

「脳を知る」
平成9年度採択研究代表者

裏出 良博

(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. 研究実施の概要

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。我々は、内因性睡眠物質であるプロスタグランジン D₂ の生合成を司るリポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素が、脳膜において活発に産生され、ヒト脳脊髄液の主要蛋白質として1960年に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 β トレースとして脳脊髄液に分泌されることを発見した。この研究結果は「脳膜と中枢神経系は脳脊髄液を介して密接な情報交換を行い、相互の機能維持に積極的に関わる」ことを示している。本研究では脳膜由来の神経調節因子・分化促進因子・神経死誘導因子とその受容体を同定し、分子レベルでの作用機構を解明する。その成果は、脳膜による中枢神経系の恒常性の維持機構を明らかにし、その機能不全による疾患の予防と治療につながる。

2. 研究実施内容

脳膜神経関連の鍵を握る蛋白質としてリポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素(β トレース)に着目して研究を行っている。我々は、分子進化の解析により、本酵素は脂溶性物質の輸送蛋白質(リポカリン)より進化した唯一の酵素蛋白質であることを示した。大腸菌を用いて調製した遺伝子組換え型酵素を用いた結合実験により、本酵素がレチノイド(活性型ビタミン A)や甲状腺ホルモン等の脂溶性生理活性物質、ビリルビンやビリベルジン等のヘム分解物、さらには、酵素反応産物であるプロスタグランジン D₂ を結合することを見出した。従って、本酵素はプロスタグランジン D₂ の合成酵素として機能すると同時に、脂溶性生理活性物質や組織障害性疎水性低分子物質の輸送あるいは捕捉蛋白質としての機能を併せ持つ多機能蛋白質であると考えられる。

本酵素は、脳膜において活発に合成され、ヒト脳脊髄液の総蛋白質の約 5 - 10% をしめる β トレースとして脳脊髄液に分泌される。各種の脳疾患患者の脳脊髄液 β トレース濃度を測定した結果、くも膜下出血患者では、発症 2 - 3 日後その濃度が 2 倍以上に上昇し、その時点の脳脊髄液より精製した本酵素の糖鎖にビリベルジ

ンと重複する分光学的特性を持つ色素が共有結合していることを見出した。これらの結果は、脳内出血に伴い脳内で産生するヘム分解物の排泄蛋白質として本酵素が機能する可能性を示している。以上の仮説に基づき、脳内出血を伴う疾患の予後改善やヘム分解物の過剰蓄積が原因である新生児黄疸の症状改善を目標とした本酵素蛋白質の補充療法についての検討を進めている。さらに、正常圧水頭症患者の脳脊髄液 β トレース濃度が、正常群や痴呆性疾患群の50~70%に低下していることを見出した。正常圧水頭症はシャント手術により回復することから脳脊髄液の循環障害による痴呆症であると考えられているが、現在でも有効な術前診断法が無い。従って、脳脊髄液 β トレース濃度は、正常圧水頭症の術前診断法として、初めての実用的マーカーである。又、ヒトの本酵素は、心臓や冠状動脈の硬化巣においても活発に生産され、血液中に分泌される。そして、腎疾患患者では尿中に高濃度の本酵素が検出される。そこで、血中および尿中の本酵素濃度と動脈硬化および腎疾患との相関を調べた。その結果、狭心症患者において冠状動脈の硬化巣の体積と抹消血の本酵素濃度が相関することを見出した。さらに、2型糖尿病患者では、尿中アルブミンの排泄量が正常値を示す患者群においても、腎機能の低下に伴い尿中の本酵素濃度が上昇することを見出した。従って、血中および尿中の本酵素濃度の測定は、動脈硬化および腎疾患の新たな診断法として期待される。

本酵素の生体内における機能を探るために、本酵素遺伝子欠損マウスを作製して、その中枢神経機能の解析を継続している。その結果、本酵素遺伝子欠損マウスは、既に発表した痛覚反応の異常（接触性アロディニアの消失）以外にも、断眠による睡眠要求蓄積の低下や、ガス麻酔薬に対する感受性の変化などの様々な中枢性の機能異常を示すことが明らかになった。これらの事実は、本酵素により生成されるプロスタグランジン D_2 が、脳膜神経相関の介在物質として機能することを示している。さらに、ヒトの本酵素を大量発現するトランスジェニックマウスを作製し、複数系統のトランスジェニックマウスにおいて、尾先端の切断の痛覚刺激により、一過性（約6時間）の徐波睡眠（熟睡時の睡眠）の増加が起き、その睡眠発作は脳内プロスタグランジン D_2 の上昇を伴うことを発見した。これは世界で初めて作製された徐波睡眠の異常マウスであり、異常な眠気を抑制する薬剤としてのプロスタグランジン D 合成酵素阻害剤のスクリーニングに有効な動物モデルである。

ヒトの先天性脱髄疾患であるクラベ病のモデル動物として知られる Twicher マウスにおいて、オリゴデンドログリア細胞のアポトーシスによる脱髄の進行に伴いリポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素が誘導されることを見出した。従って、本酵素は、特定の疾患において、グリア細胞や神経細胞の細胞死を防ぐ因子として機能すると考えられる。

セレノメチオニン置換体の本酵素の X 線結晶解析を進め2.6 分解能の三次元構

造をほぼ決定した。しかし、そのアミノ基末端約10残基の座標は決定できていない。そこで NMR による構造解析を試みたところ、レチノイドの存在下に、極めて分離の良好な二次元 NMR 像が得られ、ほぼ全てのアミノ酸残基のシグナルが同定できた。従って、今後さらに X 線結晶解析と NMR 解析の併用により、本酵素の三次元構造の最終決定を行う予定である。また、現時点での座標を基に、酵素反応に重要であると予想される 6 種類のアミノ酸残基を同定し、これらの残基に部位特異的変異法を導入して酵素反応における重要性を確認した。同時に、本酵素とレチノイド、甲状腺ホルモン、ビリベルジンとの複合体の結晶化にも成功した。それらの複合体結晶では、より高分解能の構造座標が決定できる可能性が高いため、その X 線結晶解析を進めている。一方、リポカリン型酵素とアミノ酸配列の全く異なる造血器型プロスタグランジン D 合成酵素についても、ヒトとマウスの遺伝子クローニングを行い、転写調節領域の解析や部位特異的変異法を用いた活性中心アミノ酸残基の同定を進めた。これらの情報はリポカリン型および造血器型それぞれに選択的なプロスタグランジン D 合成酵素阻害剤の開発に有効である。

培養脳膜細胞を用いた実験系では、脳膜細胞が新たな神経栄養因子を分泌することを見出し、その同定を進めている。さらに、グリア細胞との共培養による脳膜細胞におけるプロスタグランジン D 合成酵素および DP 受容体の発現量の増加が、グリア細胞の膜成分の添加により再現することを確認した。現在、細胞接着因子に標的を絞って、これらの遺伝子発現の変化に関与する蛋白質の同定を進めている。今後、脳膜由来の新規神経調節因子・分化促進因子・神経死誘導因子とそれらの受容体の同定、及び分子レベルでの作用機構の解明を進める予定である。

3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

Beuckmann, C. T., Fujimori, K., Urade, Y. and Hayaishi, O.: Identification of Mu-Class glutathione transferases M2-2 and M3-3 as cytosolic prostaglandin E synthases in the human brain. *Neurochem. Res.* 25, 733-738 (2000)

Pinzar, E., Miyano, M., Kanaoka, Y., Urade, Y., and Hayaishi, O.: Structural basis of hematopoietic prostaglandin D synthase activity elucidated by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 275, 31239-31244 (2000)

Beuckmann, C. T., Lazarus, M., Gerashchenko, D., Mizoguchi, A., Nomura, S., Mohri, I., Uesugi, A., Kaneko, T., Mizuno, N., Hayaishi, O. and Urade, Y.: Cellular localization of lipocalin-type prostaglandin D synthase (β -trace) in the central nervous system of the adult rat. *J. Comp. Neurol.* 428, 62-78 (2000)

Fujimori, K., Kanaoka, Y., Sakaguchi, Y. and Urade, Y.: Transcriptional activation of human hematopoietic prostaglandin D synthase gene in megakaryoblastic cell. *J. Biol. Chem.*, 275, 40511-40516 (2000)

Hirawa, N., Uehara, Y., Ikeda, T., Gomi, T., Hamano, K., Totsuka, Y., Yamakado, M., Takagi, M., Eguchi, N., Oda, H., Seiki, K., Nakajima, H. and Urade, Y.: Urinary prostaglandin D synthase (β -trace) excretion increases in the early stage of diabetes mellitus. *Nephron*, 87, 321-327 (2001)

Inoue, T., Takayanagi, K., Morooka, S., Uehara, Y., Oda, H., Seiki, K., Nakajima, H. and Urade, Y.: Serum prostaglandin D synthase level after coronary angioplasty may predict occurrence of restenosis. *Thromb. Haemostasis*, 85, 165-170 (2001)

Urade, Y., and Hayaishi, O.: Biochemical, structural, genetic, physiological, and pathophysiological features of lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1482, 259-271 (2001)