

「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、四つの戦略で、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。なお、平成 13 年 10 月 5 日に中間評価報告会があり、その結果が 12 月に示された。これを機会に steroid の膜受容体探索から、GPCR の膜移行の問題へ重点を移し、このため、格好の材料である嗅覚受容体の発現クローニングを進めている。

2. 研究実施内容

受容体の研究

(1) 孤児受容体の天然リガンド探索システムの開発

昨年も報告したように数多くの孤児受容体が存在し、その中には脳に発現が認められるものもある。PAF 受容体、ロイコトリエン受容体などを初めとする脂質メディエーター受容体を中心として系統図の作製から、脂質メディエーターをリガンドとする可能性のある約15種類の受容体遺伝子を新たに単離し(未発表)、そのうちの一部の受容体発現株を作製した。今まで、これらの

受容体リガンドが不明だった理由の一つは、細胞膜への正しいソーティング(運搬)がなされていないことが理由の一つであるが、ベクターの工夫や発現株をセルソーターで選択するなどの工夫を経て、良好発現細胞株の樹立に成功した。今後、急速にリガンド探索を開始する予定である。

- (2) Gタンパク共役型受容体の膜移行のメカニズムを解析する目的の一貫として、嗅覚受容体を8種類単離した。これらの受容体は HEK, Cos 細胞などに発現させても膜へ移行せず、膜移行を行う別の分子があることが予想された。酵母のツーハイブリッド法、また、パニングによる発現クローニングなどで、これらの補助分子の単離を進めている。
- (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) 昨年度発見したロイコトリエンB4受容体第二受容体の性質を解析する中で、この受容体は種々のアラキドン酸代謝産物を幅広く認識する興味ある受容体であることがわかった。第二受容体をノックアウトすべく、ターゲティングベクターの作製に成功し、ES 細胞の相同組み換えを進めている。
- (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。組織分布を明らかにした。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関わるホスホリパーゼ A2 を GFP と融合させ、小脳プルキニエ細胞、顆粒細胞、また、海馬の錐体細胞へのトランスフェクトを行った。グルタミン酸刺激、カルシウム刺激で、ゴルジや核膜への移行と共に、シナプス後膜と思われる部位への移行が明らかとなった。現在、この移動部位の解析を進めている。

- (2) ロイコトリエン A4 水解酵素の抗体作製

ロイコトリエン A4 水解酵素は脳の神経細胞や軸索に幅広く局在していることがわかった。しかし、10年ほど前に作製した抗体が少なくなり、内因性の酵素のより詳細な局在解明が必要となったため、新たに酵素を大量精製し、その抗体作製を進めている。

- (3) 新規ホスホリパーゼ A2

細胞質型ホスホリパーゼ A2 (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種の解析を進めている。 β 、 γ は以前の報告とは異なり強い活性を持つことを見いだした。これは従来の研究が必ずしも最適の条件を見つけていないためと考えられた。また、kids タンパクに関しては、新たに lysophospholipase A1 活性を持つことを見いだした。Kids cPLA2 をプリオンプロモーターにより神経細胞に高発現したトランスジェニックマウスを作製した。この解析を進めている。

遺伝子改変マウスの研究

- (1) cPLA2 欠損マウスの解析から、本酵素はブレオマイシン誘導肺線維症の発症に重要な役割を持つことが明らかとなった。また、脳虚血再灌流による梗塞層の減少、アレルギー性脳脊髄膜炎(多発性硬化症モデル)での症状の減弱が認められた。同時に、神経可塑性では海馬 CA1 領域での Long term depression (LTD)の消失が認められ、また、着床や胚の成熟異常なども認められた。cPLA2 欠損マウスは痛覚の異常は認められなかった。
- (2) PAF 受容体欠損マウスの小脳顆粒細胞は in vitro で遊走が遅く、また、in vivo でも初期発生 (E14.5day)で小脳原基の外顆粒層の成熟障害を起こすことが明らかとなった。また、シナプス伝達の異常や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でカプサイシン受容体保持細胞は PAF 受容体も存在することが明らかとなった。

3. 研究実施体制

- (1) 分子生物学グループ(東京大学大学院医学系研究科)
 - ① 研究者名: 清水孝雄 (教授)
 - ② 研究項目: 生合成酵素、トランスポーター、受容体の単離、リガンド探索など生化学分子生物学的研究を行なう。
- (2) 脂質生化学グループ(群馬大学医学部生化学)
 - ① 研究者名: 和泉孝志(教授)
 - ② 研究項目: 酵素の細胞内移行、脂質リガンドの探索
- (3) 電気生理学グループ(新潟大学脳研究施設)
 - ① 研究者名: 渋木克英 (教授)
 - ② 研究項目: 変異マウスの電気生理学的解析を行なう。
- (4) 脳形態学グループ(愛知県心身障害者コロニー)
 - ① 研究者名: 岸川正大 (部長)
 - ② 研究項目: 変異マウスの形態学的解析^①及び酵素局在の免疫組織などの解析を行なう。
- (5) 創薬グループ(明治製菓薬品総合研究所)
 - ① 研究者名: 赤松 穰 (所長)
 - ② 研究項目: 酵素阻害剤、受容体拮抗薬のスクリーニングと開発

4. 研究成果の発表

- (1) 論文発表
 - Shimizu, T. (2001) Biological control by lipid mediators and pathophysiology. *Jap. Med. Assoc. J.* 44, 369-374.
 - Yokomizo, T., Izumi, T., and Shimizu, T. (2001) Leukotriene B4: metabolism and signal transduction. *Arch. Biochem. Biophys.* 385, 231-241
 - Yokomizo, T., Kato, K., Hagiya, H., Izumi, T., and Shimizu, T. (2001) Hydroxyeicosanoids bind to and activate the low affinity leukotriene B4 receptor, BLT2. *J. Biol. Chem.* 276,

12454-12459

- Yokomizo, T., Izumi, T., and Shimizu, T. (2001) Co-expression of two LTB₄ receptors in human mononuclear cells. *Life Sci.* 68, 2207-2212
 - Wu, C., Stojanov, T., Chami, O., Ishii, S., Shimizu, T., Li, A., and O'Neill, C. (2001) Evidence for the autocrine induction of capacitation of mammalian spermatozoa. *J. Biol. Chem.* 276, 26962-26968
 - Fukunaga, K., Ishii, S., Asano, K., Yokomizo, T., Shiomi, T., Shimizu, T., and Yamaguchi, K. (2001) Single nucleotide polymorphism of human platelet-activating factor receptor impairs G-protein activation. *J. Biol. Chem.* 276, 43025-43030
 - Yamashita, A., Kawagishi, N., Miyashita, T., Nagatsuka, T., Sugiura, T., Kume, K., Shimizu, T., and Waku, K. (2001) ATP-independent fatty acyl-coenzyme A synthesis from phospholipid: coenzyme A-dependent transacylation activity toward lysophosphatidic acid catalyzed by acyl-coenzyme A:lysophosphatidic acid acyltransferase. *J. Biol. Chem.* 276, 26745-26752
 - Yamamoto, T., Yokomizo, T., Nakao, A., Izumi, T., and Shimizu, T. (2001) Immunohistochemical localization of guinea-pig leukotriene B₄ 12-hydroxydehydrogenase/15-ketoprostaglandin 13-reductase. *Eur. J. Biochem.* 268, 6105-6113
 - Ohshima, N., Ishii, S., Izumi, T., and Shimizu, T. (2002) Receptor-dependent metabolism of platelet-activating factor in murine macrophages. *J. Biol. Chem.* 277, 9722-9727
 - Hanaka, H., Shimizu, T., and Izumi, T. (2002) Nuclear-localization-signal-dependent and nuclear-export-signal-dependent mechanisms determine the localization of 5-lipoxygenase. *Biochem. J.* 361, 505-514
 - Ogasawara, H., Ishii, S., Yokomizo, T., Kakinuma, T., Komine, M., Tamaki, K., Shimizu, T., and Izumi, T. (2002) Characterization of mouse cysteinyl leukotriene receptors, mCysLT1 and mCysLT2: Differential pharmacological properties and tissue distribution. *J. Biol. Chem.* 277, 18763-18768
 - Nagase, T., Uozumi, N., Ishii, S., Kita, Y., Yamamoto, H., Ohga, E., Ouchi, Y., and Shimizu, T. (2002) A pivotal role of cytosolic phospholipase A₂ in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Nature Med.* May; 8(5):480-484
- (2) 特許出願
外国1件