

「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)

「脳膜神経相関の分子機構」

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(PG) D_2 の生合成を司るリポカリン型 PGD 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

脳膜神経相関の鍵を握る蛋白質としてリポカリン型 PGD 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 PGD $_2$ を結合することを見出した。従って、本酵素は PGD $_2$ 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にヘムの分解産物であるビリベルジンが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痴呆から回復するので脳脊髄液の循環障害による疾患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、心臓や冠動脈の動脈硬化巣で活発に生産され、血液中に分泌される。そして、腎疾患患者の尿中には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動脈の硬化巣の体積と末梢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、本酵素遺伝子ノックアウト(KO)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 KO マウスは、痛覚反応の異常(接触性アロディニアの消失)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 PGD₂ 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(TG)マウスが、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)の増加を示し、その睡眠発作は脳内 PGD₂ 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 PGD 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。さらに、本酵素 KO マウスとDP受容体 KO マウスは、共に、断眠による睡眠不足を補うために断眠解除後に起きる過剰な徐波睡眠(睡眠リバウンド)を示さないことを見出した。従って、PGD₂ は、睡眠不足を補ってその恒常性を維持するための睡眠物質として機能すると考えられる。一方、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 Twitcher マウスにおいて、オリゴデンドログリアのアポトーシスによる脱髄の進行に伴いリポカリン型 PGD 合成酵素が誘導されることを見出した。さらに、本酵素 KO マウスで作製した Twitcher マウスでは、グリア細胞や神経細胞のアポトーシスが顕著に増加することが明らかになった。又、多発性硬化症患者の脳内においても、本酵素の遺伝子発現が昂進していることが、海外で発見された。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アポトーシスを防ぐ因子として誘導されると考えられる。

本酵素のX線結晶解析を進め、セレノメチオニン置換体の 2.5 Å 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なかった。そこでNMRによる構造解析を行ない、レチノイドの存在下に、極めて良好な二次元NMR像が得られ、ほぼ全てのアミノ酸残基のシグナルを同定した。従って、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

晶化に成功し、さらに、経口投与による薬効が期待される阻害剤との共結晶の作製にも成功した。これらの複合体結晶を用いた放射光施設(SPring8)での、データ収集を行ない、高分解能の構造座標決定を進めている。

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PGD合成酵素についても、ヒト型酵素と経口投与による薬効が期待される阻害剤(HQL-79)との共結晶の高分解能X線結晶構造の決定に成功した。さらに、造血器型PGD合成酵素のKOマウスとヒト型酵素の大量発現TGマウスの作製を行い、これらの遺伝子操作マウスが様々な機能異常を示すことを発見した。これらの立体構造情報と遺伝子操作マウスの示す機能異常はリポカリン型および造血器型それぞれに選択的なPGD合成酵素阻害剤の開発に極めて有効である。

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PGD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。今後も、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. 研究実施体制

既に、脳神経科学グループ(金沢大学)との共同研究を終了し、シグナル伝達グループ(京都大学)を分子行動グループ(大阪バイオサイエンス研究所)に統合した。さらに、平成13年度9月30日にて細胞生理グループ(群馬大学)との共同研究を終了した。今後、分子行動グループに全勢力を集中してPGD合成酵素、 β トレース、脳膜あるいは脳脊髄液に関する研究を継続する。

裏出 良博(財団法人大阪バイオサイエンス研究所・第2研究部 研究部長)

研究項目

1. X線結晶解析によるPGD合成酵素の立体構造の決定。(理研播磨、JASRI、JSUP、NASDA、大阪大学蛋白質研究所、大阪大学工学部との共同研究)。
2. NMRによるPGD合成酵素の立体構造の決定(大阪大学薬学部との共同研究)。
3. PGD合成酵素に結合する脂溶性リガンド及び阻害剤の探索。(サントリー生有研、マルハ中央研究所、キッセイ薬品、医薬分子設計研究所、名古屋市立大学医学部との共同研究)。
4. PGD合成酵素遺伝子の発現調節機構の解析(マドリッド大学との共同研究)。
5. 神経細胞におけるPGD合成酵素結合蛋白質の同定。
6. PGD受容体の細胞局在、および、その下流の情報伝達系の検索(京都大学医学部、ハーバード大学との共同研究)。
7. PGD合成酵素遺伝子欠損マウス、および、ヒト型酵素を大量発現するトランスジェニックマウスの機能評価(オリエンタル酵母、国立循環器病センター、ペンシルバニア州立大学、関西医科大学、大阪医科大学、千葉大学医学部、東京大学医学部との共同研究)。

8. DP受容体遺伝子欠損マウス、および、ホスホリパーゼ β 4サブユニット遺伝子欠損マウスの機能解析(京都大学医学部、早稲田大学人間科学部、オレゴン大学との共同研究)。
9. Twitcher マウスにおける PGD 合成酵素の誘導と抗アポトーシス作用に関する研究(大阪大学医学部小児科との共同研究)。
10. サルおよびイヌを用いた PGD 合成酵素の体内動態の追跡、および、くも膜下出血モデル動物を用いた、本酵素の脳脊髄液濃度の上昇の機能解析(滋賀医科大学、第一化学薬品薬物動態研究所、マルハ中央研究所、名古屋市立大学医学部との共同研究)。中枢性疾患患者の脳脊髄液における PGD 合成酵素濃度の測定(マルハ中央研究所、名古屋市立大学医学部との共同研究)。

細胞生理グループ

石川 巧一(群馬大学・生体調節研究所 助教授)

研究項目

1. 髄膜細胞と脳実質細胞(神経およびグリア細胞)培養系を用いた脳膜神経関連の介在候補物質の分離同定。

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

- Scammell, T. E., Gerashchenko, D.Y., Mochizuki, T., McCarthy, M.T., Estabrooke, I.V., Sears, C. A., Saper, C. B., Urade, Y., and Hayaishi, O.: An adenosine A_{2a} agonist increases sleep and induces Fos in ventrolateral preoptic neurons. *Neuroscience*, 107, 653-663 (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 Haemost*, 85, 165-170 (2001)
- Huang, Z. - L., Qu, W. - M., Li, W. - D., Mochizuki, T., Eguchi, N., Watanabe, T., Urade, Y., and Hayaishi, O.: Arousal effect of orexin A depends on activation of the histaminergic system. *PNAS*, 98, 9965-9970 (2001)
- Ueno, N., Murakami, M., Tanioka, T., Fujimori, K., Tanabe, T., Urade, Y., and Kudo, I. : Coupling between cyclooxygenase, terminal prostanoid synthase, and phospholipase A₂. *J .Biol.Chem.*, 276, 34918-34927 (2001)
- Mizoguchi, A., Eguchi, N., Kimura, K., Kiyohara, Y., Qu, W. - M., Huang, Z. - L., Mochizuki, T., Lazarus, M., Kobayashi, T., Kaneko, T., Narumiya, S., Urade, Y., and Hayaishi, O. : Dominant localization of prostaglandin D receptors on arachnoid trabecular cells in mouse basal forebrain and their involvement in the regulation of non-rapid eye movement sleep. *PNAS*, 98, 11674-11679 (2001)
- Fujitani, Y., Kanaoka, Y., Aritake, K., Uodome, N., Okazaki-Hatake, K., and Urade, Y.: Pronounced eosinophilic lung inflammation and Th2 cytokine release in human lipocalin-type

prostaglandin D synthase transgenic mice. J Immunol.,168, 443-449 (2002)

- Hayaishi, O. and Urade, Y.: Prostaglandin D₂ in sleep-wake regulation: recent progress and perspectives. Neuroscientist, 8, 12-15 (2002)
- Lazarus, M., Kubata, B. K., Eguchi, N., Fujitani, Y., Urade, Y., and Hayaishi, O.: Biochemical characterization of mouse microsomal prostaglandin E synthase-1 and its colocalization with cyclooxygenase-2 in peritoneal macrophages. Arch Biochem. Biophys.,397, 336-341 (2002)
- Fujimori, K., Okada, T., and Urade, Y.: Expression of NADP(+)-dependent 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase mRNA in monkey ocular tissues and characterization of its recombinant enzyme. J.Biochem.(Tokyo),131, 383-389 (2002)
- Diaz, B.L., Fujishima, H., Kanaoka, Y., Urade, Y., and Arm, J. P. : Regulation of prostaglandin endoperoxide synthase-2 and IL-6 expression in mouse bone marrow-derived mast cells by exogenous but not endogenous prostanoids. J.Immunol.,168, 1397-1404 (2002)

(2) 特許出願

外国1件