

Title	グリア細胞プロスタノイド受容体の構造と機能調節に関する分子薬理学的研究
Author(s)	北中, 純一
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3100625
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

グリア細胞プロスタノイド受容体の
構造と機能調節に関する
分子薬理学的研究

1995年

北 中 純 一

グリア細胞プロスタノイド受容体の
構造と機能調節に関する
分子薬理学的研究

1995年

北 中 純 一

目次

緒言	-----	1
本論	-----	3
第一章	培養ラットアストロサイトcDNAライブラリーからの プロスタノイド受容体cDNAのクローニング	----- 3
第一節	プロスタグランジンF2 α 受容体 (FP受容体) cDNAの クローニング	----- 3
第二節	プロスタグランジンE受容体EP3サブタイプ (EP3受容体) cDNAのクローニング	----- 8
第三節	トロンボキサンA2受容体 (TP受容体) cDNAのクローニング	-- 13
第四節	培養ラットアストロサイトにおけるプロスタノイド受容体 情報伝達系の解析	----- 16
第五節	考察と小括	----- 19
第二章	グリア細胞におけるプロスタノイド受容体mRNAの発現分布	-- 21
第一節	各種グリア細胞におけるプロスタノイド受容体mRNAの 発現量の比較	----- 21
第二節	アストロサイトの形態分化に伴うプロスタノイド受容体 mRNA量の変化	----- 26
第三節	生後脳の発達に伴うプロスタノイド受容体mRNA量の変化	--- 29
第四節	考察と小括	----- 31
第三章	アストロサイトFP受容体の機能調節	----- 34
第一節	アストロサイトFP受容体およびリコンビナントFP受容体の 特性比較	----- 34
第二節	アストロサイトFP受容体のアンタゴニストとしての フロレチン	----- 38
第三節	FP受容体機能発現に対する糖鎖付加阻害薬の作用	----- 43
第四節	アストロサイトFP受容体の脱感作	----- 48
第五節	考察と小括	----- 53
総括	-----	56
結論	-----	58
謝辞	-----	59
引用文献	-----	60

本文中で使用した略号

PG:プロスタグランジン

TX:トロンボキサン

EP3受容体:プロスタグランジンE受容体EP3サブタイプ

FP受容体:プロスタグランジンF2 α 受容体

TP受容体:トロンボキサンA2受容体

PI:イノシトールリン脂質

PIP2:ホスファチジルイノシトール二リン酸

IP₁:イノシトール一リン酸

mRNA:メッセンジャーRNA

LDH:乳酸脱水素酵素

MTT:3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

RT-PCR:reverse transcriptase-polymerase chain reaction

STA2:9,11-epithio-11,12-methanbo-TXA2

LiKRB:lithium-containing Krebs-Ringer bicarbonate buffer

HKR:HEPES-Krebs-Ringer buffer

IBMX:*iso*-butylmethylxanthine

db-cAMP:dibutyryl cyclic AMP

TPA:12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate

TIS11:TPA-induced sequence 11

緒 言

プロスタノイドは、アラキドン酸カスケード系代謝産物のうちプロスタグランジンエンドペルオキシド合成酵素（脂肪酸シクロオキシゲナーゼ）を介して生合成されるトロンボキサン類（TX）およびプロスタグランジン類（PG）の総称である（Fig. 1）。これら一群の化合物は、すべての生体組織において生合成され、速やかにその生理作用を発揮する点において一種のオートコイドと考えられる。それらの作用は、炎症、平滑筋収縮および弛緩、血小板凝固などの末梢組織における反応から、神経機能調節まで多岐にわたって報告されている（1,2）。これら反応の作用機作として、従来から知られてきた古典的神経伝達物質、たとえばアセチルコリンやノルエピネフリンなどの場合と同様に、それぞれのプロスタノイドに特異的な受容体の存在が薬理学的に示唆されてきた（1-3）。1991年にプロスタノイドの受容体としてヒトTXA₂受容体がはじめてクローニングされ（4）、その分子としての実体が明らかにされた。その後、マウス（5-12,129）やヒト（13-23）においてほとんどすべてのプロスタノイドに特異的な受容体がクローニングされ、あらためてプロスタノイド受容体の薬理学的分類が大筋で正しいことが確認された（24,25）。

プロスタノイド作用の末梢組織における研究に比べると、中枢神経系における研究は大きく立ち遅れている（1,2,26）。これは適切な実験系が少ないこと、およびプロスタノイドの中枢神経系組織における標的細胞が不明であったことによる。最近、中枢神経系を構成する細胞のうちグリア細胞特にアストロサイトがプロスタノイドの標的細胞の一つであることが報告され、その意義について論じ始められた（27,28）。本研究は、中枢神経系細胞としては初めて、培養アストロサイトにPGF₂ α 受容体反応を見出したことに始まり、中枢神経系に存在するプロスタノイド受容体分子の構造とその調節機構を明らかにすること

を目的として、まずアストロサイトcDNAライブラリーよりプロスタノイド受容体cDNAのクローニングを行った。次にその情報をもとにreverse transcriptase-polymerase chain reaction法により、各種グリア細胞におけるプロスタノイド受容体mRNA（メッセンジャーRNA）の発現分布と発現量の変化について検討した。さらにプロスタノイド受容体アンタゴニストの検索、受容体蛋白質の発現に関わる調節機構、および発現後の情報伝達系活性化における調節機構について薬理的に検討した。

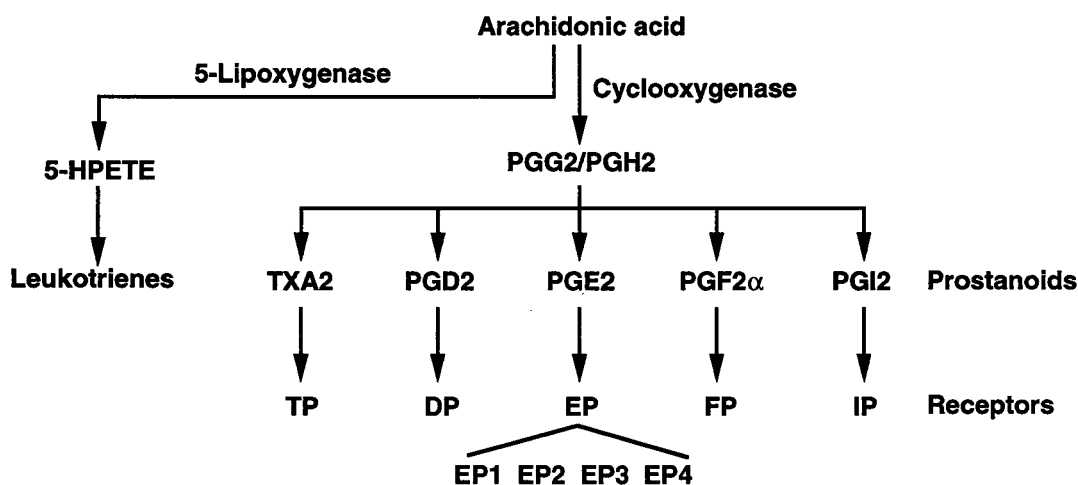


Fig. 1. Prostanoid formation and the receptors

The second messenger systems of EP1, EP2, and EP3 receptors are intracellular calcium mobilization, stimulation of cyclic AMP formation, and inhibition of cyclic AMP formation, respectively. EP4 receptor is the most recently identified subtype of EP receptor (for review, ref. 25). PG, prostaglandin; TX, thromboxane; 5-HPETE, 5-hydroperoxyeicosatetraenoic acid.

本 論

第一章 培養ラットアストロサイトcDNAライブラリーからのプロスタノイド受容体cDNAのクローニング

第一節 プロスタグランジンF2 α 受容体 (FP受容体) cDNAのクローニング

プロスタノイドは末梢組織と同様中枢神経系においても存在することがヒトを含む哺乳動物の脳で報告されている (29-33)。またそれらプロスタノイドの生合成活性 (34-37) や代謝分解活性 (38) が中枢神経系標品において見い出されており、中枢神経系におけるプロスタノイドの生理機能に注目が集まっている。事実、中枢神経系機能、たとえば体温調節 (39-44)、摂食 (45)、睡眠覚醒制御 (44,46-48) に対してプロスタノイドが関与するという報告が示されており、それらの分子レベルでの作用機作に興味をもたれている (26)。しかしながら、中枢神経系におけるプロスタノイドの標的細胞は、適切な実験系がなかったためにこれまで不明であった。この点に関し、中枢神経系を構成する細胞のうちグリア細胞特に培養アストロサイトにおいて、トロンボキサン (TX) A₂のアナログである9,11-epithio-11,12-methanbo-TXA₂ (STA₂) がPI代謝回転を亢進することが報告された (49)。またわれわれは、培養アストロサイトを各種リガンドの情報伝達系解析のための実験系として用い検討したところ、プロスタグランジン (PG) F₂ α がイノシトールリン脂質 (PI) 代謝回転を亢進する知見を得、アストロサイトが中枢神経系におけるプロスタノイドの標的細胞の一つである可能性が考えられた。そこで本節ではまず、PGF₂ α を内因性リガンドとする中枢神経系プロスタノイドFP受容体の存在とその分子構造を明らかにすることを目的として、FP受容体の存在が薬理的に示唆された培養アストロ

サイト (27,28) を用い、FP受容体cDNAのクローニングを行った。

実験方法

培養ラットアストロサイト [Raffらの分類 (50) によるタイプ1アストロサイト、すなわち glial fibrillary acidic protein陽性かつ A2B5陰性] はKimelbergとFrangakisの方法 (51) に従って調製した。培養ラットアストロサイトcDNAライブラリーの作製およびそのスクリーニングはFig. 2に示す方法で行った。すなわ

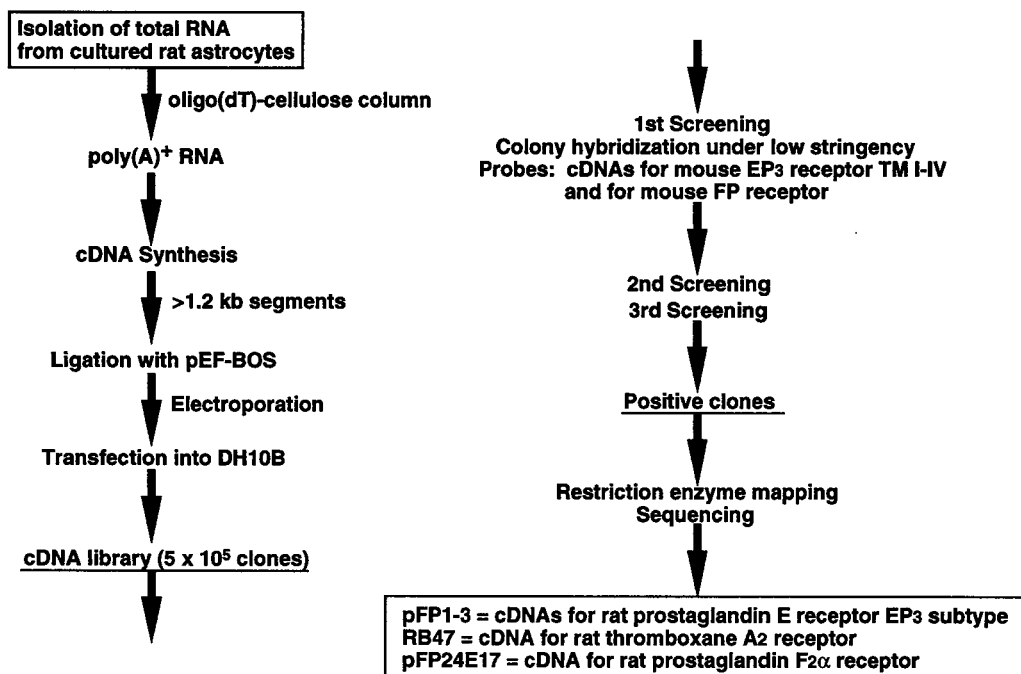


Fig. 2. Strategy for cloning of rat prostanoid receptors

Screening probes were cDNA fragments of mouse prostanoid EP3 receptor (coding region between first and fourth transmembrane domains) (ref. 9) and mouse FP receptor (1.0 kb PstI-fragment) (ref. 11).

ち、培養ラットアストロサイトからpoly(A)⁺RNAを抽出し、Amersham cDNA Synthesis System Plusを用いてcDNAを合成した。それを発現ベクターpEF-BOSに組み込み、cDNAライブラリー（5 × 10⁵クローン）を作製した。スクリーニングを行うためのプローブとして、マウスプロスタノイドFP受容体cDNAからPstIで切り出した1.0 kbのフラグメント（11）をrandom priming法により³²Pでラベルして使用した。スクリーニングはコロニーハイブリダイゼーションして行った。すなわち、フィルターをプローブ存在化28°Cで一晩インキュベーションし、その後2×SSC+0.1% SDSで28°Cの洗浄を1時間、ついで1×SSC+0.1% SDSで37°Cの洗浄を1時間行った。フィルターは-80°Cでautoradiographyした。得られた8つの陽性クローン（pFP17-pFP24）のうち、2つ（pFP17およびpFP24）を選んでdideoxy法（United States Biochemical Sequenase version 2.0 kit、Takara BcaBEST dideoxy sequencing kit、あるいはToyobo Δ *Tth* DNA polymerase sequencing PROを使用）により両strandを読むことでそれら塩基配列を決定した。

実験結果

cDNAの解析結果をFig. 3に示す。2つのクローンpFP17とpFP24は完全に同一の塩基配列を含んでおり、pFP17は図中833から2,867番目までの、pFP24は図中-133から1,222番目の塩基配列をそれぞれ持っていた。両cDNA塩基配列の解析結果より、これらは推定アミノ酸数366個の蛋白質（推定分子量40,660）をコードするcDNAの一部であることが分かった。この蛋白質はFig. 4に示すようにマウス卵巣FP受容体（11）と96.4%、ヒト子宮FP受容体（16）と85.5%、ウシ黄体細胞FP受容体（52）と80.3%のアミノ酸相同性を示し、ラットアストロサイトFP受容体であることが分かった。

		I	
Rat	MSINSSKQPASSAAGLIANTTCQTENRLSVFFSIFMTVGVIVSNLAI		50
Mouse	..M.....V.P.....L.....		50
Bovine	..T...I..V.PESE.LS....L.ED..IS.....L.....		50
Human	..M.N...LV.P.A.LS.....V.....L.....		50
		II	
Rat	LMKAYQFRFRKSKASFLLLASGLVITDFFGHLINGGIAVFFVYASDKDWIR		100
MouseQ.....		100
BovineQ.Y.S.....A.....T.....Y		100
HumanQ.....T.....E...		100
		III	
Rat	FDQSNILCSVFGISMVFSGLCPLFLGSTMAIERCIGVTNPLFHSTKITSK		150
MouseI.....A.....I.....		150
Bovine	..K.....I..C.....L.....K.I.....T.		150
HumanV...I...C.....L...V.....K.I.....		150
		IV	
Rat	HVKMILSGVCMFAVFAVALLPILGHRDVIQASRTWCFYNTTEHIEDWEDRF		200
MouseV.....		200
Bovine	...M....F.....K.....K.DE.K.....		200
Human	...M....L...I.....K.....D.K.....		200
		V	
Rat	YLLFFSSLGLLALGISFSCNAVTVTLLRVKFRSQQHRQGRSHHLEMVIO		250
MouseF.....V.....I.....		250
Bovine	...L.AF.....V...I..IS..K.....F.....		250
Human	...L..F.....V.LL...I..I.....K.....		250
		VI	VII
Rat	LLAIMCVSCVCSPLVMTMANIANGNNSPVTCTTLFALRMATWNQILD		300
Mouse		300
Bovine	..G.....I.....S.GM.IQDFKDS..R...T.....		300
HumanI.....G...H.LE.....		300
Rat	PWVYILLRKAVALRNLKYLASRCCGVNIIISLHIWELSSIKNSLKVAAISES		350
Mouse		350
BovineVCTR.....HV...V.....D.....DL		350
HumanK.....Q...HV.....		350
Rat	PAAEKENQASSEAGL		366
MouseS.....		366
Bovine	.VT..VT..T.T		362
Human	.V...S---.T		359

Fig. 4. Amino acid sequence comparison of the FP receptors of various species

The deduced amino acid sequences of the rat, mouse (11), bovine (52), and human (16) FP receptors are aligned. Dots and hyphens indicate identical and deleted amino acids, respectively, compared with those of the rat. Putative transmembrane domains are indicated with I-VII.

第二節 プロスタグランジンE受容体EP3サブタイプ (EP3受容体) cDNAのクローニング

アストロサイトはPGEの刺激に反応してその細胞内cyclic AMP量を増加させる(53,54)。このPGEによるアデニレートシクラーゼ活性化作用はRaffらの分類(50)によるタイプ2アストロサイトに強く認められる(54)。一方、タイプ1アストロサイトにおけるPGEの作用は、アデニレートシクラーゼを活性化することが知られている他の薬物の作用ほど著明ではなく(53,54)、従ってタイプ1アストロサイトにおけるEP受容体の存在の有無、そして存在する場合どのサブタイプのEP受容体 (Fig. 1) が発現しているかは不明である。そこで次に、タイプ1アストロサイトEP受容体cDNAをクローニングした。

実験方法

cDNAライブラリーの作製とスクリーニングは第一節の方法に従った。ただし第一節で得た陽性クローン中には他のプロスタノイド受容体cDNAと考えられるクローンが存在しなかったため、スクリーニング用プローブとして、マウスプロスタノイドEP3受容体cDNAのうち、推定第1から第4細胞膜貫通領域をコードする0.48 kbフラグメント (9) を用いた。得られた16個の陽性クローン (pFP1-pFP16) のうち、そのシグナルの強いものから順に10個のcDNA塩基配列 (pFP1-8,11,12) のsequencingを行った。

実験結果

塩基配列のsequencingを行った10個のクローンのうち3個 (pFP1-3) は完全に同一の塩基配列を含んでいた。そのうちpFP1とpFP2の解析結果をFig. 5に示

	-85	CGCCGTCCTC	-76
	CAGCGCGCTCCGCTGCAACCCCGCAGCTGAGCCCAGAGGCTCCGGCCCTGTGCGCCCTACCGCGGCCCGCCACT		-1
	ATGGCCGGCGTGTGGGCGCCGGAGCACTCGGTTGAAGCGCACAGCAACCAGTCAAGTGCTGCCGACGGCTGCGGGC		75
	M A G V W A P E H S V E A H S N Q S S A A D G C G		25
	TCTGTGTCCTGGCCTTCCCCATCACCATGATGGTCACTGGCTTCGTGGGCAACGCGCTGGCCATGTTGCTTGTG		150
	S V S V A F P I T M M V T G F V G N A L A M L L V		50
	TCGCGCAGCTATAGACGCGGGAGAGCAAACGCAAAAAGTCTTTCCTGTGTGCATTGGCTGGCTGGCGCTCACC		225
	S R S Y R R R E S K R K K S F L L C I G W L A L T		75
	GACTTGGTGGGGCAGCTCCTGACCAGTCCGGTGGTTCCTCGTGTACCTGTGCGAGCGACGCTGGGAGCAACTC		300
	D L V G Q L L T S P V V I L V Y L S Q R R W E Q L		100
	GACCCATCGGGGCGCCTGTGCACCTTCTTCGGGCTGACCATGACAGTGTTCGGACTGTCTCGCTCTTGGTGGCC		375
	D P S G R L C T F F G L T M T V F G L S S L L V A		125
	AGCGCCATGGCCGTGGAGCGCGCCCTGGCTATCCGTGCGCCGCACTGGTATGCCAGCCACATGAAGACTCGCGCC		450
	S A M A V E R A L A I R A P H W Y A S H M K T R A		150
	ACGCGCGCGTACTGCTGGGTGTGTGGTGTCTGTGCTCGCCTTCGCGCTGCTGCCTGTGCTGGGCGTGGGCCG		525
	T R A V L L G V W L S V L A F A L L P V L G V G R		175
	TACAGCGTGCAGTGGCCCGCACGTGGTGTTCATCAGCACCGGGCCGGGCAACGAGACGGACTCTGCGCGG		600
	Y S V Q W P G T W C F I S T G P A G N E T D S A R		200
	GAGCCGGGCAGCGTGGCCTTTGCCTCCGCCTTCGCCTGTCTAGGCTTGTGCTGGCTCTGGTGGTGACCTTTGCCTGC		675
	E P G S V A F A S A F A C L G L L A L V V T F A C		225
	AACCTGGCGACCATCAAAGCCCTGGTGTCCCGCTGCCGGGCAAAGCCGCGCCTCGCAGTCCAGCGCCAGTGG		750
	N L A T I K A L V S R C R A K A A A S Q S S A Q W		250
	GGCCGGATCACCGGAGACGGCTATCCAGCTTATGGGGATCATGTGTACTGTCCGTCTGCTGGTCCCGCTA		825
	G R I T T E T A I Q L M G I M C V L S V C W S P L		275
	TTGATAATGATGCTGAAAATGATCTTCAATCAGATGTCAGTAGAGCAATGCAAGACGAGATGGGAAAGGAGAAG		900
	L I M M L K M I F N Q M S V E Q C K T Q M G K E K		300
	GAGTGAATTCCTTCTTAATCGCCGTTGCGCTGGCTTCGCTGAACCAGATCTTGGATCCTGGGTTTATCTGCTG		975
	E C N S F L I A V R L A S L N Q I L D P W V Y L L		325
	CTAAGAAAGATCCTTCTTCGAAAGTTCTGCCAG		1008
	L R K I L L R K F C Q		336
EP3β	ATGATGAACAACCTGAAGCGGAGTTTCATTGCAATACCTGCTTCCCTGAGTATGAGAATTTCTTCCCCAGGGAA	1083	
	M M N N L K R S F I A I P A S L S M R I S S P R E	361	
	GGATAACTGAATCATTTTGGATTGTATCTTCTTCGGCCTCATATTTAAGTTTTCCTTGCCATTAACACACCG	1158	
	G	362	
	AGACAAGCTT	1168	
EP3γ	GTAGCAAACGCTGTCTCCAGCTGCTCTAGTGACCAACAGAAAGGGCAGGCCATCTCCTTGTCTAATGAAGTAGTA	1083	
	V A N A V S S C S S D Q Q K G Q A I S L S N E V V	361	
	CAGCCAGGGCCATGAAAGAGAACAGAGCCAATGAGCTTAGACACAGCTTTTGCAGCAATGTCTTAACCTTATGG	1158	
	Q P G P	365	
	AC	1160	

Fig. 5. Nucleotide sequences of rat EP3 receptor cDNAs and their deduced amino acid sequences

Two clones (pFP1 and pFP2, corresponding to EP3β and EP3γ, respectively) were sequenced. The nucleotide sequence is numbered in the 5' to 3' direction, starting with the initiator ATG of the open reading frame. Putative N-glycosylation sites are indicated with asterisks and presumed transmembrane domains are underlined. Potential phosphorylation sites by protein kinases A and C are shown by arrow heads.

す。この2つのクローンは塩基配列で1,008番目、推定アミノ酸配列で336番目まではまったく同一であった。しかし塩基配列で1,009番目、推定アミノ酸配列で337番目以降はpFP1とpFP2とでは別々の配列を持っており、互いにアイソフォームをコードしていることが分かった。もう一つのクローンpFP3は推定アミノ酸配列でpFP2のコードするアミノ酸とまったく同一であったが、3'側の非翻訳領域がpFP2よりも短いものであった（データには示さず）。pFP1がコードする蛋白質（推定分子量39,634）は、Fig. 6に示すようにマウス癌化肥満細胞EP3受容体EP3 β アイソフォーム（7）と94.8%のアミノ酸相同性を示し、ラットアストロサイトEP3受容体EP3 β アイソフォームであることが分かった。また、pFP2がコードする蛋白質のC末端から29アミノ酸は、pFP1のコードする蛋白質のC末端から26アミノ酸と置き換わった構造をしており、マウス癌化肥満細胞EP3受容体EP3 γ アイソフォーム（8）に対応するラットアストロサイトEP3受容体EP3 γ アイソフォームであることが分かった。

Fig. 6には、ラットアストロサイトEP3受容体EP3 β アイソフォームのアミノ酸配列を、すでに報告されているマウス癌化肥満細胞EP3受容体EP3 β アイソフォーム（7）、ウサギ腎臓EP3受容体クローン77A（55）、ウシ副腎髄質EP3受容体EP3Aアイソフォーム（56）、およびヒト子宮EP3受容体EP3-IIIアイソフォーム（21）と比較したものを示した。マウス癌化肥満細胞においては3種類の（EP3 α 、EP3 β およびEP3 γ ）（7,8）、ウサギ腎臓においては4種類の（クローン72A、74A、77A、および80A）（55）、またウシ副腎髄質においては4種類のEP3受容体アイソフォーム（EP3A-EP3D）（56）がそれぞれ報告されており、それらがalternative splicingにより作られることが証明されている。alternative splicingを受けてアミノ酸配列が変化する部位はいずれの動物種においても、C末端側のアミノ酸残基であり（Fig. 6の矢印で示す部位からC末端までのアミノ酸残基）、ラットアストロサイトにおいてもFig. 5に示すように、alternative splicingを受けてできる複数のEP3受容体アイソフォームの存在が示唆された。

また、pFP4-6、8、11、12はsequencingの成績から特定の蛋白質を同定することができなかった（データには示さず）。さらにpFP7に関しては、塩基配列の部分解析によりpFP1の塩基配列と約30%の相同性を示す領域を持つことから、さらに詳細に検討した（次節）。

第三節 トロンボキサンA2受容体 (TP受容体) cDNAのクローニング

前節において解析したクローンのうちpFP7は、その塩基配列から推定される部分アミノ酸配列がマウスTP受容体 (5) と高い相同性を示したことから、ラットアストロサイトTP受容体cDNAの一部である可能性が示唆された。培養ウサギアストロサイトにおいてはTXA2のアナログであるSTA2がPI代謝回転を亢進することが報告されており (49)、アストロサイトにはTP受容体が存在すると考えられた。そこで本節では、pFP7の解析成績をもとにラット脳よりTP受容体cDNAのクローニングを行った。

実験方法

pFP7の解析結果とマウスTP受容体アミノ酸配列 (5) との比較より、pFP7は推定蛋白質C末端側の翻訳領域に対応する部分から3'側にかけての塩基が欠失していることが分かった。そこでFrohmanらの方法 (57) に従って欠失した部分を含む3'側cDNAの増幅を行い、全翻訳領域の解析を行った。まずアダプタープライマー5'-GACTCGAGTCGACATCGA-(T)₁₇-3'を用い (57)、ラット脳RNAサンプルよりcDNAプールを作製した。次にpFP7の塩基配列 (Fig. 7の-384番目から994番目) より得られた情報をもとに2つのプライマー、すなわちプライマー1、5'-GGTGTGTTGGATGCCCTTGC-3' (Fig. 7の756番目から775番目)、およびプライマー2、5'-TGCTGCAGACGCTACCTGTC-3' (Fig. 7の797番目から816番目) をデザインした。プライマー1とアダプタープライマーを用いてラット脳cDNAプールを鋳型としてpolymerase chain reaction法 (PCR法) (128) により増幅を行った。そのPCR産物をさらにプライマー2とアダプタープライマーを用いてPCR法により増幅を行った。得られたPCR産物を1%アガロースゲル電気泳動により回収し、pFP7とPCR産物とをligationして全翻訳領域を含

むcDNAをクローニングした (クローンRB47)。

実験結果

RB47のcDNA解析結果をFig. 7に示す。これは推定アミノ酸数341個の蛋白質 (推定分子量36,860) をコードするcDNAであった。この蛋白質はFig. 8に示すようにマウス肺TP受容体 (5) と92.7%、ヒト胎盤TP受容体 (4) と71.8%のアミノ酸相同性を示し、ラットアストロサイトTP受容体であることが分かった。

```

-384      GAACACCACTGCCCTACCCTCCCA -361
ACAGTGGAGACAGGGCTCAGGAATGCAGGACCACCCACATCCCAGTGACTTCTTTGGCTCCCGGGTGTCCAAAGCTGGGGTGTGGTGGC -271
CTGCGCCTGTACCCAGCTTCAGAAGCTGGGGGAGATGACTCTCAGGGAGTCCAGGCCAGCCTGGTCTACACAGTACAGAGTCTGCAG -181
GAGTGAAGTACAGAATTCCTGAGCCTTGACATTCACAGGCCCAAAGCTCCTTGTCTCAAGGCTGTGGAACTGATAGGGCGCAGAGACAC -91
CAAGTGGCCAGAGCCTGCATCAGCCCAACGTCCAGTCCAGTGCATCTGATGGGGTGTGACCCCTTATCACGTCAGGCTCAGGAGCC -1

ATGTGGCTCAACAGCACCTCGCTGGGGGCATGCTTCCGCCAGTGAACATCACGCTGCAGGAGCGACGTGCCATCGCGTCGCCATGGTTC 90
M W L N S T S L G A C F R P V N I T L Q E R R A I A S P W F 30
      *                               *
GCGGCATCCFTCTGCGCACTGGGCCTGGGGTCCAACCTGCTGGCGCTGAGTGTGCTGGCCGGGGCGGCACCTGGGGCGGGACCCCGCTCC 180
A A S F C A L G L G S N L L A L S V L A G A R P G A G P R S 60

TCCTTCCTCGCTTTGCTGTGCGGCCTCGCTCACCGACTTCCTGGGGCTGTGCTGCTCACCGCGCTGTGCTGGCGTGCACACAGCCGCC 270
S F L A L L C G L V L T D F L G L L V T G A V V A S O H A A 90
II
TTGTTGGACTGGCGTGCACCTGATCCCAGTTGCGCCTTTGCCACTTCATGGCGCGGCATGGTGTTCCTGGGGCTGTGTCCCTGTCTC 360
L L D W R A T D P G C R L C H F M G A A M V F F G L C P L L 120
III
CTGGGGCCCGATGGCTGCAGAGCGCTTCGTGGGCATCACACGGCCCTTCTCACGACCCGAGCCAGTTCGCGCCGCGCTGGGCCACT 450
L G A A M A A E R F V G I T R P F S R P A A T S R R A W A T 150
      A A IV
GTGGGGCTGGTGTGGTGGGGCCGGGACTCTCGGGCTGCTGCCACTGTGGGGCTCGGCCGCTACAGTGTGAGTACCCCGGCTCCTGG 540
V G L V W V G A G T L G L L P L L G L G R Y S V Q Y P G S W 180

TGCTTCTGACTCTTGGGGCGGACCGCGCGACGTGGCCTTCGGGCTCATGTTTGTCTCTCCTGGGACGCGTGTCCGTGGGGCTGTCCCTC 630
C F L T L G A G R G D V A F G L M F A L L G S V S V G L S L 210
V
CTGCTCAACACCGTGAGCGTGGCCCTCTGCCCGCTTACCATCGCGCGAGGCCACACAGCGCCCCGGGACTGTGAGGTGGAGATG 720
L L N T V S V A T L C R V Y H A R E A T Q R P R D C E V E M 240
      A VI
ATGGTTACAGCTCGTAGGCATCATGTTGGTGGCCACGGTGTGTTGGATGCCCTTGCTGGTCTTCATCTCCTGCAGACCTTGCTGCAGACGCTA 810
M V Q L V G I M V V A T V C W M P L L V F I L O T L L O T L 270

CCTGTCTAGAGCCCTCCGGACAGCTGTGCGGACCACGGAGCGCCAACCTGCTCATCTACCTACGCGTGGCCACATGGAACAGATCTTG 900
P V M S P S G Q L L R T T E R Q L L I Y L R V A T W N O I L 300
VII
GACCCCTGGGTCTACATCTCTTCCGTAGTCCGTGCTTCGACGCTGCATCCAAGTTCACCTCCAGCTCCAGGCTGTGTCTTGCAC 990
D P W V Y I L E R R S V L R R L H P R F T S Q L Q A V S L H 330

TCACCCCCACACAGGCCATGCTCAGTGGACCTGAAGGACGGTGCCAAATCAAAGCTGGGGTCTTGGTGTACTGCTAACGACCTGTCTCC 1080
S P P T Q A M L S G P 341

TGTCACAGGAGCCTGAATGTTGGTGGGATGGAGTTACAACACAGGGCTGACTCCTGTGAACACAAAGATACCTCCTCCATGCTAGGGA 1170
GATCCTCCCTGGCCCCCTCCACAGACTACTTGTACAGTAGGAGGTTGGAGCATATGTGGGAGTCCCTTGCAGGAATCTATGGTTACACAG 1260
AGAGAACCCTGGGGTCCGATGGCATCTCCCATCTTGCATAGTCCGCGCTCTGTCTCAGCCCCGTGTGCCGGGCTTCATGTTTGTCTCT 1350
TAGGCTCAAGGATCATCGGCCTTGGGTGTGGAAGCACCCACTGTGGTCCAGTAGCTGGCTTGGAGTTACCAACCTCCTCGTGTCTACT 1440
GAGCCCCCTCCCCACGGCTATCCAACACACATGCTCAATAAATGGTGAATGTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1516

```

Fig. 7. Nucleotide sequence of rat TP receptor cDNA and its deduced amino acid sequence

The sequence of clone RB47 is shown. The nucleotide sequence is numbered in the 5' to 3' direction, starting with the initiator ATG of the open reading frame. Putative N-glycosylation sites are indicated with asterisks and presumed transmembrane domains are underlined. Potential phosphorylation sites by protein kinase C are shown by arrow heads. A possible polyadenylation signal is double underlined.

		I	
Rat	MWLNSTSLGACFRPVNITLQERRAIASPWFAASFCALGLGSNLLALSvla		50
Mouse	..P.G.....		50
Human	..P.GS...P...T...E...L.....VV..A.....		50
		II	
Rat	GARPGAG-PRSSFLALLCGLVLTDFLGLLVGTGAVVASQHAALLDWRATDP		99
Mouse-.....I.....		99
Human	...Q.GSHT.....TF.....TI.V.....FE.H.V..		100
		III	
Rat	GCRLCHFmGAAMVFFGLCPLLLGAAMAAERFVGITRPFsrPAATS-RRAW		148
Mouse	S...Y...V.....S.....T...-....		148
HumanR...VV.I...S.....S..YL.....VA.Q....		150
		IV	V
Rat	ATVGLVWVGAGTLGLLPLLGLGRYSVQYPGSWCFLTLGAGRGDVAFGLMF		198
MouseA..A.....TQ...V...I.		198
HumanAA.LA.....V..T.....GES.....L.		200
		VI	
Rat	ALLGSVSVGLSLLLNTVSVATLCRVYHAREATQ-RPRDCEVEMMVQLVGI		247
MouseA.....T.....-.....		247
Human	SM..GL.....F.....H...GQ..A.Q....S.....A..L..		250
		VII	
Rat	MVVATVCWmPLLVFILQTLQTLpVMSpSGQLLRtTERQLLIYLRVATWN		297
MouseM.....P...F.....A..H.....		297
Human	...S...L.....A..V.RNP.A...A...S...KE.....		300
Rat	QILDpWVYILFRRSVLRRLHPRFtSQLQAVSLHSPPTQAMLsGP		341
MouseS.....RR..A.....		341
HumanA.....Q..LSTRPRSL..QPQL..RSLQ		343

Fig. 8. Amino acid sequence comparison of the TP receptors of various species

The deduced amino acid sequences of the rat, mouse (5), and human(4) TP receptors are aligned. Dots and hyphens indicate identical and deleted amino acids, respectively, compared with those of the rat. Putative transmembrane domains are indicated with I-VII.

第四節 培養ラットアストロサイトにおけるプロスタノイド受容体情報伝達系の解析

前節までにクローニングして一次構造を決定した各プロスタノイド受容体は、FPおよびTP受容体がPI代謝回転系と、EP3受容体がcyclic AMP産生を抑制する系と共役していることが、末梢組織 (1,2) やリコンビナント受容体の系 (6-8,11,52) で報告されている。そこで第一節から第三節において得られたクローンのコードする受容体が、実際にアストロサイトにおいて発現して機能を持っているかについて検討した。

実験方法

PI代謝回転の指標として、リガンド反応後細胞内に蓄積したイノシトール1-リン酸 (IP_1) を、Berridgeらの方法 (59) に従って測定した。すなわち、まず培養アストロサイト (Corning社製12-well plate中でconfluentになったもの) を *myo*-[3H]イノシトール (37 kBq/well) で24時間標識した。その後、 IP_1 脱リン酸化酵素阻害活性を持つリチウムとシクロオキシゲナーゼ阻害薬であるインドメタシンを含むKrebs-Ringer bicarbonate buffer [LiKRB、組成 (mM) : LiCl 10、NaCl 110、KCl 5.5、CaCl₂ 2.5、MgCl₂ 1.2、KH₂PO₄ 1.2、NaHCO₃ 20、D-glucose 11、indomethacin 0.01、pH 7.4]で細胞を洗浄し、LiKRBで20分間、37°Cでプレインキュベーションした。次に新しいLiKRBに交換して各薬物を添加し、反応を開始した。反応は薬物を含むLiKRBを除いた後、氷冷メタノールを添加して停止した。細胞を培養プレートから剥がして氷冷クロロホルム中に添加し、そこへさらに水を添加した。この水-メタノール-クロロホルム混合細胞浮遊液を攪拌、超音波処理して細胞を完全に破碎した。遠心操作によって水層と有機層とに分離し、水層を陰イオン交換樹脂 (Bio-Rad AG1-X8、100-200 mesh、ギ酸

型) の入ったカラムに通し、カラム内を水、ついで5 mMホウ酸ナトリウム/60 mMギ酸ナトリウムで洗浄した。樹脂に結合した $[^3\text{H}]\text{IP}_1$ は、0.1 Mギ酸/0.2 Mギ酸アンモニウムで溶出し、カクテルと混和した後液体シンチレーションカウンターでその放射活性を測定した。有機層はそのままカクテルと混和した後その放射活性を測定した。PI代謝回転は細胞に取り込まれた全トリチウム量に対する $[^3\text{H}]\text{IP}_1$ 量 (% Hydrolysis) として表示した。なお、20分間のプレインキュベーション中に細胞内に認められた $[^3\text{H}]\text{IP}_1$ 量を反応時間0分のバックグラウンド値としてすべての測定値より差し引き、反応時間中に産生された正味の蓄積量として示した。

細胞内cyclic AMP量は、Babaらの方法 (60) に従って測定した。すなわち、アストロサイトの培地を除いてHEPES-Krebs-Ringer buffer [HKR、組成 (mM) : NaCl 145、KCl 6、CaCl₂ 1.8、MgSO₄ 0.8、HEPES 25、D-glucose 19、pH 7.4]で洗浄後、HKRで20分間プレインキュベーションした。HKRを除き1 mMイソブチルメチルキサンチン (IBMX) を含むHKRに交換し、5分後に各薬物を含むIBMX-HKRを添加して反応した。反応は氷冷トリクロロ酢酸を5%の濃度となるように添加して停止した。反応プレートを-30°Cで凍らせた後解凍して細胞を完全に破碎した。調製したサンプルのcyclic AMP量はラジオイムノアッセイキット (Amersham) を使用して行った。また、蛋白質の定量はLowryらの方法 (61) に従って行った。

実験結果

PGF₂ α およびTXA₂のアナログであるSTA₂は、培養アストロサイトに対するイノシトールリン脂質代謝回転亢進作用について、他のプロスタノイドと比較してポテンシー、エフィカシーともに強かった (Fig. 9A)。また、EP₃受容体選択的アゴニストであるM&B28767は (24,25)、培養アストロサイトにおける

フォルスコリンによるcyclic AMP産生を濃度依存的に抑制した (Fig. 9B)。

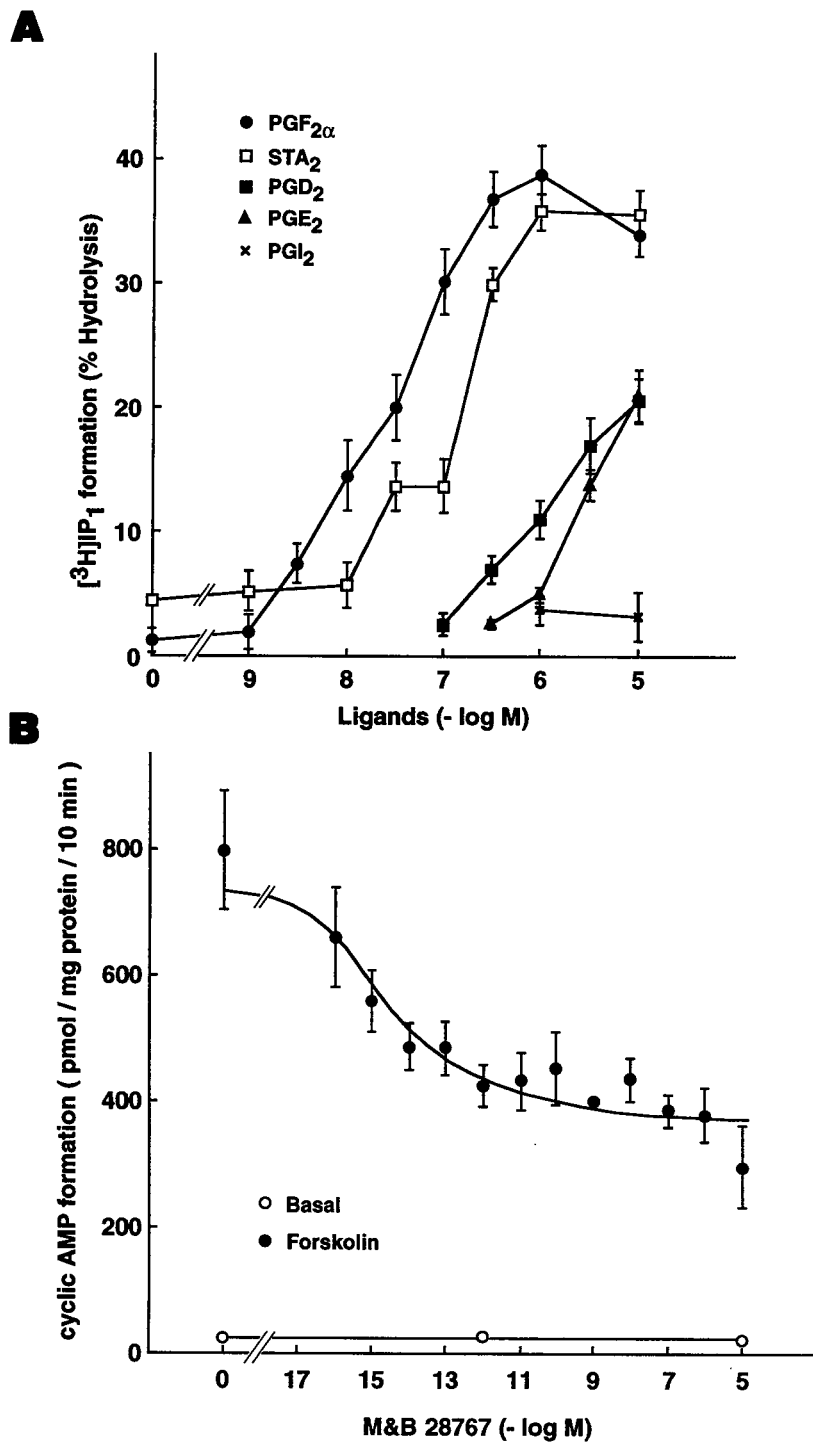


Fig. 9. Signal transduction of prostanoid FP, TP, and EP3 receptors in cultured rat astrocytes

(A) Phosphoinositide hydrolysis, (B) cyclic AMP formation.

Values are means \pm S.E.M. of at least three independent experiments.

第五節 考察と小括

考察

本章において明らかにした3種類のラットタイプ1アストロサイトのプロスタノイド受容体 (FP、EP3、およびTP) の推定アミノ酸配列を、すでに報告されているラット肺EP2受容体 (58) と合わせて比較したものをFig. 10に示す。マウスおよびヒトにおいて指摘されているのと同様に (25)、ラットにおいても第7細胞膜貫通領域および第2細胞外ループ領域で特に高い保存性が認められた。また、いずれのクローンのコードする受容体も、末梢組織由来のcDNAクローンの成績と比較して推定アミノ酸配列で90%以上の相同性を示し (Figs. 4,6,8)、中枢神経系プロスタノイド受容体は末梢組織のものと同一であると考えられた。

第二節において示したように、ラットタイプ1アストロサイトにおいて、従来の薬理的検討によっては見い出されなかったEP3受容体 (27,28,54) が存在すること、およびラットアストロサイトには少なくとも2種類のEP3受容体アイソフォーム (マウスEP3 β およびEP3 γ に対応する) が発現していることが明らかとなった。また実際に本受容体活性がアストロサイトに認められ、その機能を有していることを第四節において示した (Fig. 9A)。全脳RNAを用いたノーザン解析においては、クローニングされた3種類のEP受容体サブタイプのうちEP3サブタイプのmRNA (メッセンジャーRNA) のみその存在が確認されている (6,9,10)。この点に関し最近Sugimotoらはマウス脳切片を用いたin situハイブリダイゼーション法により、EP3受容体mRNAが神経細胞に局在して存在するという成績を報告した (62)。この成績 (62) と本章第二節および第四節の結果を合わせて考えると、神経細胞に加えてグリア細胞特にアストロサイトも実際に中枢神経系におけるプロスタノイド受容体情報伝達系のネットワークを

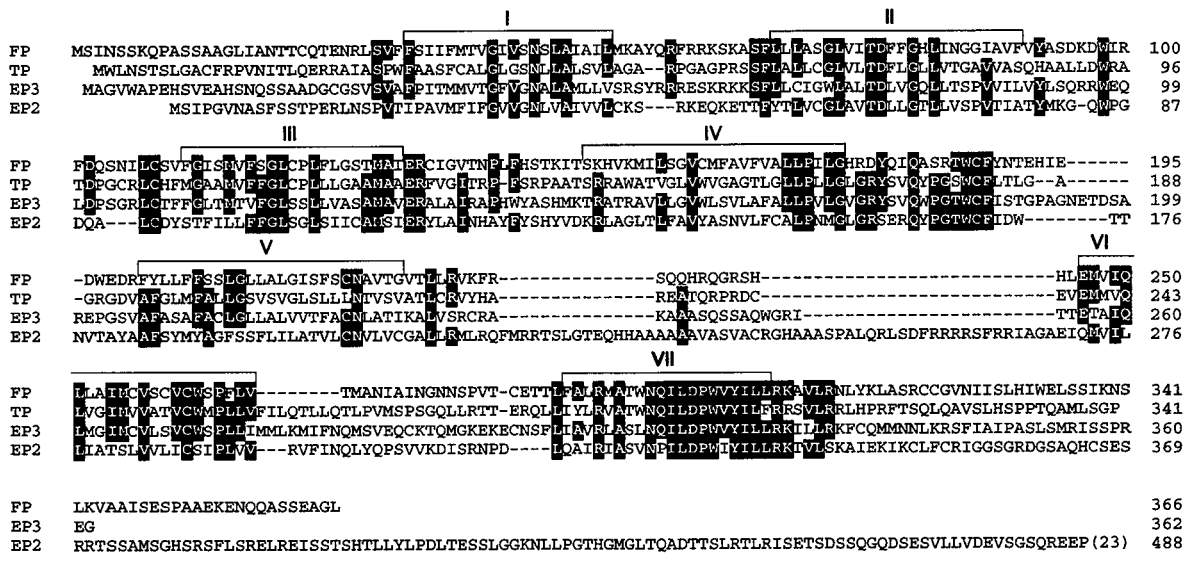


Fig. 10. Comparison of the amino acid sequences of rat prostanoid receptors
 Rat astrocyte EP3 (EP3 β isoform), FP, TP, and rat lung EP2 (58) receptors are aligned.
 The approximate positions of the putative transmembrane domains are indicated with I-VII. The shadowed areas show amino acid residues conserved among three or four receptors.

構成している一員である可能性が考えられる。

小括

1. ラット培養アストロサイト (タイプ1) cDNAライブラリーより、3種類のプロスタノイド受容体 (FP、EP3、およびTP) cDNAのクローニングを行い、その推定アミノ酸配列を明らかにした。
2. クローニングした各受容体は培養アストロサイトにおいて、各々が共役する情報伝達系を活性化することを明らかとし、実際に受容体機能を有していることを示した。

第二章 グリア細胞におけるプロスタノイド受容体mRNAの発現分布

第一節 各種グリア細胞におけるプロスタノイド受容体mRNAの発現量の比較

中枢神経系グリア細胞はアストロサイト、オリゴデンドロサイト、およびミクログリアに大別される(63)。各グリア細胞は病理学的所見、電子顕微鏡的観察、あるいは*in vitro*の実験系によって、たとえばアストロサイトは脳損傷時の活性化とグリア瘢痕の形成や局所イオン環境の維持(64-67)、オリゴデンドロサイトは神経細胞軸索に対するミエリン形成(68)、ミクログリアはいわゆる脳内免疫系ネットワークの形成(69-71)といった機能が示唆されている。しかしその存在意義は完全には証明されておらず、従ってそれら生理的役割の解明へアプローチする一つの方法として、細胞外刺激に応答する細胞受容機構、すなわち各種リガンドの受容体発現分布を明らかにすることが重要と考えられている(72-75)。この観点から、本章においては各種グリア細胞に対するプロスタノイドの生理的役割を検討する目的で、第一章において明らかとなったラットプロスタノイド受容体の塩基配列をもとにプライマーを作製し、reverse transcriptase-PCR法(RT-PCR法)により各種グリア細胞におけるプロスタノイド受容体mRNAの発現分布を検討した。またその成績を、髄膜由来繊維芽細胞、グリア細胞の継代培養系であるラットC6グリオーマ細胞、副腎髄質褐色細胞由来のPC12細胞、全脳、およびEP3(6)、FP(11)、およびTP(5)受容体が存在することが知られている腎臓での成績と比較した。

実験方法

培養ラットアストロサイトの調製は第一章第一節の方法に従った。オリゴデ

ンドロサイトおよびミクログリアの調製は、Sawadaらの方法 (76) に従って行った。髄膜由来繊維芽細胞はPearceらの方法 (77) に従って調製した。本検討においては、他の細胞のコンタミネーションを極力防ぐように各種細胞を培養したために細胞量 (従ってそのRNA量) が少なく、ノーザン解析が不可能であった。そこで、比較的少量のRNAを用いてその量的解析ができるRT-PCR法によって各プロスタノイド受容体mRNAの解析を行った。

RNAの調製はChomczynskiとSacchiの方法 (78) に従って行った。得られたRNAサンプルを鋳型とし、M-MLV reverse transcriptaseを用いてdNTPs存在下で逆転写してcDNAを得た。

各プロスタノイド受容体のプライマーは第一章の結果より、次のようにデザインした：FP受容体センスプライマー、5'-GCATCCAGAACTTGGTGCTT-3'、アンチセンスプライマー、5'-CGTCGTCTCACAGGTCAGT-3' (増幅フラグメントサイズ、318 bp) ; EP3受容体センスプライマー、5'-GCTGACCATGACAGTGTTCG-3'、アンチセンスプライマー、5'-GTGGCTGGCATAACCAGTGCG-3' (増幅フラグメントサイズ、103 bp); TP受容体センスプライマー、5'-TGCTGCAGACGCTACCTGTC-3'、アンチセンスプライマー、5'-GATTGGCACCGTCTTCAGG-3' (増幅フラグメントサイズ、245 bp) 。サイクル数および鋳型となるcDNA量は定量性のある範囲で設定し (FP受容体の場合、Fig. 11) 、³²P-dCTPの存在下で*Tth* DNA polymeraseを用いたPCR法により増幅されたフラグメント中の放射活性を測定することで評価した。すなわち、FPおよびTP受容体に関しては、PCR用反応液 (cDNA量は50 ngのRNAを鋳型にしたものに相当する量とした) をまず94°Cで1分間加熱した後、94°Cで1分間の変性、58°Cで1分間のアニーリング、72°Cで2分間の増幅反応を35サイクル行った。EP3受容体に関しては、PCR用反応液 (cDNA量は50 ngのRNAを鋳型にしたものに相当する量とした) をまず94°Cで1分間加熱した後、94°Cで1分間の変性、61°Cで2分間のアニーリング、72°Cで2分間の増幅反応を40サイクル行った。反応終了後、

反応液を1.2% (FPおよびTP受容体) あるいは2% (EP3受容体) アガロースゲル電気泳動して、増幅されたフラグメントを切り出した。なお各増幅フラグメントは DNA sequencingあるいは制限酵素マッピングにより予想される受容体のフラグメントであることを確認した (データには示さず)。

アストロサイトEP3受容体に関してはalternative splicingによる複数のアイソフォームの存在を第一章第二節において示したが (Fig. 5)、各アイソフォームを一組のプライマーセットでRT-PCR法により増幅することが、ラットEP3受容体RNAの高次構造に起因するとみられる理由により不可能であったので、各アイソフォームを区別せず、それらをまとめてEP3受容体として検討した。

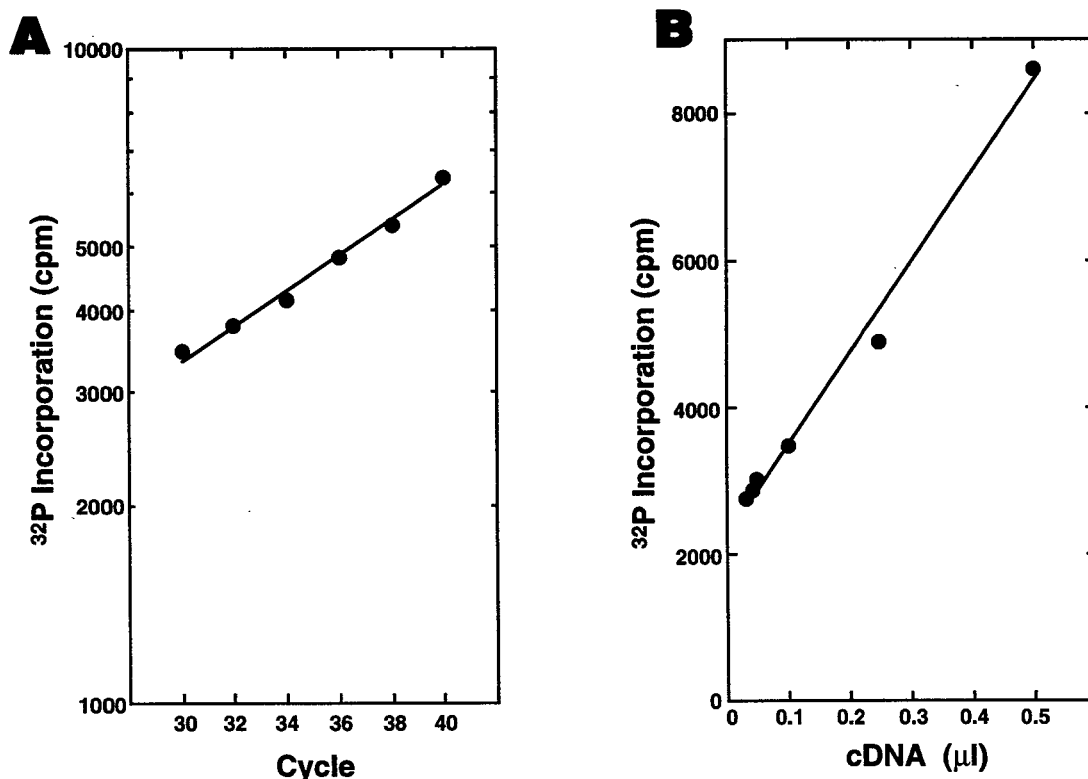


Fig. 11. Amplification of 318-bp cDNA fragment of the rat FP receptor by RT-PCR

Cultured rat astrocyte cDNA sample (A: 0.25 μl /tube, B: indicated volumes) was used for RT-PCR (A: indicated number of cycles, B: 35 cycles) to obtain a 318-bp fragment of FP receptor.

実験結果

EP3受容体mRNAはC6グリオーマ細胞以外のサンプルでその発現が認められた (Fig. 12)。発現量は、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、およびミクログリアで腎臓の約40%であった。また特にPC12細胞では腎臓と同程度のEP3受容体mRNAの発現が認められた。

FP受容体mRNAの発現は、グリア細胞ではアストロサイトおよびオリゴデンドロサイトでのみ認められ、ミクログリアにはFP受容体mRNAは発現していなかった。繊維芽細胞、腎臓においてはアストロサイトおよびオリゴデンドロサイトの約60-70%の発現が認められた。全脳においてもわずかではあるもののFP受容体mRNAの発現が確認された。なお、FP受容体は黄体細胞に豊富に存在し (79-81)、PGF2 α は黄体縮体に関与するオータコイドとして知られている (82,83)。そこでFP受容体に関しては、妊娠14日めのラット卵巣からRNAを調製して同様の検討を行ったところ、Fig. 12に示すようにラットアストロサイトの約250%のmRNA発現が確認された。

TP受容体mRNAは調べた3種類のプロスタノイド受容体mRNAのなかで最も普遍的に存在しており、その発現量も培養細胞と腎臓では同程度であった (Fig. 12)。

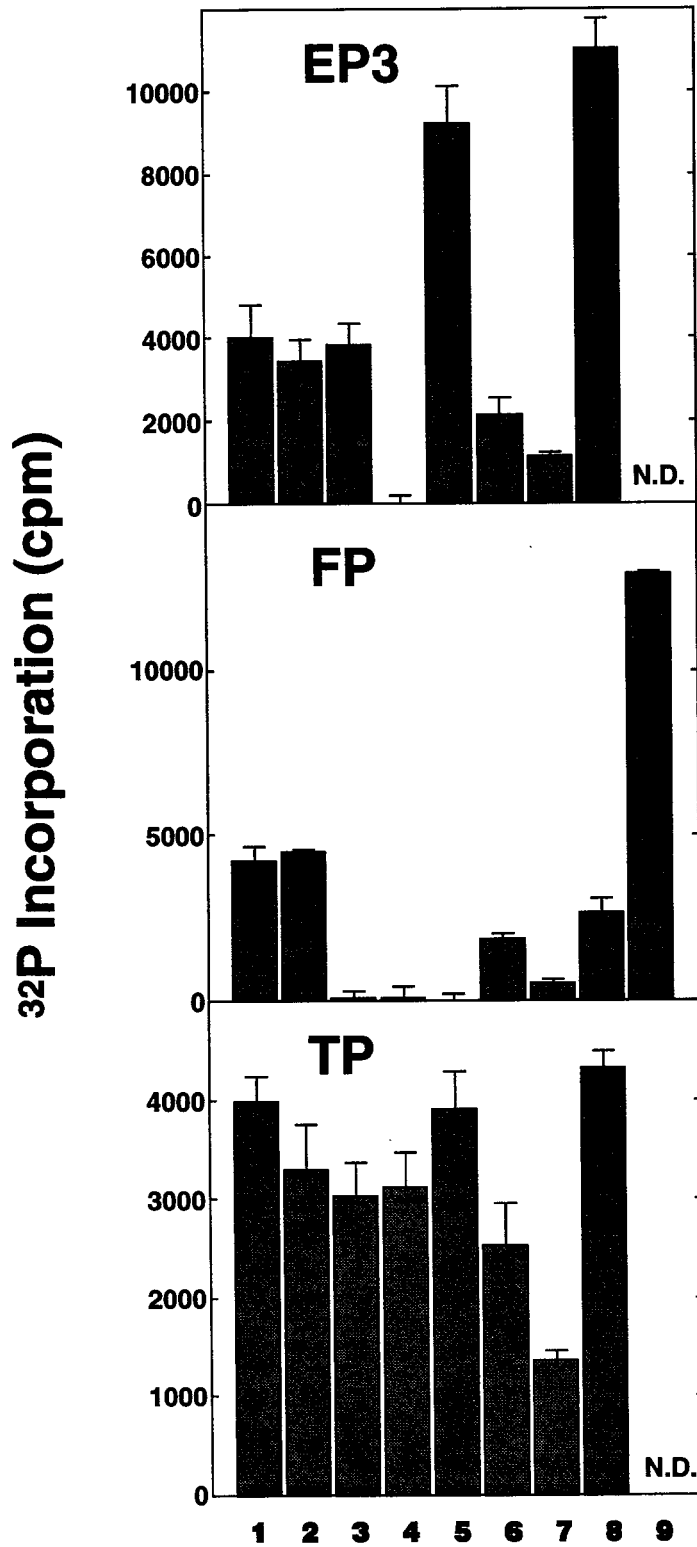


Fig. 12. Expression levels of messenger RNAs for rat prostanoid receptors RT-PCR analysis was performed using cDNA samples of cultured astrocytes (1), oligodendrocytes (2), microglia (3), C6 glioma (4), pheochromocytoma PC12 (5), meningeal fibroblasts (6), whole brain (7), kidney (8), and pregnant ovary (9). Values are means \pm S.E.M. of three to four experiments. N.D., not determined.

第二節 アストロサイトの形態分化に伴うプロスタノイド受容体mRNA量の変化

アストロサイト（タイプ1）は細胞内cyclic AMPの濃度上昇（84,85）やホルボールエステル処置（86）により扁平な石垣状の形態からグリア突起を持った形態へと分化する。これはアストロサイトの細胞骨格系蛋白質が再構成することによって生じると考えられている（87-89）。この形態分化に伴って、炭酸脱水酵素や($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase活性の上昇（90）、神経伝達物質受容体数の増加（91,92）、グルタミン酸代謝活性変化（93）、神経細胞-グリア細胞相互作用の変化（94）など、アストロサイトにおける重要な機能の変化が生じることが知られている。そこで本節では、アストロサイトの形態分化に伴う各プロスタノイド受容体mRNA量の変化について検討を行った。

実験方法

培養ラットアストロサイトの調製は第一章第一節の方法に従った。第二次培養後コンフルエントになった細胞に対し、cyclic AMPの細胞膜透過性アナログであるdibutyryl cyclic AMP (db-cAMP) 1 mMで3日間、あるいはホルボールエステルの一つである12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) 100 nMで24時間処置して、細胞を形態分化させた。その後RNAを調製し（78）、第二章第一節に示すRT-PCR法で各プロスタノイド受容体mRNA量を測定した。なおTPA処置細胞に対するコントロールとして、0.1%ジメチルスルホキシドで同様の期間処置した細胞のRNAを調製し、実験に用いた。また、TPA処置することでアストロサイトにおいてそのmRNA量が増加することが知られているTIS11（95,96）を、TPA処置実験におけるポジティブコントロールとして定量した。ラットTIS11のPCR用プライマーは次の通りとした：センスプライマー、5'-CTACCCCAGCC-

TGTTGTCCCTCCTG-3'、アンチセンスプライマー、5'-GATGCGATTGAAGAT-GGGAAGACGC-3' (増幅フラグメントサイズ、236 bp) (96)。

実験結果

培養アストロサイト (タイプ1) をdb-cAMPで処置した場合、FP受容体mRNA量のみコントロールと比較して有意な増加 (約500%) を示した (Fig. 13A)。これに対して、EP3受容体およびTP受容体mRNA量はdb-cAMP処置により有意な変化を示さなかった。

また、培養アストロサイトTPAで処置した場合、FP受容体mRNA量のみコントロールと比較して有意な増加 (約200%) を示した (Fig. 13B)。これに対して、EP3受容体およびTP受容体mRNA量はTPA処置により有意な変化を示さなかった。なお、TIS11 mRNAもFP受容体mRNAと同様、TPA処置による有意な増加を示した (Fig. 13B)。

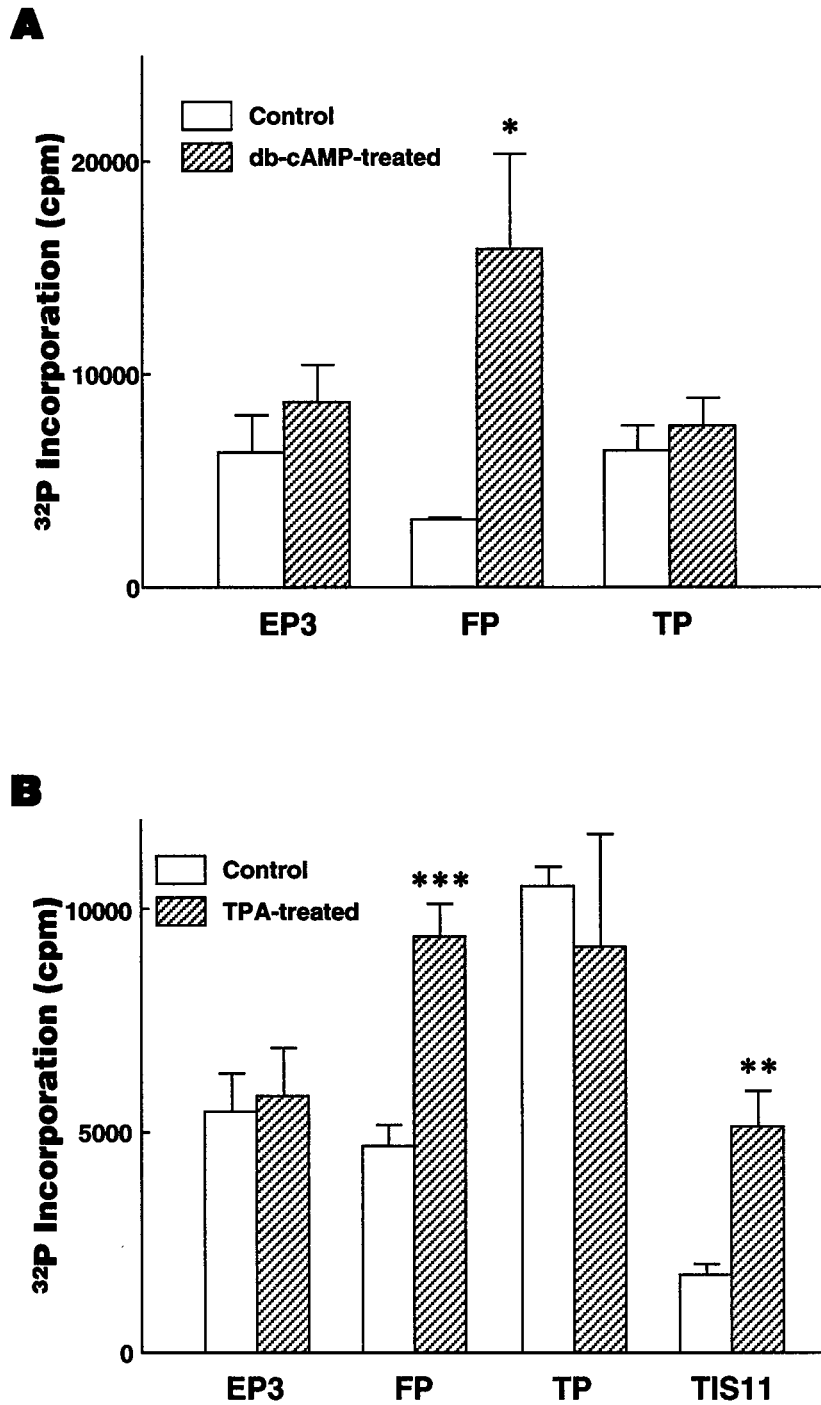


Fig. 13. Changes in expression levels of messenger RNAs for rat prostanoid receptors in cultured astrocytes by differentiating agents

Astrocytes were treated with dibutyryl cyclic AMP (db-cAMP, A) or 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA, B) and the RNAs were prepared to analysis by RT-PCR. Values are means \pm S.E.M. of three experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, compared with control. TIS, TPA-induced sequence.

第三節 生後脳の発達に伴うプロスタノイド受容体mRNA量の変化

中枢神経系におけるプロスタノイド合成酵素活性は、個体の発生に伴って増加し、その後プラトーに達することが報告されている (35)。しかしながら、実際の脳内におけるプロスタノイドの含量変化は、プロスタノイド代謝経路の個体発生に伴う変化を考慮にいれなければならず、従って合成酵素活性の変化と一致するか否かは不明である。またプロスタノイド受容体数の個体発生に伴う変化については、特にPGD2結合部位 (35)、およびPGE2結合部位 (35,97) において検討されているが、リガンド結合実験における全結合と非特異的結合の差が小さく、受容体数変化を実験的に明確にすることが困難と考えられる。

第二章第一節および第二節において用いたRT-PCR法は、プロスタノイド受容体mRNAの存在を正確に示し、また、反応条件を適当に選ぶことによりmRNA量を定量することが可能である。従って本節では、ラット個体発生後の脳内プロスタノイド受容体mRNA量の変化をRT-PCR法により検討した。

実験方法

生後0、1、2、3、4、6、7、10、および21日目のWistar系ラット全脳より第二章第一節に示した方法に従ってcDNAサンプルを調製し、PCR反応を行った。なお本検討に関しては、個体間でのRNA抽出効率の違いによるデータのばらつきをなくすために、内部標準物質として β -アクチンmRNAを選び、同時にPCR反応を行った。データは、各個体における β -アクチンのmRNA量に対する各プロスタノイド受容体mRNA量の比で示し、生後0日を100とした。またラット β -アクチンのPCR用プライマーは次の通りとした:センスプライマー、5'-GATGGTGGGTATGGGTCAGAAGGA-3'、アンチセンスプライマー、5'-GCTCATTGCCGATAGTGATGACCT-3' (増幅フラグメント630 bp) (98)。

実験結果

Fig. 14に各プロスタノイド受容体mRNA量のラット脳における生後変化を示す。EP3およびTP受容体は生後7日でそのmRNA量が最大となった後、プラトーとなり（EP3受容体）、あるいは徐々に減少傾向を示した（TP受容体）。FP受容体は生後6日でそのmRNA量が最大となった後、減少傾向を示した。

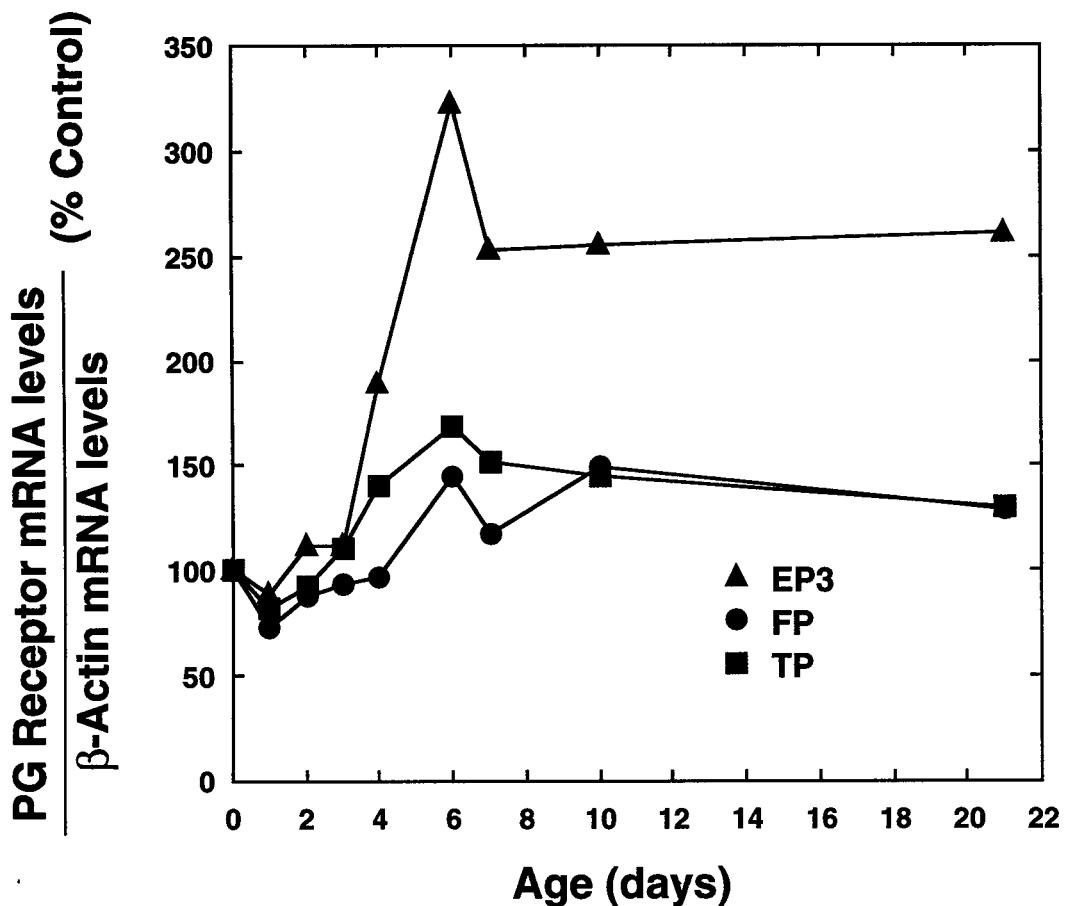


Fig. 14. Developmental changes in messenger RNAs of prostanoid receptors in rat brain

RNA samples were obtained from rats of indicated days after birth. Each point indicates a mean value of four experiments. The S.E.M. value was less than 20% of the mean.

第四節 考察と小括

考察

本章第一節において、3種類のプロスタノイド受容体mRNAはグリア細胞種によりその発現パターンが異なっていることを明らかにした (Fig. 12)。また本章第二節において、cyclic AMPアナログやホルボールエステル処置に対して特定のプロスタノイド受容体mRNA量が反応したことから、各々のプロスタノイドが各グリア細胞に対して特異的な作用を有することが推察された。アストロサイトの形態分化に伴って α_1 -アドレナリン受容体活性が上昇することが報告されている (91,92)。この活性上昇は蛋白質合成阻害薬シクロヘキシミドやmRNA翻訳阻害薬アクチノマイシンDの共存により抑制されることから、アストロサイトの形態分化に伴って α_1 -アドレナリン受容体mRNAの翻訳活性上昇が起こると推察されているが (92)、その直接的な証明はない。この点に関し、本章第二節の成績 (Fig. 13) はFP受容体が形態分化に伴いそのmRNA量の変化が上昇する受容体であることを、アストロサイト受容体としては初めて明確に示したものである。プロスタノイド受容体のうちヒトTP受容体遺伝子のみが解析されているが (99)、そのプロモーター領域にAP-2やTREコンセンサス配列が確認されており、ホルボールエステルによるTP受容体発現誘導が示唆されている。本章第二節において、ラットアストロサイトTP受容体mRNA量はTPAによる細胞分化の影響を受けないことを示したが (Fig. 13B)、形態分化を伴わない速やかな薬物処置によるプロスタノイド受容体mRNA量の変化については依然不明であり、また各プロスタノイド受容体mRNAの安定性についても不明であるため、遺伝子解析の成績から導かれた推察 (99) と本章第二節の結果との相違点は動物種による本質的なプロスタノイド受容体mRNA発現制御機構の相違か、あるいは実験的条件の相違によるものか検討の余地が残されている。

本章第二節において、ラット全脳RNAサンプルに各プロスタノイド受容体 mRNAが発現していることをRT-PCR法により明確に示した。いずれの受容体 mRNA の全脳RNAサンプルにおける発現量も、培養アストロサイトにおけるそれと比較して40%未満であった (Fig. 12)。マウス全脳RNAサンプルを用いたノーザン解析では、EP3およびTP受容体mRNAはその存在が認められているが (5,6)、FP受容体mRNAは認められていない (11)。従って中枢神経系におけるプロスタノイド受容体mRNAの発現解析にはRT-PCR法が有効であることが示された。そのRT-PCR法により生後脳の発達に伴う各プロスタノイド受容体 mRNA量の変化を検討したところ、いずれの受容体mRNAも生後6日あるいは7日でその量が最大となることが明らかとなった (Fig. 14)。ラット脳において、PGE2結合能は生後7日で最大となることが報告されており (35)、これはFig. 14の成績から予測されるプロスタノイド受容体蛋白質量の変化と一致している。Fig. 14の成績から、FPおよびTPプロスタノイド受容体蛋白質量に関しても、現在のところリガンド結合活性の生後変化に関する報告はないが、EP3受容体と同様の生後変化を示すものと推察される。

小括

- 1.ラット培養グリア細胞 (アストロサイト、オリゴデンドロサイト、およびミクログリア) における3種類のプロスタノイド受容体 (FP、EP3、およびTP) のmRNA発現分布を、RT-PCR法により明らかにした。
- 2.培養アストロサイトの形態分化に伴って、3種類のプロスタノイド受容体のうちFP受容体mRNA量のみが増加することを明らかにした。
- 3.ラット脳の発達に伴って、3種類のプロスタノイド受容体mRNA量ははず

れも生後6日あるいは7日で最大となることが明らかとなった。

第三章 アストロサイトFP受容体の機能調節

第一節 アストロサイトFP受容体およびリコンビナントFP受容体の特性比較

プロスタノイド受容体の機能調節に関しては、EP受容体を中心に検討が行われており、リガンド結合活性に対する糖鎖の関与 (100) やリガンド結合後の情報伝達機構の調節 (脱感作) が明らかにされている (2,101-103)。しかしながらFP受容体の機能調節に関しては、それを評価する実験系が少なかったために明らかにされていない。培養アストロサイトは、受容体情報伝達機構の解析系として純度の高いものが簡便に調製できるうえに (51)、FP受容体mRNAが腎臓サンプルの160%程度発現しており (Fig. 12)、FP受容体の機能調節を検討するのに有用であると考えられる。そこでまず、FP受容体反応を薬理学的に検討するためアストロサイトFP受容体およびリコンビナントFP受容体のリガンド結合活性を比較検討した。

実験方法

第一章第一節においてクローニングしたFP受容体cDNA (pFP17およびpFP24) はいずれも翻訳領域を部分的にコードするものであったので、両クローンをligationして翻訳領域をすべて含むcDNA (pFP24E17、Fig. 1における-133から1,222番目をコードするもの) を発現ベクターpEF-BOS内でサブクローニングした。このcDNAをDEAE-dextran法 (104) によりCOS-7細胞へ導入した。導入後2日間細胞を培養して膜標品の調製に用いた。なお発現ベクターpEF-BOSのみを導入したCOS-7細胞の膜標品にはPGF₂α結合活性のないことを確認した (データには示さず)。

培養ラットアストロサイトあるいはpFP24E17導入後COS-7細胞の膜標品は次

のように調製した。まず、15-cm dishで10枚分の細胞をphosphate-buffered salineで洗浄後ホモジナイズ用buffer [組成 (mM) : Tris-HCl 20、MgCl₂ 10、EDTA 1、sucrose 250、phenylmethanesulfonyl fluoride 0.2、indomethacin 0.02、dithiothreitol 1、pH 7.5]で回収した。このサンプルに対してfreezing and thawingを二度行い、さらにテフロン-ガラスホモジナイザーにてホモジナイズ (10 up-and-down) し、490 gで5分間遠心した。上清を回収して、沈殿にホモジナイズ用bufferを添加しホモジナイズした。その490 g遠心上清と先に回収した上清とを合わせて200,000 gで遠心し、得られた沈殿を膜標品とした。

リガンド結合実験はSugimotoらの方法 (7) に従って行った。すなわち膜標品を反应用buffer [組成 (mM) : MES 20、MgCl₂ 10、EDTA 1、pH 6.0]で希釈した後、300 μ lの反応系 (スキッチャード解析の場合必要に応じて変化させた各濃度の³H-PGF2 α 、阻害曲線の場合2.5 nMの³H-PGF2 α を含む) に30 μ g前後の膜標品を添加し、さらに必要に応じて各濃度のアイソトープ非標識のプロスタノイドを添加して30°Cで1時間インキュベーションした。反応停止は、氷冷した反應用bufferを添加してGF/Cフィルターで吸引ろ過することで行った。その後フィルターの放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。

実験結果

pFP24E17導入後COS-7細胞の膜標品における³H-PGF2 α 結合の各種プロスタノイドによる阻害曲線をFig. 15に示す。³H-PGF2 α 結合はPGF2 α 、PGD2、PGE2、PGI2の順で抑制された。

培養アストロサイトの膜標品を用いた場合、スキッチャード解析により、特異的な³H-PGF2 α 結合部位が認められた (Fig. 16A)。また、第二章第二節で示したようにアストロサイトをdb-cAMPで処置して形態分化を起こした場合、³H-PGF2 α 結合部位数の増加が認められた (Fig. 16A)。さらに培養アストロサ

イトの膜標品における ^3H -PGF 2α 結合は、PGF 2α 、PGD 2 、PGE 2 の順で抑制された (Fig. 16B)。

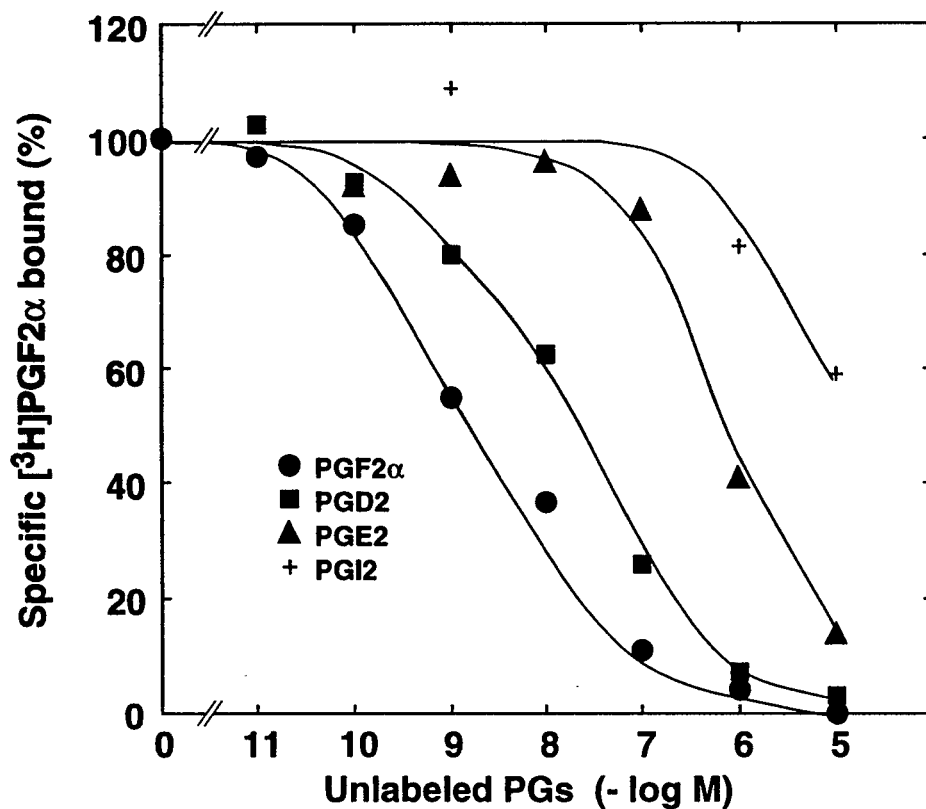


Fig. 15. Displacement by unlabeled PGs of the specific binding of [^3H]PGF 2α in membranes from COS-7 cells transfected with the rat FP receptor cDNA

The specific binding of [^3H]PGF 2α in the membranes was 85% of total binding. Representative curves of three experiments performed in triplicate are shown.

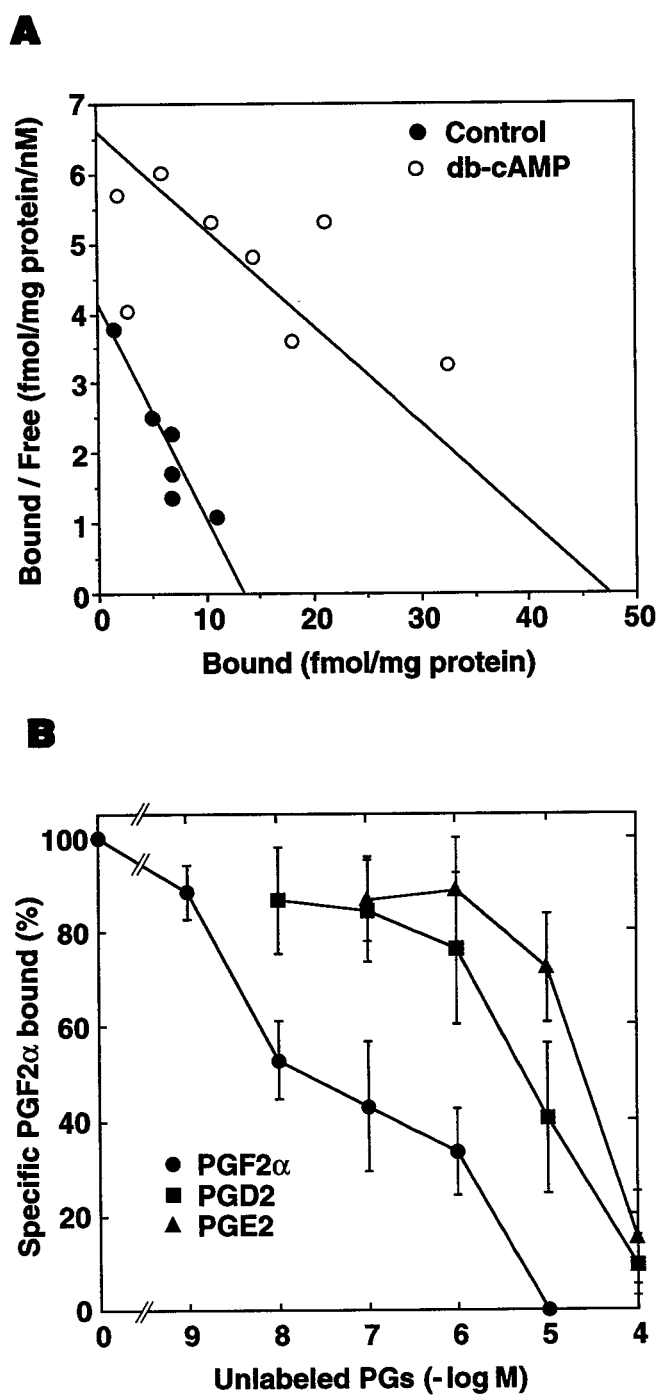


Fig. 16. Characterization of FP receptor in membranes from cultured astrocytes
 (A) Scatchard analysis of [^3H]PGF 2α binding sites in membranes from astrocytes treated with or without db-cAMP. A representative result performed in triplicate was shown.
 (B) Displacement curves of specific PGF 2α binding by unlabeled PGs. Values are means \pm S.E.M. of three independent experiments.

第二節 アストロサイトFP受容体のアンタゴニストとしてのフロレチン

FP受容体に関しては、たとえばTP受容体におけるS-145 (105) のような安定でかつ選択的なアンタゴニストは開発されておらず (1,106) 、その受容体機能の研究は他のプロスタノイド受容体ほど進められていない。そのなかで、グルコーストランスポーター阻害薬であるフロレチン (107) およびその誘導体は平滑筋においてPGF2 α を含むプロスタノイドの反応を抑制することが報告されている (108-110) 。本章第一節において培養アストロサイトはFP受容体機能を検討するのに有用な実験系であることを示した。そこでPGF2 α によるイノシトール代謝回転亢進に対するフロレチンの作用について、培養アストロサイトをを用い検討した。

実験方法

PI代謝活性の測定は、第一章第四節の方法に従って行った。

細胞内Ca²⁺濃度の測定は、Grynkiewiczらの方法 (111) に従って行った。すなわち、培養アストロサイトに蛍光指示薬fura-2/AM 5 μ Mを添加し37°Cで0.5-1時間インキュベーションした。その後細胞を洗浄し、二波長顕微分光法 (励起波長340および380 nm) で細胞内Ca²⁺濃度を測定した。

実験結果

Fig. 17に示すようにフロレチンはPGF2 α によるPI代謝回転亢進を濃度依存的に抑制した。またその抑制効果はインキュベーション開始10分後から有意なものであった (Fig. 18) 。さらに、培養アストロサイトにおけるPGF2 α によるPI代謝回転亢進の用量反応曲線を、フロレチンは濃度依存的に右へシフトさせた

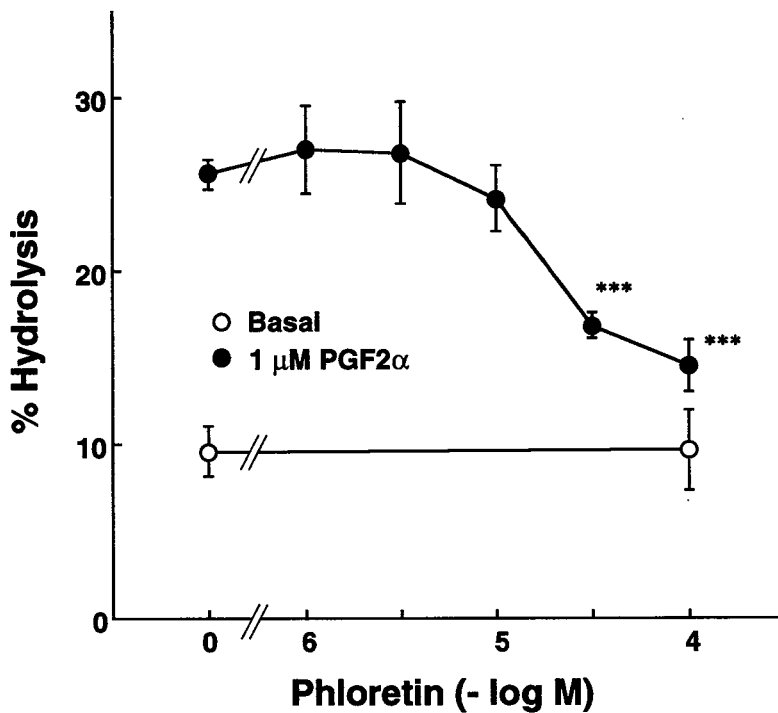


Fig. 17. Inhibitory effect of phloretin on PGF2 α -stimulated PI hydrolysis in cultured rat astrocytes

The cells were exposed to the agents for 15 min. Values are means \pm S.E.M. of three experiments. ***P<0.001, compared with 1 μ M PGF2 α (without phloretin).

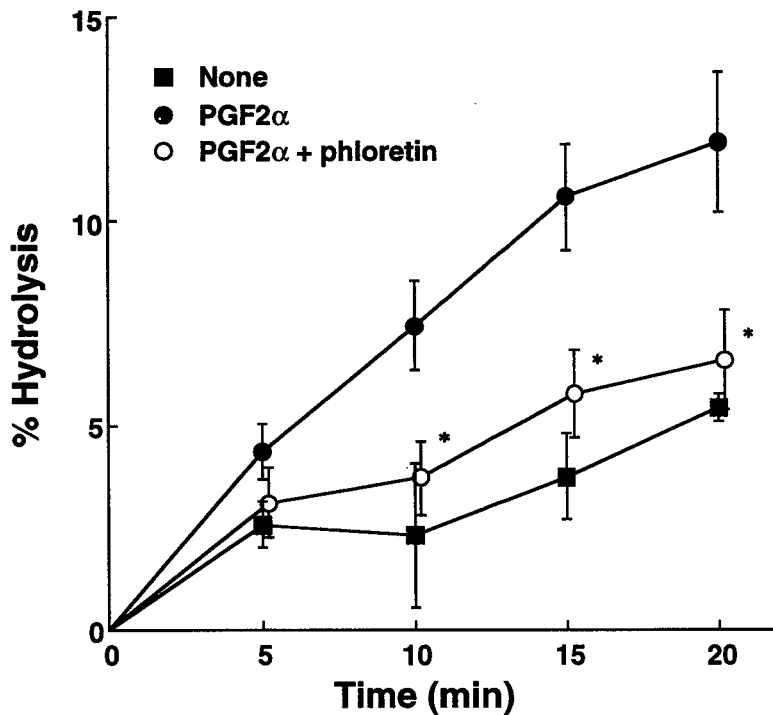


Fig. 18. Time course of inhibitory effect of phloretin on PGF2 α -stimulated PI hydrolysis in cultured rat astrocytes

The cells were exposed to 1 μ M PGF2 α with or without 100 μ M phloretin for the indicated periods. Values are means \pm S.E.M. of four experiments. *P<0.05, compared with PGF2 α alone.

(Fig. 19)。

PGF2 α 1 μ Mは単一の培養アストロサイト細胞内Ca²⁺濃度を上昇させた (Fig. 20)。そこへフロレチン100 μ Mを同時添加すると細胞内Ca²⁺濃度変化は抑制され、さらにPGF2 α 1 μ Mのみを添加することで細胞内Ca²⁺濃度が上昇した (Fig. 20)。

培養アストロサイトにはプロスタノイド受容体以外にもさまざまな神経伝達物質受容体が存在している (72-75)。そこでフロレチン作用のリガンド選択性について検討した (Table I)。フロレチン100 μ Mは、PGF2 α (1 μ M)、PGD2 (10 μ M)、およびPGE2 (10 μ M) によるPI代謝回転亢進を有意に抑制した。一方、ノルエピネフリン (10 μ M)、カルバコール (100 μ M)、グルタミン酸 (500 μ M)、エンドセリン-1 (50 nM)、およびATP (100 μ M) によるPI代謝回転亢進に対してはフロレチンは何ら影響しなかった。フロレチン100 μ Mは、培養アストロサイトのグルコース取り込み活性を $95.9 \pm 0.4\%$ 抑制したが (³H-O-methyl-D-glucose取り込み測定による成績)、PGF2 α (1 μ M) 刺激時に LiKRB (第一章第四節で示した反应用buffer) からグルコースを除去してもそのPI代謝回転亢進は何ら影響を受けなかった (正常LiKRBの場合Fig. 17、およびグルコース除去した場合 $25.5 \pm 1.4\%$ Hydrolysis)。

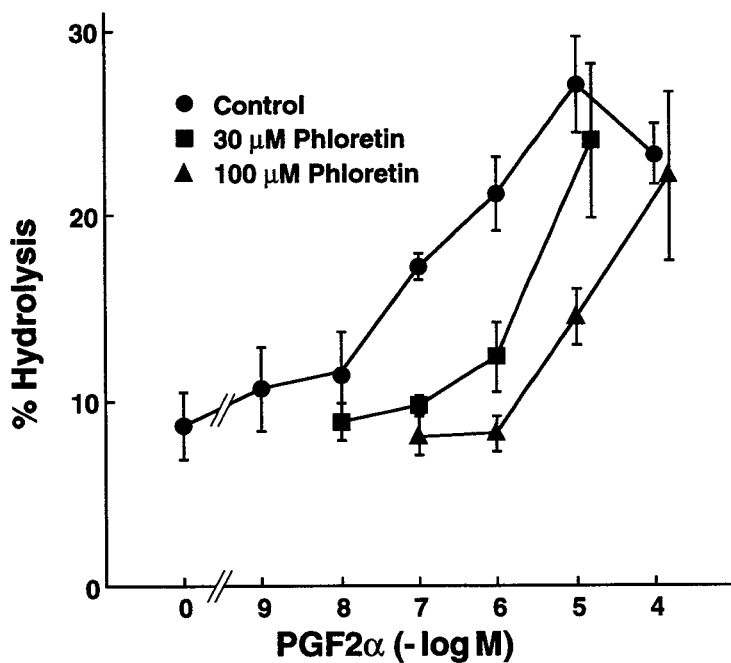


Fig. 19. Dose-response curves for PGF 2α -stimulated PI hydrolysis in the presence or absence of phloretin
The cells were exposed to the agents at the indicated concentrations for 15 min. Values are means \pm S.E.M. of three experiments.

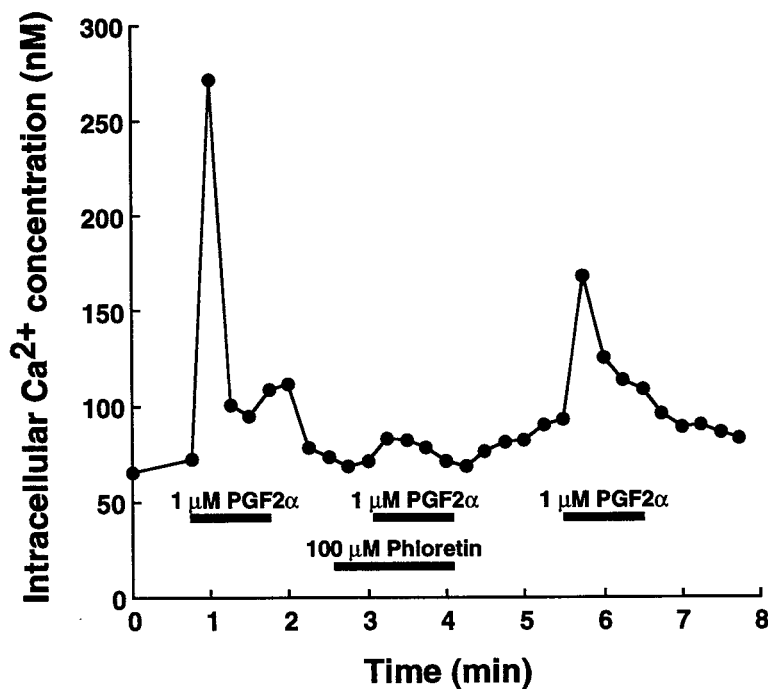


Fig. 20. Single-cell intracellular Ca $^{2+}$ response stimulated by PGF 2α in cultured rat astrocytes

The cells were perfused continuously with Krebs-Ringer bicarbonate buffer (37°C) and each agent was applied throughout the period indicated by the horizontal bar.

Table I. Effect of phloretin on ligand-stimulated PI hydrolysis in cultured rat astrocytes

Ligand	% Hydrolysis	
	Control	Phloretin (100 μM)
None	6.6 \pm 1.8	6.7 \pm 1.7
PGF2α (1 μM)	26.7 \pm 3.9	12.0 \pm 0.8 **
PGD2 (10 μM)	16.3 \pm 1.4	10.4 \pm 1.1 *
PGE2 (10 μM)	8.8 \pm 0.8	5.0 \pm 0.4 *
Norepinephrine (10 μM)	36.2 \pm 1.8	33.6 \pm 2.9
Carbachol (100 μM)	11.9 \pm 2.5	16.4 \pm 0.5
L-Glutamate (500 μM)	25.3 \pm 1.6	22.4 \pm 1.0
Endothelin-1 (50 nM)	32.3 \pm 2.7	29.0 \pm 3.1
ATP (100 μM)	16.3 \pm 4.2	16.2 \pm 2.0

The cells were exposed to ligands at the indicated concentrations for 15 min in the presence or absence of 100 μ M phloretin. Values are means \pm S.E.M. of three to five experiments. *P<0.05, **P<0.01, compared with control.

第三節 FP受容体機能発現に対する糖鎖付加阻害薬の作用

第一章第一節において明らかにしたラットFP受容体のアミノ酸配列 (Fig. 3) と他の動物種よりクローニングされたFP受容体のアミノ酸配列 (11,16,52) との比較 (Fig. 4) より、いずれの動物種においてもN末端に2つの推定糖鎖付加部位 (4番目および19番目のAsn) が保存されていることが分かる。細胞膜蛋白質は一般に、リボソームでの蛋白質合成中に糖鎖付加コンセンサス配列 (Asn-X-Ser/Thr) にオリゴ糖が付加されることで正常に発現すると考えられている (112)。従ってFP受容体の場合、特にN末端の推定糖鎖付加部位に糖鎖が付加することがその発現に重要であると推察される。そこで次に、FP受容体機能発現と糖鎖付加の関係について検討した。

実験方法

培養アストロサイトにおけるPI代謝活性の測定は、第一章第四節の方法に従って行った。

脂質分離は、ShaikhとPalmerの方法 (113) に従って行った。すなわち、まず第一章第四節に示した方法で有機層を回収して窒素ガスで蒸発乾固した後、25 μ lのクロロホルム-メタノール-水 (20:9:1) で溶解した。そのサンプルを、0.1% シュウ酸カリウムで展開、活性化済みのシリカゲルプレート (Merck社製 aluminium sheets silica gel 60 Art.5553) 上にマイクロシリンジを用いてスポットした。それを展開溶媒 (クロロホルム-アセトン-メタノール-酢酸-水、40:15:13:12:8) 中で分離し、ヨウ素蒸気中で発色させた。ホスファチジルイノシトール二リン酸 (PIP₂、Rf値=0.36) に対応する部分のゲルをかき取りクロロホルム-メタノール (1:2) 中で抽出した後、カクテルと混和してその放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。

細胞障害の程度は3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) を用いたMosmannの方法 (114) および乳酸脱水素酵素 (LDH) の細胞外遊離量の測定 (115) を指標として検討した。なお、LDH遊離測定においては0.1% Triton X-100で細胞を処置した際のLDH量を100%遊離とした。

実験結果

N-結合型糖鎖付加過程のうち、リボソームでの蛋白質合成中に糖鎖付加コンセンサス配列 (Asn-X-Ser/Thr) にオリゴ糖を付加する過程を選択的に阻害する薬物ツニカマイシン (112,116) は、濃度依存的に培養アストロサイトにおけるPGF2 α によるPI代謝回転を抑制した (Fig. 21)。その最大抑制は100 ng/mlのツニカマイシンにおいて認められた。またツニカマイシンによる抑制作用は時間依存的であり、12時間の前処置によってその後のPGF2 α によるPI代謝回転亢進を有意に抑制した (Fig. 22)。ツニカマイシン24時間処置においてはPI代謝回転のbasal活性も有意に低下した (Fig. 22)。さらにこの反応は可逆的であり、ツニカマイシン12時間前処置後、細胞を洗浄してさらに12時間インキュベーションした場合、その細胞におけるPGF2 α によるPI代謝回転亢進はもとのレベルまで回復した (Fig. 23)。

ツニカマイシン処置細胞におけるPIP₂量 (PI代謝回転の基質) を調べたところ、Table IIに示すように各処置時間において有意な変化は認められなかった。また細胞障害の程度を検討したところ、Table IIIに示すように、ツニカマイシン12時間処置では細胞障害は認められなかった。ツニカマイシンを24時間処置した場合、統計的に有意ではないものの無処置群と比較してLDHの141%の遊離と、20%の細胞増殖抑制が観察された (Table III)。

オリゴ糖が蛋白質に付加した後の糖鎖修飾過程を選択的に阻害する薬物スエンソニン、プロモコンジュリトール、および1-デオキシマンノジリマイシン

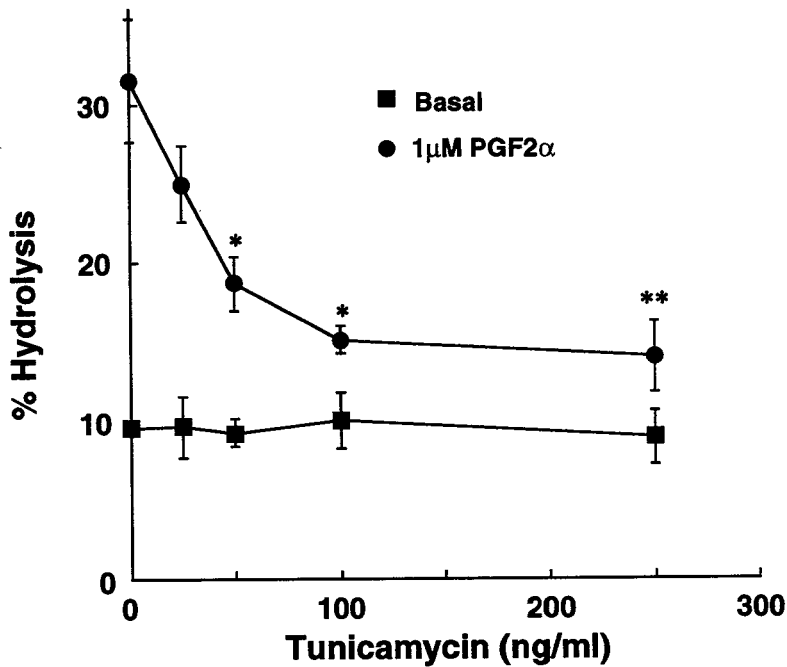


Fig. 21. Dose-response curve for inhibitory effect of tunicamycin on PGF2 α -stimulated PI hydrolysis in cultured rat astrocytes
 The cells were treated with tunicamycin at indicated concentrations for 12 hours and then exposed to 1 μ M PGF2 α for 15 min. Values are means \pm S.E.M. of three experiments. *P<0.05, **P<0.01, compared with 0 ng/ml tunicamycin.

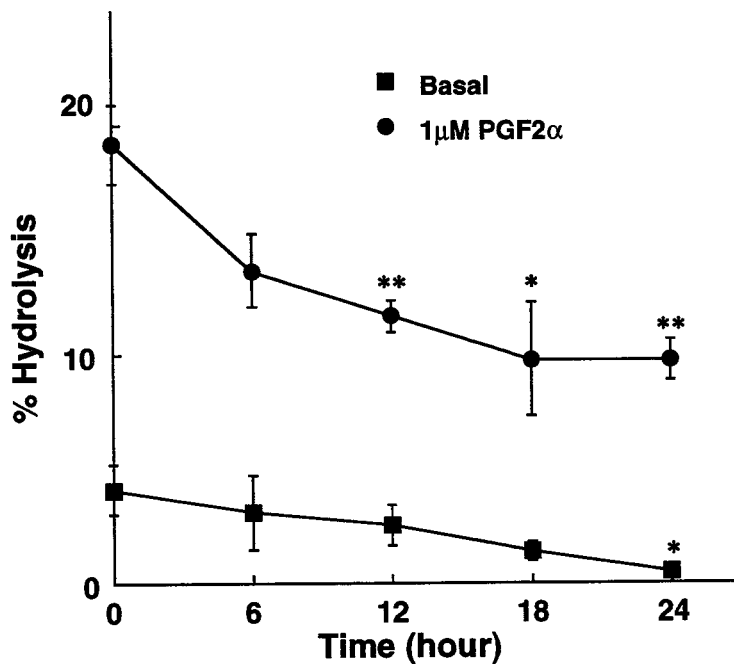


Fig. 22. Time course of inhibitory effect of tunicamycin on PGF2 α -stimulated PI hydrolysis in cultured rat astrocytes
 The cells were treated with 100 ng/ml tunicamycin for indicated periods and then exposed to 1 μ M PGF2 α for 15 min. Values are means \pm S.E.M. of three to five experiments. *P<0.05, **P<0.01, compared with time zero.

Table II. Effect of tunicamycin on the incorporation of *myo*-[³H]inositol into phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

Treatment	Pretreatment time (hour)			
	0	12	18	24
Tunicamycin (100 ng/ml)	100	90.4 ± 2.3	92.3 ± 9.2	100.0 ± 10.0

Astrocytes were incubated with 37 kBq/ml of *myo*-[³H]inositol for 24 h. Tunicamycin (100 ng/ml) was added to the culture medium during the period of cell labeling with [³H]inositol. For 24-hour treatment of tunicamycin, *myo*-[³H]inositol and tunicamycin were added to the culture medium together and the cells were incubated for 24 hours. For 12- and 18-hour treatments, tunicamycin was added to the culture medium after incubation of the cells with *myo*-[³H]inositol for 12 and 6 hours, respectively. Zero-hour treatment of tunicamycin means cultured cells were incubated with *myo*-[³H]inositol alone. After 24 hours, the cells were rinsed three times with Krebs-Ringer bicarbonate buffer and treated as described for PI hydrolysis assay to obtain organic phases. The Rf value for PIP₂ was 0.36. Values are means ± S.E.M. of three to four separate experiments and expressed as % of radioactivity in control cells (tunicamycin treatment for 0 hour, 5200 ± 530 dpm/10⁵ dpm incorporated).

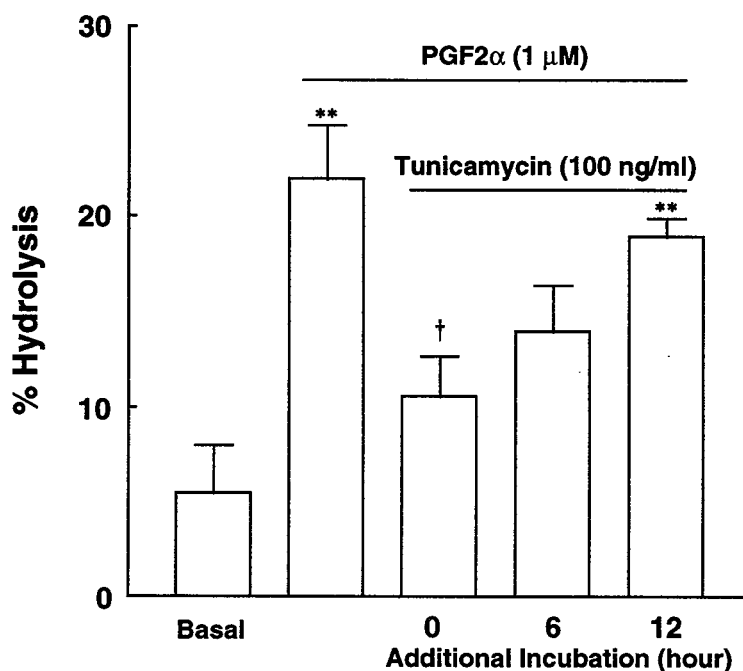


Fig. 23. Reversible effect of tunicamycin on PGF₂α-stimulated PI hydrolysis in cultured rat astrocytes

The cells were treated with 100 ng/ml tunicamycin, washed, and additionally incubated for indicated periods after removal of tunicamycin. Values are means ± S.E.M. of three to four experiments. **P<0.01, compared with basal. †P<0.05, compared with PGF₂α (1 μM).

(112) によってはFP受容体機能が抑制されなかった (Table IV) 。また高濃度でツニカマイシンと同様の作用を示すことが報告されているD-グルコサミン (117) は本実験系においてもツニカマイシンと同様の抑制作用を示した (Table IV) 。

Table III. Viability of astroglial cultures after tunicamycin treatment

	Tunicamycin pretreatment (hour)		
	0	12	24
LDH release (% of release)	7.1 ± 0.2	6.8 ± 1.4	10.0 ± 1.4
MTT assay (x 10 ⁴ cells/cm ²)	7.0 ± 0.4	6.9 ± 0.3	5.6 ± 0.5

In LDH release assay, cells were treated with or without 100 ng/ml tunicamycin for 12 hours in the absence of 10% fetal bovine serum. After 12 hours, culture media were collected and the activity of LDH was measured. In the MTT assay, primary cultures were trypsinized and the cell suspension was seeded on the culture plates at a density of 4.0 x 10⁴ cells/cm². After 24 hours, the cells were treated with or without tunicamycin (100 ng/ml for 12 hours) in the presence of 10% fetal bovine serum and then exposed to 0.5 mg/ml MTT for 4 hours. The absorbance was read using a test wavelength of 570 nm and a reference wavelength of 630 nm. Values are means ± S.E.M. from at least three experiments.

Table IV. Effects of inhibitors of the biosynthesis and processing of N-linked sugar chains on PGF₂α-stimulated PI hydrolysis in cultured rat astrocytes

Treatment	% Hydrolysis	
	Basal	PGF ₂ α (1 μM)
Control	4.9 ± 0.8	22.4 ± 2.5
Tunicamycin (100 ng/ml)	3.2 ± 1.6	12.3 ± 2.3 *
D-Glucosamine (10 mM)	3.4 ± 0.4	10.5 ± 0.9 **
Swainsonine (1 μg/ml)	6.8 ± 1.1	24.8 ± 1.6
Bromoconduritol (1 μg/ml)	6.2 ± 1.1	22.3 ± 2.2
1-Deoxymannojirimycin (1 μg/ml)	5.8 ± 0.9	20.5 ± 1.8

Cells were treated with inhibitors for 12 hours and then exposed to PGF₂α for 15 min. Values are means ± S.E.M. of three experiments. *P<0.05, **P<0.01, compared with control.

第四節 アストロサイトFP受容体の脱感作

プロスタノイド受容体の脱感作機構に関しては、cyclic AMP産生系と共役したEP受容体を中心に薬理的検討が行われている(2)。しかしながらFP受容体に関しては、その情報伝達系解析のための適切な実験系がなかったために今だ明らかにはされていない。そこで本節において、培養ラットアストロサイトをFP受容体情報伝達系解析のための実験系として用い、その脱感作機構について検討を行った。

実験方法

培養アストロサイトにおけるPI代謝活性の測定は、第一章第四節の方法に従って行った。脱感作時のPI代謝回転の測定は、*myo*-[³H]イノシトールで標識した細胞をPGF2 α で前処置した後、100 μ Mフロレチン (FP受容体アンタゴニスト、本章第二節) を含む培地で3回洗浄してPGF2 α を除去した細胞で行った。

実験結果

アストロサイトにおけるPGF2 α によるPI代謝回転亢進は、細胞を各プロスタノイド (10 μ M、Fig.9Aにより最大反応を引き起こす濃度) で4時間前処置した場合のみ有意に減弱したが、ノルエピネフリン (10 μ M) やカルバコール (100 μ M) 前処置では影響を受けなかった (Fig. 24A)。また逆に、PGF2 α (10 μ M) で4時間前処置した細胞においては、引き続き各プロスタノイドによるPI代謝回転亢進のみ有意に減弱したが、ノルエピネフリン (10 μ M) やカルバコール (100 μ M) によるPI代謝回転亢進は影響を受けなかった (Fig. 24B)。

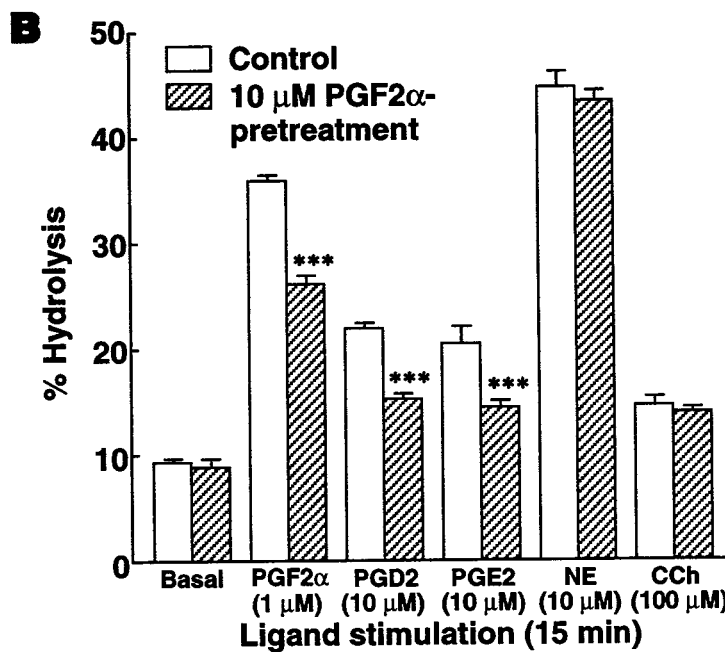
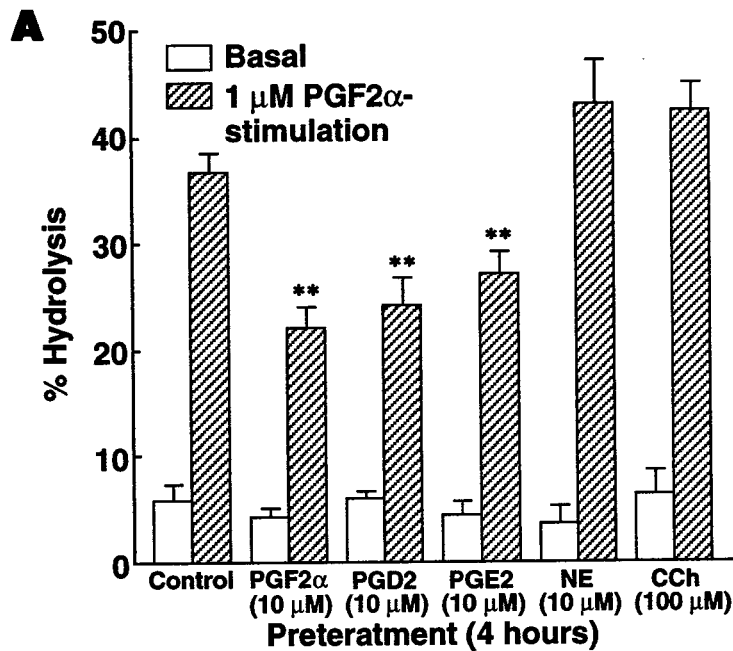


Fig. 24. Homologous desensitization of FP receptor in cultured astrocytes
 (A) Effects of pretreatment with various ligands on subsequent PGF2 α -stimulated PI hydrolysis. The cells were treated with ligands for 4 hours and then exposed to 1 μ M PGF2 α for 15 min. Values are means \pm S.E.M. of four experiments. **P<0.01, compared with control. (B) Effect of PGF2 α -pretreatment on subsequent ligand-stimulated PI hydrolysis. The cells were treated with 10 μ M PGF2 α for 4 hours and then exposed to ligands for 15 min. Values are means \pm S.E.M. of four experiments. ***P<0.001, compared with control. NE, norepinephrine; CCh, carbachol.

PGF2 α によるPI代謝回転亢進は、PGF2 α 前処置の濃度依存的 (Fig. 25) および時間依存的 (Fig. 26) に抑制された。さらにこの抑制効果はPGF2 α 前処置後一定期間細胞をPGF2 α の存在しない培地でインキュベーションすることで消失した (Fig. 27)。またPGF2 α 前処置の際フロレチン (100 μ M) を同時添加することで抑制効果は消失した (Fig. 28)。さらにアストロサイトをTPA 100 nMで24時間前処置して細胞内のプロテインキナーゼCを枯渇させた実験系においては (118)、ホスホリパーゼC活性そのものは減弱したが、FP受容体反応の脱感作は有意に認められた (Fig. 29)。

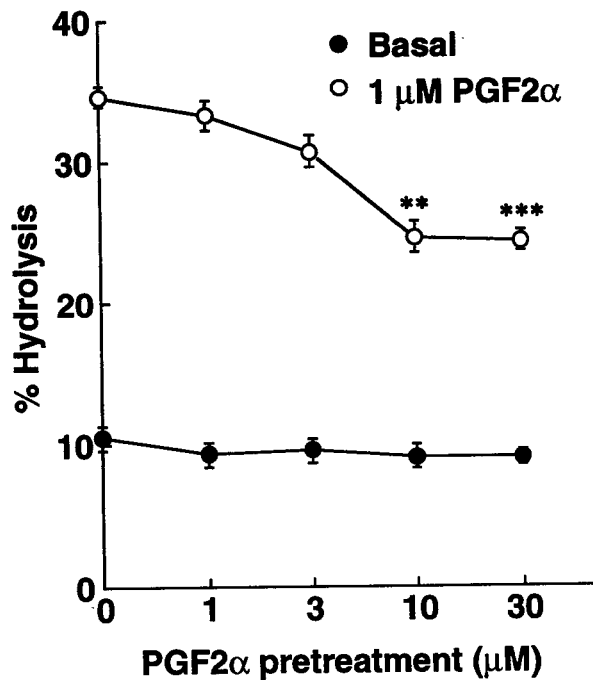


Fig. 25. Effect of pretreatment of astrocytes with various concentrations of PGF2 α on subsequent PGF2 α -stimulated PI hydrolysis

The cells were treated with indicated concentrations of PGF2 α for 4 hours and then exposed to 1 μ M PGF2 α for 15 min. Values are means \pm S.E.M. of four experiments. **P<0.01, ***P<0.001, compared with 1 μ M PGF2 α stimulation (0 μ M PGF2 α pretreatment).

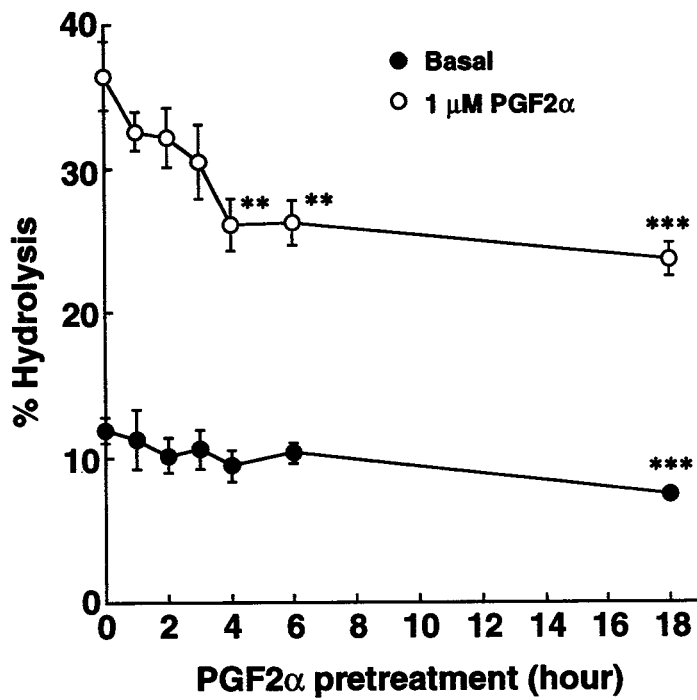


Fig. 26. Time-course of desensitization of PGF2 α -stimulated PI hydrolysis in cultured rat astrocytes

The cells were treated with 10 μ M PGF2 α for indicated periods and then exposed to 1 μ M PGF2 α for 15 min. Values are means \pm S.E.M. of four experiments. **P<0.01, ***P<0.001, compared with PGF2 α treatment (0 hour).

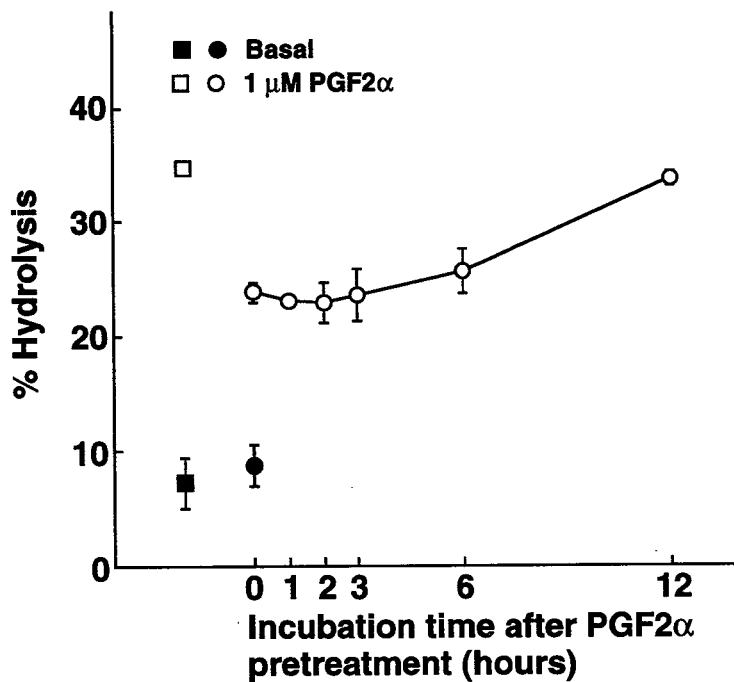


Fig. 27. Recovery of PGF2 α -stimulated PI hydrolysis after PGF2 α pretreatment in cultured rat astrocytes

The cells were treated with 10 μ M PGF2 α for 4 hours, washed, and then incubated in culture medium for indicated periods at 37°C. The cells were then exposed to 1 μ M PGF2 α for 15 min. Values are means \pm S.E.M. of four experiments.

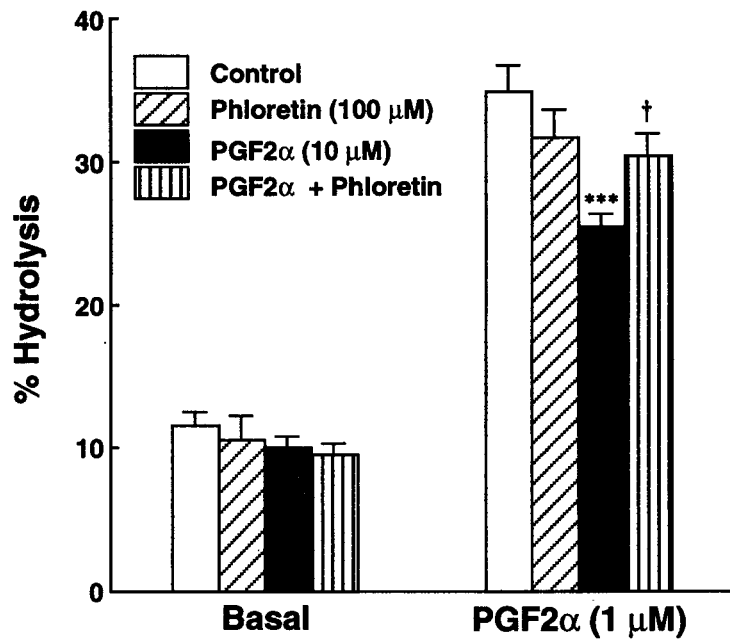


Fig. 28. Effect of phloretin on desensitization of PGF2 α -stimulated PI hydrolysis in cultured rat astrocytes

The cells were treated with PGF2 α (10 μ M), phloretin (100 μ M), or both agents for 4 hours and then exposed to 1 μ M PGF2 α for 15 min. Values are means \pm S.E.M. of three experiments. ***P<0.001, compared with basal. †P<0.05, compared with PGF2 α (10 μ M).

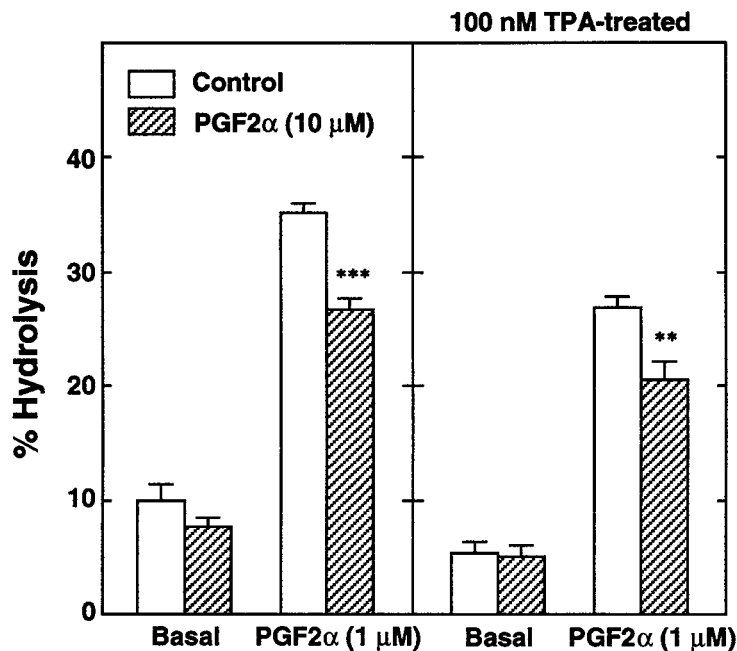


Fig. 29. Effect of TPA-pretreatment on desensitization of PGF2 α -stimulated PI hydrolysis in cultured rat astrocytes

The cells were pretreated with 100 nM TPA for 24 hours, washed, and incubated with 10 μ M PGF2 α for 4 hours. The cells were then exposed to 1 μ M PGF2 α for 15 min. Values are means \pm S.E.M. of five experiments. **P<0.01, ***P<0.001, compared with control.

第五節 考察と小括

考察

本章第一節および第二章第一節において示したように、培養アストロサイトには卵巣サンプルの約40%、腎臓サンプルの約160%のFP受容体mRNAが発現しているうえに (Fig. 12)、中枢神経系細胞標品として純度の高いものが、オリゴデンドロサイトとは異なり比較的簡便に調製でき (51)、クローニングされたFP受容体cDNAを発現させた細胞におけるリガンド結合選択性 (Fig. 15および文献11,16,52)と同様の特性を培養アストロサイト膜標品が示す (Fig.16B)ため、培養アストロサイトはFP受容体機能を検討する有用な実験系であることが示された。またdb-cAMP処置によるアストロサイトの形態分化に伴ってFP受容体mRNA量の増加が認められるが (Fig. 13A)、同時に受容体蛋白質の増加も起こっていることから (Fig. 16A)、細胞分化による情報伝達系活性の上昇が推察される。事実、db-cAMP処置によるアストロサイトの形態分化に伴ってPGF2 α (1 μ M)によるPI代謝回転亢進の増強が認められた (コントロールに対して333 \pm 25%の増強)。

この実験系を用いてまずFP受容体アンタゴニストの検索を行ったところ、グルコーストランスポーター阻害薬であるフロレチンが競合的 (Figs. 19,20)かつ選択的な (Table I) FP受容体アンタゴニストであることを明らかにした。さらにこのフロレチン作用は、グルコーストランスポーター阻害活性によるものでないことから (第三章第二節)、FP受容体機能を薬理的に検討するツールとして有用であることが示された。

また、FP受容体の発現にN-結合型糖鎖付加が重要であることをツニカマイシンを用いた検討により明らかにした (Figs. 21,22)。このツニカマイシン処置 (100 ng/ml、12時間)は、N-結合型糖鎖付加過程のうちリボソームでの蛋白質

合成中に糖鎖付加コンセンサス配列 (Asn-X-Ser/Thr) にオリゴ糖を付加する過程を選択的に阻害する量とされる範囲であり (112)、かつ細胞毒性に起因する二次的現象ではないことを示した (Fig. 23, Tables II, III)。ただしツニカマイシン処置を 100 ng/ml で 24 時間としたときの basal 活性低下 (Fig. 22) は、細胞毒性に起因する可能性がある (Table III)。オリゴ糖付加後の糖鎖修飾過程を選択的に阻害する薬物、すなわちスエンソニン (ゴルジマンノシダーゼ II 活性阻害)、ブromoコンジュリトール (グルコシダーゼ II 活性阻害)、および 1-デオキシマンノジリマイシン (ゴルジマンノシダーゼ I 活性阻害) (112) は FP 受容体機能に何ら影響しなかったことから、オリゴ糖付加が FP 受容体発現に重要であって、その後の糖鎖修飾過程は重要でないことが示唆された。以上の成績より、第一章第一節において明らかにしたラット FP 受容体に認められる推定糖鎖付加部位のうちいくつかは実際に糖鎖付加を受け、その機能発現に重要な役割を果たしていることが推察される。事実、ラット FP 受容体ポリクローナル抗体を用いたウエスタン解析により FP 受容体の分子量は 133 kD と推定されているが (119)、これは推定アミノ酸配列から導いた分子量 40,660 よりも大きいことから、糖鎖が FP 受容体蛋白質に付加している可能性を示唆している。

さらにリガンド前処置に対する FP 受容体の機能調節について検討したところ、培養アストロサイトを PGF2 α で前処置するとその濃度および時間依存的に情報伝達系の活性低下が認められた (Figs. 25, 26)。この活性低下は可逆的であり (Fig. 27)、FP 受容体に作用するリガンドに選択的に認められる (Fig. 24) ことから同種脱感作であると考えられる。反応性の低下が約 40% であり、最大反応が 4 時間のリガンド前処置によって認められることは、速やかな脱感作が認められる他の神経伝達物質受容体とは機構が異なることを示唆している。リガンド結合後速やかに認められる (1 時間以内) 脱感作は、受容体と GTP 結合蛋白質との共役が解かれるために起こると考えられているが、この機構はプロスタノイド受容体と同じロドプシン型の構造をもつアドレナリン受容体の場合、

受容体の細胞内ループ領域に存在する蛋白質リン酸化部位がプロテインキナーゼによってリン酸化されることが重要であると考えられている (120,121)。Fig. 3に示すように、アストロサイト FP受容体の推定アミノ酸配列には第1、第2細胞内ループおよびC末端に合計5つの蛋白質リン酸化部位 (62、144、337、341番目のSerおよび148番目のThr) が認められるが、リガンド結合後に速やかにその脱感作が認められないことは、それらの部位が、受容体とGTP結合蛋白質との共役が解かれておこる脱感作に関与していないことを示唆している。アストロサイトFP受容体の脱感作はプロテインキナーゼC活性化が関与せず (Fig. 29)、またFP受容体アンタゴニストとしてのフロレチン (第三章第二節) により抑制されることから (Fig. 28)、その機構はアゴニストの受容体結合後に作動するものではあるが、GTP結合蛋白質との共役が解かれるために起こるものではない可能性が示唆される。

小括

1. グルコーストランスポーター阻害薬であるフロレチンはその作用とは別に、競合的かつ選択的なFP受容体アンタゴニストとして作用することを明らかにした。
2. アストロサイトFP受容体発現に糖鎖付加が重要であることを明らかにした。
3. 過剰なりガンド作用により、アストロサイトFP受容体が脱感作を起こすことを明らかにした。

総括

本研究において明らかにした実験結果と、すでに報告されている知見とを合わせてまとめたものがFig. 30である。アストロサイトは中枢神経系におけるプロスタノイドの標的細胞である(27,28,49,54)と同時に、主要なプロスタノイド産生細胞でもある(122-124)。従って中枢神経系においてプロスタノイドは、神経細胞に対してのみならず(26,62)、アストロサイトの機能をもオートクリンあるいはパラクリンに調節している可能性が考えられる。

脳組織の損傷などの際にその含量が上昇することが知られているATPやインターロイキン1は、中枢神経系における主要なプロスタノイド産生細胞であるアストロサイトに作用して各種プロスタノイドを産生することが知られている(27,125)。これらのプロスタノイドがそれぞれに特異的な受容体を発現した各種グリア細胞に作用して、その生理作用を引き起こす可能性が考えられる。

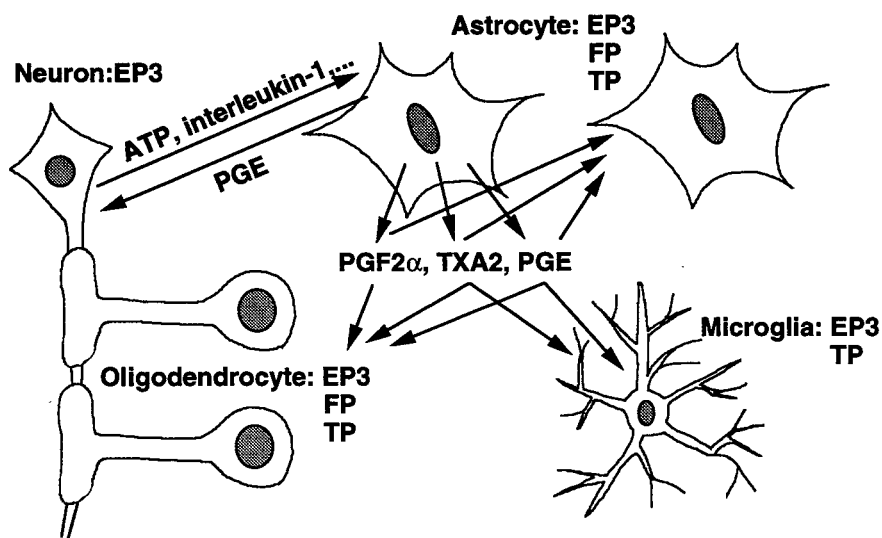


Fig. 30. Cell-cell interactions in the central nervous system via possible prostanoid signalling

本研究過程において、中枢神経系プロスタノイド受容体mRNA量は、たとえば脳障害モデルとして一過性脳虚血を負荷したラットにおいて大きな変化を示さないことを認めている（データには示さず）。従って、グリア細胞プロスタノイド受容体を介して引き起こされる生理機能がリガンド含量の変化によって生じるものと仮定すれば、アストロサイトのプロスタノイド産生を促進する内因性リガンドはATPやインターロイキン1以外にはほとんど知られていないことから（27）、プロスタノイドシグナリングを介したグリア細胞の細胞間コミュニケーションは、脳障害時の局所ホメオスタシスの維持に寄与している可能性が考えられる。その情報の受け手であるプロスタノイド受容体は、過剰なリガンド刺激に対してその活性を大きく失うことがないため、細胞間にリガンドが存在すれば恒常的に細胞内情報伝達系を活性化することが予想される。従って、プロスタノイドシグナリングは中枢神経系機能の調節に恒常的に関与していることが推察される。

結 論

1. 培養ラットアストロサイトcDNAライブラリーから3種類のプロスタノイド受容体cDNA (EP3、FP、およびTP) のクローニングを行い、それらの推定アミノ酸配列を決定した。
2. 3種類のプロスタノイド受容体mRNAの発現分布はアストロサイト、オリゴデンドロサイト、およびミクログリアでは異なっており、各プロスタノイドはグリア細胞に対してそれぞれ固有の役割を持つことが考えられた。
3. アストロサイトFP受容体にフロレチンがアンタゴニストとして作用することを見出した。またアストロサイトFP受容体の発現に糖鎖付加が関与していること、そして過剰なりガンド刺激に対して本受容体反応が脱感作を起こすことが明らかとなった。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御親切なる御指導と御鞭撻を賜りました恩師、大阪大学薬学部教授、馬場明道先生に心より厚く御礼申し上げます。

また本研究にあたり、種々御指導と御助言を頂きました大阪大学薬学部松田敏夫先生、小山 豊先生、橋本 均先生に深謝いたします。

またマウスプロスタノイドEP3受容体およびFP受容体cDNAを御供与いただき、有益なる御指導を頂きました京都大学薬学部教授市川 厚先生、根岸 学博士、杉本幸彦博士、ならびに各種培養グリア細胞の調製と同定に関し御協力と御指導を頂きました藤田保健衛生大学総合医科学研究所教授丸野内棣先生、澤田誠博士および同大学医学部錫村明生博士に感謝いたします。

また本研究を遂行するにあたり御協力を頂きました佐賀 寛修士、後藤雅将修士、相野博司修士、近藤 薫修士、平沢芳美学士、濱野崇子学士、坂田和子学士をはじめとする大阪大学薬学部薬理学教室の皆様感謝いたします。

最後に、本研究に対して御援助を頂きました日本学術振興会に深謝いたします。

引用文献

- 1) Coleman, R. A., Kennedy, I., Humphrey, P. P. A., Bunce, K. and Lumley, P. Prostanoids and their receptors, in: *Comprehensive Medicinal Chemistry* (Hansch, C., Sammes, P. G., Taylor, J. B. and Emmett, J. C., eds.) Vol. 3, pp.643-714, Pergamon Press, Oxford (1990)
- 2) Halushka, P. V., Mais, D. E., Mayeux, P. R. and Morinelli, T. A. Thromboxane, prostaglandin and leukotriene receptors *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **10**, 213-239 (1989)
- 3) Coleman, R. A., Humphrey, P. P. A., Kennedy, I. and Lumley, P. Prostanoid receptors: the development of a working classification *Trends Pharmacol. Sci.* **5**, 303-306 (1984)
- 4) Hirata, M., Hayashi, Y., Ushikubi, F., Yokota, Y., Kageyama, R., Nakanishi, S. and Narumiya, S. Cloning and expression of cDNA for a human thromboxane A₂ receptor *Nature* **349**, 617-620 (1991)
- 5) Namba, T., Sugimoto, Y., Hirata, M., Hayashi, Y., Honda, A., Watabe, A., Negishi, M., Ichikawa, A. and Narumiya, S. Mouse thromboxane A₂ receptor: cDNA cloning, expression and Northern blot analysis *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184**, 1197-1203 (1992)
- 6) Sugimoto, Y., Namba, T., Honda, A., Hayashi, Y., Negishi, M., Ichikawa, A. and Narumiya, S. Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP₃ subtype *J. Biol. Chem.* **267**, 6463-6466 (1992)
- 7) Sugimoto, Y., Negishi, M., Hayashi, Y., Namba, T., Honda, A., Watabe, A., Hirata, M., Narumiya, S. and Ichikawa, A. Two isoforms of the EP₃ receptors with different carboxyl-terminal domains: Identical ligand binding properties and different coupling with G_i proteins *J. Biol. Chem.* **268**, 2712-2718 (1993)
- 8) Irie, A., Sugimoto, Y., Namba, T., Harazono, A., Honda, A., Watabe, A., Negishi, M., Narumiya, S. and Ichikawa, A. Third isoform of the prostaglandin-E-receptor EP₃ subtype with different C-terminal tail coupling to both stimulation and inhibition of adenylate cyclase *Eur. J. Biochem.* **217**, 313-318 (1993)
- 9) Honda, A., Sugimoto, Y., Namba, T., Watabe, A., Irie, A., Negishi, M., Narumiya, S. and Ichikawa, A. Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP₂ subtype *J. Biol. Chem.* **268**, 7759-7762 (1993)
- 10) Watabe, A., Sugimoto, Y., Honda, A., Irie, A., Namba, T., Negishi, M., Ito, S., Narumiya, S. and Ichikawa, A. Cloning and expression of cDNA for a mouse EP₁ subtype of prostaglandin E receptor *J. Biol. Chem.* **268**, 20175-20178 (1993)
- 11) Sugimoto, Y., Hasumoto, K., Namba, T., Irie, A., Katsuyama, M., Negishi, M., Kakizuka, A., Narumiya, S. and Ichikawa, A. Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin F receptor *J. Biol. Chem.* **269**, 1356-1360 (1993)
- 12) Namba, T., Oida, H., Sugimoto, Y., Kakizuka, A., Negishi, M., Ichikawa, A. and Narumiya, S. cDNA cloning of a mouse prostacyclin receptor: Multiple signaling pathways and expression in thymic medulla *J. Biol. Chem.* **269**, 9986-9992 (1994)
- 13) Funk, C. D., Furci, L., FitzGerald, G. A., Grygorczyk, R., Rochette, C., Bayne, M. A., Abramovitz, M., Adam, M. and Metters, K. M. Cloning and expression of a cDNA for the human prostaglandin E receptor EP₁ subtype *J. Biol. Chem.* **268**, 26767-26772 (1993)
- 14) An, S., Yang, J., Xia, M. and Goetzl, E. J. Cloning and expression of the EP₂ subtype of human receptors for prostaglandin E₂ *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **197**, 263-270 (1993)
- 15) Yang, J., Xia, M., Goetzl, E. J. and An, S. Cloning and expression of the EP₃-subtype of human receptors for prostaglandin E₂ *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **198**, 999-1006 (1994)
- 16) Abramovitz, M., Boie, Y., Nguyen, T., Rushmore, T. H., Bayne, M. A., Metters, K. M., Slipetz, D. M. and Grygorczyk, R. Cloning and expression of a cDNA for the human prostanoid FP receptor *J. Biol. Chem.* **269**, 2632-2636 (1994)
- 17) Bastien, L., Sawyer, N., Grygorczyk, R., Metters, K. M. and Adam, M. Cloning, functional expression, and characterization of the human prostaglandin E₂ receptor EP₂ subtype *J. Biol. Chem.* **269**, 11873-11877 (1994)
- 18) Boie, Y., Rushmore, T. H., Darmon-Goodwin, A., Grygorczyk, R., Slipetz, D. M.,

- Metters, K. M. and Abramovitz, M. Cloning and expression of a cDNA for the human prostanoid IP receptor *J. Biol. Chem.* **269**, 12173-12178 (1994)
- 19) Katsuyama, M., Sugimoto, Y., Namba, T., Irie, A., Negishi, M., Narumiya, S. and Ichikawa, A. Cloning and expression of a cDNA for the human prostacyclin receptor *FEBS Lett.* **344**, 74-78 (1994)
 - 20) Kunapuli, S. P., Fen Mao, G., Bastepe, M., Liu-Chen, L.-Y., Li, S., Cheung, P. P., DeRiel, J. K. and Ashby, B. Cloning and expression of a prostaglandin E receptor EP₃ subtype from human erythroleukaemia cells *Biochem. J.* **298**, 263-267 (1994)
 - 21) Adam, M., Boie, Y., Rushmore, T. H., Müller, G., Bastien, L., McKee, K. T., Metters, K. M. and Abramovitz, M. Cloning and expression of three isoforms of the human EP₃ prostanoid receptor *FEBS Lett.* **338**, 170-174 (1994)
 - 22) Regan, J. W., Baily, T. J., Donello, J. E., Pierce, K. L., Pepperl, D. J., Zhang, D., Kedzie, K. M., Fairbairn, C. E., Bogardus, A. M., Woodward, D. F. and Gil, D. W. Molecular cloning and expression of human EP₃ receptors: evidence of three variants with differing carboxyl termini *Br. J. Pharmacol.* **112**, 377-385 (1994)
 - 23) Regan, J. W., Baily, T. J., Pepperl, D. J., Pierce, K. L., Bogardus, A. M., Donello, J. E., Fairbairn, C. E., Kedzie, K. M., Woodward, D. F. and Gil, D. Cloning of a novel human prostaglandin receptor with characteristics of the pharmacologically defined EP₂ subtype *Mol. Pharmacol.* **46**, 213-220 (1994)
 - 24) Negishi, M., Sugimoto, Y. and Ichikawa, A. Prostanoid receptors and their biological actions *Prog. Lipid Res.* **32**, 417-434 (1993)
 - 25) Coleman, R. A., Smith, W. L. and Narumiya, S. International union of pharmacology classification of prostanoid receptors: Properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes *Pharmacol. Rev.* **46**, 205-229 (1994)
 - 26) Shimizu, T. and Wolfe, L. S. Arachidonic acid cascade and signal transduction *J. Neurochem.* **55**, 1-15 (1990)
 - 27) Bruner, G., Simmons, M. L. and Murphy, S., Astrocytes: Targets and sources for purines, eicosanoids, and nitrosyl compounds, in: *Astrocytes: pharmacology and function* (Murphy, S., ed.), pp.89-108, Academic Press, New York (1993)
 - 28) Inagaki, N. and Wada, H. Histamine and prostanoid receptors on glial cells *Glia* **11**, 102-109 (1994)
 - 29) Abdel-Halim, M. S., Hamberg, M., Sjöquist, B. and Ånggård, E. Identification of prostaglandin D₂ as a major prostaglandin in homogenates of rat brain *Prostaglandins* **14**, 633-643 (1977)
 - 30) Wolfe, L. S., Pappius, H. M. and Marion, J. The biosynthesis of prostaglandins by brain tissue in vitro *Adv. Prostaglandin Thromboxane Res.* **1**, 345-355 (1976)
 - 31) Narumiya, S., Ogorochi, T., Nakao, K. and Hayaishi, O. Prostaglandin D₂ in rat brain, spinal cord and pituitary: Basal level and regional distribution *Life Sci.* **31**, 2093-2103 (1982)
 - 32) Abdel-Halim, M. S., von Holst, H., Meyerson, B., Sachs, C. and Ånggård, E. Prostaglandin profiles in tissue and blood vessels from human brain *J. Neurochem.* **34**, 1331-1333 (1980)
 - 33) Ogorochi, T., Narumiya, S., Mizuno, N., Yamashita, K., Miyazaki, H. and Hayaishi, O. Regional distribution of prostaglandins D₂, E₂, and F_{2α} and related enzymes in postmortem human brain *J. Neurochem.* **43**, 71-82 (1984)
 - 34) Shimizu, T., Yamamoto, S. and Hayaishi, O. Purification and properties of prostaglandin D synthetase from rat brain *J. Biol. Chem.* **254**, 5222-5228 (1979)
 - 35) Ueno, R., Osama, H., Urade, Y. and Hayaishi, O. Changes of enzymes involved in prostaglandin metabolism and prostaglandin binding proteins in rat brain during development and aging *J. Neurochem.* **45**, 483-489 (1985)
 - 36) Hayashi, H., Fujii, Y., Watanabe, K. and Hayaishi, O. Enzymatic formation of prostaglandin F_{2α} in human brain *Neurochem. Res.* **15**, 385-392 (1990)
 - 37) García-Fernández, L. F., Iñiguez, M. A., Rodríguez-Peña, A., Muñoz, A. and Bernal, J. Brain-specific prostaglandin D₂ synthetase mRNA is dependent on thyroid hormone during rat brain development *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **196**, 396-401 (1993)
 - 38) Watanabe, K., Shimizu, T., Iguchi, S., Wakatsuka, H., Hayashi, M. and Hayaishi, O. An NADP-linked prostaglandin D dehydrogenase in swine brain *J. Biol. Chem.* **255**, 1779-1782 (1980)

- 39) Milton, A. S. Thermoregulatory actions of eicosanoids in the central nervous system with particular regard to the pathogenesis of fever *Ann. NY Acad. Sci.* **559**, 392-419 (1989)
- 40) Amir, S. and Schiavetto, A. Injection of prostaglandin E₂ into the anterior hypothalamic preoptic area activates brown adipose tissue thermogenesis in the rat *Brain Res.* **528**, 138-142 (1990)
- 41) Nonogaki, K., Iguchi, A., Yatomi, A., Uemura, K., Miura, H., Tamagawa, T., Ishiguro, T. and Sakamoto, N. Dissociation of hyperthermic and hyperglycemic effects of central prostaglandin F_{2α} *Prostaglandins* **41**, 451-462 (1991)
- 42) Fyda, D. M., Cooper, K. E. and Veale, W. L. Contribution of brown adipose tissue to central PGE₁-evoked hyperthermia in rats *Am. J. Physiol.* **260**, R59-R66 (1991)
- 43) Rothwell, N. J. Eicosanoids, thermogenesis and thermoregulation *Prostaglandins Leukotrienes Essent. Fatty Acids* **46**, 1-7 (1992)
- 44) Onoe, H., Watanabe, Y., Ono, K., Koyama, Y. and Hayaishi, O. Prostaglandin E₂ exerts an awaking effect in the posterior hypothalamus at a site distinct from that mediating its febrile action in the anterior hypothalamus *J. Neurosci.* **12**, 2715-2725 (1992)
- 45) Scaramuzzi, O. E., Baile, C. A. and Mayer, J. Prostaglandins and food intake of rats *Experientia* **27**, 256-257 (1971)
- 46) Ueno, R., Ishikawa, Y., Nakayama, T. and Hayaishi, O. Prostaglandin D₂ induces sleep when microinjected into the preoptic area of conscious rats *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **109**, 576-582 (1982)
- 47) Onoe, H., Ueno, R., Fujita, I., Nishino, H., Oomura, Y. and Hayaishi, O. Prostaglandin D₂, a cerebral sleep-inducing substance in monkeys *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 4082-4086 (1988)
- 48) Koyama, Y. and Hayaishi, O. Modulation by prostaglandins of activity of sleep-related neurons in the preoptic/anterior hypothalamic areas in rats *Brain Res. Bull.* **33**, 367-372 (1994)
- 49) Nakahata, N., Ishimoto, H., Kurita, M., Ohmori, K., Takahashi, A. and Nakanishi, H. The presence of thromboxane A₂ receptors in cultured astrocytes from rabbit brain *Brain Res.* **583**, 100-104 (1992)
- 50) Raff, M. C., Abney, E. R., Cohen, J., Lindsay, R. and Noble, M. Two types of astrocytes in cultures of developing rat white matter: Differences in morphology, surface gangliosides, and growth characteristics *J. Neurosci.* **3**, 1289-1300 (1983)
- 51) Frangakis, M. V. and Kimelberg, H. K. Dissociation of neonatal rat brain by dispase for preparation of primary astrocyte cultures *Neurochem. Res.* **9**, 1689-1698 (1984)
- 52) Sakamoto, K., Ezashi, T., Miwa, K., Okuda-Ashitaka, E., Houtani, T., Sugimoto, T., Ito, S. and Hayaishi, O. Molecular cloning and expression of a cDNA of the bovine prostaglandin F_{2α} receptor *J. Biol. Chem.* **269**, 3881-3886 (1994)
- 53) Evans, T., McCarthy, K. D. and Harden, T. K. Regulation of cyclic AMP accumulation by peptide hormone receptors in immunocytochemically defined astroglial cells *J. Neurochem.* **43**, 131-138 (1984)
- 54) Ito, S., Sugama, K., Inagaki, N., Fukui, H., Giles, H., Wada, H. and Hayaishi, O. Type-1 and type-2 astrocytes are distinct targets for prostaglandins D₂, E₂, and F_{2α} *Glia* **6**, 67-74 (1992)
- 55) Breyer, R. M., Emeson, R. B., Tarnag, J.-L., Breyer, M. D., Davis, L. S., Abromson, R. M. and Ferrenbach, S. M. Alternative splicing generates multiple isoforms of a rabbit prostaglandin E₂ receptor *J. Biol. Chem.* **269**, 6163-6169 (1994)
- 56) Namba, T., Sugimoto, Y., Negishi, M., Irie, A., Ushikubi, F., Kakizuka, A., Ito, S., Ichikawa, A. and Narumiya, S. Alternative splicing of C-terminal tail of prostaglandin E receptor subtype EP₃ determines G-protein specificity *Nature* **365**, 166-170 (1993)
- 57) Frohman, M. A., Dush, M. K. and Martin, G. R. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8998-9002 (1988)
- 58) Sando, T., Usui, T., Tanaka, I., Mori, K., Sasaki, Y., Fukuda, Y., Namba, T., Sugimoto, Y., Ichikawa, A., Narumiya, S. and Nakao, K. Molecular cloning and expression of rat prostaglandin E receptor EP₂ subtype *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **200**, 1329-1333 (1994)

- 59) Berridge, M. J., Downes, C. P. and Hanley, M. R. Lithium amplifies agonist-dependent phosphatidylinositol responses in brain and salivary glands *Biochem. J.* **206**, 587-595 (1982)
- 60) Baba, A., Saga, H. and Hashimoto, H. Inhibitory glutamate response on cyclic AMP formation in cultured astrocytes *Neurosci. Lett.* **149**, 182-184 (1993)
- 61) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951)
- 62) Sugimoto, Y., Shigemoto, R., Namba, T., Negishi, M., Mizuno, N., Narumiya, S. and Ichikawa, A. Distribution of the messenger RNA for the prostaglandin E receptor subtype EP₃ in the mouse nervous system *Neuroscience* **62**, 919-928 (1994)
- 63) Mucke, L. and Eddleston, M. Astrocytes in infectious and immune-mediated disease of the central nervous system *FASEB J.* **7**, 1226-1232 (1993)
- 64) Walz, W. and Hertz, L. Functional interactions between neurons and astrocytes: II. Potassium homeostasis at the cellular level *Prog. Neurobiol.* **20**, 133-183 (1983)
- 65) Malhotra, S. K., Shnitka, T. K. and Elbrink, J. Reactive astrocytes: a review *Cytobios* **61**, 133-160 (1990)
- 66) Norton, W. T., Aquino, D. A., Hozumi, I., Chiu, F.-C., Brosnan, C. F. Quantitative aspects of reactive gliosis: A review *Neurochem. Res.* **9**, 877-885 (1992)
- 67) Eddleston, M. and Mucke, L. Molecular profile of reactive astrocytes: Implications for their role in neurologic disease *Neuroscience* **54**, 15-36 (1993)
- 68) Scolding, N. J., Morgan, B. P., Campbell, A. K. and Compston, D. A. S. The role of calcium in rat oligodendrocyte injury and repair *Neurosci. Lett.* **135**, 95-98 (1992)
- 69) Perry, V. H. and Gordon, S. Macrophages and microglia in the nervous system *Trends Neurosci.* **11**, 273-277 (1988)
- 70) Streit, W. J., Graeber, M. B. and Kreutzberg, G. W. Functional plasticity of microglia: A review *Glia* **1**, 301-307 (1988)
- 71) Jordan, F. L. and Thomas, W. E. Brain macrophages: questions of origin and inter-relationship *Brain Res. Rev.* **13**, 165-178 (1988)
- 72) Murphy, S. and Pearce, B. Functional receptors for neurotransmitters on astroglial cells *Neuroscience* **22**, 381-394 (1984)
- 73) Ritchie, T., Cole, R., Kim, H.-S., de Vellis, J. and Noble, E. P. Inositol phospholipid hydrolysis in cultured astrocytes and oligodendrocytes *Life Sci.* **41**, 31-39 (1987)
- 74) Hösli, E. and Hösli, L. Receptors for neurotransmitters on astrocytes in the mammalian central nervous system *Prog. Neurobiol.* **40**, 477-506 (1993)
- 75) Kimelberg, H. K. *Glial cell receptors*, Raven Press, New York (1988)
- 76) Sawada, M., Itoh, Y., Suzumura, A. and Marunouchi, T. Expression of cytokine receptors in cultured neuronal and glial cells *Neurosci. Lett.* **160**, 131-134 (1993)
- 77) Pearce, B., Cambray-Deakin, M., Morrow, C., Grimble, J. and Murphy, S. Activation of muscarinic and α_1 -adrenergic receptors on astrocytes results in the accumulation of inositol phosphates *J. Neurochem.* **45**, 1534-1549 (1985)
- 78) Chomczynski, P. and Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction *Anal. Biochem.* **162**, 156-159 (1987)
- 79) Powell, W. S., Hammarström, S. and Samuelsson, B. Occurrence and properties of a prostaglandin F_{2α} receptor in bovine corpora lutea *Eur. J. Biochem.* **56**, 73-77 (1975)
- 80) Kyldén, U. and Hammarström, S. Molecular weight of detergent-solubilized prostaglandin F_{2α} receptor from bovine corpora lutea *Eur. J. Biochem.* **109**, 489-494 (1980)
- 81) Orlicky, D. J., Fisher, L., Dunscomb, N. and Miller, G. J. Immunohistochemical localization of PGF_{2α} receptor in the rat ovary *Prostaglandins Leukotrienes Essent. Fatty Acids* **46**, 223-229 (1992)
- 82) McCracken, J. A., Glew, M. E. and Scaramuzzi, R. J. Corpus luteum regression induced by prostaglandin F_{2α} *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **30**, 544-546 (1970)
- 83) Horton, E. W. and Poyser, N. L. Uterine luteolytic hormone: A physiological role for prostaglandin F_{2α} *Physiol. Rev.* **56**, 595-651 (1976)
- 84) Shapiro, D. L. Morphological and biochemical alterations in foetal rat brain cells cultured in the presence of monobutyl cyclic AMP *Nature* **241**, 203-204 (1973)
- 85) Shain, W., Forman, D. S., Madelian, V. and Turner, J. N. Morphology of astroglial cells

- is controlled by beta-adrenergic receptors *J. Cell Biol.* **105**, 2307-2314 (1987)
- 86) Mobley, P. L., Scott, S. L. and Cruz, E. G. Protein kinase C in astrocytes: a determinant of cell morphology *Brain Res.* **398**, 366-369 (1986)
 - 87) Sharma, N., Norman-O'Guin, K. and Shafit-Zagardo, B. Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) and inhibitors of protein kinase C alter glial fibrillary acidic protein (GFAP) mRNA levels *Glia* **4**, 572-579 (1991)
 - 88) Rolland, B., Le Prince, G., Fages, C., Nunez, J. and Tardy, M. GFAP turnover during astroglial proliferation and differentiation *Dev. Brain Res.* **56**, 144-149 (1990)
 - 89) Le Prince, G., Fages, C., Rolland, B., Nunez, J. and Tardy, M. DBcAMP effect on the expression of GFAP and of its encoding mRNA in astroglial primary cultures *Glia*, **4**, 322-326 (1991)
 - 90) Kimelberg, H. K., Narumi, S. and Bourke, R. S. Enzymatic and morphological properties of primary rat brain astrocyte cultures, and enzyme development in vivo *Brain Res.* **153**, 55-77 (1978)
 - 91) Sommermeyer, H. and Fahrig, T. Influence of dBcAMP-induced morphological differentiation on norepinephrine-, glutamate-, and t-ACPD-stimulated phosphoinositide-breakdown in cultured rat brain astrocytes *Neurosci. Res. Commun.* **1**, 187-193 (1992)
 - 92) Fahrig, T. and Sommermeyer, H. Dibutyryl cyclic AMP-induced morphological differentiation of rat brain astrocytes increases α_1 -adrenoceptor induced phosphoinositide breakdown by a mechanism involving protein synthesis *Brain Res.* **602**, 318-324 (1993)
 - 93) Zielke, H. R., Tildon, J. T., Baab, P. J. and Hopkins, I. B. Synthesis of glutamate and glutamine in dibutyryl cyclic AMP-treated astrocytes *Neurosci. Lett.* **97**, 209-214 (1989)
 - 94) Gilad, G. M., Shanker, G., Dahl, D. and Gilad, V. H. Dibutyryl cyclic AMP-induced changes in neuron-astroglia interactions and fibronectin immunocytochemistry in dissociated rat cerebellar cultures *Brain Res.* **508**, 215-224 (1990)
 - 95) Arenander, A. T., Lim, R. W., Varnum, B. C., Cole, R., de Vellis, J. and Herschman, H. R. TIS gene expression in cultured rat astrocytes: Induction by mitogens and stellation agents *J. Neurosci. Res.* **23**, 257-265 (1989)
 - 96) Kaneda, N., Oshima, M., Chung, S. Y. and Guroff, G. Sequence of a rat TIS11 cDNA, an immediate early gene induced by growth factors and phorbol esters *Gene* **118**, 289-291 (1992)
 - 97) Tai, T.-C., MacLusky, N. J. and Adamson, S. L. Ontogenesis of prostaglandin E₂ binding sites in the brainstem of the sheep *Brain Res.* **652**, 28-39 (1994)
 - 98) Martres, M. P., Sokoloff, P., Giros, B. and Schwartz, J. C. Effects of dopaminergic transmission interruption on the D2 receptor isoforms in various cerebral tissues *J. Neurochem.* **58**, 673-679 (1992)
 - 99) Nüsing, R. M., Hirata, M., Kakizuka, M., Eki, T., Ozawa, K. and Narumiya, S. Characterization and chromosomal mapping of the human thromboxane A₂ receptor *J. Biol. Chem.* **268**, 25253-25259 (1993)
 - 100) Morii, H. and Watanabe, Y. A possible role of carbohydrate moieties in prostaglandin D₂ and prostaglandin E₂ receptor proteins from the porcine temporal cortex *Arch. Biochem. Biophys.* **292**, 121-127 (1992)
 - 101) Kenimer, J. G. and Nirenberg, M. Desensitization of adenylate cyclase to prostaglandin E₁ or 2-chloroadenosine *Mol. Pharmacol.* **20**, 585-591 (1981)
 - 102) Robertson, R. P., Westcott, K. R., Storm, D. R. and Rice, M. G. Down-regulation in vivo of PGE receptors and adenylate cyclase stimulation *Am. J. Physiol.* **239**, E75-E80 (1980)
 - 103) Limas, C. and Limas, C. J. Homologous regulation of prostaglandin E₂ receptors in rat renal medulla *Arch. Biochem. Biophys.* **259**, 89-97 (1987)
 - 104) Ishihara, T., Nakamura, S., Kaziro, Y., Takahashi, T., Takahashi, K. and Nagata, S. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding the secretin receptor *EMBO J.* **10**, 1635-1641 (1991)
 - 105) Hanasaki, K. and Arita, H. Characterization of a new compound, S-145, as a specific TXA₂ receptor antagonist in platelets *Thromb. Res.* **50**, 365-376 (1988)
 - 106) Sanner, J. H. Substances that inhibit the actions of prostaglandins *Arch. Int. Med.*

- 133**, 133-144 (1974)
- 107) LeFevre, P. G. Sugar transport in the red blood cell: structure-activity relationships in substrates and antagonists *Pharmacol. Rev.* **13**, 39-70 (1961)
 - 108) Eakins, K. E., Karim, S. M. M. and Miller, J. D. Antagonism of some smooth muscle actions of prostaglandins by polyphloretin phosphate *Br. J. Pharmacol.* **39**, 556-563 (1970)
 - 109) Mathé, A. A., Strandberg, K. and Åström, A. Blockade by polyphloretin phosphate of the prostaglandin F_{2α} action on isolated human bronchi *Nature New Biol.* **230**, 215-216 (1971)
 - 110) Mathé, A. A., Strandberg, K. and Frédholm, B. Antagonism of prostaglandin F_{2α} induced bronchoconstriction and blood pressure changes by polyphloretin phosphate in the guinea-pig and cat *J. Pharm. Pharmacol.* **24**, 378-382 (1971)
 - 111) Gryniewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R. Y. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties *J. Biol. Chem.* **260**, 3440-3450 (1985)
 - 112) Elbein, A. D. Inhibitors of the biosynthesis and processing of N-linked oligosaccharide chains *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 497-534 (1987)
 - 113) Shaikh, N. A. and Palmer, F. B. St. C. Phosphoinositide kinases in chick brain and sciatic nerve, a developmental study *J. Neurochem.* **28**, 395-402 (1977)
 - 114) Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays *J. Immunol. Methods* **65**, 55-63 (1983)
 - 115) Wróblewski, F. and LaDue, J. S. Lactic dehydrogenase activity in blood *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **90**, 210-213 (1955)
 - 116) Tkacz, J. S. and Lampen, J. O. Tunicamycin inhibition of polyisoprenyl N-acetylglucosaminyl pyrophosphate formation in calf-liver microsomes *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **65**, 248-257 (1975)
 - 117) Koch, H. U., Schwarz, R. T. and Scholtissek, C. Glucosamine itself mediates reversible inhibition of protein glycosylation: A study of glucosamine metabolism at inhibitory concentrations in influenza-virus-infected cells *Eur. J. Biochem.* **94**, 515-522 (1979)
 - 118) Harrison, B. C. and Mobley, P. L. Phorbol ester-induced change in astrocyte morphology: Correlation with protein kinase C activation and protein phosphorylation *J. Neurosci. Sci.* **25**, 71-80 (1990)
 - 119) Orlicky, D. J. and Williams-Skipp, C. Immunohistochemical localization of PGF_{2α} receptor in the rat oviduct *Prostaglandins Leukotrienes Essent. Fatty Acids* **48**, 185-192 (1993)
 - 120) Lefkowitz, R. J., Hausdorff, W. P. and Caron, M. G. Role of phosphorylation in desensitization of the β-adrenoceptor *Trends Pharmacol. Sci.* **11**, 190-194 (1990)
 - 121) Savarese, T. M. and Fraser, C. M. In vitro mutagenesis and search for structure-function relationships among G protein-coupled receptors *Biochem. J.* **283**, 1-19 (1992)
 - 122) Keller, M., Jackisch, R., Seregi, A. and Hertting, G. Comparison of prostanoid forming capacity of neuronal and astroglial cells in primary cultures *Neurochem. Int.* **7**, 655-665 (1985)
 - 123) Seregi, A., Keller, M. and Hertting, G. Are cerebral prostanoids of astroglial origin? Studies on the prostanoid forming system in developing rat brain and primary cultures of rat astrocytes *Brain Res.* **404**, 113-120 (1987)
 - 124) Murphy, S., Pearce, B., Jeremy, J. and Dandona, P. Astrocytes as eicosanoid-producing cells *Glia*, **1**, 241-245 (1988)
 - 125) Marriott, D. R., Wilkin, G. P. and Wood, J. N. Substance P-induced release of prostaglandins from astrocytes: Regional specialisation and correlation with phosphoinositol metabolism *J. Neurochem.* **56**, 259-265 (1991)
 - 126) Feramisco, J. R., Glass, D. B. and Krebs, E. G. Optimal spatial requirements for the location of basic residues in peptide substrates for the cyclic AMP-dependent protein kinase *J. Biol. Chem.* **255**, 4240-4245 (1980)
 - 127) House, C., Wettenhall, R. E. H. and Kemp, B. E. The influence of basic residues on the substrate specificity of protein kinase C *J. Biol. Chem.* **262**, 772-777 (1987)
 - 128) Saiki, R., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with

- thermostable DNA polymerase *Science* **239**, 487-491 (1988)
- 129) Hirata, M., Kakizuka, A., Aizawa, M., Ushikubi, F. and Narumiya, S. Molecular characterization of a mouse prostaglandin D receptor and functional expression of the cloned gene *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 11192-11196 (1994)

