

「脳を知る」

平成10年度採択研究代表者

清水 孝雄

(東京大学大学院医学系研究科 教授)

## 「脂質メディエーターの dual receptor 系と神経機能」

### 1. 研究実施の概要

脳は脂質の宝庫といわれ、実際に多くの脂質が存在し、これから多様な脂質メディエーター（プロスタグランジン、ロイコトリエン、血小板活性化因子など）が産生され、分解されている。脂質メディエーターはペプチドやタンパク性リガンドと異なり、直接遺伝情報で決まるものではないために、ポストゲノム時代の主要な標的分子と考えられ、注目が集まっている。脂質メディエーターは神経伝達物質やホルモンなどと協調しながら、神経伝達やグリア機能の調節、また、神経の発生や分化に関与していると考えられているが、それぞれのメディエーターの役割については不明の点が多い。本研究ではこれら脂質メディエーターの脳における機能を系統的に解明することを目標としている。また、この中で、脂質メディエーターを持つ「デュアル受容体機能」に注目し、他の水溶性リガンドとの作用の違いを明らかにする。「デュアル受容体機能」とは一つのリガンドが脂溶性である特徴を利用し、細胞膜と核内の双方に受容体を持ち、多様性を示すとの仮説である。本研究目的で、現在、三つの方向からのアプローチを進めている。(1) 脂質メディエーター合成酵素の分布および細胞内動態の解析、(2) 脂質メディエーターの細胞膜、核内受容体の単離と解析、さらに、(3) 脂質メディエーターの酵素や受容体の遺伝的改変マウスを用いた脳機能の解析である。現在のところ、脂質メディエーター産生の鍵を握ると思われるホスホリパーゼ A2 や5-リポキシゲナーゼは CHO 細胞に発現するとカルシウム刺激に応じて活性化されるが、その際は細胞質から核膜周囲に移行することが明らかとなり、核内受容体説を支持する結果が見いだされている。他方、エストロゲンなどのホルモンが細胞膜にも受容体を持つ予備的な結果も得られている。さらに、本研究室で世界に先駆けて作成された血小板活性化因子受容体欠損マウス、ホスホリパーゼ A2 欠損マウスなどの遺伝的純化が進められており、純系マウスを用いた脳機能の解析の準備が進んでいる。

## 2. 研究実施内容

### (1) ロイコトリエン B<sub>4</sub> 受容体欠損マウスの樹立

マウスの同遺伝子を単離し、標的遺伝子組換えベクターを構築し、さらに、この遺伝子を導入し、組換えをおこした胚幹細胞(ES cells)の樹立に成功した。現在、本細胞をマウスの胚盤胞に注入し、そのマウスの誕生を待っている段階である。また、この遺伝子構造の解明の中で、構造の類似した新規 Gタンパク共役型受容体を発見した。この受容体のリガンド探索を続けている。

### (2) 神経細胞に特異的発現が認められる新規 Gタンパク共役受容体に関する研究

PAF 受容体との類似からクローニングされた新規受容体 (PSP24) は、海馬、大脳皮質の錐体細胞、嗅球の僧帽細胞、また、小脳のプルキニエ細胞に発現が認められた。脳以外での発現はほとんど認められていない。本受容体のリガンドスクリーニング系を開発し、現在、脳の抽出液からのリガンド探索を進めている。

### (3) ロイコトリエン産生酵素の細胞内移行の研究

ロイコトリエン産生には、細胞質型ホスホリパーゼ A<sub>2</sub>、5-リポキシゲナーゼ、ロイコトリエン A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>) 水解酵素の三種類が必要であるが、これらの酵素遺伝子を GFP (蛍光タンパク質) と融合させ、細胞にトランスフェクトし、それらの酵素がどのような局在の変化を示すかを解析している。その結果、細胞質型ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> はカルシウム刺激により、細胞質から核周囲に、また、5-リポキシゲナーゼは細胞質、核質よりいずれも核膜へ、さらに、LTA<sub>4</sub> 水解酵素は細胞膜と核膜へと移行をすることが明らかとなりつつある。現在、他の刺激や他の細胞に導入した際の変化についてなお解析を進めている。

(4) PAF 受容体欠損マウス、細胞質型ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> 欠損マウスの繁殖と遺伝的純化を待って、電気生理学的及び形態学的解析を進める準備を整えている。また、細胞質型ホスホリパーゼ A<sub>2</sub>、5-リポキシゲナーゼ、LTA<sub>4</sub> 水解酵素の脳内局在を明らかにすべく、種々の抗体の検定などを進めている。さらにホスホリパーゼ A<sub>2</sub> 阻害剤の効率的なスクリーニングシステムを開発中である。

## 3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

○T. Hirabayashi, K. Kume, K. Hirose, T. Yokomizo, M. Iino, H. Itoh and T. Shimizu (1999) Critical Duration of Intracellular Ca<sup>2+</sup> Response Required for Continuous Translocation and Activation of Cytosolic Phospholipase A<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.* 274, 5163-5169.

○K. Masuda, T. Yokomizo, T. Izumi, and T. Shimizu (1999) cDNA Cloning and characterization of guinea-pig leukotriene B<sub>4</sub> receptor. *Biochem. J.* 342, 79-85

○A. Toda, T. Yokomizo, K. Masuda, A. Nakao, T. Izumi, T. Shimizu. (1999)

Cloning and Characterization of Rat Leukotriene B<sub>4</sub> Receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262, 806-812.