約1週間かかって徐々に減少した(図6a)。このマウスの子宮では、妊娠期間の長期化による胎盤の変性と胎児の子宮内死亡に伴う吸収が観察された。一方、これらの胎児は分娩予定日に帝王切開し借り親に託すことにより救助され(図6b)、その後正常に発育した。これらの結果、ホモ欠損マウスでは分娩の発来機構に異常があることが明らかとなった。

分娩の誘発にはいくつかのホルモンの働きが関係しており、なかでもオキシトシンが重要であることが知られている(152)。実際、分娩時には子宮平滑筋のオキシトシン感受性が昂進するが、これは子宮でのオキシトシン受容体の発現誘導によることが知られている(153)。そこで、妊娠20日のマウス子宮のオキシトシン感受性が平滑筋の収縮反応で、またオキシトシン受容体mRNAの発現がノーザンブロット法で解析された。その結果、

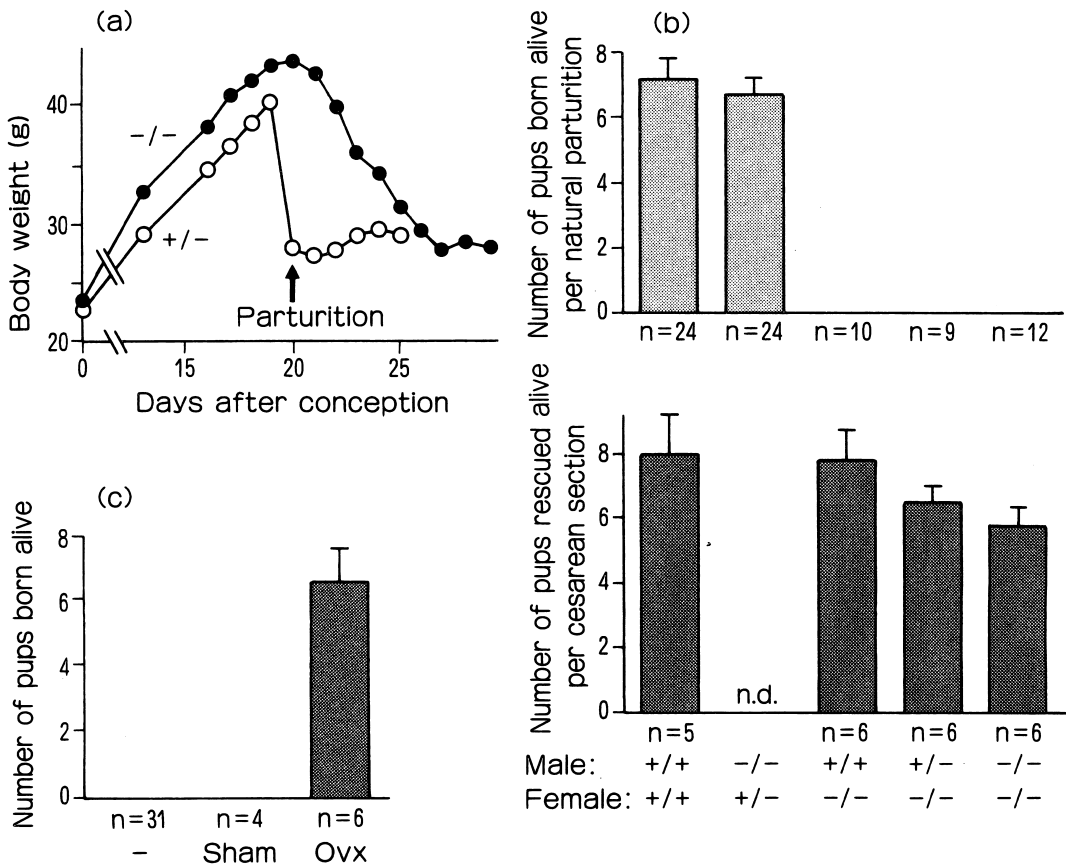


図 6. FP 受容体欠損マウスに認められた分娩障害

- (a) 妊娠に伴う体重の経時変化
○ヘテロ接合体, ●FP受容体欠損マウス.
- (b) 出生児数に対する雌雄マウスの遺伝子型の影響(上段)と帝王切開によって救助された生児数(下段)メスがホモ接合体の場合はオスの遺伝子型とは無関係に分娩障害が認められ児は死亡する. しかし, これらも帝王切開後借り親に託すことにより野生型とほぼ同数の生児が得られる. n.d. 実施せず. +/+野生型マウス, +/-ヘテロ接合体, -/-FP受容体欠損マウス.
- (c) FP受容体欠損マウスの卵巣摘除による分娩の正常化
妊娠19日のFP受容体欠損マウスに卵巣摘除術を行い, 翌日に得られた生児数を示す. -無処置, Sham シャム手術, Ovx 卵巣摘除術.

野生型マウスのオキシトシン感受性は昂進しオキシトシン受容体の発現は著明に増加していたが, ホモ欠損マウスではこれらの変化は全く認められなかった.

一方, 母体の血中プロゲステロン濃度は分娩に先だって低下し(154), これが子宮平滑筋の収縮力の増加につながると考えられている(155). そこで, マウス血中プロゲステロン濃度を測定すると, 野生型マウスでは妊娠19~21日で著明に低下

するが, FPホモ欠損マウスでは変化が認められなかった. この結果は, FPホモ欠損マウスで見られる分娩障害がプロゲステロンの持続産生に起因することを示唆するものであった. 実際に, 主要なプロゲステロン産生臓器である卵巣を妊娠19日に摘出することにより, FPホモ欠損マウスは分娩が可能となった(図6c). また, 卵巣摘出によって12時間以内に子宮でのオキシトシン受容体が発現誘導されることが確認された. これらの結

果を総合すると、FP ホモ欠損マウスの分娩障害は黄体退縮が起きずプロゲステロンが持続して分泌されることが原因と考えられた。

従来、アスピリンなどPG産生を抑制する薬物が分娩遅延をきたすことが知られていたが(156)、どのPGがどのような機構で分娩に関与するかは不明であった。また、オキシトシンを投与すると子宮でのPGF_{2α}産生が昂進することから、PGF_{2α}の作用はオキシトシンによって調節されると考えられていた(157)。しかし、FP欠損マウスの解析によって、PGF_{2α}がまず黄体退縮を引き起こし、これが血中プロゲステロン濃度を低下させ、続いて子宮でのオキシトシン受容体の発現を誘導するという分娩において働く一連の機構が解明された。この結果、PGF_{2α}は子宮収縮作用を示すのみでなく、分娩の発来において基本的に重要な役割をもつプロスタノイドであることが示された。

3. EP4 受容体欠損マウスの解析

最近、EP4受容体欠損マウスの作出と解析の報告が2カ所の研究所からなされ(158, 159)、ほぼ同様の結果が得られた。EP4受容体ホモ欠損マウスは生後呼吸を開始し正常に授乳を受けるが、その95%は次第に衰弱し蒼白となって72時間以内に死亡した。残りの5%のマウスの動脈管は閉鎖しており、正常に発育して1年以上生存する。このEP4ホモ欠損マウスの生存率はマウスの遺伝的背景の影響を受けて変動する。衰弱したホモ欠損マウスを解剖すると肺うっ血と左心室や肺動脈の拡張など左心不全の所見が認められた。そこで、心血管系を解析したところ動脈管の開存が見い出された。動脈管は肺動脈と下行大動脈を繋ぐ血管であり、胎生期に肺への血流を大動脈ヘシヤントする働きをする(160)。通常、動脈管は生直後に閉鎖するが、これは肺呼吸の開始に伴う動脈血酸素分圧の上昇による動脈管の収縮と出産に伴うPGE₂の血中濃度の低下に基づく動脈管拡張作用の消失によると考えられている。動脈管が開存すると肺への血流が過剰となるため肺高血圧症を経て心不全に陥る。従来、アスピリン (PGE₂を

めてプロスタノイドの産生を抑制する薬物)を妊婦に投与すると動脈管が胎生期に閉鎖することが知られており(161)、この作用は動脈管開存症の治療に利用されている(162)。一方、PGE₂は動脈管の閉鎖を抑制することが知られており、この作用を利用してある種の心奇形の治療に用いられている(163)。最近、PGE₂の動脈管拡張作用はEP4受容体を介することが示された(164)。実際に、EP4受容体が野性型マウスの動脈管に多く発現しており、EP4受容体ホモ欠損マウスでは欠損していることが*in situ*ハイブリダイゼーション法によって確認された。これらの結果は、EP4受容体が胎生期に動脈管を開存させる役割を持つことを示唆しているが、EP4受容体ホモ欠損マウスで認められた動脈管の開存の所見とは一見矛盾する。この結果の解釈は困難であるが、動脈を持続的に拡張しておき突然これを中止することによって血管の収縮が増強される現象(165, 166)が目される。EP4ホモ欠損マウスでは胎生期に十分な動脈管の拡張が得られずそれに対抗する収縮力の増強が認められない、その結果出生直後の動脈管の収縮が相対的に弱まる可能性が挙げられる。いずれにせよ、EP4受容体が出生直後の動脈管の閉鎖にとって重要な役割を持つことが明らかにされた。

4. EP3 受容体欠損マウスと発熱

発熱は疾患の主要な徴候であり、菌体成分であるLSPや無菌性炎症などの外因性発熱物質により引き起こされる。これらの外因性発熱物質はIL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α, MIP-1βなどのサイトカインの産生を惹起し、これらが内因性発熱物質として脳に作用する(167)。従来、発熱がプロスタノイドの産生を阻害するアスピリンなどの抗炎症薬によって抑制される(168)ことから、プロスタノイドが発熱にとって重要な役割を果たすと考えられてきた。なかでもPGE₂が発熱のメディエータとして重視されてきた(169)が、この点に関しては多くの議論がなされてきた(167, 170~173)。また、PGE₂の発熱作用がEP1,

EP2, EP3, EP4のうちどのサブタイプ受容体を介して発揮されるのかについても不明であった。そこで4種類のEP受容体サブタイプの各々を欠損したマウスを用いてPGE₂の発熱作用が解析された(174)。PGE₂を野性型マウスの脳室内に投与すると25分後をピークとして約2℃の一過性の発熱が出現する。EP1, EP2, EP4受容体欠損

マウスではPGE₂の脳室内投与により野性型マウスと同様の発熱反応が出現したが、EP3受容体欠損マウスでは全く反応が認められなかった(図7a)。この結果、PGE₂の発熱作用はEP3受容体を介することが明らかになった。ついで、代表的な内因性発熱物質であるIL-1βを野性型マウスの静脈内に投与すると20分後をピークとして約1

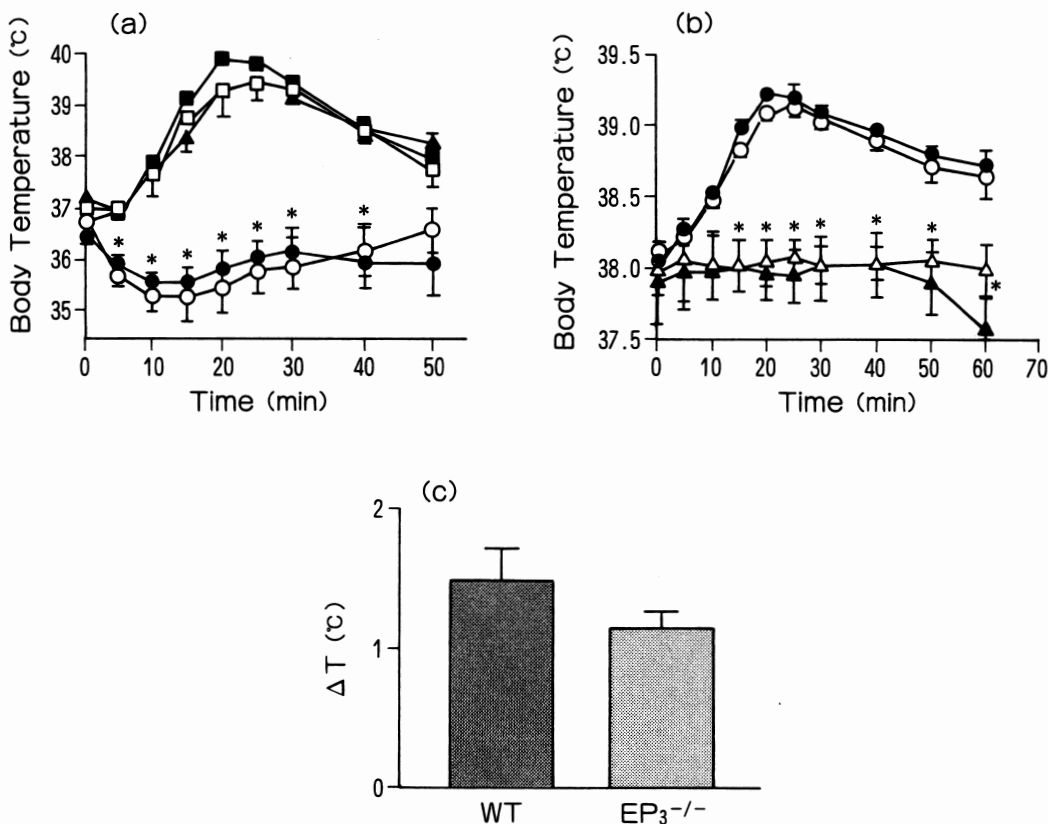


図7. EP3受容体欠損マウスと発熱

(a) EP3受容体欠損マウスでのPGE₂誘発発熱

PGE₂ (1 nmol)を脳室内に投与し、直腸温を経時的に計測した。EP1(■), EP2(□), EP4(▲)受容体欠損マウスでは投与後20~25分をピークとして一過性の発熱を認める。しかし、EP3(●)受容体欠損マウスは全く発熱反応を示さない。○ピークルを投与したEP3受容体欠損マウス, *p < 0.01 (PGE₂投与した野生型マウスに対して)。

(b) EP3受容体欠損マウスでのLPS誘発発熱

LPS (10 mg/kg body weight)を尾静脈より投与し、直腸温を経時的に計測した。野生型マウス(○)とEP1受容体欠損マウス(●)では投与後20~25分をピークとして持続性の発熱を認める。しかし、EP3受容体欠損マウス(▲)は全く発熱反応を示さない。△ピークルを投与したEP3受容体欠損マウス, *p < 0.01。

(c) EP3受容体欠損マウスでのストレス誘発発熱

マウスをホルダーに入れることで拘束性ストレスを加え、30分後の体温の上昇を測定した。この解析では、野生型マウスとEP3受容体欠損マウスとでその体温上昇の程度に差は認められない。

℃の一過性の発熱が出現し、脳室内に投与すると1時間後より数時間持続する発熱が認められた。この発熱反応もEP3受容体欠損マウスにおいて特異的に消失しており、少なくとも一部の内因性発熱物質による発熱はEP3受容体を介することが明らかになった。一方、LPSによる発熱はIL-1 β を含む複数の内因性発熱物質(サイトカイン)の産生を介して発揮されている。実際、IL-1 β 欠損マウスにおいてもLPSによる発熱反応は野性型マウスと同様に認められ(175, 176)、IL-1 β 以外のサイトカインもLPS発熱に重要な役割を果たすと考えられる。そこで、まずEP3受容体欠損マウスの腹腔マクロファージを用いてLPS刺激によるIL-1 β とIL-6の産生を検討し、これらの産生が正常であることが確認された。また、LPSを野性型マウスに静脈内投与すると20分後をピークとして約1℃の持続性の発熱が出現した。ついで、LPSをEP3受容体欠損マウスに投与すると全く発熱反応が認められなかった(図7b)。この結果、PGE₂はEP3受容体を介して外因性発熱物質による発熱のメディエータとして働くことが明らかとなった。一方、EP3受容体欠損マウスでは、マウスを拘束することによるストレス誘発発熱反応は正常であり(図7c)、発熱機構そのものは正常と考えられた。以上の結果、PGE₂は外因性発熱物質や内因性発熱物質による発熱の最終メディエータとして作用すること、およびその作用はEP3受容体を介することが証明された。

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、各々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り、その現在までの成果についても紹介した。今後は、プロスタノイドの炎症・免疫系、骨、腎、消化管、中枢神経、循環器

など多くの臓器・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。その結果は、選択的で副作用の少ない各プロスタノイド受容体作用薬の開発やその適用の指標に資すると考えられる。

文 献

- (1) Bito, L.Z. (1972) *J. physiol.* **221**, 371-387.
- (2) Pickles, V.R. (1967) In Nobel Symposium. Vol 2: Prostaglandins, edited by S. Bergstrom and B. Samuelsson, pp.79-83, Almquist & Wicksell, Stockholm.
- (3) Andersen, N.H., Eggeman, T.L., Harker, L.A., Wilson, C.H. & De, B. (1980) *Prostaglandins* **19**, 711-745.
- (4) Gardiner, P.J. & Collier, H.O.J. (1980) *Prostaglandins* **19**, 819-841.
- (5) Kennedy, I, Coleman, R.A., Humphrey, P.P., Levy, G.P. & Lumley, P. (1982) *Prostaglandins* **24**, 667-689.
- (6) Jones, R.L., Peesapati, V. & Wilson, N.H. (1982) *Br. J. Pharmacol.* **76**, 423-438.
- (7) Butcher, R.W. & Sutherland, E.W. (1967) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **139**, 849.
- (8) Kuehl, F.A. & Humes, J.L. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **69**, 480-484.
- (9) Rao, C.V. (1973) *Prostaglandins* **4**, 567-576.
- (10) Powell, W.S., Mammarmstrom, S. & Samuelsson, B. (1974) *Eur. J. Biochem.* **41**, 103-107.
- (11) Coleman, R.A., Kennedy, I, Humphrey, P.P.A., Bunce, K. & Lumley, P. (1990) In: J.C. Emmett (Ed.), *Comprehensive Medicinal Chemistry, Vol.3: Membranes and Receptors*. Pergamon Press, Oxford, UK, pp.643-714.
- (12) Coleman, R.A., Grix, S.P., Head, S.A., Louttit, J.B., Mallett, A. & Sheldrick, R.L.G. (1994) *Prostaglandins*. **47**, 151-168.
- (13) Ushikubi, F., Nakajima, M., Hirata, M., Okuma, M., Fujiwara, M. & Narumiya, S. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 16496-16501.
- (14) Hirata, M., Hayashi, Y., Ushikubi, F., Yokota, Y., Kageyama, R., Nakanishi, S. & Narumiya, S. (1991) *Nature* **349**, 617-620.
- (15) Mais, D.E., True, T.A. & Martinelli, M.J. (1992) *Eur. J. Pharmacol.* **227**, 267-274.
- (16) Boie, Y., Sawyer, N., Slipetz, D.M., Metters K.M. & Abramovitz, M.A. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 18910-18916.
- (17) Hirata, M., Kakizuka, A., Aizawa, M., Ushikubi, F. & Narumiya, S. (1994) *Proc. Natl.*

Acad. Sci. U.S.A.

- (18) Watabe, A., Sugimoto, Y., Honda, A., Irie, A., Namba, T., Negishi, M., Ito, S., Narumiya, S. & Ichikawa, A. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 20175-20178.
- (19) Okuda-Ashitaka, E., Sakamoto, K., Ezashi, T., Miwa, K., Ito, S. & Hayaishi, O. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 31255-31261.
- (20) Funk, C.D., Furci, L.G., Fitzgerald, A., Grygorczyk, R., Rochette, C., Bayne, M.A., Abramovits, M.A., Adam, M. & Metters, K.M. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 26767-26772.
- (21) 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. & Gil, D.W. (1994) *Mol. Pharmacol.* **46**, 213-220.
- (22) Katsuyama, M., Nishigaki, N., Sugimoto, Y., Morimoto, K., Negishi, M., Narumiya, S. & Ichikawa, A. (1995) *FEBS Lett.* **372**, 151-156.
- (23) Sugimoto, Y., Namba, T., Honda, A., Hayashi, Y., Negishi, M., Ichikawa, A. & Narumiya, S. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 6463-6466.
- (24) Namba, T., Sugimoto, Y., Negishi, M., Irie, A., Ushikubi, F., Kakizuka, A., Ito, S., Ichikawa, A. & Narumiya, S. (1993) *Nature* **365**, 166-170.
- (25) Takeuchi, K., Abe, T., Takahashi, N. & Abe, K. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **194**, 885-891.
- (26) Yang, J., Xia, M., Goetzl, E.J. & An, S. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **198**, 999-1006.
- (27) 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. & Gil, D.W. (1994) *Br. J. Pharmacol.* **112**, 377-385.
- (28) Breyer, R.M., Emeson, R.B., Tarng, J.L., Breyer, M.D.L., Davis, S., Abromson, R.M. & Ferrenbach, S.M. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 6163-6169.
- (29) Adam, M., Boie, Y., Rushmore, T.H., Muller, G., Bastien, L., Mckee, K.T., Metters, K.M. & Abramovitz, M. (1994) *FEBS Lett.* **338**, 170-174.
- (30) Honda, A., Sugimoto, Y., Namba, T., Watabe, A., Irie, A., Negishi, M., Narumiya, S. & Ichikawa, A. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 7759-7762.
- (31) An, S., Yang, J., Xia, M. & Goetzl, E.J. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **197**, 263-270.
- (32) Bastien, L., Sawyer, N., Grygorczyk, R., Metters, K.M. & Adam, M. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 11873-11877.
- (33) Sando, T., Usui, T., Tanaka, I., Mori, K., Sasaki, Y., Fukuda, Y., Namba, T., Sugimoto, Y., Ichikawa, A., Narumiya, S. & Nakao, K. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **200**, 1329-1333.
- (34) Sugimoto, Y., Hasumoto, K., Namba, T., Irie, A., Katsuyama, M., Negishi, M., Kakizuka, A., Narumiya, S. & Ichikawa, A. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 1356-1360.
- (35) Abramovitz, M., Boie, Y., Nguyen, T., Rushmore, T.H., Bayne, M.A., Metters, K.M., Slipets, D.M. & Grygorczyk, R. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 2632-2636.
- (36) Sakamoto, K., Ezashi, T., Miwa, K., Okuda-Ashitaka, E., Houtani, T., Sugimoto, T., Ito, S. & Hayaishi, O. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 3881-3886.
- (37) Kitanaka, J., Hashimoto, H., Sugimoto, Y., Negishi, M., Aino, H., Gotoh, M., Ichikawa, A. & Baba, A. (1994) *Prostaglandins* **48**, 31-41.
- (38) Pierce, K.L., Bailey, T.J., Hoyer, P.B., Gil, D.W., Woodward, D.F. & Regan, J.W. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 883-887.
- (39) Namba, T., Oida, H., Sugimoto, Y., Kakizuka, A., Negishi, M., Ichikawa, A. & Narumiya, S. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 9986-9992.
- (40) Boie, Y., Rushmore, T.H., Darmon-Goodwin, A., Grygorczyk, R., Slipets, D.M., Metters, K.M. & Abramovitz, M. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 12173-12178.
- (41) Katsuyama, M., Sugimoto, Y., Namba, T., Irie, A., Negishi, M., Narumiya, S. & Ichikawa, A. (1994) *FEBS Lett.* **344**, 74-78, 1994.
- (42) Nakagawa, O., Tanaka, I., Usui, T., Harada, M., Sasaki, Y., Itoh, H., Yoshimasa, T., Namba, T., Narumiya, S. & Nakao, K. (1994) *Circulation*.
- (43) Sasaki, Y., Usui, T., Tanaka, I., Nakagawa, O., Sando, T., Takahashi, T., Namba, T., Narumiya, S. & Nakao, K. (1994) *Biochim. Biophys. Acta*.
- (44) Namba, T., Sugimoto, Y., Hirata, M., Hayashi, Y., Honda, A., Watabe, A., Negishi, M., Ichikawa, A. & Narumiya, S. (1992)

- Biochem. Biophys. Res. Commun. **184**, 1187-1203.
- (45) Abe, T., Takeuchi, K., Takahashi, N., Tsutsumi, E., Taniyama, Y. & Abe, K. (1995) *J. Clin. Invest.* **96**, 657-664.
- (46) Muck, S., Weber, A.A., Kirchrath, J.M. & Schror, K. (1998) *Naunyn - Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **357**, 10-16.
- (47) Nishigaki, N., Negishi, M., Honda, A., Sugimoto, Y., Namba, T., Narumiya, S. & Ichikawa, A. (1995) *FEBS Lett.* **364**, 339-341.
- (48) Savarese, T.M. & Fraser, C.M. (1992) *Biochem. J.* **283**, 1-19.
- (49) Hausdorff, W.P., Caron, M.G. & Lefkowitz, R.J. (1990) *FASEB J.* **4**, 2881-2889.
- (50) Narumiya, S., Hirata, M., Namba, T., Hayashi, Y., Ushikubi, F., Sugimoto, Y., Negishi, M. & Ichikawa, A. (1993) *J. Lipid Mediators* **6**, 155-161.
- (51) Armstrong, R.A., Lawrence, R.A., Jones, R.J., Wilson, N.H. & Collier, A. (1989) *Br. J. Pharmacol.* **97**, 657-668.
- (52) Burke, S.E., Lefer, A.M., Nicolaou, K.C., Smith, G.M. & Smith, J.B. (1983) *Br. J. Pharmacol.* **78**, 287-292.
- (53) Narumiya, S., Okuma, M. & Ushikubi, F. (1986) *Br. J. Pharmacol.* **88**, 323-331.
- (54) Taketo, M., Rochelle, J.M., Sugimoto, Y., Namba, T., Honda, A., Negishi, M., Ichikawa, A., Narumiya, S. & Seldin, M.F. (1994) *Genomics* **19**, 585-588.
- (55) Ishikawa, T., Tamai, Y., Rochelle, J.M., Hirata, M., Namba, T., Sugimoto, Y., Ichikawa, A., Narumiya, S., Taketo, M. & Seldin, M.F. (1996) *Genomics* **32**, 285-288.
- (56) Nusing, R.M., Hirata, M., Kakizuka, A., Eki, T., Ozawa, K. & Narumiya, S. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 25253-25259.
- (57) Duncan, A.M.V., Anderson, L.L., Funk, C.D., Abramovitz, M. & Adam, M. (1995) *Genomics* **25**, 740-742.
- (58) Brilliant, M.F., Williams, R.W., Conti, C.J., Angel, J.M., Oakey, R.J. & Holdener, B.C. (1994) *Mamm. Genome* **5**, S104-S123.
- (59) Taylor, B.A., Frankel, W.N. & Reeves, R.H. (1992) *Mamm. Genome* **3**, S153-S161.
- (60) Davisson, M.T., Lalley, P.A., Peters, J., Doolittle, D.P., Hillyard, A.L. & Searle, A.G. (1991) *Cytogenet. Cell Genet.* **58**, 1152-1189.
- (61) Batshake, B., Nilsson, C. & Sundelin, J. (1995) *Eur. J. Biochem.* **231**, 809-814.
- (62) Foord, S.M., Marks, B., Stolz, M., Bufflier, E., Fraser, N.J. & Lee, M.G. (1996) *Genomics* **35**, 182-188.
- (63) Arakawa, T., Laneville, O., Miller, C.A., Lakkides, K.M., Wingerd, B.A., Dewitt, D.L. & Smith, W.L. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 29569-29575.
- (64) Ogawa, Y., Tanaka, I., Inoue, M., Yoshitake, Y., Isse, N., Nakagawa, O., Usui, T., Itoh, H., Yoshimasa, T., Narumiya, S. & Nakao, K. (1995) *Genomics* **27**, 142-148.
- (65) Sugimoto, Y., Negishi, M., Hayashi, Y., Namba, T., Honda, A., Watabe, A., Hirata, M., Narumiya, S. & Ichikawa, A. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 2712-2718.
- (66) Negishi, M., Sugimoto, Y., Irie, A., Narumiya, S. & Ichikawa, A. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 9517-9521.
- (67) Irie, A., Sugimoto, Y., Namba, T., Harazono, A., Honda, A., Watabe, A., Negishi, M., Narumiya, S. & Ichikawa, A. (1993) *Eur. J. Biochem.* **217**, 313-318.
- (68) Kotani, M., Tanaka, I., Ogawa, Y., Usui, T., Tamura, N., Mori, K., Narumiya, S., Yoshimi, T. & Nakao, K. (1997) *Genomics* **40**, 425-434.
- (69) Raychowdhury, M.K., Yukawa, M., Collins, L.J., Mcgrail, S.H., Kent, K.C. & Ware, J.A. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 19256-19261.
- (70) Hirata, T., Ushikubi, F., Kakizuka, A., Okuma, M. & Narumiya, S. (1996) *J. Clin. Invest.* **97**, 949-956.
- (71) Hasegawa, H., Negishi, M. & Ichikawa, A. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 1857-1860.
- (72) Negishi, M., Hasegawa, H., & Ichikawa, A. (1996) *FEBS Lett.* **386**, 165-168.
- (73) Jin, J., Mao, G.F. & Ashby, B. (1997) *Br. J. Pharmacol.* **121**, 317-323.
- (74) Takahashi, N., Takeuchi, K., Sugawara, A., Taniyama, Y., Kato, T., Wilcox, C.S., Abe, K. & Ito, S. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **244**, 489-493.
- (75) Nakajima, M., Yamamoto, M., Ushikubi, F., Okuma, M., Fujiwara, M. & Narumiya, S. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **158**, 958-965.
- (76) Kinsella, B.T., O'Mahony, D.J. & Fitzgerald, G.A. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 29914-29919.
- (77) Dorn, G.W., II, Davis, M.G. & D'Angelo, D.D. (1994). *Am. J. Physiol.* **266**, C1231-C1239.
- (78) Matsuda, K., Mathur, R., Duzic, E. & Halushka, P.V. (1993) *Am. J. Physiol.* **265**,

E928-E934.

- (79) Ajayi, A.A., Mathur, R. & Halushka, P.V. (1995) *Circulation* **91**, 2742-2747.
- (80) Sasaki, Y., Takahashi, T., Tanaka, I., Nakamura, K., Okuno, Y., Nakagawa, O., Narumiya, S. & Nakao, K. (1997) *Blood* **90**, 1039-1046.
- (81) 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. (1996) *J. Mol. Med.* **74**, 333-336.
- (82) Toh, H., Ichikawa, A. & Narumiya, S. (1995) *FEBS Lett.* **361**, 17-21.
- (83) Yokomizo, T., Izumi, T., Chnag, K., Takuwa, Y. & Shimizu, T. (1997) *Nature* **387**, 620-624.
- (84) Coleman *et al.* (1987) *Br. J. Pharmacol.* **323**.
- (85) Kiriya, M., Ushikubi, F., Kobayashi, T., Hirata, M., Sugimoto, Y. & Narumiya, S. (1997) *Br. J. Pharmacol.* **122**, 217-224.
- (86) Giles, H., Leff, P., Bolof, M.L., Kelly, M.G. & Robertson, A.D. (1989) *Br. J. Pharmacol.* **96**, 291-300.
- (87) Coleman, R.A., Feniuk, L. & Kennedy, I. (1981) *Br. J. Pharmacol.* **74**, 913-914.
- (88) Woodward, D.F., Protzman, C.E., Krauss, A.H.P. & Williams, L.S. (1993) *Prostaglandins* **46**, 371-383.
- (89) Sonnenburg, W.K. & Smith, W.L. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 6155-6160.
- (90) Smith, G.C.S., Coleman, R.A. & Mcgrath, J.C. (1994) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **271**, 390-396.
- (91) Tanaka, M., Kojima, C., Muramatsu, M. & Tanabe, H. (1995) *Arzneim. Forsch.* **45**, 967-970.
- (92) Kajikawa, N., Nogimori, T., Murata, T., Nishio, S. & Uchiyama, S. (1989) *Arzneim. Forsch.* **39**, 495-499.
- (93) Yamasaki, S., Kawamoto, A., Hayashi, M., Ohyama, M., Machii, K., Naka, M., Kondo, K. & Hamanaka, N. (1995) *Jpn. J. Pharmacol.* **67**, Supple I, P3-110.
- (94) Dong, Y.J., Jones, R.L. & Wilson N.H. (1986) *Br. J. Pharmacol.* **87**, 97-107.
- (95) Coleman, R.A. & Sheldrick, R.L.G. (1989) *Br. J. Pharmacol.* **96**, 688-692.
- (96) Dorn, G.W., II., Becker, M.W. & Davis, M.G. (1992) *J. Pharmacol. Exp. Med.* **267**, 24897-24905.
- (97) Fukunaga, M., Makita, N., Roberts II, L.J., Morrow, J.D., Takahashi, K. & Badr, K.F. (1993) *Am. J. Physiol.* **264**, C1619-C1624.
- (98) Pratico, D., Smyth, E.M., Violi, F. & Fitzgerald, G.A. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 14916-14924.
- (99) Shenker, A., Goldsmith, P., Unson, C. & Spiegel, A. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 9309-9313.
- (100) Knezevic, I., Borg, C. & Le Breton, G.C. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 26011-26017.
- (101) Ushikubi, F., Nakamura, K. & Narumiya, S. (1994) *Mol. Pharmacol.*
- (102) Offermanns, S., Laugwitz, K.L., Spicher, K. & Schultz, G. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 504-508.
- (103) Halushka, P.V., Mais, D.E., Mayeux, P.R. & Morinelli, T.A. (1989) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **10**, 213-239.
- (104) Ogletree, M.L. & Allen, G.T. (1992) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **260**, 789-794.
- (105) Dorn, G.W., II. (1989) *J. Clin. Invest.* **84**, 1883-1891.
- (106) Takahara, K., Murray, R., Fitzgerald, G.A. & Fitzgerald, D.J. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 6836-6844.
- (107) Hirata, T., Kakizuka, A., Ushikubi, F., Fuse, I., Okuma, M. & Narumiya, S. (1994) *J. Clin. Invest.* **94**, 1662-1667.
- (108) Fuse, I., Mito, M., Hattori, A., Higuchi, W., Shibata, A., Ushikubi, F., Okuma, M. & Yahata, K. (1993) *Blood* **81**, 944-1000.
- (109) Negishi, M., Namba, T., Sugimoto, Y., Irie, A., Katada, T., Narumiya, S. & Ichikawa, A. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 26067-26070.
- (110) Goureau, O., Tanfin, Z., Marc, S. & Harbon, S. (1992) *Am. J. Physiol.* **263**, C257-C265.
- (111) Negishi, M., Ito, S. & Hayaishi, O. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 3916-3923.
- (112) Watanabe, T., Yatomi, Y., Sunaga, S., Miki, I., Ishii, A., Nakao, A., Higashihara, M., Seyama, Y., Ogura, M., Saito, H., Kurokawa, K. & Shimizu, T. (1991) *Blood* **78**, 2328-2336.
- (113) Vassaux, G., Gaillard, D., Ailhaud, G. & Negrel, R. (1992) *J. Biol. Chem.* **268**, 11092-11097.
- (114) Perez, A.G. & Smith, W.L. (1984) *J. Clin. Invest.* **74**, 63-74.
- (115) Audoly, L. & Breyer, R.M. (1997) *Mol. Pharmacol.* **51**, 61-68.
- (116) Chang, C.S., Negishi, M., Nishigaki, N. & Ichikawa, A. (1997) *Prostaglandins* **54**, 437-446.
- (117) Negishi, M., Irie, A., Sugimoto, Y., Namba, T. & Ichikawa, A. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**,

- 16122-16127.
- (118) Audoly, L. & Breyer, R.M. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 13475-13478.
- (119) Chiang, N., Kan, W.M. & Tai, H.H. (1996) *Arch. Biochem. Biophys.* **334**, 9-17.
- (120) D'Angelo, D.D., Eubank, J.J., Davis, M.G. & Dorn, G.W., II. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 6233-6240.
- (121) Baldwin, J.M. (1994) *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 180-190.
- (122) Dorn, G.W., II. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 4240-4246.
- (123) Kobayashi, T., Kiriyama, M., Hirata, T., Hirata, M., Ushikubi, F. & Narumiya S. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 15154-15160.
- (124) Dorn, G.W., II., Davis, M.G. & D'Angelo, D.D. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 12399-12405.
- (125) Oida, H., Hirata, M., Sugimoto, Y., Ushikubi, F., Ohishi, H., Mizuno, N., Ichikawa, A. & Narumiya, S. (1977) *FEBS Lett.* **417**, 53-56.
- (126) Urade, Y., Kitahama, K., Ohishi, H., Kaneko, T., Mizuno, N. & Hayaishi, O. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 9070-9074.
- (127) Matsumura, H., Nakajima, T., Osaka, T., Satoh, S., Kawase, K., Kubo, E., Kantha, S.S., Kasahara, K. & Hayaishi, O. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 11998-12002.
- (128) Sugimoto, Y., Namba, T., Shigemoto, R., Negishi, M., Ichikawa, A. & Narumiya, S. (1994) *Am. J. Physiol.* **266**, F823-F828.
- (129) Breyer, M.D., Jacobson, H.R., Davis, L.S. & Breyer, R.M. (1994) *Kidney Int.* **43**, 1372-1378.
- (130) Sugimoto, Y., Shigemoto, R., Namba, T., Negishi, M., Mizuno, N., Narumiya, S. & Ichikawa, A. (1994) *Neuroscience* **62**, 919-928.
- (131) Morimoto, K., Sugimoto, Y., Katsuyama, M., Oida, H., Tsuboi, K., Kishi, K., Konoshita, Y., Negishi, M., Chiba, T., Narumiya, S. & Ichikawa, A. (1997) *Am. J. Physiol.* **272**, G681-G687.
- (132) Katsuyama, M., Sugimoto, Y., Morimoto, K., Hasumoto, K., Fukumoto, M., Negishi, M. & Ichikawa, A. (1997) *Endocrinology* **138**, 344-350.
- (133) Yee, G.M. & Kennedy, T.G. (1991) *Biol. Reprod.* **45**, 163-171.
- (134) Hasumoto, K., Sugimoto, Y., Yamasaki, A., Morimoto, K., Kakizuka, A., Negishi, M. & Ichikawa, A. (1997) *J. Reprod. Fertil.* **109**, 45-51.
- (135) Hasumoto, K., Sugimoto, Y., Gotoh, M., Segi, E., Yamasaki, A., Yamasaki, M., Honda, H., Hirai, H., Negishi, M., Kakizuka, A. & Ichikawa, A. (1997) *Genes to cells* **2**, 571-580.
- (136) Oida, H., Namba, T., Sugimoto, Y., Ushikubi, F., Ohishi, H., Ichikawa, A. & Narumiya, S. (1995) *Br. J. Pharmacol.* **116**, 2828-2837.
- (137) Ishiguro, S., Arii, S., Monden, K., Adachi, Y., Funaki, N., Higashitsuji, H., Fujita, S., Furutani, M., Mise, M., Kitao, T., Nakamura, T., Ushikubi, F., Nakamura, K., Narumiya, S., Enomoto, K., Ohmura, T., Mori, M. & Imamura, M. (1994) *Hepatology* **20**, 1281-1286.
- (138) Spurney, R.F., Onorato, J.J., Albers, F.J. & Coffman, T.M. (1993) *Am. J. Physiol.* **264**, F292-F299.
- (139) Simmons, TR., Cook, J.A., Moore, J.N. & Halushka, P.V. (1993) *J. Leuko. Biol.* **53**, 173-178.
- (140) Takahashi, N., Takeuchi, K., Abe, T., Murakami, K., Yamaguchi, M. & Aba, K. (1995) *Endocrinology* **136**, 4143-4146.
- (141) Ushikubi, F., Aiba, Y., Nakamura, K., Namba, T., Hirata, M., Mazda, O., Katsura, Y. & Narumiya, S. (1993) *J. Exp. Med.* **178**, 1825-1830.
- (142) Bunting, S., Moncada, S. & Vane, J.R. (1983) *Br. Med. Bull.* **39**, 271-276.
- (143) 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. (1997) *Nature* **388**, 678-682.
- (144) Kurz, K.D., Main, B.W. & Sandusky, G.E. (1990) *Thromb. Res.* **60**, 269-280.
- (145) Vadas, P., Wasi, S., Movat, H.Z. & Hay, J.B. (1981) *Nature* **293**, 583-585.
- (146) Ueno, A., Tokumasu, T., Naraba, H. & Ohishi, S. (1995) *Eur. J. Pharmacol.* **284**, 211-214.
- (147) Winter, C.A. & Flataker, L. (1965) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **150**, 165-171.
- (148) Koster, R., Anderson, M. & deBeer, E.J. (1959) *Fed. Proc.* **18**, 412.
- (149) 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. (1997) *Science* **277**, 681-683.

- (150) McCracken, J.A., Carlson, J.C., Glew, M.E., Goding, J.R., Baird, D.T., Green, K. & Samuelsson, B. (1972) *Nature New Biol.* **238**, 129-134.
- (151) Moeljono, M.P., Bazer, F.W. & Thatcher, W.W. (1976) *Prostaglandins* **11**, 737-743.
- (152) Soloff, M.S., Alexandrova, M. & Fernstrom, M.J. (1979) *Science* **204**, 1313-1315.
- (153) Kimura, T., Tanizawa, O., Mori, K., Brownstein, M.J. & Okayama, H. (1992) *Nature* **356**, 526-529.
- (154) Thorburn, G.D. & Challis, J.R. (1979) *Physiol. Rev.* **59**, 863-918.
- (155) Fuchs, A.R., Periyasamy, S., Alexandrova, M. & Soloff, M.S. (1983) *Endocrinology* **113**, 742-749.
- (156) Lewis, R.B. & Schulman, J.D. (1973) *Lancet* **2**, 1159-1161.
- (157) Soloff, M.S. (1988) in *The Onset of Labor : Cellular and Integrative Mechanisms*, McNellis, D. *et al.*, eds., pp 87-123, Perinatology Press.
- (158) Nguyen, M., Camenisch, T., Snouwaert, J.N., Hicks, E., Coffman, T.M., Anderson, P.A., Malouf, N.N. & Koller, B.H. (1997) *Nature* **390**, 78-81.
- (159) Segi, E., Sugimoto, Y., Yamasaki, A., Aze, Y., Oida, H., Nishimura, T., Murata, T., Matsuoka, T., Ushikubi, F., Fukumoto, M., Tanaka, T., Yoshida, N. & Narumiya, S. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **246**, 7-12.
- (160) Heymann, M.A. & Rudolph, A.M. (1975) *Physiol. Rev.* **55**, 62-78.
- (161) Levin, D.L., Fixler, D.E., Morriss, F.C. & Tyson, J. (1978) *J. Pediatr.* **92**, 478-483.
- (162) Yeh, T.F., Luken, J.A., Thalji, A., Raval, D., Carr, I & Pildes, R.S. (1981) *J. Pediatr.* **98**, 137-145.
- (163) Moulart, A., Senders, R., Ertbruggen, I., Huysmans, H. & Harinck, E. (1977) *Eur. J. Cardiol.* **5**, 321-325.
- (164) Smith, G.C., Coleman, R.A. & McGrath, J.C. (1994) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **271**, 390-396.
- (165) Pollock, D., Muir, T.C., MacDonard, A. & Henderson, G. (1972) *Eur. J. Pharmacol.* **20**, 321-328.
- (166) McCulloch, C.R. & Pollock, D. (1985) *Eur. J. Pharmacol.* **118**, 253-261.
- (167) Kluger, M.J. (1991) *Physiol. Rev.* **71**, 93-127.
- (168) Vane, J.R. (1971) *Nature New Biol.* **231**, 232-235.
- (169) Milton, A.S. & Wendlandt, S.A. (1970) *J. Physiol. (London)* **207**, 76-77.
- (170) Stitt, J.T. (1986) *Yale J. Biol. Med.* **59**, 137-149.
- (171) Mitchell, D., Laburn, H.P., Cooper, K.E., Hellon, R.F., Cranston, W.I. & Townsend, Y. (1986) *Yale J. Biol. Med.* **59**, 159-168.
- (172) Milton, A.S. (1989) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **559**, 392-410.
- (173) Saper, C.B. & Breder, C.D. (1994) *N. Engl. J. Med.* **330**, 1880-1886.
- (174) Ushikubi, F., Segi, E., Sugimoto, Y., Murata, T., Matsuoka, T., Kobayashi, T., Hizaki, H., Tuboi, K., Katsuyama, M., Ichikawa, A., Tanaka, T., Yoshida, N. & Narumiya, S. (1998) *Nature* **395**, 281-284.
- (175) Zheng, H., Fletcher, D., Kozak, W., Jiang M., Hofmann, K.J., Conn, C.A., Soszynski, D., Grabiec, C., Trumbauer, M.E. & Shaw, A. (1995) *Immunity* **3**, 9-19.
- (176) Kozak, W., Zheng, H., Conn, C.A., Soszynski, D., van der Ploeg, L.H. & Kluger, M.J. (1995) *Am. J. Physiol.* **269**, R969-R977.