

平成 21 年 5 月 26 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590094

研究課題名 (和文) プロスタグランジン D₂ の輸送と代謝に関する研究研究課題名 (英文) Lipocalin-type Prostaglandin D synthase; transporter and scavenger for Prostaglandin D₂

研究代表者

有竹 浩介 (ARITAKE KOSUKE)

財団法人大阪バイオサイエンス研究所・分子行動生物学部門・研究員

研究者番号：70390804

研究成果の概要：

酵素活性と低分子化合物輸送能を有する多機能タンパク質のリポカリン型プロスタグランジン (PG) D₂ 合成酵素 (L-PGDS) と、酵素反応生成物 PGD₂ の相互作用を調べたところ、LPGDS は PGD₂ と可逆的に結合する一方で、PGD₂ の分解物の 15d-PGJ₂ とは不可逆的に共有結合することが判明した。L-PGDS は細胞内では PGD₂ 産生を触媒し、細胞外では PGD₂ を安定的に標的組織まで輸送し、分解物を結合して不活化する作用を有すると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：

1. 研究開始当初の背景

生理活性脂質のプロスタグランジン (PG) D₂ は、中枢ではくも膜やオリゴデンドログリアで発現するリポカリン型 PGD 合成酵素 (L-PGDS) の触媒作用で産生され、脳脊髄液に分泌された後、前脳基底部のくも膜に局在する PGD 受容体に作用し情報を伝達する。しかし、PGD₂ は水溶液中では比較的不安定な物質であり、容易に脱水反応を起こして、PGJ₂、 Δ 12-PGJ₂、15-deoxy- Δ 12,14PGJ₂ などの J シリーズの PG へと変換するので、脳脊髄液には PGD₂ を安定化して標的組織に輸送する機

構が存在すると考えられるが、PGD₂ の生体内での代謝・排泄機構の詳細は不明である。L-PGDS (別名 β -trace) は、ヒト脳脊髄液の主要蛋白質であり、脂溶性低分子化合物の結合と輸送を行う分泌蛋白質により構成されるリポカリン遺伝子ファミリーに属し、PGD 合成酵素としての機能と脂溶性低分子化合物の輸送蛋白質としての機能を有する多機能蛋白質である。そこで、我々は脳脊髄液に分泌された生理活性脂質 PGD₂ の輸送と代謝にも L-PGDS が関与する可能性を考えた。

2. 研究の目的

プロスタグランジン (PG) D_2 は、末梢組織ではアレルギーや炎症反応のメディエータとして作用する。一方、中枢神経系の主要な PG としても産生され、睡眠や痛覚の調節に関与する生理活性脂質である。

リポカリン型酵素は、ヒト脳脊髄液の主要蛋白質である β -trace と同じ蛋白質であり、脂溶性低分子化合物の結合と輸送を行う分泌蛋白質により構成されるリポカリン遺伝子ファミリーに属する。L-PGDS は酵素活性を有するリポカリンとして初めて同定された蛋白質であり、PGD 合成酵素としての機能と脂溶性低分子化合物の輸送蛋白質としての機能を有する多機能蛋白質である。

本申請研究は、以下の研究結果と着想に基づく。

(1) L-PGDS は生理的な睡眠の調節に関与する PGD₂ の産生に関与する。

(2) L-PGDS は中枢神経系では脳膜やオリゴデンドログリアで産生され、脳脊髄液に分泌される。

(3) 一方、睡眠調節に関与する DP1 受容体は、前脳基底部のくも膜細胞に局在する。従って、くも膜やオリゴデンドログリアで産生された PGD₂ は、脳脊髄液に分泌された後、前脳基底部のくも膜に局在する DP1 受容体に作用して睡眠情報を伝達すると思われる。

(4) PGD₂ は水溶液中では比較的不安定な物質なので、脳脊髄液に PGD₂ を安定化して標的組織に輸送する機構が存在すると思われる。

(5) 睡眠を遮断 (断眠) すると、脳内や脳脊髄液中では L-PGDS の触媒によって PGD₂ が有意に増加する。また、脳損傷等の炎症時には、L-PGDS とマイクログリアに発現する H-PGDS の両酵素によって一過性に大量の PGD₂ が産生される。しかし、これらの条件下でも、末梢の血液や尿中では PGD₂ やその代謝物の変動がほとんど検出されない。

従って、産生された PGD₂ が脳内あるいは末梢で未知の分解物に代謝され、効率良く排泄されるためと考えられる。

L-PGDS は PGD₂ 産生を触媒する酵素であり、脳脊髄液の主要蛋白質である β -trace として脳脊髄液に分泌される。さらに、L-PGDS は脂溶性低分子の結合活性を有する。従って、脳脊髄液に分泌された PGD₂ の輸送と代謝にも L-PGDS が関与すると思われる。

そこで、L-PGDS と PGD₂ の相互作用について調べ PGD₂ の代謝・排泄機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) L-PGDS と PGD₂ の相互作用解析

① L-PGDS と PGD₂ の親和性測定

表面プラズモン共鳴法や電気泳動法によって親和性を測定する。

② L-PGDS と PGD₂ 複合体構造決定

NMR によって PGD₂ の結合領域を同定する。

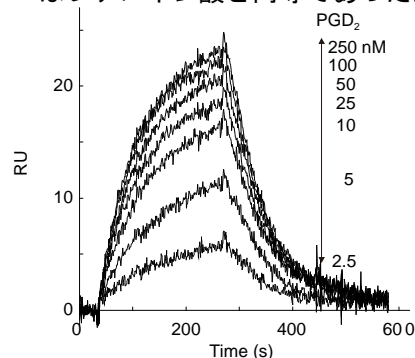
(2) L-PGDS/PGD₂ 複合体の検出・測定

① 複合体をクロマトグラム法によって分離分析方法を確立する。

② L-PGDS/PGD₂ 複合体を特異的に認識する抗体作製し、免疫組織化学染色や ELISA 測定系を確立する。抗体作製には L-PGDS 遺伝子欠損マウスを用いる。

4. 研究成果

① 表面プラズモン共鳴法を用いて結合実験を行ったところ、L-PGDS は PGD₂ と可逆的に結合し (KD = 20 nM)、その結合親和性はレチノイン酸と同等であった。



② NMR による PGD₂ のタイトレーション実験の結果、PGD₂ は酵素活性中心 Cys65 を取り巻く疎水性ポケット付近に結合することが判明した。

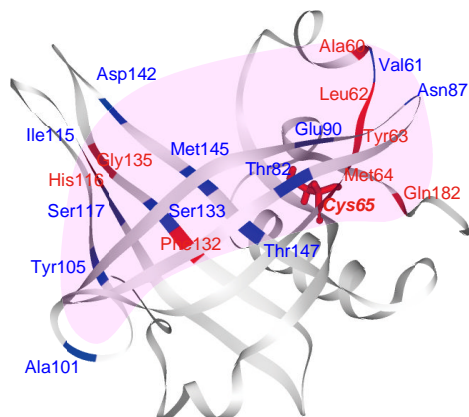


図 NMR 法による PGD₂ 結合領域の同定

③ ^3H -PGD₂ を緩衝液中でアルブミンあるいは L-PGDS の存在下に反応させると、アルブミン存在下に PGD₂ は PGJs へ分解されたが、L-PGDS 存在下では反応開始から 24 時間後まで反応上清中には PGJs は検出されず、蛋白質画分の放射活性が反応時間依存的に増加した。

④ PGD₂ は PGJs に分解された後、L-PGDS に不可逆的に結合すると考えられたので、PGJs を L-PGDS と共存させたところ、PGJs は、5 分以内に L-PGDS に不可逆的に結合し、L-PGDS と 15d-PGJ₂ の複合体のアミノ酸分析を行ったところ、酵素活性中心の Cys65 に結合していることも判明した。

これらの結果から、PGD₂ は産生後に細胞外へ分泌され、脳脊髄液中の L-PGDS に捕捉されて標的組織まで輸送され、DP 受容体を刺激して情報を伝達する。一方、PGJs は、L-PGDS に強固に結合して不活化され排泄されると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- 1) Irikura D, Aritake K, Nagata N, Maruyama T, Shimamoto S, Urade Y. Biochemical, functional, and pharmacological characterization of AT-56, an orally active and selective inhibitor of lipocalin-type prostaglandin D synthase. *J Biol Chem.* 2009. 284(12):7623-30.
- 2) Murata T, Lin MI, Aritake K, Matsumoto S, Narumiya S, Ozaki H, Urade Y, Hori M, Sessa WC. Role of prostaglandin D2 receptor DP as a suppressor of tumor hyperpermeability and angiogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008. 105(50):20009-14.
- 3) Fujimori K, Aritake K, Urade Y. Enhancement of prostaglandin D₂ production through cyclooxygenase-2 and lipocalin-type prostaglandin D synthase by upstream stimulatory factor 1 in human brain-derived TE671 cells under serum starvation. *Gene.* 2008. 426(1-2):72-80.
- 4) Tajima T, Murata T, Aritake K, Urade Y, Hirai H, Nakamura M, Ozaki H, Hori M. Lipopolysaccharide induces macrophage migration via

prostaglandin D₂ and prostaglandin E₂. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008. 326(2):493-501.

- 5) Shimamoto S, Yoshida T, Inui T, Gohda K, Kobayashi Y, Fujimori K, Tsurumura T, Aritake K, Urade Y, Ohkubo T. NMR solution structure of lipocalin-type prostaglandin D synthase: evidence for partial overlapping of catalytic pocket and retinoic acid-binding pocket within the central cavity. *J Biol Chem.* 2007. 282(43):31373-9.
- 6) Fujimori K, Aritake K, Urade Y. A novel pathway to enhance adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells by up-regulation of lipocalin-type prostaglandin D synthase mediated by liver X receptor-activated sterol regulatory element-binding protein-1c. *J Biol Chem.* 2007. 282(25):18458-66.
- 7) Kanekiyo T, Ban T, Aritake K, Huang ZL, Qu WM, Okazaki I, Mohri I, Murayama S, Ozono K, Taniike M, Goto Y, Urade Y. Lipocalin-type prostaglandin D synthase/beta-trace is a major amyloid beta-chaperone in human cerebrospinal fluid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007. 104(15):6412-7.

[学会発表] (計 4 件)

- 1) 有竹 浩介 「Lipocalin-type prostaglandin D synthase is a transporter and a scavenger of prostaglandin D₂」 33rdFEBS Congress&11th IUBMB Conference, 2008 年 7 月 3 日, アテネ
- 2) 有竹 浩介 「リポカリン型 PGD 合成酵素の PGD₂ の輸送と結合に関する解析」 第 81 回日本生化学会大会、2008 年 12 月 12 日、神戸ポートアイランド (神戸国際会議場, 神戸国際展示場, 神戸ポートピアホテル)
- 3) 裏出 良博 「リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素の輸送蛋白としての機能について」 第 80 回日本生化学会大会、2007 年 12 月 13 日、パシフィコ横浜
- 4) 鶴村 俊治 「リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素における構造学および生化学的解析」 第 80 回日本生化学会大会、2007 年 12 月 14 日、パシフィコ横浜

[図書] (計 1 件)

Urade, Y. & Aritake, K. Multifunctional properties of lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Prostaglandin D₂ Synthase—A Multitude of Biological Functions*, 2007 (ed. by Ragolia, L.), Research Signpost, Kerala India, Chapter 4, 47–62 (2007)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有竹 浩介 (ARITAKE KOSUKE)
分子行動生物学部門・研究員
研究者番号： 70390804

(2) 研究分担者

藤森 功 (FUJIMORI KO)
大阪薬科大学薬学部生体防御研究室・講師
研究者番号： 70425453

黄 志力 (Zhi-Li HUANG)

分子行動生物学部門・研究員

研究者番号： 10321704

星川 有美子 (HOSHIKAWA YUMIKO)

分子行動生物学部門・研究員

研究者番号： 10390808

丸山 俊彦 (MARUYAMA TOSHIHIKO)

分子行動生物学部門・研究員

研究者番号： 70414133

(3) 連携研究者