

「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、三つの方向からのアプローチを進めている。(1) 脂質メディエーター合成酵素の分布および細胞内動態の解析、(2) 脂質メディエーターの細胞膜、核内受容体の単離と解析、さらに、(3) 脂質メディエーターの酵素や受容体の遺伝的改変マウスを用いた脳機能の解析である。現在のところ、脂質メディエーター産生の鍵を握るとされるホスホリパーゼA2や5-リポキシゲナーゼはCHO細胞に発現するとカルシウム刺激に応じて活性化されるが、その際は細胞質から核膜周囲に移行することが明らかとなり、核内受容体説を支持する結果が見いだされている。他方、エストロゲンなどのホルモンが細胞膜にも受容体を持つ予備的な結果も得られている。さらに、本研究室で世界に先駆けて作成された血小板活性化因子受容体欠損マウス、ホスホリパーゼA2欠損マウスなどの遺伝的純化が進められており、純系マウスを用いた脳機能の形態学及び機能解析の準備が進んでいる。

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。現在、(1)で述べた方法により、大脳抽出物よりリガンドスクリーニングを進めている。
- (3) 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、哺乳動物での遺伝子配列の極めて特殊な例であることが明らかとなった (現在、印刷中)。また、ミクログリアを活性化するロイコトリエンD 受容体を新たにマウスより単離した。現在、この性質の解明を進めている。
- (4) エストロジェンがHepG2以下いくつかの細胞で膜受容体を介すると思われる反応を引き起こすことを証明し、dual receptor仮説に一定の肯定的所見を得た。この内容は1999年のFASEB Conferenceで発表した。

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、さらに、LTA4水解酵素は細胞膜と核膜へと移行をすることが明らかとなりつつある。現在、酵素局在の責任配列の決定及び、神経細胞における局在の変化を解析している。

遺伝子改変マウスの研究

- (1) PAF受容体欠損マウス、細胞質型ホスホリパーゼA2欠損マウスの繁殖と遺伝的純化を待って、電気生理学的及び形態学的解析を進めている。PAF受容体欠損マウスは予想と反してLTP (長期増強) は普通に起こることがわかったが、シナプス伝達に異常が認められ、また、痛覚反応の著しい減弱が認められた。

さらに、実験的脳炎モデルにおいて、PAF受容体欠損マウスは著明な症状の減弱が認められた（以上は論文準備中）。細胞質型ホスホリパーゼA2欠損マウスは生殖系に異常があり、繁殖が困難であるが、現在、種々の解析のための遺伝的純化を進めている。また、この過程で、カイニン酸刺激により海馬歯状回に特異的に発現するcPLA2のアイソフォームを発見した。現在、この分子の解析を進めている。

- (2) ロイコトリエンB 受容体はこれを欠損させたES細胞を樹立したが、未だに生殖細胞に入らないなどのトラブルを抱えている。別のコンストラクトを形成している。

3 . 主な研究成果の発表（論文発表）

Masuda, K, Yokomizo, T, Izumi, T, Shimizu, T cDNA cloning and characterization of guinea-pig leukotirene B4 receptor. *Biochem. J.* 342, 79-85 (1999)

Toda, A, Yokomizo, T, Masuda, K, Nakao, A, Izumi, T, and Shimizu, T Cloning and characterization of rat leukotriene B4 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262, 806-812 (1999)