

AMCoR

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

炎症と免疫 (1996.04) 4巻3号:278～285.

PG, TXレセプターとその拮抗薬
トロンボキサン(TX)レセプター

牛首文隆、成宮 周

トロンボキサン(TX)レセプター

牛首文隆* 成宮 周*

トロンボキサン(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もつ生理活性物質である。TXは合成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レセプター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短時間でTXB₂へと不活化されることから、オータコイドとして局所のホメオスタシスの維持に働いている。TXレセプターは、ヒト血小板よりプロスタノイドレセプターとしてはじめて精製され、ついでそのcDNAがクローニングされた。この結果TXレセプターは、7回膜貫通構造をもちG蛋白質と連関するロドプシン型のレセプターであることが明らかとなった。最近、TXレセプターのアイソフォームが発見されたり、生体内での分布やその情報伝達機構に関して新たな知見が得られている。

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もつことで知られていた。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はじまる。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レセプター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、オータ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(図1)。

TXレセプターは、ヒト血小板よりプロスタノイドレセプターとしてはじめて精製され¹⁾、ついでそのcDNAがクローニングされた²⁾。この結果TXレセプターは、7回膜貫通構造をもちG蛋白質と連関するロドプシン型のレセプターであることが明らかとなった(図2)。

本稿では、TXレセプターに関して最近の研究の進歩を中心にして概説する。

1. TXレセプターとその遺伝子の構造

現在までに、ヒト、ラット、マウスTXレセプターのcDNAクローニングが行われ、その一次構造が解明されている(図3)。ヒト²⁾、ラット³⁾、マウ

[キーワード]

トロンボキサン(TX)
ロドプシン型レセプター
プロスタノイド
プロスタグランジン(PG)
オータコイド

* USHIKUBI Fumitaka, NARUMIYA Shu/京都大学医学研究科神経・細胞薬理学

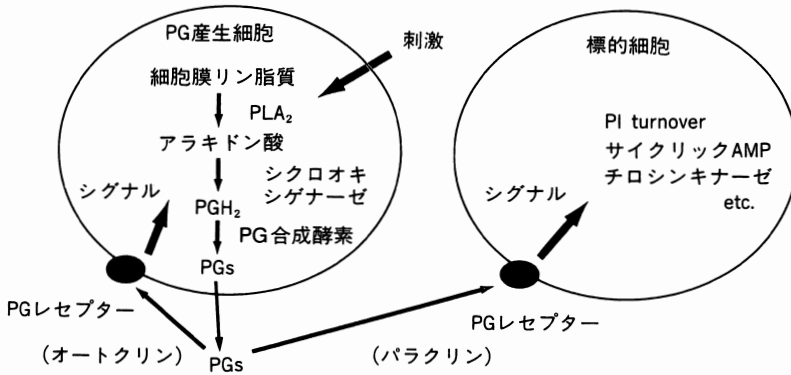


図1. プロスタノイドの作用機構

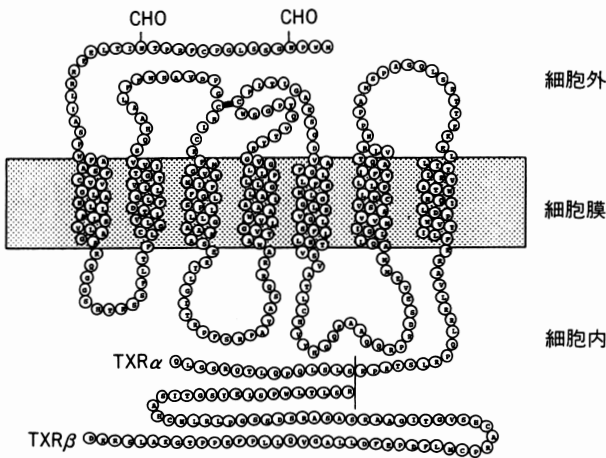


図2. トロンボキサン(TX)レセプターの構造模式図

N-グリコシレーション部位をCHOで、ジスルフィド結合を実線で示す。

	I	II	
ヒト	MWPNGSSLGPCFRPTNITLEERRLIASPWFAASFCVVGLASNLLALSVLGARGGGSHTRSSFLTFLCGLVLTDF		75
ラット	L ST A V Q A	AL G P AGP- AL	74
マウス	T A V Q A	AL G P AGP- AL	74
	III	IV	
ヒト	LGLLVTGTIIVVSQHAALFEWHAVDPGCRLCRFMGVVMIFFGLSPLLGAAMASERYLGITRPFSPRPAVASQRRAW		150
ラット	AV A LD R T H AA V C A FV AT -		148
マウス	A A LD R T S Y A V C FV TAT -		148
	V		
ヒト	ATVGLVWAAALALGLLPLLVGRYTVQYPGSWCFLTLGAESGDVAFGLLFSMLGGLSVGLSFLCNTVSVATLCHV		225
ラット	VG GT L S R M AL SV		223
マウス	V G L S TQR V I AL SA		223
	VI	VII	
ヒト	YHQEAAQQRPRDSEVEMMAQLLIGIMVVASVCWLP LLVFIAQTVLRNPPAMSPAGQLSRTTEKELLIYLRVATWN		300
ラット	AR T - C V V T M L L QTL V S L RQ		297
マウス	TR T - C V V T M M L QT V FS L A HQ		297
ヒト	QILDWPVYILFRRAVLRRLQPRLSSTRPRSLSLQPOLTORSGLQ		343
ラット	S H FTSQLQAV HSPP AMLSGP		341
マウス	S H F SQLQAV RRPPA AMLSGP		341

図3. ヒト, ラット, マウスのトロンボキサンレセプターのアミノ酸配列

横線は、膜貫通領域を数字とともに示す。ラット, マウスのアミノ酸配列は、ヒトのものとは異なるアミノ酸のみを表記した。

ス⁴TXレセプターは、それぞれ343, 341, 341個のアミノ酸よりなり、7回膜貫通構造をもつロドプシン型のレセプターである。ラットとマウスレセプターのアミノ酸配列の相同性は93%と高く、ヒトレセプターに対してはそれぞれ72%と76%である。

これらのTXレセプターは、ロドプシン型レセプターによく認められる構造上の特徴をもっている(図2)。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あげられる。実際にヒトTXレセプターでは、この残基のグリコシレーションによって精製レセプターの分子量(約57kDa)とアミノ酸組成より計算された分子量(約37kDa)の差が起因することが証明されている⁵⁾。つぎに、レセプターの第1および第2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あげられる。これはレセプターの立体構造の保持に役立っており、還元剤の存在下ではTXレセプターのリガンド結合能が低下するという報告と一致する。また、TXレセプター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、レセプターの脱感作現象に関与すると考えられている。

一方、プロスタノイドレセプターに共通してよく保存されているアミノ酸配列領域が、レセプター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レセプターで保存されており、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レセプター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⁶⁾。これらの結果プロスタノイドレセプターが全体としてロドプシン型レセプタースーパーファミリーのなかで、新しいレセプターサブファミリーを形成していることが明らかとなった⁷⁾。

TXの作用に種差があることはよく知られている。たとえばウサギ血小板は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。また、TXレセプター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。このような種差はレセプターホモログ間の高いアミノ酸配列の相

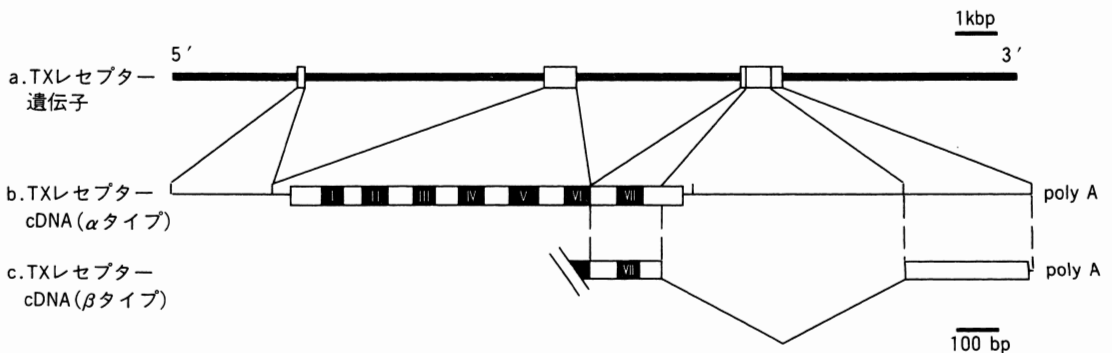


図4. ヒトTXレセプター遺伝子とcDNAの構造模式図

a: ヒトTXレセプター遺伝子の構造。エクソンをボックスで示す。bとc: ヒトTXレセプターの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示す。

同性にもかかわらず、レセプターの構造上の差異に起因していると思われる。

マウスTXレセプターの染色体マッピングによって、レセプター遺伝子は第10染色体上に位置することが明らかとなった⁹⁾。また、ヒトTXレセプター遺伝子は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個のエクソンよりなることが明らかとなった⁹⁾(図4)。このエクソン-イントロンの関係は他のプロスタノイドレセプターでも認められ、さらに種を越えて保存されている。また、ヒトTXレセプター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、これらのエクソンのalternative splicingによってレセプターアイソフォームが生成する¹⁰⁾(図4)。このalternative splicingは第7膜貫通領域の直後でおき、カルボキシル末端の構造のみ異にする2種類のレセプターアイソフォームが形成される。現在、ヒト以外の種のTXレセプターアイソフォームの報告はない。

2. TXレセプターの機能

TXは化学的に不安定なため、TXレセプターの解析には安定な類縁物質が用いられる。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レセプターが解析された。また、生化学的に放射性リガンドを用いて、種々の組織においてTXレセプターの同定がなされた。これらには、血小板、血管・気管支平滑筋細胞、血管内皮細胞、肝類洞内皮細胞、腎糸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)などが含まれる。これらの結果TXレセプターは、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レセプター発現細胞を用いてレセプターのリガンド結合の特異性が解析された²⁾⁻⁴⁾。種々のリガンドのTXレセプターに対する結合親和性は、I-BOP, S-145>

ONO-3708>SQ-29548, STA₂>U-46619>PGD₂>PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂, TXB₂, PGD₂の順であり、I-BOPやS-145の結合解離定数(Kd値)は数nMであった。一方、TXレセプターの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、その情報伝達経路には違いがある。

TXレセプターは、非常に多様な情報伝達経路をもっている。たとえば、TXレセプターはG蛋白質と関連し、PLCを活性化することが知られている¹¹⁾。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る¹²⁾。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、異論もあるが、TXが血小板のアデニル酸シクラーゼを抑制するという報告がある¹³⁾。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、レセプター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¹⁴⁾¹⁵⁾。つぎに、TXレセプターと関連するG蛋白質レベルでの多様性によるものが考えられる。TXレセプター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¹⁶⁾⁻¹⁹⁾。これらにはG_q, G₁₂, 未同定の85kDaのG蛋白質, G₁₂, G₁₃が含まれる。このように、TXレセプターを介する情報伝達経路の多様性は、少なくともレセプターとそれに関連するG蛋白質の両者の多様性に起因していると考えられる。

この点に関連して、TXレセプターアイソフォームの情報伝達機構の解析は興味深い。TXレセプターの2種類のアイソフォームが血小板に発現しており、この両者はともにPLCを活性化する。しかし、各アイソフォームはそれぞれアデニル酸シクラーゼに対して刺激的あるいは抑制的に作用する。つまり、αタイプのレセプターはG_q, G_sと

関連し、 β タイプのもは G_q , G_i と関連する²⁰⁾。さらに、最近TXに対する反応低下症例において、原因と考えられるTXレセプター変異が見出された²¹⁾。この変異は、ヒトTXレセプターのArg⁶⁰の点変異によるものであり、両方のアイソフォームに認められた。この変異の結果、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PLA₂の活性化は可能である。また、この変異によって、TXレセプターと G_q , G_s の関連は阻害されるが、 G_i との関連は保たれる。これらの結果から、TXレセプターの 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ている。

TXレセプターの多くの特徴が解明されてきているが、いくつかのレセプター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。TX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²²⁾。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^{src}を活性化することが報告されている²³⁾。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、これも近い将来解明されることが期待される。

3. TXレセプターの生体内分布

従来の薬理的・生化学的研究は、TXレセプターが生体のいくつかの組織に発現していることを見出してきたが、レセプターの発現レベルの低い組織での解析やレセプターの組織内・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レセプター抗体を用いた免疫組織化学的手法が導入され、TXレセプターの分布に関する新たな知見が得られた。マウスTXレセプターmRNAのノーザンブロット解析⁴⁾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レセプター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ギウム細胞、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レセプター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²⁴⁾。

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、まったく新しいレセプター分布も見出され、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レセプター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レセプター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レセプター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²⁵⁾。また、従来精巣におけるTXレセプター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レセプター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もつことを示唆しており、その解明が期待される。

4. TXレセプターの発現調節

TXレセプターの機能は、その遺伝子発現の活

性化や抑制あるいは発現レセプター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。

TXレセプター遺伝子のプロモーター領域にはいくつかの転写因子反応領域が存在している。これらには、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。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レセプターを発現誘導することが示された²⁶⁾²⁷⁾。しかし、グルココルチコイドやインターロイキン(IL)-1, IL-6, リポポリサッカライド(LPS), C reactive protein(CRP), 腫瘍壊死因子(tumor necrosis factor: TNF)- α などの急性期反応惹起物質はHEL細胞においてTXレセプターの発現を誘導しなかった。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レセプターの発現を誘導すること²⁸⁾や、テストステロンの人体投与によって血小板TXレセプター数が増加し、血小板凝集反応が亢進すること²⁹⁾が示された。

同種脱感作現象では、まずTXレセプターと連関するG蛋白質との解離がおき、ついでレセプターの細胞膜からの消失が起こる。このTXレセプターのinternalizationの機構による消失は、CHRF-288細胞³⁰⁾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、他のロドプシン型レセプターの脱感作機構にみられるように、レセプターキナーゼによるTXレセプターのリン酸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にTXレセプターのリン酸化が起こることが報告されている³¹⁾。一方、TXレセプター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ときに認められる。この現象には、これらのキナーゼによるTXレセプター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レセプター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²⁷⁾。

おわりに

近年、TXレセプター研究は分子生物学的手法を用いて飛躍的に進展し、レセプターの構造、機能、分布に関する新たな知見が蓄積してきている。今後は、TXレセプター欠損マウスの解析などを通して生体内におけるTXレセプターのもつ生理的な意義の解明がなされることが期待される。

文献

- 1) Ushikubi, F. *et al.*: Purification of the thromboxane A₂/prostaglandin H₂ receptor from human blood platelets. *J. Biol. Chem.* **264**: 16496-16501, 1989
- 2) Hirata, M. *et al.*: Cloning and expression of cDNA for a human thromboxane A₂ receptor. *Nature* **349**: 617-620, 1991
- 3) Abe, T. *et al.*: Rat kidney thromboxane receptor: molecular cloning, signal transduction and intrarenal expression localization. *J. Clin. Invest.* **96**: 657-664, 1995
- 4) Namba, T. *et al.*: Mouse thromboxane A₂ receptor; cDNA cloning, expression and northern blot analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184**: 1187-1203, 1992
- 5) Mais, D. E. *et al.*: Characterization of the human thromboxane A₂/prostaglandin H₂ receptor; evidence for N-glycosylation. *Eur. J. Pharmacol.* **227**: 267-274, 1992
- 6) Funk, C. D. *et al.*: Point mutation in the seventh hydrophobic domain of the human thromboxane A₂ receptor allows discrimination between agonist and antagonist binding sites. *Mol. Pharmacol.* **44**: 934-939, 1993
- 7) Ushikubi, F. *et al.*: Molecular biology of prostanoïd receptors; an overview. *J. Lipid. Mediat. Cell Signal.* **12**: 343-359, 1995
- 8) Taketo, M. *et al.*: Mapping of the genes encoding mouse thromboxane A₂ receptor and prostaglandin E receptor subtypes EP₂ and EP₃.

- Genomics* **19** : 585-588, 1994
- 9) Nüsing, R. M. *et al.* : Characterization and chromosomal mapping of the human thromboxane A₂ receptor gene. *J. Biol. Chem.* **268** : 25253-25259, 1993
 - 10) Raychowdhury, M. K. *et al.* : Alternative splicing produces a divergent cytoplasmic tail in the human endothelial thromboxane A₂ receptor. *J. Biol. Chem.* **269** : 19256-19261, 1994
 - 11) Brass, L. F. *et al.* : Interactions in platelets between G proteins and the agonists that stimulate phospholipase C and inhibit adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* **263** : 5348-5355, 1988
 - 12) Fuse, I. *et al.* : Stimulations of arachidonate release and inositol-1,4,5-triphosphate formation are mediated by distinct G proteins in human platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **146** : 659-665, 1987
 - 13) Halushka, P. V. *et al.* : Thromboxane, prostaglandin and leukotriene receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **10** : 213-239, 1989
 - 14) Dorn, G. W., II. : Distinct platelet thromboxane A₂/prostaglandin H₂ receptor subtypes : a radioligand binding study of human platelets. *J. Clin. Invest.* **84** : 1883-1891, 1989
 - 15) Takahara, K. *et al.* : The response to thromboxane A₂ analogues in human platelets : discrimination of two binding sites linked to distinct effector systems. *J. Biol. Chem.* **265** : 6836-6844, 1990
 - 16) Shenker, A. *et al.* : The G protein coupled to the thromboxane A₂ receptor in human platelets is a member of the novel G_q family. *J. Biol. Chem.* **266** : 9309-9313, 1991
 - 17) Knezevic, I. *et al.* : Identification of G_q as one of the G proteins which copurify with human platelet thromboxane A₂/prostaglandin H₂ receptors. *J. Biol. Chem.* **268** : 26011-26017, 1993
 - 18) Ushikubi, F. *et al.* : Functional reconstitution of platelet thromboxane A₂ receptor with G_q and G₁₂ in phospholipid vesicles. *Mol. Pharmacol.* **46** : 808-816, 1994
 - 19) Offermanns, S. *et al.* : G proteins of the G₁₂ family are activated via thromboxane A₂ and thrombin receptors in human platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91** : 504-508, 1994
 - 20) Hirata, T. *et al.* : Two thromboxane A₂ receptor isoforms in human platelets : opposite coupling to adenylyl cyclase with different sensitivity to Arg⁶⁰ to Leu mutation. *J. Clin. Invest.* **97** : 949-956, 1996
 - 21) Hirata, T. *et al.* : Arg⁶⁰ to Leu mutation of the human thromboxane A₂ receptor in a dominantly inherited bleeding disorder. *J. Clin. Invest.* **94** : 1662-1667, 1994
 - 22) Hanasaki, K. *et al.* : Receptor - mediated mitogenic effect of thromboxane A₂ in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Pharmacol.* **40** : 2535-2542, 1990
 - 23) Maeda, H. *et al.* : Protein-tyrosine kinase p72^{syk} is activated by thromboxane A₂ mimetic U44069 in platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **197** : 62-67, 1993
 - 24) Takahashi, N. *et al.* : Immunohistochemical localization of thromboxane receptor and thromboxane synthase in rat testis. *Endocrinology* **136** : 4143-4146, 1995
 - 25) Ushikubi, F. *et al.* : Thromboxane A₂ receptor is highly expressed in mouse immature thymocytes and mediates DNA fragmentation and apoptosis. *J. Exp. Med.* **178** : 1825-1830, 1993
 - 26) Nakajima, M. *et al.* : expression of thromboxane A₂ receptor in cultured human erythroleukemia cells and its induction by 12-O-tetradecanoylphorbol - 13 - acetate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **158** : 958-965, 1989
 - 27) Kinsella, B. T. *et al.* : Phosphorylation and regulated expression of the human thromboxane A₂ receptor. *J. Biol. Chem.* **269** : 29914-29919, 1994
 - 28) Matsuda, K. *et al.* : Androgen regulation of thromboxane A₂/prostaglandin H₂ receptor expression in human erythroleukemia cells. *Am. J. Physiol.* **265** : E928-E934, 1993
 - 29) Ajayi, A. A. *et al.* : Testosterone increases human platelet thromboxane A₂ receptor density and aggregation responses. *Circulation* **91** : 2742-2747, 1995
 - 30) Dorn, G. W., II. : Regulation of the response to thromboxane A₂ in CHRF-288 megakaryocytic cells. *Am. J. Physiol.* **262** : C991-C999, 1992

31) Okwu, A. K. *et al.* : Agonist-induced phosphorylation of human platelet thromboxane A₂/

prostaglandin H₂ receptors. *Biochim. Biophys. Acta* **1221** : 83-88, 1994