

# トロンボキサン A<sub>2</sub> 受容体サブクラスと その細胞情報伝達機序の研究

(課題番号 09470497)

平成 9 年度～10 年度文部省科学研究費補助金  
基盤研究(B)(2) 研究成果報告書

平成 11 年 3 月

研究代表者 中畑則道  
(東北大学・薬学部・助教授)

東北大学図書



00021003889

附属図書館

## 目 次

はしがき	1
研究組織・研究経費	2
研究発表	
(1) 学会誌論文等	2
(2) 学会発表	4
(3) 出版物（本・総説）	5
研究概要	6
本補助金によって遂行された研究の出版物	8

## はしがき

1975年に血管の収縮物質として Hamberg らによって発見されたトロンボキサン  $A_2$  (TXA<sub>2</sub>) に関する研究は、その受容体に特異的なアゴニストおよびアンタゴニストが他のプロスタノイドに比較して早く見いだされたために、プロスタノイド研究の中心的な役割を演じながら、生理的な役割の解明やその合成を制御する薬物の開発などの応用研究へと進展してきた。その生理作用としては、血管収縮とともに血小板凝集が代表的なものと考えられる。1989年我々はアストロサイト由来の細胞株である 1321N1 ヒトアストロサイトーマ細胞に TXA<sub>2</sub> 受容体が存在することをはじめて見出し、その細胞情報伝達系について検討を加え、百日咳毒素非感受性の G 蛋白質である G<sub>q</sub> の介在、さらにホスホリパーゼ C-β (PLC-β) による Ca<sup>2+</sup> 動員性セカンドメッセンジャーであるイノシトール三リン酸 (IP<sub>3</sub>) の生成を明らかにしてきた。アストロサイトに加えて血小板および血管の TXA<sub>2</sub> 受容体刺激による情報伝達の解析から、TXA<sub>2</sub> 受容体刺激によって活性化される情報伝達系には Gq/PLC-β/IP<sub>3</sub>/Ca<sup>2+</sup> 系以外の伝達系が作動していることを早くから提唱してきた。

1991年 Hirata らにより胎盤より TXA<sub>2</sub> 受容体の cDNA がクローニングされ、その後、alternative splicing 産物の内皮細胞型 TXA<sub>2</sub> 受容体の cDNA がクローニングされた。この2つの alternative splicing 産物の cDNA を人工的に発現させた場合、ともに Ca<sup>2+</sup> 動員のシグナルを与えることから、我々が考えている TXA<sub>2</sub> 受容体刺激によって活性化される Gq 系以外の情報伝達系を alternative splicing による結果としては説明するのは難しい。

一方、以前から血小板と血管における TXA<sub>2</sub> 受容体が異なることが示唆されており、それはある種のアゴニストやアンタゴニストによって区別された。したがって、現在知られている胎盤型および内皮細胞型の TXA<sub>2</sub> 受容体以外に、新しいタイプの TXA<sub>2</sub> 受容体が存在し、それが Gq 系以外の情報伝達系を刺激している可能性がある。本研究では、主にアストロサイトーマ細胞を用いて、TXA<sub>2</sub> 受容体刺激による新しい情報伝達系を明らかにすべく、血小板や血管の反応と比較検討した。

## 研究組織

研究代表者： 中畑 則道（東北大学・薬学部・助教授）

## 研究経費

平成9年度	6,200千円
<u>平成10年度</u>	<u>3,000千円</u>
計	9,200千円

## 研究発表

### (1) 学会誌論文等

1. Mun-Chual Rho, Norimichi Nakahata, Hideshi Nakamura, Akio Murai and Yasushi Ohizumi: Tyrphostin 23 blocks phosphorylation of p42 but not p38 mitogen-activated protein kinase by zooxanthellatoxin-A. *Eur. J. Pharmacol.* 319, 375-378 (1997)
2. Mun-Chual Rho, Norimichi Nakahata, Hideshi Nakamura, Akio Murai and Yasushi Ohizumi: Involvement of phospholipase C- $\gamma$ 2 in activation of mitogen-activated protein kinase and phospholipase A<sub>2</sub> by zooxanthellatoxin-A in rabbit platelets. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282, 496-504 (1997)
3. Isao Matsuoka, Norimichi Nakahata and Hironori Nakanishi: Selective inhibition of collagen-induced arachidonic acid liberation by 1-(5-indonaphthalene-1-sulphonyl)-1H-hexahydro-1,4-diazepine hydrochloride (ML-7), a myosin light chain kinase inhibitor, in washed rabbit platelets. *Biochem. Pharmacol.* 54, 1019-1026 (1997)
4. Mun-Chual Rho, Norimichi Nakahata and Yasushi Ohizumi: Effect of zooxanthellatoxin-A, an unique marine product, on arachidonic acid cascade in rabbit platelets. *Folia Pharmacol. Japon.* 110, Suppl 1, 189P-194P (1997)

5. Mun-Chual Rho, Norimichi Nakahata and Yasushi Ohizumi: Two distinct effects of 12S-hydroxyeicosatetraenoic acid on platelet aggregation by zooxanthellatoxin-A. *Japan. J. Pharmacol.* 76, 117-120 (1998)
6. Shigeyoshi Honma, Norimichi Nakahata and Yasushi Ohizumi: Two thromboxane A<sub>2</sub> receptor subtypes that communicate with G<sub>q</sub>/11 and G<sub>12</sub> in human astrocytoma cells. *Prostaglandins* 55, 159-168 (1998)
7. Norimichi Nakahata, Shigeyoshi Honma, Hiroshi Kobayashi and Yasushi Ohizumi: Thromboxane A<sub>2</sub> receptor-mediated signal transduction in glial cells. *Folia Pharmacol. Japon.* 112, Suppl 1, 113P-117P (1998)
8. Norimichi Nakahata, Satoko Ohkubo, Emiko Ito, Masayuki Nakano, Kiyoshi Terao and Yasushi Ohizumi: Comparison of maitotoxin with thromboxane A<sub>2</sub> in rabbit platelet activation. *Toxicon* (1999) in press.
9. Shigeyoshi Honma, Norimichi Nakahata, Hiroshi Kobayashi, Shizuyo Ikeda, Noriko Takeda and Yasushi Ohizumi: Decrease in thromboxane A<sub>2</sub> receptor expression by differentiation with dibutyryl cyclic AMP in 1321N1 human astrocytoma cells. Manuscript in submission.
10. Norimichi Nakahata, Hiromichi Takano and Yasushi Ohizumi: Thromboxane A<sub>2</sub>-induced phosphatidylcholine hydrolysis in porcine vascular smooth muscle cells. Manuscript in submission.
11. Hiroshi Kobayashi, Shigeyoshi Honma, Norimichi Nakahata and Yasushi Ohizumi: A novel pathway of thromboxane A<sub>2</sub>-induced mitogen-activated protein kinase stimulation in astrocytoma cells. Manuscript in submission.

## (2) 学会発表

1. 本間茂佳、中畑則道、大泉 康：ヒトアストロサイトーマ細胞 (1321N1) のトロンボキサン A<sub>2</sub> 受容体サブクラス. 第 70 回日本薬理学会総会 (千葉、1997 年 3 月) : Jap. J. Pharmacol. 73, 157P (1997)
2. 魯ムンチョル、中畑則道、中村英士、村井章夫、大泉 康：ゾーザンテラトキシシン-A のウサギ血小板活性化時の p38 および p42MAP キナーゼ活性化に対するチロホスチン 23 の作用. 第 70 回日本薬理学会総会 (千葉、1997 年 3 月) : Jap. J. Pharmacol. 73, 64P (1997)
3. 魯ムンチョル、中畑則道、大泉 康：ゾーザンテラトキシシン-A およびイオノマイシンによる血小板凝集の 12-HETE による影響. 第 70 回日本生化学会大会 (金沢、1997 年 9 月) : 生化学 69, 768 (1997)
4. 中畑則道、魯ムンチョル、大泉 康：ゾーザンテラトキシシン-A の血小板アラキドン酸カスケードの活性化作用. 第 25 回薬物活性シンポジウム (東京、1997 年 10 月) : 日薬理誌 110, 189P-194P (1997)
5. 本間茂佳、中畑則道、大泉 康：ヒトアストロサイトーマ細胞 (1321N1) のトロンボキサン A<sub>2</sub> 受容体発現のジブチリル cAMP による変化. 第 71 回日本薬理学会総会 (京都、1998 年 3 月) : Jap. J. Pharmacol. 76, 95P (1998)
6. Norimichi Nakahata, Rho Mun-Chual and Yasushi Ohizumi: Effect of Zoonanthellatoxin-A, an unique marine macrolide, on arachidonic acid cascade in rabbit platelets. XIIIth International Congress of Pharmacology (Munche, Germany): Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 358, R347 (1998)
7. 中畑則道、本間茂佳、小林 博、大泉 康：ヒトアストロサイトーマ細胞におけるジブチリルサイクリック AMP 処理によるトロンボキサン A<sub>2</sub> 受容体情報伝達系の変化. 第 71 回日本生化学会大会 (名古屋 1998 年 10 月) : 生化学 70, 805 (1998)

8. 中畑則道、本間茂佳、小林 博、大泉 康：グリア細胞におけるトロンボキサン A<sub>2</sub> 受容体情報伝達系. 第 26 回薬物活性シンポジウム（福岡 1998 年 10 月）：日薬理誌 112, 113P-117P（1998）
9. 小林 博、本間茂佳、中畑則道、大泉 康：ヒトアストロサイトーマにおけるトロンボキサン A<sub>2</sub> 受容体刺激による Gq-PI-PLC 系を介さない MAPK の活性化. 第 72 回日本薬理学会年会（札幌 1999 年 3 月）

### (3) 出版物（本・総説）

1. 大泉 康、中畑則道：ロイコトリエン受容体・トロンボキサン受容体（細胞膜の受容体 基礎知識から最新の情報まで） 分担執筆：高柳一成編、p287-299 南山堂（平成 10 年 11 月発行）
2. 中畑則道：抗老化薬を目指した天然生理活性物質の研究 薬学研究の進歩 14, 95-103（1998）
3. 中畑則道：ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> 活性調節とその測定法 *Radioisotopes* 47, 375-376（1998）

## 研究概要

本研究では、TXA<sub>2</sub> 受容体刺激による新しい情報伝達系、すなわち Gq/ホスホリパーゼ C-β (PLC-β) /イノシトール三リン酸 (IP<sub>3</sub>) /Ca<sup>2+</sup>系以外の伝達系を明らかにすべく、アストロサイトーマ細胞、血小板や血管の反応と比較検討した。

血管平滑筋には血小板とは異なる TXA<sub>2</sub> 受容体が発現していることが考えられているが、すでにわれわれは、血管平滑筋における TXA<sub>2</sub> 受容体刺激による収縮反応が極めて長く持続し、IP<sub>3</sub> による Ca<sup>2+</sup> 上昇では説明できないことや、その収縮がプロテインキナーゼ C の阻害薬によって抑制されることを見い出している。そこで、プロテインキナーゼ C を活性化する内因性の活性物質であるジアシルグリセロールを生成することのできる情報伝達系に着目し、ホスファチジルコリン特異的ホスホリパーゼ C の活性化が TXA<sub>2</sub> 受容体刺激によって起こるかどうかについて検討した。その結果、TXA<sub>2</sub> 受容体刺激は、ホスファチジン酸を生成するホスファチジルコリン特異的ホスホリパーゼ D の活性をわずかしき上昇させなかった。ところが、TXA<sub>2</sub> 受容体刺激によるジアシルグリセロールの生成は、ホスファチジルコリン特異的ホスホリパーゼ C の阻害薬である D-609 によって用量依存的に抑制を受け、TXA<sub>2</sub> 受容体刺激がホスファチジルコリン特異的ホスホリパーゼ C を活性化させることが明らかになった。

一方、1321N1 ヒトアストロサイトーマ細胞膜から TXA<sub>2</sub> 受容体抗体を用いて、TXA<sub>2</sub> 受容体蛋白質の精製を試みた。その結果、SDS-PAGE 上で 2 本のバンドを確認することができた。さらに、TXA<sub>2</sub> 受容体を含む画分には G<sub>q</sub> と G<sub>12</sub> の 2 つの G 蛋白質が共存することをウエスタンブロッティングによって確認した。なお、ヒトアストロサイトーマ細胞には、胎盤型および内皮細胞型の 2 つの alternative splicing 産物の mRNA が存在することも RT-PCR 法で確認した。

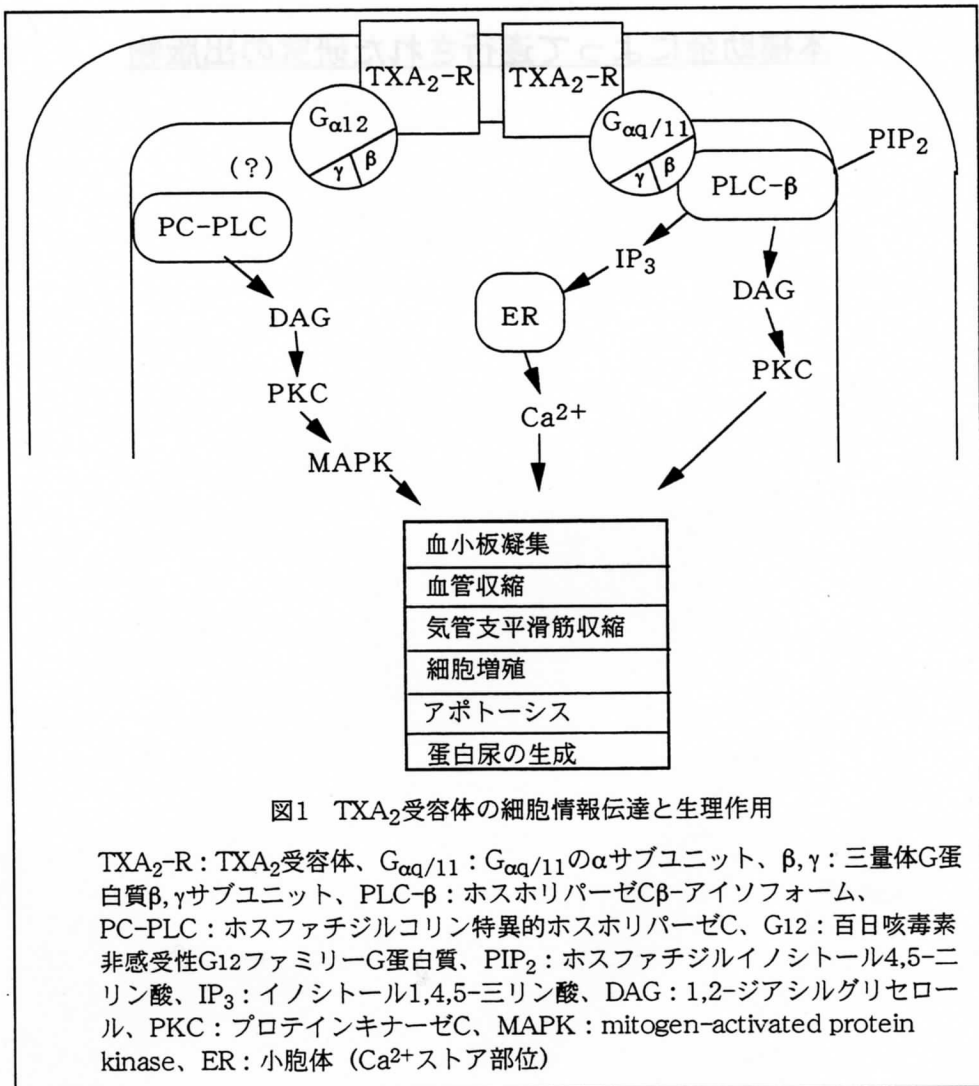
血小板では、TXA<sub>2</sub> 受容体刺激が mitogen-activated protein kinase (MAPK) を活性化することを、海洋由来生理活性物質のゾーザンテラトキシン-A を用いた実験から明らかにするとともに、TXA<sub>2</sub> 受容体アゴニスト自身でも活性化することを見い出した。したがって、TXA<sub>2</sub> 受容体刺激によってもたらされる情報伝達のひとつに MAPK の活性化があることを明らかにした。

アストロサイトーマ細胞においては、ジブチリルサイクリック AMP で細胞を分化させると、イノシトールリン脂質水解反応が顕著に抑制され、Ca<sup>2+</sup> シグナルの減弱が認められた。興味あることに、この分化させた細胞では、MAPK の活性化が亢進しており、その MAPK の活性化はホスファチジルコリン特異

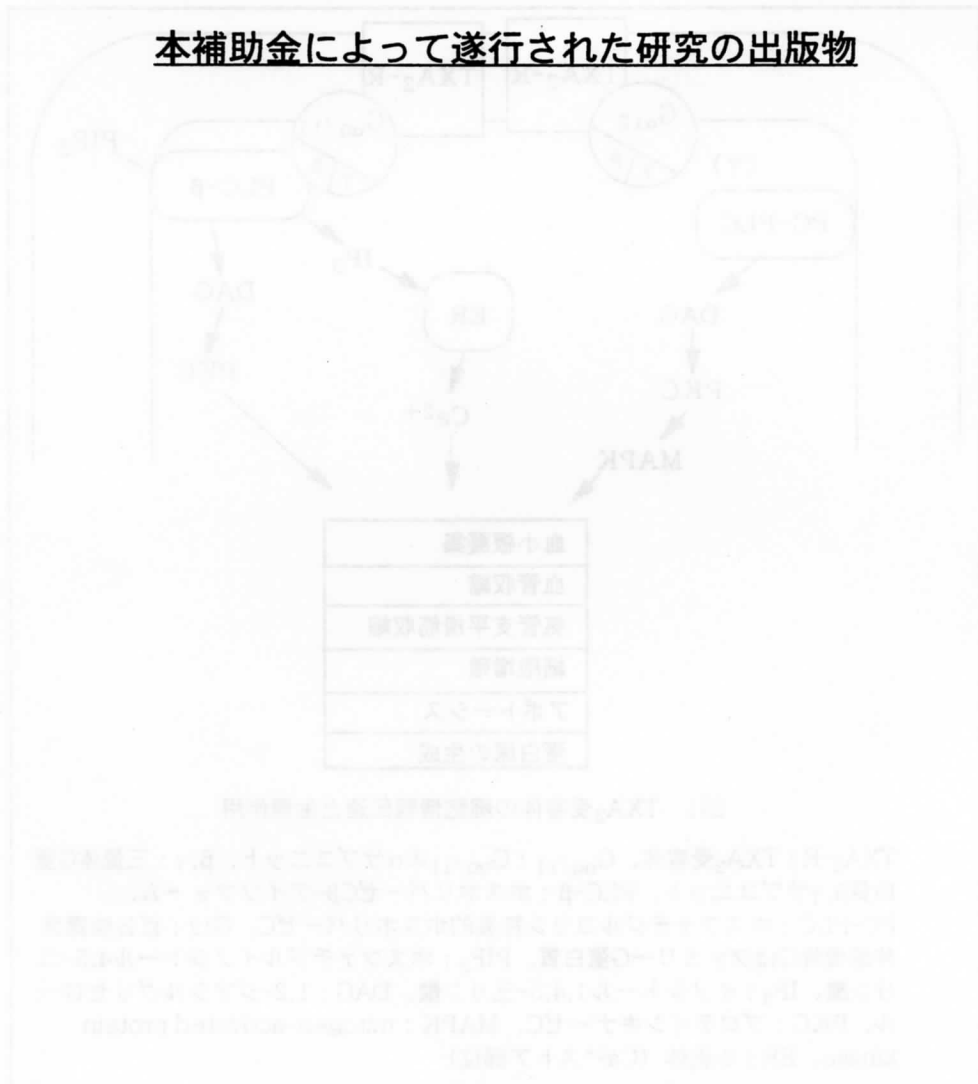


的ホスホリパーゼ C の阻害薬である D-609 によって用量依存的に強く抑制された。すなわち、MAPK の上流にはホスファチジルコリン特異的ホスホリパーゼ C が存在するものと思われる。

以上のように本研究によって得られた TXA<sub>2</sub> 受容体を介する情報伝達系をまとめて図 1 に示す。今後、(1)「G<sub>12</sub> を活性化する TXA<sub>2</sub> 受容体が胎盤型や内皮細胞型以外のものかどうか」、(2)「G<sub>12</sub> によってホスファチジルコリン特異的ホスホリパーゼ C が活性化するかどうか」について詳細な検討が必要であると思われる。



本補助金によって遂行された研究の出版物



本報告書収録の学術雑誌等発表論文は本ファイルに登録していません。なお、このうち東北大学在籍の研究者の論文で、かつ、出版社等から著作権の許諾が得られた論文は、個別に **TOUR** に登録しております。