

# 輸送蛋白質から進化した PGD 合成酵素

「遺伝と変化」領域 江口 直美

## 研究の狙い・目的

リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素(L-PGDS)は、内因性の睡眠誘発物質である PGD<sub>2</sub> を産生する「酵素」としての機能と、細胞分化に関与するレチノイド(ビタミン A 群)を結合して輸送する「輸送蛋白質」としての機能を併せ持つユニークな蛋白質である。本さきがけ研究 21 では、ヒトを含む哺乳動物における L-PGDS の体内動態や細胞局在の検討及びこれら両機能の in vivo 解析を行い、生体での役割を探った。



## 研究成果

### 1) L-PGDS 遺伝子欠損マウスの作製：

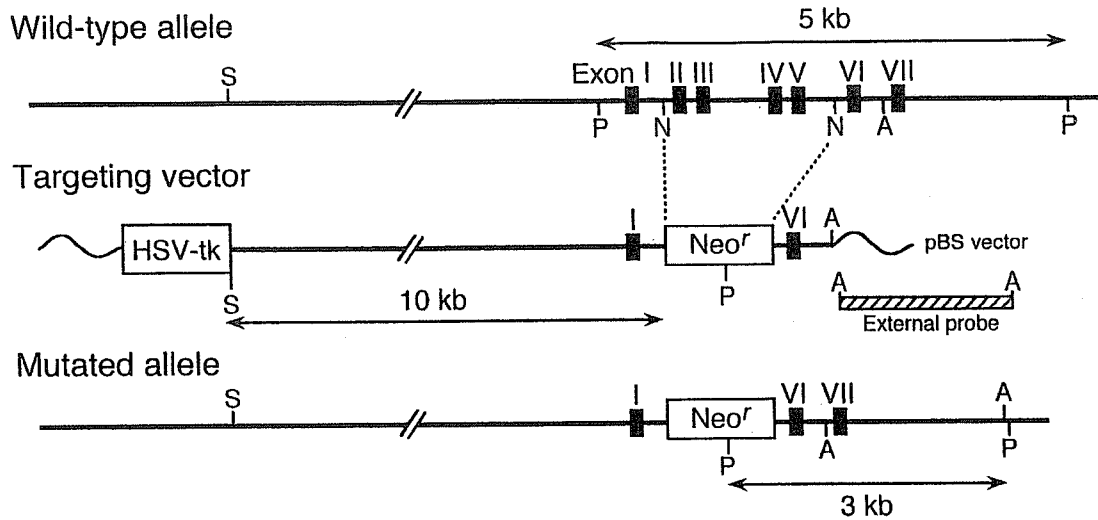
L-PGDS の生理機能を個体レベルで検討するために、マウス L-PGDS 遺伝子のクローニングを行いその構造を決定した。ひきつづき、遺伝子工学的手法を用いて L-PGDS 遺伝子を欠損させたマウスを作製した (Fig. 1)。その結果、L-PGDS の遺伝子欠損による胎仔致死性は認められなかった。

### 2) L-PGDS の微量定量法(ELISA)の開発と One-Step 精製法の確立：

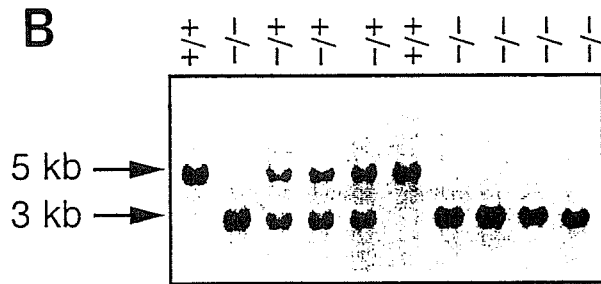
酵素活性測定により、L-PGDS がヒト・ラット・マウスの脳脊髄液などの体液中に分泌されることを見い出した。その挙動をより詳細に追跡するために、ヒト L-PGDS 特異的モノクローナル抗体を用いた微量定量法(ELISA)を開発した。また、標準曲線の作成に必要なヒト L-PGDS を調製するために、モノクローナル抗体を用いたイムノカラムを作製し、一回の操作で 80 %以上の回収率を示し、高純度の精製標品が得られる大量精製系を確立した (Fig.2)。その結果、ヒト脳脊髄液・尿・血清・精漿・羊水における L-PGDS の定量が可能になった。

**Fig.1.**

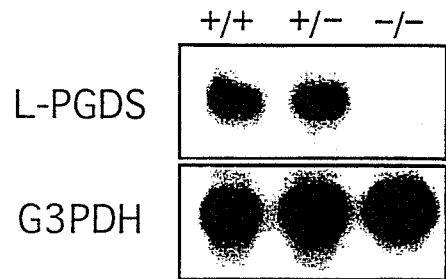
**A**



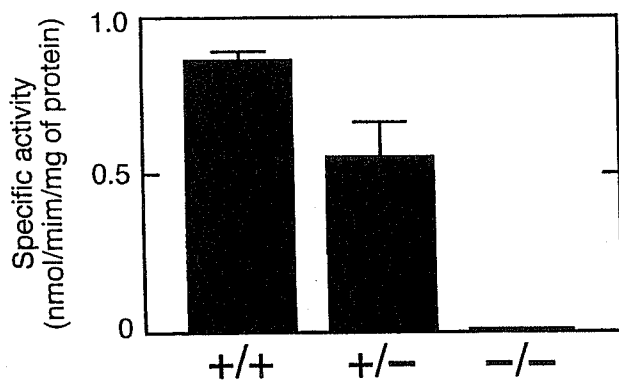
**B**



**C**



**D**



**E**



Fig. 1. L-PGDS 遺伝子欠損マウスの作製： A. マウス L-PGDS 遺伝子およびターゲティングベクターの構造と相同組換え法による L-PGDS 遺伝子の欠損。S, Sal I; P, Pvu II; A, Acl I. B. サザンブロット法による L-PGDS 遺伝子欠損の確認。マウス尾から抽出した DNA を Pvu II 処理後 External probe を用いると野生型 (+/+) は 5kb、欠損型 (-/-) は 3 kb の DNA fragment が検出される。C. ノーザンブロット法による L-PGDS mRNA 欠損の確認。D. 酵素活性測定による L-PGDS 蛋白質欠損の確認。E. L-PGDS 遺伝子欠損マウス (8 週齢)。

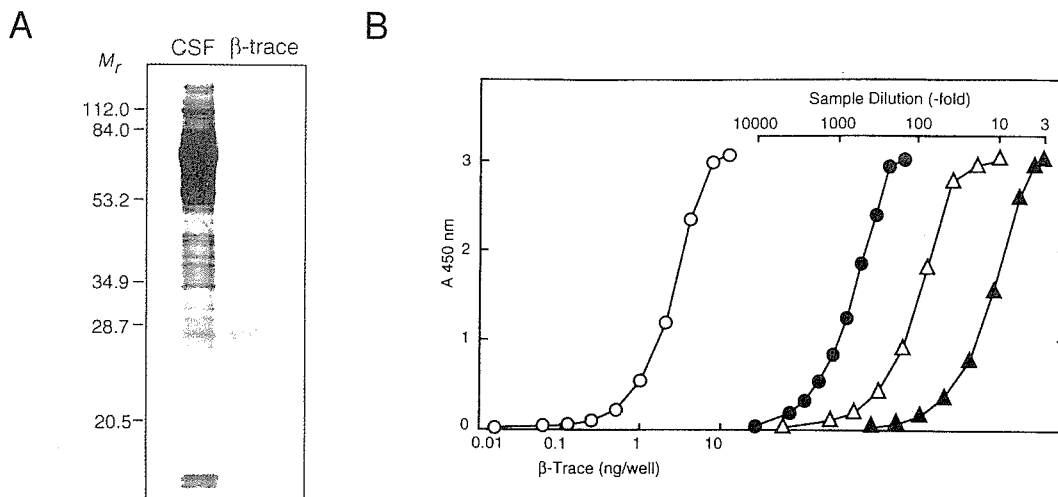


Fig. 2. ヒト L-PGDS( $\beta$ -trace)の One-Step 精製法と ELISA。

- A. One-Step 精製法によるヒト脳脊髄液(CSF)から  $\beta$ -trace の精製。写真は電気泳動後、銀染色を行った。
- B. ELISA による  $\beta$ -trace の標準曲線。○、精製  $\beta$ -trace；●、脳脊髄液；△、尿；▲、血清。

### 3) 中枢神経系：

(i)ラット L-PGDS は脳を取り巻くクモ膜の柱状細胞や網膜色素上皮細胞で活発に産生され、脳脊髄液や光受容細胞隔マトリックスへ分泌される (Fig. 3)。クモ膜での活発な産生は L-PGDS に特異的であり、他の脳脊髄液蛋白質群には認められない。

(ii)ヒト L-PGDS の微量定量法(ELISA)を用いて各種脳神経系疾患の患者脳脊髄液内 L-PGDS 濃度を測定した結果、クモ膜下出血の予後におこる血管攣縮前後に一過性の濃度上昇が認められた。

(iii)L-PGDS 遺伝子欠損マウスを用いて、 $PGD_2$  が接触による痛みの誘起を調節することが分かり、同時に脊髄における L-PGDS は  $PGD_2$  産生に関与していることが分かった。

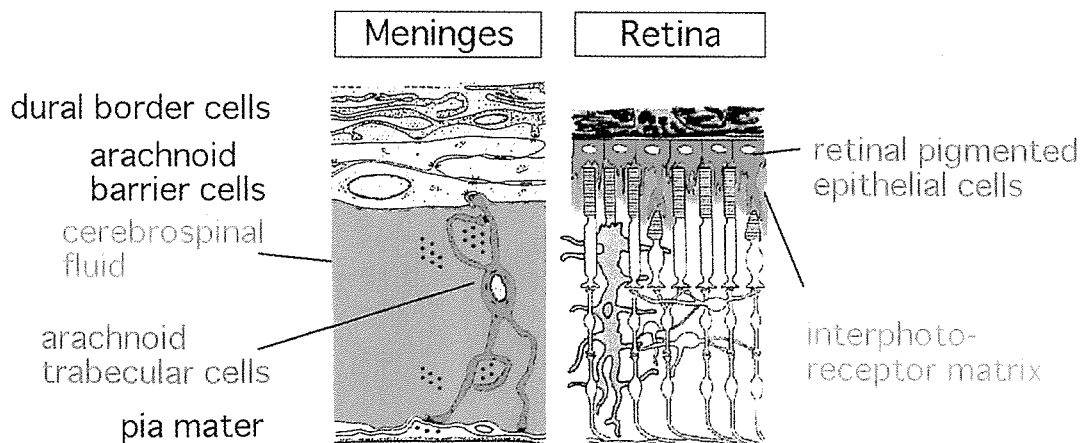


Fig. 3. クモ膜 Meninges と網膜 Retina における L-PGDS の産生 (赤色) と分泌 (柿色)。

#### 4) オス生殖器：

L-PGDS は精巣・副睾丸で産生され、精液中へ分泌される。男性不妊要因である精子減少症の患者精液中における L-PGDS 濃度は健常人に比べ有意に低いことがわかった (Fig. 4)。一方ウシ精液の高受胎率関連蛋白質として報告された SP26 が L-PGDS であることを明らかにした。精液中に PGD<sub>2</sub> は殆ど検出されないことより、L-PGDS 自体が精子の成熟やメス体内への物質輸送に参与する可能性がある。

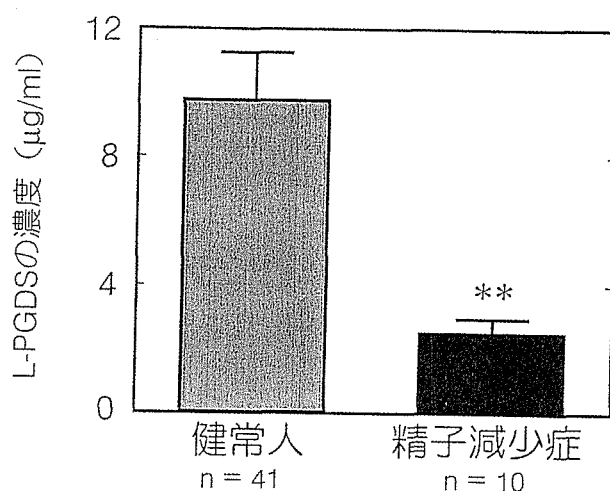


Fig. 4. ヒト精液中における L-PGDS の濃度。\*\*, 有意差検定 < 0.01。

#### 5) メス生殖器：

(i)L-PGDS は妊娠後期の胎仔中枢神経系で発現し、羊水中へ分泌される。その量は胎仔の成長に伴い増加した。同様の現象はヒトにおいても確認された。従って、L-PGDS は妊娠異常のマーカーとして有効である。

(ii)L-PGDS 欠損マウスの顕著な妊娠期間の延長と正常分娩が認められた。野生マウスでは妊娠中期の胎盤で特異的且つ一過性に L-PGDS が発現するため、胎盤での L-PGDS 欠損による胎仔の発育遅滞か、あるいは受精卵の着床遅延を予測している。

#### 6) 循環器系：

L-PGDS はヒト・サル・マウス心臓で活発に産生され、心筋細胞、心内膜・心外膜の内皮細胞に局在し (Fig. 5A)、さらに血中へ分泌される。また、安定狭心症患者の冠動脈内膜の病変巣において狭窄の進行に伴い出現する増殖型平滑筋細胞を抗 L-PGDS 抗体が認識した。この抗体反応は収縮型平滑筋細胞では認められない (Fig.5B)。L-PGDS は血小板凝集抑制作用を持つ PGD<sub>2</sub> の産生に参与していると考えられる。

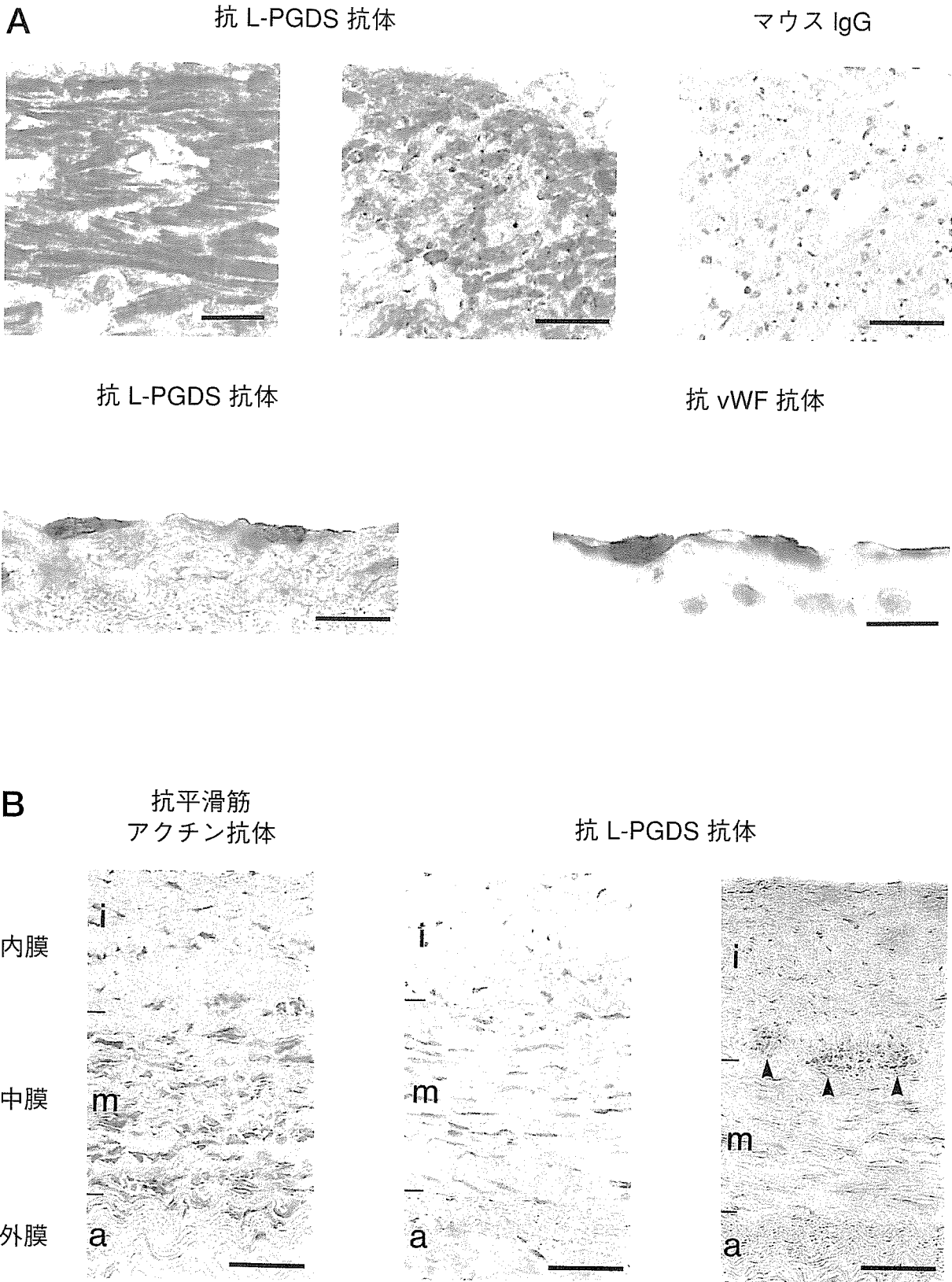


Fig. 5. ヒト心臓における L-PGDS の免疫組織化学。A. 心筋細胞と心内膜細胞における L-PGDS の局在。vWF は内皮細胞のマーカー。図中の黒線は上段が 50 ミクロン、下段が 10 ミクロン。B. 収縮型平滑筋細胞（左、中央）と増殖型平滑筋細胞（右、矢印）における L-PGDS の局在。図中の黒線は 50 ミクロン。

## 今後の展望

本研究期間中に、L-PGDS が予想外に多岐にわたる生理機能に関与することを見い出した。引き続き、L-PGDS のより詳細な細胞局在や内因性リガンドの同定、正常及び疾患時の動態を調べる。さらに L-PGDS 遺伝子欠損マウスを用いた分子行動生物学的、薬理的、電気生理学的機能解析を行っている。この研究成果は生体防御反応機構を含む生体のホメオスタシスの解明のみならず、治療方法や新薬の開発にもつながると確信している。

## 発表論文リスト

1. Eguchi, Y., Eguchi, N., Oda, H., Seiki, K., Kijima, Y., Matsu-ura, Y., Urade, Y., and Hayaishi, O.: Expression of lipocalin-type prostaglandin D synthase ( $\beta$ -trace) in human heart and its accumulation in the coronary circulation of angina patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press, 1997.
2. Tokugawa, Y., Kunishige, I., Kubota, Y., Shimoya, K., Nobunaga, T., Kimura, T., Saji, F., Murata, Y., Eguchi, N., Oda, H., Urade, Y., and Hayaishi, O.: Lipocalin-type prostaglandin D synthase in human male reproductive organs and seminal plasma. *Biol. Reprod.*, in press, 1997.
3. Gerena, R. L., Irikura, D., Urade, Y., Eguchi, N., Chapman, D. A., and Killian, G. J.: Identification of a fertility-associated protein in bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biol. Reprod.*, in press, 1997.
4. Hiraoka, A., Arato, T., Tominaga, I., Eguchi, N., and Urade, Y.: Sodium dodecyl sulfate capillary electrophoretic analysis of molecular mass heterogeneity of  $\beta$ -trace protein in cerebrospinal fluid from patients with central nervous system diseases. *J. Chromatography*; in press, 1997.
5. 江口直美、裏出良博: プロスタグランジン D 合成酵素の最近の研究成果. *Isotope News* (社団法人日本アイソトープ協会) 11月号、6~11頁、1997年.
6. Hiraoka, A., Arato, T., Tominaga, I., Eguchi, N., Oda, H., and Urade, Y.: Analysis of low-molecular-mass proteins in cerebrospinal fluid by sodium dodecyl sulfate capillary gel electrophoresis. *J. Chromatography B*, **697**: 141-147, 1997.
7. Kanaoka, Y., Ago, H., Inagaki, E., Nanayama, T., Miyano, M., Kikuno, R., Fujii, Y., Eguchi, N., Toh, H., Urade, Y., and Hayaishi, O.: Cloning and crystal structure of hematopoietic prostaglandin D synthase. *Cell*, **90**: 1085-1095, 1997.

8. Tanaka, T., Urade, Y., Kimura, H., Eguchi, N., Nishikawa, A., and Hayaishi, O.: Lipocalin-type prostaglandin D synthase ( $\beta$ -trace) is a newly recognized type of retinoid transporter. *J. Biol. Chem.*: **272**: 15789-15795, 1997
9. Beuckmann, C. T., Nomura, S., Eguchi, N., Kaneko, T., Mizuno, N., Urade, Y., and Hayaishi, O.: Immunohistochemical detection of prostaglandin D synthase in rat leptomeninges. in "*Various Problems at the Meninges*" (監修 ; 早石修、吉岡享、山下純宏) , SciMed Publications, Tokyo, 1997, pp108-113.
10. 裏出良博、江口直美、田中俊樹、早石修: 分泌型プロスタグランジンD合成酵素 (ベーター・トレース) の多機能性—脳脊髄液中の新たな輸送蛋白質としての可能性— in "*Various Problems at the Meninges*" (監修 ; 早石修、吉岡享、山下純宏) , SciMed Publications, Tokyo, 1997, pp. 92-99.
11. Yamashima, T., Sakuda, K., Tohma, Y., Yamashita, J., Oda, H., Irikura, D., Eguchi, N., Beuckmann, C. T., Kanaoka, Y., Urade, Y., and Hayaishi, O.: Prostaglandin D synthase ( $\beta$ -trace) in human arachnoid and meningioma cells: roles as a cell marker or in CSF absorption, tumorigenesis, and calcification process. *J. Neurosci.* **17**: 2376-2382, 1997
12. Eguchi, N., Kanaoka, Y., Urade, Y., and Hayaishi, O.: Expression and cellular localization of  $\beta$ -trace in genital organs. *Prostaglandins* **51**: 298, 1996.
13. Toh, H., Kubodera, H., Nakajima, N., Sekiya, T., Eguchi, N., Tanaka, T., Urade, Y., and Hayaishi, O.: Glutathione-independent prostaglandin D synthase as a lead molecule for designing new functional proteins. *Protein Engineering* **9**: 1067-1082, 1996.
14. Beuckmann, C. T., Gordon, W. C., Kanaoka, Y., Eguchi, N., Marcheselli, V. L., Gerashchenko, D. Y., Urade, Y., Hayaishi, O., and Bazan, N. G.: Lipocalin-type prostaglandin D synthase ( $\beta$ -trace) is located in pigmented epithelial cells of rat retina and accumulates within interphotoreceptor matrix. *J. Neurosci.* **16**: 6119-6124, 1996.
15. Oda, H., Eguchi, N., Urade, Y., and Hayaishi, O.: Quantitative sandwich immunosorbent assay of human secretory prostaglandin D synthase ( $\beta$ -trace). *Proc. Japan Acad.* **72**:108-111, 1996.
16. Takahata, R., Matsumura, H., Eguchi, N., Kantha, S. S., Satoh, S., Sakai, T., Kondo, N., and Hayaishi, O.: Seasonal variation in levels of prostaglandins  $D_2$ ,  $E_2$ , and  $F_{2a}$  in the brain of a mammalian hibernator, the Asian chipmunk. *Prostaglandins Leukotrienes Essent. Fatty Acids* **54**: 77-81, 1996.
17. Urade, Y., Tanaka, T., Eguchi, N., Kikuchi, M., Kimura, H., Toh, H., and Hayaishi, O.: Structural

and functional significance of cysteine residues of glutathione-independent prostaglandin D synthase. Identification of Cys<sup>65</sup> as an essential thiol. *J. Biol. Chem.* **270**: 1422-1428, 1995.

## その他

口頭発表 32 件 (うち海外 3 件)