

「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 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(トレース)に着目して研究を行った。我々は、分子進化の解析により、本酵素が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が、遺伝子組換え型の本酵素を用いた結合実験を行い、本酵素がレチノイド(活性型ビタミンA)以外に甲状腺ホルモン等の脂溶性生理活性物質、さらには、ビリルビンやビリベルジン等のヘム分解物を高親和性($K_d = 30 \sim 40 \text{ nM}$)に結合することを見出した。従って、本酵素は内因性睡眠物質である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の輸送蛋白質、あるいは、組織障害性疎水性低分子物質の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 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トレース濃度を測定した結果、くも膜下出血後の患者では、その濃度が出血発作後2~3日後に2倍以上に上昇することを見出した。さらに、くも膜下出血患者の脳

脊髄液より精製した本酵素がビリルビンやビリベルジンと重複する吸収スペクトルを持つ色素を結合していることを確認した。これらの結果は、ビリルビンが脳血管の収縮物質として作用するという従来知見と合わせて、本酵素が脳内出血後の脳血管攣縮などの脳障害を発症させる物質の排泄蛋白質として機能する可能性を示している。現在、脳内出血を伴う疾患の予後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。

本酵素の生体内 (in vivo) 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、本酵素が脳膜神経相関の介在物質として機能する可能性を強く示唆している。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D₂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。

セレノメチオニン置換体の本酵素のX線結晶解析も順調に進行し、2.6 Å分解能の三次元構造が決定されつつある。また、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、それらの結晶化条件の最適化を進めている。

新たに脳膜に局在することが判明したDP受容体とホスホリパーゼ4について、それぞれの遺伝子欠損マウスを用いた機能解析を開始した。その結果、従来より提唱されていたプロスタグランジンD₂のアレルギー反応の増悪への関与が、DP受容体遺伝子欠損マウスおよびヒト型プロスタグランジンD合成酵素トランスジェニックマウスを用いて証明できた。又、ホスホリパーゼ4遺伝子欠損マウスでは、レム睡眠時の脳波が野生型マウスとは異なる周波数を示し、レム睡眠が短時間の覚醒により中断される睡眠異常が起きることを見出した。

又、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 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

Mase, M., Yamada, K., Iwata, A., Matsumoto, T, Seiki, K., Oda, H., and Urade, Y.: Acute and transient increase of lipocalin-type prostaglandin D synthase (-trace) level in cerebrospinal fluid of patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosci. Lett.* , 270, 188-190 (1999)

Beuckmann, C.T., Aoyagi, M., Okazaki, I., Hiroike, T., Toh, H., Hayaishi, O. and Urade, Y. Binding of biliverdin, bilirubin, and thyroid hormones to lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biochemistry*, 38, 8006-8013 (1999)

Inui, T., Ohkubo, T., Urade, Y., and Hayaishi, O. : Enhancement of lipocalin-type prostaglandin D synthase enzyme activity by guanidine hydrochloride. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 266, 641-646 (1999)

Kuwamoto, K., Miyauchi-Hashimoto, H., Tanaka, K., Eguchi, N., Inui, T., Urade, Y., and Horio, T.: Possible involvement of enhanced prostaglandin E2 production in the photosensitivity in xeroderma pigmentosum group a model mice. *J. Invest. Dermatol.*, 114, 241-246 (2000)

Matsuoka, T., Hirata, M., Tanaka, H., Takahashi, Y., Murata, T., Kabashima, K., Sugimoto, Y., Kobayashi, T., Ushikubi, F., Aze, Y., Eguchi, N., Urade, Y., Yoshida, N., Kimura, K., Mizoguchi, A., Honda, Y., Nagai, H. and Narumiya, S. : Prostaglandin D2 as a mediator of allergic asthma. *Science*, 287, 2013-2016 (2000)