

ヒトプロスタグランジントランスポーター (hPGT) 分子の 性質から得られた PG 製剤に有用な構造の検討

土田孝之, 金井直明¹⁾, 遠藤真一, 加藤梧郎²⁾
前田秀一郎²⁾, 上野 精, 橋本敬太郎¹⁾

山梨医科大学 医学部 泌尿器科学教室

¹⁾ 山梨医科大学 医学部 薬理学教室

²⁾ 山梨医科大学 医学部 第1生化学教室

抄 録: プロスタグランジン (以下 PG) 製剤の大きな問題は, 血液中に短時間しか存在できないことにある。PG 製剤の多くは肺でトランスポーターという膜蛋白によって細胞内に取り込まれ不活性化される。この不活性化には 15-hydroxy-PG-dehydrogenase を中心に多くの細胞内代謝酵素が関与する。したがって半減期の長い PG 製剤を開発する上で効率的な方法は, 多くの代謝酵素それぞれに対して抵抗性を与えるよりも, 細胞内に取り込まれない構造を持たせることである。我々はヒト PG トランスポーター (以下 PGT) cDNA を HeLa 細胞に導入した安定発現細胞を作成した。PGT 安定発現細胞の ³H-PGE₁ (0.6nM) の細胞内取り込みは 20 分間でほぼプラトーに達した。この時点で PGT 安定発現細胞は control 細胞に比べて, アルブミン非存在下で約 150 倍, 5 % アルブミン存在下で約 80 倍の ³H-PGE₁ を細胞内に取り込んだ。0.6nM PGE₁ のアルブミン結合率はほぼ 100 % である。それにもかかわらず, PGT がアルブミン存在下でも PGE₁ を取り込めることが明らかになり, 生理的に大きな役割を果たしているものと推定された。この系を使い PGT を通過しない安定な PG 製剤の構造を検討した。PG 誘導体の PG 受容体への親和性と PGT への親和性を比較検討したが, その間に有意な相関は認められなかった。したがって PG 受容体への親和性は高く維持しつつ, PGT への親和性を低く抑えた半減期の長い PG 製剤が開発可能であると考えられた。また PGT への親和性を決定する重要な基は PG 分子内の極性基であったため, その極性基の修飾が安定な PG 製剤には必要であると思われた。

キーワード プロスタグランジントランスポーター, PGT, hPGT, プロスタグランジン受容体

1. はじめに

プロスタグランジン (以下 PG) は, 細胞膜脂質を材料に合成される強力な局所ホルモンである。その種類はきわめて多く, 作用も多岐にわたっている。PG 類の強力な作用が注目され,

多くの PG 誘導体が薬剤として開発された。しかし, 多くの PG 製剤は血中から速やかに除去されるため, それを防ぐ構造に大きな関心が集まっている。PG の多くは肺でトランスポーターという膜蛋白によって細胞内に取り込まれ, 細胞内に存在する代謝酵素によって不活性化される¹⁾。したがって PG 製剤がトランスポーターを通過しなければ代謝酵素により不活性化されることもない。

我々はヒトPGトランスポーター(以下PGT)をクローニングし報告してきた²⁻⁴⁾。今回ヒトPGT cDNAをHeLa細胞に導入した安定発現細胞を作成し、PGTへの親和性を決定する重要なPG誘導体の構造を検討した。また、PGは一般に親油性の構造を有しており、血液中ではほとんどアルブミンと結合している⁵⁾。したがって遊離しているPGの濃度は非常に低いと考えられる。今までアルブミン非存在下における各種PGのPGTへの親和性、流入速度を報告してきたが^{3,4,6)}、より生理的な状態であるアルブミン存在下でのPGTの果たす役割についても検討した。

II. 材料および方法

A) ヒトPGT組み込みプラスミドの作成

既に報告したようにヒトPGT cDNAは当初pSPORT1プラスミドに組み込みクローニングした⁴⁾。このpSPORT1-PGTをEcoRI, Dra I, Bst XIで切断し、open reading frame 1929bpを含む2121bpのDNA断片を切り出した。このPGT cDNA断片をpMEP4 (Invitrogen) ベクターにサブクローニングした。pMEP4は哺乳動物細胞用の発現ベクターでメタロチオニンプロモーターを有する。メタロチオニンプロモーターはZnなどの重金属により発現誘導されるが、一般にZnなしでも強力に働く。pMEP4プラスミドはEpstein-Barウイルス由来の複製起点を有し、真核細胞内で複製することができる。また、ハイグロマイシン耐性遺伝子を選択マーカーとして利用できる。組み換えプラスミドpMEP4-PGTを大腸菌HB101中で増幅させplasmid maxi kit (QUIAGEN) で抽出した。negative controlにはpMEP4のメタロチオニンプロモーターに対しPGT cDNA断片を逆向きに挿入したプラスミドを作成した。

B) ヒトPGT安定発現細胞株の作成

HeLa細胞はDulbecco's modified Eagle's medium (Life Technologies, Inc.) に5%牛胎

児血清, 100 units/ml penicillin (Life Technologies, Inc.), 0.1 mg/ml streptomycin (Life Technologies, Inc.)を加えた培養液で培養した。35 mm 組織培養皿で育てたHeLa細胞に組み換えプラスミドpMEP4-PGT cDNA (10ug) とLipofectin (20ug, Life Technologies, Inc.)を含むDulbecco's modified Eagle's mediumを加え4時間培養した後、通常の血清を含む培養液に交換した。48時間後から600 units/mlハイグロマイシン (Life Technologies, Inc.)を加えた選択培養液で育てた。10 ~ 14日後、ハイグロマイシン耐性コロニーを選択し、選択培養液でさらに増殖させ、得られた安定発現細胞から³H-PGE₁輸送能の高いものを選択した。また、メタロチオニンプロモーターに対するZnの効果もあわせて検討した。この場合、ハイグロマイシンを含まない培養液に100 uM ZnSO₄を加え30時間培養した。さらにZnSO₄の濃度を200 uMに上げ、もう18時間PGTの発現誘導を行った。negative controlにはnegative controlプラスミドを導入したHeLa細胞を作成した。また、Northern blotでPGT mRNAの発現も確認した。Northern blotのプローブはヒトPGT cDNAのopen reading frame 1929bpを含む2121bpのRNAプローブである (Genius System, Boehringer Mannheim Biochemicals)。このプローブにalkaline phosphatase 酵素タンパクを直接ラベルして使用した (AlkPhos Direct, Amersham LIFE SCIENCE)。positive controlとしてβアクチンを使用した。

C) トランスポート アッセイ

PGT安定発現細胞を35 mm 組織培養皿上で80% confluentになるまで培養した。細胞をWeymouth's solutionで3回洗浄し血清蛋白を取り除いた。最終濃度0.6 nMになるように³H-PGE₁ (62cpm/fmol, New England Nuclear)をWeymouth's solutionに加え、³H-PGE₁の細胞内への取り込みを時間を追って測定した。データには2つの異なる培養皿で育てられた細胞の取り込みの平均値と標準偏差を示した。

D) PGT への親和性に対するアルブミンの影響
5%アルブミン存在下, 非存在下における³H-PGE₁の細胞内流入速度の違いを測定した。また非プロスタノイド Bromocresol green を含め, プロスタノイド (PGE₁, PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}) の PGT への親和性に対する 5%アルブミンの影響について検討した。親和性の測定法は以下に記する方法 E) と同様である。

E) PG 誘導体の PGT への親和性 (Ki 値) の測定
35 mm 組織培養皿で育てた PGT 安定発現細胞を用いて, アルブミン非存在下において 0.6 nM ³H-PGE₁ の細胞内初期流入速度を測定した。33 種類の PG 誘導体による ³H-PGE₁ の初期流入速度の抑制から, 各 PG 誘導体の PGT への親和性 (Ki 値) を計算した。使用した ³H-PGE₁ の濃度 0.6 nM は PGE₁ の PGT への親和性に比べてはるかに小さい。したがって PG 誘導体の PGT への親和性 (Ki 値) は $[I] * V_i / (V - V_i)$ にほぼ等しい。ここで [I] は PG 誘導体 (inhibitor) の濃度, V は inhibitor 非存在下の ³H-PGE₁ の初期流入速度, V_i は inhibitor 存在下の ³H-PGE₁ の初期流入速度である。1 回の実験は, 異なる 2 個の培養皿で同様に育てられた細胞を使いその平均値を 1 つの濃度における初期流入速度とした。各 PG 誘導体につき少なくとも 3 つ以上の inhibitor 濃度を用いて Ki 値を計算しその平均値を求めた。データに表示した値は, この実験を 3 回繰り返し得られた平均値と標準誤差である。一部の結果について t 検定を行った。

F) PG 誘導体の各種 PG 受容体への親和性
CHO 細胞, COS-1 細胞, COS-7 細胞にマウス EP₁⁷⁾, マウス EP₂⁸⁾, マウス EP_{3A}⁹⁾ マウス EP₄¹⁰⁾, ヒト IP₁₁¹¹⁾ 受容体 cDNA を導入し Binding assay で測定した (小野薬品工業)。

III. 結 果

A) ヒト PGT 安定発現細胞株の作成

得られたハイグロマイシン耐性コロニーから ³H-PGE₁ 輸送能の高いものを選択し, 併せて Northern blot でヒト PGT mRNA の発現を確認した (図 1A)。

図 1B に Zn 非存在下における PGT 安定発現細胞による ³H-PGE₁ の細胞内取り込みの時間経過を示した。control 細胞は control plasmid を導入したものである。PGT 安定発現細胞の ³H-PGE₁ (0.6 nM) の細胞内取り込みは 20 分間でほぼプラトーに達した。この時点で PGT 安定発現細胞は control 細胞に比べて, アルブミン非存在下で約 150 倍, 5%アルブミン存在下で約 80 倍の ³H-PGE₁ を細胞内に取り込んだ。0 分から 1 分までの取り込みは原点からほぼ線形に増加するため, これを初期流入速度とした。

ZnSO₄ で PGT 発現誘導をかけると ³H-PGE₁ の細胞内取り込みはさらに 1.5 倍に増加した。Zn 非存在下でも充分な ³H-PGE₁ の細胞内取り込みが得られたため, Zn による発現誘導はおこなわないこととした (データ省略)。

B) PGT への親和性に対するアルブミンの影響
表 1 に示したように, PGE₁, PGE₂, PGD₂, PGF_{2α} などプロスタノイドはアルブミン存在下でも PGT への親和性はほとんど変化しない。一方非プロスタノイドの Bromocresol green はアルブミン存在下で親和性が著しく低下した。

C) PG 誘導体の PGT への親和性 (Ki 値) と構造
PGT の特徴の 1 つは, 細胞膜にトンネル部分を構成している膜貫通ドメイン内に荷電性アミノ酸が 3 つしかないことである。これら荷電性アミノ酸のどれ 1 つを非荷電性アミノ酸に変換したミュータントでも PG に対する親和性が著しく低下する¹²⁾。このため, PG 誘導体中の極性基を中心に構造を変換した。図 2 に今回検討した 33 種類の PG 誘導体のうち特徴的なものを示した。

図 2A に EP 受容体活性に重要な α 鎖末端のカルボキシル基を修飾した化合物を示した。比較のため PGE₂ を基本骨格とした。末端カルボ

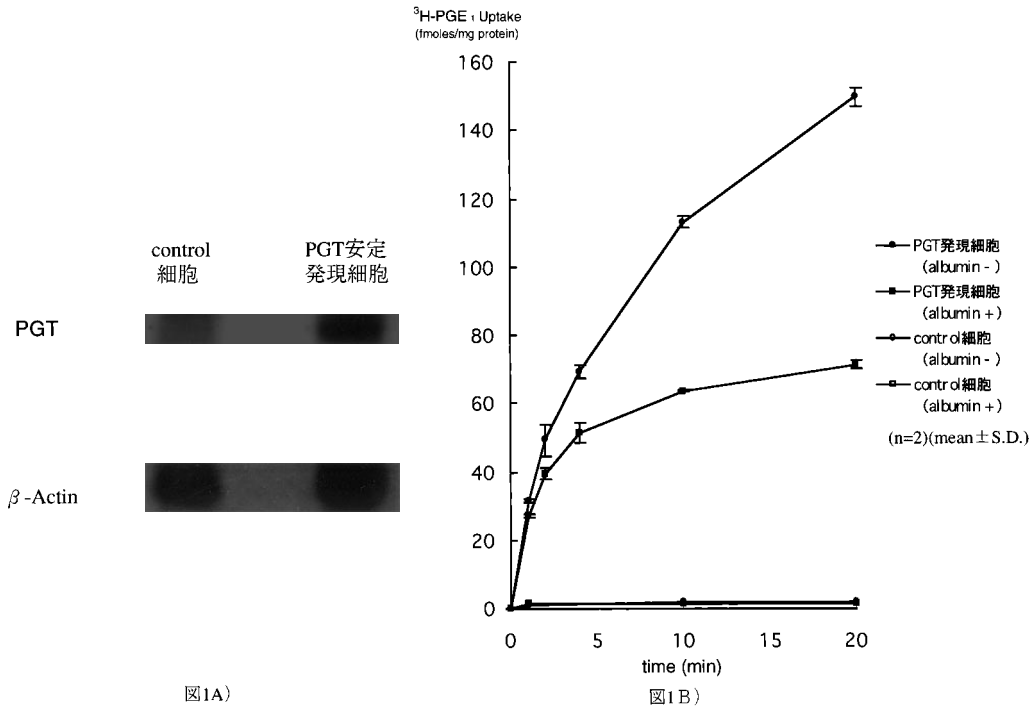


図1 A) Northern blot
PGT 安定発現細胞株におけるヒト PGT mRNA の発現
B) PGT 安定発現細胞株における $^3\text{H-PGE}_1$ の細胞内取り込み
albumin 非存在下における PGT 発現細胞の $^3\text{H-PGE}_1$ の細胞内取り込み
5%albumin 存在下における PGT 発現細胞の $^3\text{H-PGE}_1$ の細胞内取り込み
albumin 非存在下における control 細胞の $^3\text{H-PGE}_1$ の細胞内取り込み
5%albumin 存在下における control 細胞の $^3\text{H-PGE}_1$ の細胞内取り込み
結果は mean \pm S.D.で示す。

表1. PGTへの親和性(K_i)に対する Albuminの影響

	Albumin 非存在下 K_i (μM)	Albumin 存在下 K_i (μM)
PGE ₁	0.13 \pm 0.02	0.09 \pm 0.02
PGE ₂	0.07 \pm 0.01	0.08 \pm 0.02
PGD ₂	0.12 \pm 0.04	0.11 \pm 0.02
PGF _{2α}	0.12 \pm 0.04	0.10 \pm 0.02
Bromocresol green	1.99 \pm 0.24	27.55 \pm 3.43

(n = 3)(mean \pm S. E.)

キシル基を還元したアルコール体になると PGT への親和性は軽度低下し, 末端カルボキシル基をエステル化するとさらに親和性は低下した。

図2Bに EP₁ 受容体活性に重要な C11 位の水酸基が PGT への親和性に与える影響について

示した。比較のため 11-deoxy-PGE₂ を基本骨格とした。C11 位に水酸基を導入しても親和性はほとんど変化しないが, 一方メトキシ基を導入すると親和性が著しく低下した。

図2Cでは PG 活性に重要な C15 位の水酸基と ω 鎖の構造の関係について検討した。比較のため PGE を基本骨格とした。 ω 鎖末端についている bulky な基を C15 位に近づけていくと PGT への親和性は軽度低下するだけだが, 16 位が 2 級炭素から 3 級炭素になると親和性が失われ, C15 位の水酸基をメトキシ基に変換しても親和性は失われた。

図2Dに二重結合の数と位置の影響を示した。比較のため PGE を基本骨格とした。 Δ 13

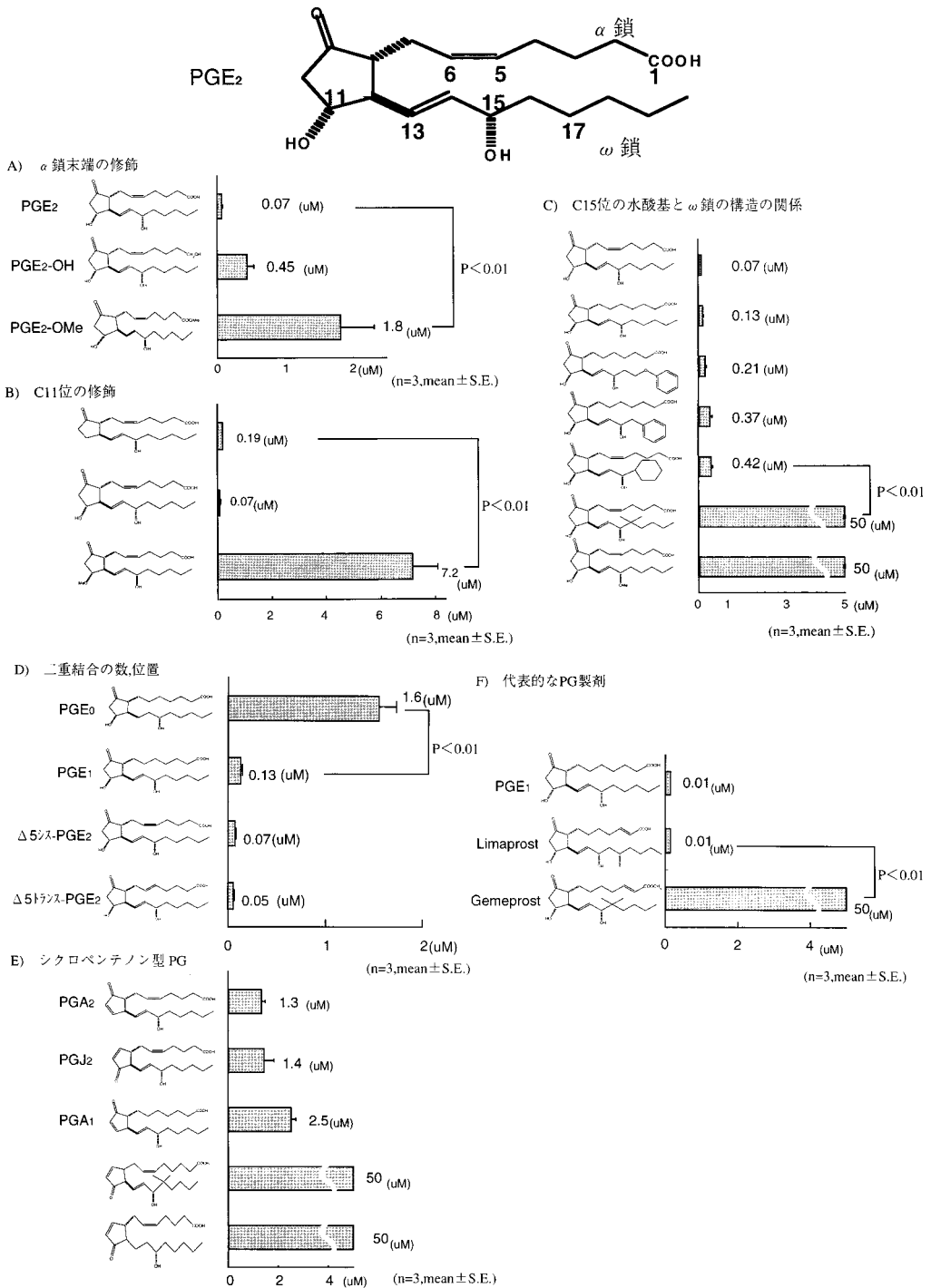


図2 PG誘導体の構造とPGTへの親和性結果はmean \pm S.E.で示す。

の二重結合が存在しないとPGTへの親和性は低下するが、二重結合が1個と2個ではほとんど変化がなく、 $\Delta 5$ の二重結合をトランス位にしても親和性は変化しなかった。

図2Eに特異な作用機序を有する抗癌剤として注目されているシクロペントノン型PGのPGTへの親和性を示した。PGA₁, PGA₂, PGJ₂が比較的高い親和性を有した。

図2Fに臨床で使用されている代表的PG製剤のPGTへの親和性を示した。C17位にメチル基を導入したLimaprostの親和性は高いままであるが、16位を3級炭素にし、 α 鎖末端のカルボキシル基をエステル化したGemeprostの親和性は著しく低下した。

D) PGT分子への親和性とPG受容体への親和性の相関

図3にCaチャンネル制御型受容体(EP₁), Gi共役型受容体(EP_{3A}), Gs共役型受容体(EP₂,

EP₄, IP)それぞれへの親和性とPGTへの親和性の相関を示した。どの受容体においてもPG受容体への親和性とPGTへの親和性の間に有意な相関は認められなかった。

IV. 考察

PGを輸送するトランスポーター分子で今までクローニングされたものは、PGT²⁻⁴⁾, OAT(multispecific organic anion transporter)¹³⁾, OAT²⁴⁾の3種類である。いずれも細胞内へのPG取り込みに関与していると考えられている。OAT1(腎), OAT2(肝)は非特異的なPGトランスポーターで、PGへの親和性は低い。PGTは肺を中心に広範な臓器に発現しており、PGに高い親和性を有するプロスタグランジン特異的トランスポーターである。PGTによる各種PGの細胞内取り込みには重要な選択性がある。PGTは体循環に回ると下痢、子

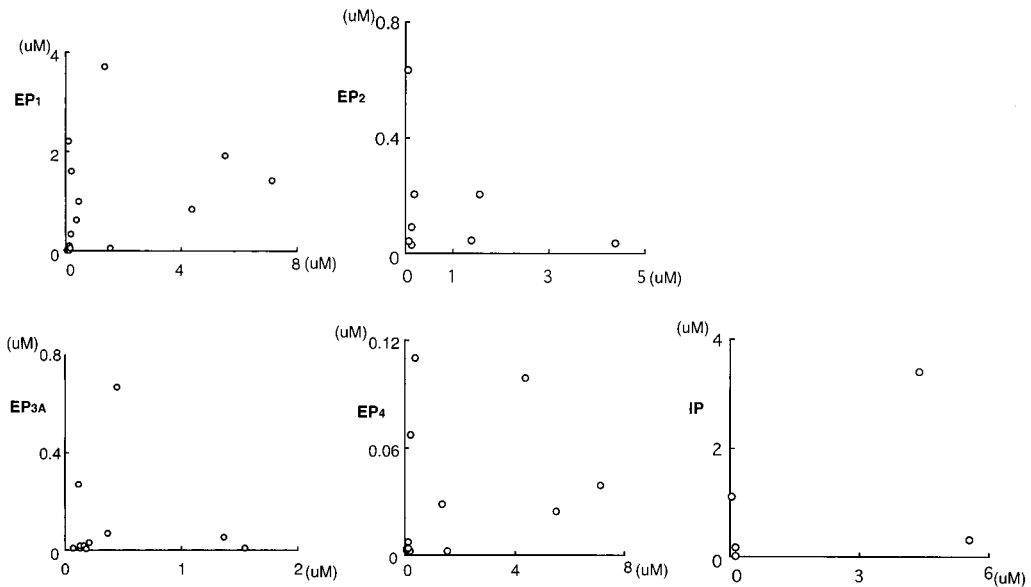


図3 PGTへの親和性とPG受容体への親和性の相関

横軸: PGTへの親和性

縦軸: PG受容体への親和性

EP₁: Caチャンネル制御型受容体

EP₂, EP₄, IP: Gs共役型受容体

EP_{3A}: Gi共役型受容体

宮収縮などをおこす PGE₂, PGF_{2α}などを肺で細胞内に取り込み不活性化している。PGI₂のように体循環系の動脈で必要とされるものは取り込まない。このように PG 不活性化の選択性を担っているのは細胞内代謝酵素 (15-hydroxy-prostaglandin dehydrogenase : 15PGDH)¹⁾ではなく、細胞内に取り込むトランスポーター (PGT) であると考えられている。

今回我々はヒト PGT 安定発現細胞株を作成した。PGT 安定発現細胞は control 細胞に比べて 100 倍以上の ³H-PGE₁ の細胞内取り込みを示し、PGT 分子の性質を調べるのに有用な実験系であると考えられた (図 1B)。PG の原材料は細胞膜成分であるが HeLa 細胞に PGT が発現していないとほとんど PG は細胞内に流入しないことも注目される。これは PG が生理的 pH では陰性に荷電しているため細胞膜を拡散で通過できないためと考えられる。5% アルブミン存在下では、0.6 nM PGE₁ の蛋白結合率はほぼ 100% である⁵⁾。それにもかかわらず、今回 PGT を介した極めて高い PGE₁ の細胞内取り込みが認められた (図 1B)。PGE₁, PGE₂, PGD₂, PGF_{2α} の PGT への親和性もほとんどアルブミンの影響を受けない (表 1)。このことから PGT が強力な PG トランスポーターとしてアルブミン存在下の生理的条件でも大きな役割を果たしていると考えられる。

図 3 に示したように PG 誘導体の PG 受容体への親和性と PGT への親和性の間に有意な相関は認められなかった。したがって、PG 受容体への親和性は高く、PGT への親和性は低い構造が可能であると考えられる。トランスポーターへの親和性が低ければ血液中に長く存在できるものと期待される。

33 種類の PG 誘導体を検討し、PGT への親和性を低下させると思われる特徴的な構造を記す。16 位の 3 級炭素、C15 位のケト基、C15 位のメトキシ基、C6 位のケト基、α 鎖末端カルボキシル基のエステル化、Δ13 二重結合の還元体の 6 構造である。C15 位のケト基以外は受容体への親和性を著しく低下させることはな

く、PGT 非通過性の PG 製剤を創薬する上では有用な構造である。

図 2A に α 鎖末端カルボキシル基が PGT への親和性に与える影響を示した。PG 誘導体の末端カルボキシル基は PG 受容体の第 7 膜貫通ドメイン内のアルギニン残基に結合する重要な構造である¹⁵⁾。一方アルギニン残基も全ての PG 受容体に保存されている重要な残基である⁷⁻¹¹⁾。よく調べられている EP 受容体の場合、PG 誘導体は PG 受容体のアルギニン残基とイオン結合しても水素結合しても PG 受容体を活性化できる¹⁶⁻¹⁸⁾。内因性 PG はカルボキシル基を有するので PG 受容体とイオン結合するが、一部の PG 誘導体は水素結合して作用する。水素結合は、水素供与体と水素受容体の組み合わせで成立する。PG 受容体のアルギニン残基はプロトンを取り込み安定な共鳴構造をとるため強い水素供与体となる。PG 誘導体が水素結合するためには、その構造が水素受容体でなければならない。PGE₂ を基本骨格とすれば PGE₂ はカルボキシル基を有するので PG 受容体とイオン結合ができる。カルボキシル基をエステル化した PGE₂-Me は水素受容体なので、これも PG 受容体の活性化が可能である。一方カルボキシル基を還元したアルコール体 PGE₂-OH は H₂O に比べて水素受容能力が低く水溶液中では水素供与体としかなり得ない。したがって PG 受容体への親和性は著しく低下する。これらの関係がトランスポーターに対しても当てはまるかどうか検討した。PGT の膜貫通ドメインに存在する 3 つの荷電性アミノ酸の 1 つは PG 受容体と同様に第 11 膜貫通ドメインに存在するアルギニン残基である。イオン結合、水素結合ともに可能なアルギニン残基を水素結合しかできないアスパラギン残基に代えたミュータントでは PG 輸送能が著しく減弱する¹²⁾。しかし PG 誘導体の PGT への親和性は、図 2A に示すようにイオン (PGE₂) > 水素供与体 (PGE₂-OH) > 水素受容体 (PGE₂-Me) の順である。水素供与体 (PGE₂-OH) でも親和性が失われることはない。受容体においてもトランスポーターにおいても

アルギニン残基が重要であることに変わりはないが、基質との結合における役割は異なるようである。 α 鎖末端カルボキシル基のエステル化はPGTへの親和性を低下させるが、その程度はPGの基本骨格により様々である(データ省略)。よく検討されているPGE₂-Meの場合、PGE₂に比べて受容体への作用はEP₁, EP₂, EP_{3A}, EP₄受容体どれに対してもEC50値が1~2倍になるだけでほとんど影響がない¹⁸⁾。一方PGTへの親和性は低下し、Ki値は24倍になる。PGの基本骨格によりPGTへの影響が異なるため、一概には言えないが、 α 鎖末端カルボキシル基のエステル化は血中から除去されにくいPG製剤を開発する上で有用な構造になり得ると期待される。カルボキシル基を還元したアルコール体はPGE₂-OHのみ検討した。PGE₂-OHの場合、PGE₂に比べてEP₁, EP₂, EP_{3A}, EP₄受容体に対するEC50値がそれぞれ5倍以上、500倍以上、100倍、40倍と作用が著しく減弱する¹⁸⁾。一方PGTへの親和性も低下しKi値は6倍になるが、受容体に比べると影響はるかに小さい。したがって、 α 鎖末端のアルコール構造はPG受容体に作用しないPGT抑制剤を開発する上で有力な候補となり得る。

図2BにC11位の水酸基がPGTへの親和性に与える影響を示した。C11位の水酸基はPG誘導体がEP₁受容体への親和性を獲得するのに必要な構造である¹⁹⁾。EP₁受容体はPGE₂がおもに作用する4つの受容体サブタイプの1つであり、疼痛、発熱に大きく関与していると考えられている。全てのPGの合成を阻害してしまうNSAIDと異なり、EP₁選択的アンタゴニストが開発できれば副作用の少ない解熱鎮痛薬になり得ると期待されている。C11位水酸基は今のところEP₁選択的アンタゴニストを開発する上で必須の構造であるため、PGTへの親和性に対する影響を検討した。11-deoxy-PGE₂を基本骨格として、C11位に水酸基を導入しても親和性はほとんど変化がない。一方メトキシ基を導入すると親和性は著しく低下する。選択的EP₁アンタゴニストに必須なC11位水酸基は血

液中での安定という意味からは不利な構造である。PGT抵抗性を与えるには別の部位を修飾する必要がある。

一般にPG誘導体は肺を通過する際に、細胞内に豊富に存在する15PGDHによりC15位の水酸基がケト基に酸化されて失活する。このことからPG誘導体のC15位水酸基を代謝酵素からまもる構造が考案されてきた。C17位のメチル基、16位の3級炭素、C16位のフェノキシ基の導入などである²⁰⁾。これらの構造がPGTへの親和性に与える影響を図2Cに示した。 ω 鎖末端についているbulkyな基をC15位に近づけていくと親和性は軽度低下するだけだが、注目されるのは16位が2級炭素から3級炭素になると親和性がほぼ失われることである。図2Fに示すように16位に3級炭素を導入し、 α 鎖末端のカルボキシル基をエステル化したGemeprostは15PGDH抵抗性でPGTへの親和性がなく、血中半減期は10~15分と非常に長い²¹⁾。一方、C17位にメチル基を導入したLimaprostも15PGDH抵抗性だが、PGTへの親和性が高く、血中半減期は約50秒である²²⁾。PGE₁の血中半減期20秒とあまり変わらない²³⁾。GemeprostもLimaprostも15PGDH抵抗性は保たれている。しかし血中半減期は大きく異なることからPG製剤を創薬するにあたり、今までのように代謝酵素抵抗性のみでなく、トランスポーター抵抗性も考慮する必要があると考えられる。

シクロペンテノン型PGは現在使用されている抗癌剤とは全く異なる作用機序を有する強力な抗癌剤である。トランスポーターにより細胞内に取り込まれ、核に移行し核内でp21を誘導し、p53非依存的に細胞周期をG1期で停止させる²⁴⁾。これはPGE₁, PGE₂, PGF_{2 α} , PGD₂などの細胞表面にある受容体に作用する古典的PGとは全く異なる作用である。この型のPGではトランスポーターが極めて重要な意味を持つが、その実体は明らかでない。今回3種類のシクロペンテノン型PGがPGTに比較的高い親和性を示したことからシクロペンテノン型PG

抗癌剤の作用機構における PGT の役割に興味
がもたれる。

今回得られたデータ及び実験系が新しい PG
製剤を創薬する上で活用できるものと期待され
る。

謝 辞

山梨医科大学薬理学教室の斉藤雅樹博士から
有機化学に関する貴重な助言をいただきました。
小野薬品工業には 33 種類の貴重な PG 誘
導体の提供と本論文における重要な参考データ
である受容体への binding assay をお願いしま
した。本研究の一部は、文部省科学研究費
08671803 (金井)、文部省科学研究費 09770059
(金井)、テレビ山梨厚生文化事業団サイエンス
振興基金(金井)の助成を得ておこなわれたも
のです。ここに記し篤く感謝の意を表します。

文 献

- 1) Okita RT, Sinning AR, Okita JR, Tai HH, Markwald RR et al. : NAD⁺-dependent 15-hydroxy-prostaglandin dehydrogenase : immunochemical characterization of the lung enzyme from pregnant rabbits. *Arch Biochem Biophys* **279**: 242-248, 1990.
- 2) Hakes DJ, Berezney R: Molecular cloning of matrix F/G: A DNA binding protein of the nuclear matrix that contains putative zinc finger motifs. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 6186-6190, 1991.
- 3) Kanai N, Lu R, Satriano JA, Bao Y, Wolkoff AW et al. : Identification and characterization of a prostaglandin transporter. *Science* **268**: 866-869, 1995.
- 4) Lu R, Kanai N, Bao Y, Schuster VL : Cloning, in vitro expression, and tissue distribution of a human prostaglandin transporter cDNA (hPGT). *J Clin Invest* **98**(5): 1142-1149, 1996.
- 5) 宮本茂敏, 石堂雅恒, 沢田正文, 梶原郁郎, 新谷哲也, 他 : OP-1206 · α -cyclodextrin 包接化合物 (OP-1206 · α CD) の生体内動態 (第 3 報) ラットにおける代謝について. *現代医療* **18**: 80-103, 1986.
- 6) Itoh S, Lu R, Bao Y, Morrow JD, Roberts LJ et al.: Structural determinants of substrates for the prostaglandin transporter PGT. *Mol Pharmacol* **50**(4): 736-742, 1996.
- 7) Watabe A, Sugimoto Y, Honda A, Irie A, Namba T et al.: Cloning and expression of a cDNA for a mouse EP1 subtype of prostaglandin E receptor. *J Biol Chem* **268**(27): 20175-20178, 1993.
- 8) Katsuyama M, Nishigaki N, Sugimoto Y, Morimoto K, Negishi M et al. : The mouse prostaglandin E receptor EP2 subtype: cloning, expression, and Northern blot analysis. *FEBS Lett*, **372**: 151-156, 1995.
- 9) Sugimoto Y, Namba T, Honda A, Hayashi Y, Negishi M et al.: Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP3 subtype. *J Biol Chem*, **267**(10): 6463-6466, 1992.
- 10) Nishigaki N, Negishi M, Honda A, Sugimoto Y, Namba T et al.: Identification of prostaglandin E receptor 'EP2' cloned from mastocytoma cells as EP4 subtype. *FEBS Lett*, **364**: 339-341, 1995.
- 11) Katsuyama M, Sugimoto Y, Namba T, Irie A, Negishi M et al.: Cloning and expression of a cDNA for human prostacyclin receptor. *FEBS Lett*, **344**: 74/78, 1994.
- 12) Chan B, Bao Y, Itoh S, Lu R, Schuster VL: Role of charged residues in the function of the prostaglandin transporter "PGT". *J Am Soc Nephrol* **7**(9): 1297, 1996.
- 13) Sekine T, Watanabe N, Hosoyamada M, Kanai Y, Endou H : Expression cloning and characterization of a novel multispecific organic anion transporter. *J Biol Chem* **272**(30): 18526-18529 1997.
- 14) Sekine T, Cha SH, Tsuda M, Apiwattanakul N, Nakajima N et al. : Identification of multispecific organic anion transporter 2 expressed predominantly in the liver. *FEBS Lett* **429**(2): 179-182, 1998.
- 15) Funk CD, Furci L, Moran N, Fitzgerald GA: Point mutation in the seventh hydrophobic domain of the human thromboxane A2 receptor allows discrimination between agonist and antagonist binding sites. *Mol Pharmacol* **44**(5): 934-939, 1993.
- 16) Negishi M, Irie A, Sugimoto Y, Namba T, Ichikawa A : Selective coupling of prostaglandin E receptor EP3D to Gi and Gs through interaction of alpha-carboxylic acid of agonist and arginine residue of seventh transmembrane domain. *J Biol Chem*, **270**(27): 16122-16127, 1995.
- 17) Negishi M, Harazono A, Sugimoto Y, Hazato A, Kurozumi S et al.: Selective coupling of prostaglandin E receptor EP3D to multiple G proteins depending on interaction of the carboxylic acid of agonist and arginine residue of seventh transmembrane domain. *Biochem*

- Bophys Res Commun **212**: 279–285, 1995.
- 18) Chang CS, Negishi M, Nishigaki N, Ichikawa A : Characterization of functional interaction of carboxylic acid group of agonists and arginine of the seventh transmembrane domains of four prostaglandin E receptor subtypes. *Prostaglandins* **54**(1): 437–446, 1997.
 - 19) 市川 厚 : プロスタグランジン受容体の構造と機能. 生体機能と設計分子ニュース, **1**(1): 11–16, 1997.
 - 20) 岸 守男 : 薬になるプロスタグランジン修飾体. 総説 プロスタグランジン : 103–142, 1994.
 - 21) Dimov V, Green K, Bygdeman M, Christensen NJ: Metabolism of 16, 16-dimethyl-trans-delta 2-prostaglandin E1 methyl ester (ONO-802) following intravenous and vaginal administration to pregnant women. *Drug Metab Dispos* **14**(4): 494–502, 1986.
 - 22) 宮本茂敏, 谷口 健, 梶原郁郎, 岡田和正, 木田準之助, 他 : OP-1206 · α -cyclodextrin 包接化合物(OP-1206 · α CD)の生体内動態 (第1報) ラットにおける経口, 尾静脈内投与時の吸収, 排泄について. *現代医療* **18**: 56–69, 1986.
 - 23) 宮本 積, 金子修至, 国久昌弘, 井口庸一, 平田文雄 : ラットにおける Prostaglandin E1 · α -cyclodextrin の吸収, 分布, 排泄および代謝に関する研究. *現代医療*, **10**: 589–604, 1978.
 - 24) 鈴木正昭 : 生体機能探索分子の精密設計と有機合成. 生体機能と設計分子ニュース **1**(1): 17–26 1997.