

「脳を知る」
平成10年採択研究代表者

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の持つ「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、四つのストラテジーで、それぞれの階層でのアプローチを進めている。

(1)分子レベル:新規受容体、脂質メディエーター合成酵素の単離、トランスポーターの単離;(2)細胞レベル:酵素の細胞内局在、カルシウム刺激による移行の解析;(3)組織レベル:インサイチュウハイブリダイゼーション、免疫組織化学による酵素、受容体の局在化、電気生理;(4)個体レベル:ホスホリパーゼ A2、PAF 受容体、ロイコトリエン受容体欠損マウスなどの解析。

2. 研究実施内容

受容体の研究

(1) 孤児受容体のリガンドスクリーニング系の開発

多くの G タンパク共約型受容体はリガンドが不明のまま、その数が増えている。細胞内のシグナルに関わらず、そのリガンドを同定できるシステムを作ること、基礎的な神経科学の研究にも、また、創薬の上でも大変重要である。今回、PC-12 細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイにより、細胞内のシグナルに関わらず検出出来る高感度のシステムを開発し、発表した。

(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) の二つのアイソフォーム (50%程度の相同性) を見いだした。両受容体とも胎生期13日頃から、神経特異的に発現しており、アダルトでは大脳皮質の錐体細胞、小脳のプルキニエ細胞、嗅脳の僧帽細胞に発現していることが明らかとなった。また、脂質リガンドを持つと思われ、脳に分布する新たに15個の受容体を単離し、これを発現した細胞株を樹立した。上記の検定方法でこれらの天然リガンドの探索を進めている。

- (3) ロイコトリエン B4 受容体欠損マウスの樹立に成功した。現在、遺伝的純化と解析を同時並行で進めている。
- (4) ロイコトリエン B4 受容体に関連した第二受容体を新たに発見した。この受容体は第一受容体のプロモーター領域にあることがわかり、また、種々のヒドロキシアラキドン酸に反応することが明らかとなった。
- (5) ロイコトリエン C4, D4 に反応する二種類の受容体をマウスより単離し、ゲノム構造を明らかにした。現在、ノックアウトマウスを作成中である。また、ミクログリアには受容体が多量に発現し、刺激に応じて化学走性を示すことを明らかにした。

酵素の研究

(1) 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 A2、5- リポキシゲナーゼ、ロイコトリエン A4 (LTA4) 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 A2 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移行する。この際、酵素がリン酸化反応を受けることを明らかにした。

(2) 酵素の脳内局在の解析

愛知コロニーのグループの免疫組織化学的研究を元に、酵素の脳内局在が詳細に明らかになってきた。すなわち、細胞質型ホスホリパーゼ A2 はほとんどの神経細胞、特に大脳皮質や海馬の錐体細胞、小脳プルキニエ細胞に多く存在している。LTA4 水解酵素は神経細胞、特に軸索に多く存在している。また、LTC4 合成酵素は脳内でも視床下部の室傍核周辺のニューロンに局在していることが明らかとなった。LTC4 合成酵素の脳内局在に関する報告は今までなく、LTC4 の機能を考える上で重要な知見と考えられる。

(3) 新規ホスホリパーゼ A2

細胞質型ホスホリパーゼ A α (cPLA2 α) のファミリーと考えられる 3 種類のホスホリパーゼ A2 を単離した。ホスホリパーゼ A2 β 、及び γ 、さらにカイニン酸で誘導される kids cPLA2 (kainite inducible dentate specific cPLA2) の 3 種である。このうち、kids cPLA2 はカイニン酸刺激や電気刺激で海馬歯状回に特異的に出現する酵素で、cPLA2 α の一部でありながら、ノックアウトマウスでも出現するという極めて興味深い酵素であることが判明した。現在、本分子の機能解析と、カイニン酸受容体欠損マウスでの応答をソーク研究所のハイネマン教授との共同で進めている。

遺伝子改変マウスの研究

- (1) cPLA2 欠損マウスの解析から、本酵素はエンドトキシンなどによる多臓器損傷に深く関わっていること (Nature Immunology に発表済み) 実験的アレルギー脳脊髄膜炎、脳虚血後の梗塞層の拡大などにかかわっていること (投稿準備中) 関節リウマチ、大腸ポリープの発症にかかわっていること (Journal of Biological Chemistry に発表済み) また、海馬の長期抑圧にも関与していることが明らかとなった。今後、その機構について解析を進めるが、cPLA2 の特異的阻害剤が種々の病態の治療や予防に応用しうることが明らかとなった。
- (2) PAF 受容体欠損マウスの小脳顆粒細胞は遊走が悪く、発育障害を起こすことが明らかとなった。また、受精率が減少していること、痛覚鈍麻があることがわかった。マウスの後根神経節の小型神経細胞には PAF 受容体が存在することが明らかとなった。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

Hirabayashi, T., and Shimizu, T. Localization and regulation of cytosolic phospholipase A2. *Biochim. Biophys. Acta* 1488, 124-138 (2000)

Takaku, K, Sonoshita, M., Sasaki, N., Uozumi, N., Doi, Y., Shimizu, T., and Taketo, M. M. Suppression of intestinal polyposis in Apc-716 knockout mice by an additional mutation in the cytosolic phospholipase A2 gene. *J. Biol. Chem.* 275, 34013-34016 (2000)

Kawasawa, Y., Kume, K., Nakade, S., Haga, H., Izumi, T., and Shimizu, T. Brain-specific expression of novel G-protein-coupled receptors, with homologies to Xenopus PSP24 and human GPR45. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276, 960-964 (2000)

Kawasawa, Y., Kume, K., Izumi, T., and Shimizu, T. Mammalian PSP24s are not responsible to lysophosphatidic acid in mammalian expression systems. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276, 952-959 (2000)

Nakatani, N., Uozumi, N., Kume, K., Murakami, M., Kudo, I., and Shimizu, T. Role of cytosolic phospholipase A2 in lipid mediator productions and histamine release in mouse bone marrow-derived mast cells. *Biochem. J.* 352, 311-317 (2000)

Kato, K., Yokomizo, T., Izumi, T., and Shimizu, T. Cell-specific transcriptional regulation of human leukotriene B4 receptor gene. *J. Exp. Med.* 192, 413-420 (2000)

Yokomizo, T., Kato, K., Terawaki, K., Izumi, T., and Shimizu, T. A second leukotriene B4 receptor, BLT2 : a new therapeutic target in inflammation and immunological disorders. *J. Exp. Med.* 192, 421-432 (2000)

Shindou, H., Ishii, S., Uozumi, N., and Shimizu, T. Roles of Cytosolic Phospholipase A2 and Platelet-activating Factor Receptor in the Ca-induced Biosynthesis of PAF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271, 812-817 (2000)

Nagase, T., Uozumi, N., Ishii, S., Kume, K., Izumi, T., Ouchi, Y., and Shimizu, T. Acute lung injury by sepsis and acid aspiration : a key role of cytosolic phospholipase A2. *Nature Immunol.* 1, 42-46, (2000)

Ishii, S, and Shimizu, T.: Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. (Review) *Prog. Lipid Res.* 39, 41-82, (2000)

Yokomizo, T., Masuda, K., Kato, K, Toda, A., Izumi, T., and Shimizu, T. Leukotriene B4 Receptor ; cloning and intracellular signaling. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 161, S51-S55 (2000)

Aihara, M., Ishii, S., Kume, K., and Shimizu, T. Interaction between neuron and glia mediated by platelet-activating factor. *Genes to Cells* 5(5)397-406 (2000)

Tabuchi, S., Kume, K., Aihara, M., and Shimizu, T. Expression of lysophosphatidic acid receptor in rat astrocytes : Mitogenic effect and expression of neurotrophic genes. *Neurochem. Res.* 25, 573-582 (2000)

Yokomizo, T., Izumi, T., and Shimizu, T. Co-expression of two LTB4 receptors in human mononuclear cells. *Life Sci.* 68, p2207-2212 (2001)

Yokomizo, T., Izumi, T., and Shimizu, T. Leukotriene B4 : metabolism and signal transduction. (Review) *Arch. Biochem. Biophys.* 385, p231-241 (2001)

Yokomizo, T., Kato, K., Hagiya, H., Izumi, T., and Shimizu, T. Hydroxyeicosanoids bind to and activate the low-affinity leukotriene B4 receptor, BLT2. *J. Biol. Chem.* 276, p12454-12459 (2001)