

「脳を知る」

平成9年度採択研究代表者

裏出 良博

((財) 大阪バイオサイエンス研究所 部長)

「脳膜神経関連の分子機構」

1. 研究の概要

脳膜(クモ膜)は脳脊髄を取り囲む単なる保護膜と考えられていた。しかし、我々は内因性睡眠物質[プロスタグランジン(PG)D₂]の合成酵素が、主にくも膜で生産され脳脊髄液に分泌されることを発見した。従って、脳膜は脳脊髄液を介して脳の機能維持に積極的に関与すると予想される。初年度、我々は、PGD合成酵素が活性型ビタミンAや甲状腺ホルモンを結合し、これら疎水性生理活性物質の脳内輸送蛋白質として機能する可能性を示した。そして、本酵素の遺伝子欠損マウスおよび大量発現マウスを作成して、これら遺伝子変異マウスが痛覚反応などの中枢性の機能異常を示すことを見出した。また、ヒト脳脊髄液の本酵素濃度がくも膜下出血等の疾患において上昇することや、本酵素がヒト心臓でも生産され、冠状動脈血管の狭窄部位に蓄積し、血流中に放出されることを発見した。

2. 研究実施内容

脳膜(クモ膜)は脳や脊髄などの中枢神経系を取り囲む薄い膜状の組織であり、従来は、脳を物理的に保護し中枢神経系と末梢組織を隔てる単なる支持被膜であるとされていた。しかし、我々は内因性睡眠物質であるプロスタグランジン(PG)D₂の生合成を司るリポカリン型PGD合成酵素が、ラットやヒトのクモ膜において活発に産生されることを発見し、1960年にヒト脳脊髄液の主要蛋白質として発見されて以来その機能や構造および産生場所が不明であった謎の蛋白質「ベータートレース」と同一蛋白質であり、脳脊髄液に活発に分泌されることを証明した。この発見を契機として「脳膜は単なる支持性被膜ではなく、脳脊髄液を介して積極的に脳の機能維持に関与する」という発想が生まれ、本研究を提案した。2年度までに、本プロジェクトに参加する4つの研究チーム(大阪バイオサイエンス研究所、京都大学、群馬大学、金沢大学)の研究環境と研究機器の整備、及び人的支援をほぼ終了し、各チームの連携を計りながら、個別に進めてきたPGD合成酵素、ベータートレース、脳膜あるいは脳脊髄液に関する研究を継続してきた。2年度までの成果を以下にまとめる。

- 1) リポカリン型 PGD 合成酵素 がレチノイド (活性型ビタミンA) や甲状腺ホルモン以外に、ヘムの分解産物であるビリルビンやビリベルジンを高親和性に結合することを発見した。一方、種々の脳疾患を持つ患者の脳脊髄液における本酵素濃度の測定を行い、クモ膜下出血等の複数の疾患において脳脊髄液の本酵素濃度が特異的に上昇することを確認した。
- 2) リポカリン型 PGD 合成酵素の生体内における機能を探るため、本酵素の遺伝子欠損マウスを作製した。その中枢神経機能の解析を行った結果、内因性発痛物質 PGE₂ あるいは GABA_A 受容体拮抗薬ピククリンの髄腔内投与により誘発されるアロディニア(触覚刺激による異痛)反応が消失していることを見出した。遺伝子欠損マウスのアロディニア反応は、PGD₂ あるいは PGD₂ 受容体作動薬 BW 245C の極微量 (1-100fg)の同時投与により再現し、1pg 以上の同時投与では再び消失した。さらに PGD₂ 受容体拮抗薬 BW A868C は、野生型マウスおよび PGD₂ を同時投与した遺伝子欠損マウスの PGE₂ あるいはピククリン誘発アロディニアを用量依存的に完全に抑制した(IC50 = 2-30fg)。以上の結果は、脊髄レベルでの PGE₂ 及び GABA_A 受容体を介する痛覚反応に必要な PGD₂ 生合成に本酵素が関与することを示し、同時に、PGD₂ が PGE₂ あるいはピククリン誘発アロディニアに必須であり、生理的な条件下ではその抑制に関与することを示唆している。
- 3) ラット前脳基底部のクモ膜下腔への PGD₂ 投与により誘発される徐波睡眠時に活性化される細胞を、c-Fos 蛋白質の発現を指標として追跡した結果、投与部位近傍のクモ膜細胞と新たな睡眠中枢である腹側外側視索前野 (VLPO) の神経細胞が活性化され、逆に、ヒスタミン系神経の起始核である覚醒中枢の結節乳頭核 (TMN) の活動が低下することを発見した。今後、前脳基底部・VLPO・TMN 間の睡眠誘発情報の伝達機構を解析する。
- 4) ヒトにおけるリポカリン型 PGD 合成酵素 (ベータートレース) の役割を病理学的側面から検討するため、クモ膜由来の腫瘍である髄膜腫における本酵素の発現と細胞局在を調べ、髄膜腫細胞の核周辺の粗面小胞体膜に本酵素が局在し、その遺伝子発現が部位により顕著に異なり砂粒体周辺の変性クモ膜細胞に特に強いことを見出した。
- 5) ヒト・リポカリン型 PGD 合成酵素が、ラットやマウスとは異なり、心臓において活発に産生され、冠状動脈血管の狭窄部位に蓄積し、冠循環血流中に放出されることを発見した。この研究成果に基づいて、本酵素血中濃度測定法の心機能診断薬としての実用性を追求するため、科学技術振興事業団・先端的基盤技術開発事業への申請を行った。その結果、委託開発企業としてマルハ株式会社が選定され、現在、実用化に向けた研究が進行中である。
- 6) 脳マラリアにおける傾眠と PGD₂ の関係を調べる研究を行った結果、マラリア

原虫が哺乳類とは異なった PG 合成系を持つことを見出した。これは、現在までに報告されている中で最も下等な生物における PG 合成系の発見である。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

- Y. Tokugawa, I. Kunishige, Y. Kubota, K. Shimoya, T. Nobunaga, T. Kimura, F. Saji, Y. Murata, N. Eguchi, H. Oda, Y. Urade, and O. Hayaishi: Lipocalin-type prostaglandin D synthase in human male reproductive organs and seminal plasma. *Biol. Reprod.*, 58, 600-607 (1998)
- D. Gerashchenko, C. T. Beuckmann, V. L. Marcheselli, W. C. Gordon, Y. Kanaoka, N. Eguchi, Y. Urade, O. Hayaishi, and N. G. Bazan: Localization of lipocalin-type prostanoid D synthase (β -trace) in iris, ciliary body, and eye fluids. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 39, 198-203 (1998)
- A. Hiraoka, T. Arato, I. Tominaga, N. Eguchi, and Y. Urade: Sodium dodecyl sulfate capillary electrophoretic analysis of molecular mass heterogeneity of β -trace protein in cerebrospinal fluid from patients with central nervous system diseases. *J. Chromatogr.*, 802, 143-148 (1998)
- R. L. Gerena, D. Irikura, Y. Urade, N. Eguchi, D. A. Chapman, and G. J. Killian: Identification of a fertility-associated protein in bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biol. Reprod.*, 58, 826-833 (1998)
- L. F. Garcia-Fernandez, Y. Urade, O. Hayaishi, J. Bernal, and A. Munoz: Identification of a thyroid hormone response element in the promoter region of the rat lipocalin-type prostaglandin D synthase (beta-trace) gene. *Mol. Brain Res.*, 55, 321-330 (1998)
- T. Scammell, D. Gerashchenko, Y. Urade, H. Onoe, C. Saper, and O. Hayaishi: Activation of ventrolateral preoptic neurons by the somnogen prostaglandin D₂. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 93, 5980-5984 (1998)
- D. Gerashchenko, C. T. Beuckmann, Y. Kanaoka, N. Eguchi, W. C. Gordon, Y. Urade, N. G. Bazan, and O. Hayaishi: Dominant expression of rat prostanoid DP receptor mRNA in leptomeninges, inner segments of photoreceptor cells, iris epithelium, and ciliary processes. *J. Neurochem.*, 71, 937-945 (1998)
- B. K. Kubata, N. Eguchi, Y. Urade, K. Yamashita, T. Horii, and O. Hayaishi: Evidence of prostaglandin production by the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *S. Afr. J. Sci.*, 94, 285-286 (1998)
- B. K. Kubata, N. Eguchi, Y. Urade, K. Yamashita, T. Mitamura, K. Tai, O. Hayaishi, and T. Horii: *Plasmodium falciparum* produces prostaglandins that

are pyrogenic, somnogenic and immunosuppressive substances in human. *J. Exp. Med.*, 188, 1197-1202 (1998)

○N. Eguchi, T. Minami, N. Shirafuji, Y. Kanaoka, T. Tanaka, A. Nagata, N. Yoshida, Y. Urade, S. Ito, and O. Hayaishi: Lack of tactile pain (allodynia) in lipocalin-type prostaglandin D synthase-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 726-730 (1999)

○M. Taniike, I. Mohri, N. Eguchi, D. Irikura, Y. Urade, K. Suzuki, and S. Okada: An apoptotic depletion of oligodendrocytes in the twitcher, a murine model of globoid cell leukodystrophy. *J. Neurophathol. Exp. Neurol.*, 58, 644-653, (1999)

他3件