

機関番号：34521
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20500346
 研究課題名（和文）15デオキシデルタ12、14-プロスタグランジン J₂膜標的分子の同定
 研究課題名（英文）Identification of membrane targets for 15-deoxy $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂
 研究代表者
 矢上 達郎（YAGAMI TATSUROU）
 姫路獨協大学・薬学部・教授
 研究者番号：00363812

研究成果の概要（和文）：15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂) 膜特異的結合部位の神経変性への関与を見出し、プロテオーム解析により11種の標的タンパク質を同定した。標的は、解糖系酵素（神経特異的エノラーゼ・ピルビン酸キナーゼM1・グリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素）、分子シャペロン（熱ショックタンパク質8・Tコンプレックスタンパク質1）および細胞骨格タンパク質（アクチン β ・Fアクチンキャッピングタンパク質、チューブリン β ・インターネキシン α ）に分類された。

研究成果の概要（英文）：We found that specific binding sites of 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂) was involved in the neurodegeneration. A proteomic approach was used to identify protein targets for 15d-PGJ₂ in the plasma membrane. By using biotinylated 15d-PGJ₂, eleven proteins were identified as biotin-positive spots and classified into three different functional proteins: glycolytic enzymes (Enolase2, pyruvate kinase M1 (PKM1) and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)), molecular chaperones (heat shock protein 8 and T-complex protein 1 subunit α), cytoskeletal proteins (Actin β , F-actin-capping protein, Tubulin β and Internexin α). GAPDH, PKM1 and Tubulin β are A β -interacting proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学、神経化学・神経薬理学

キーワード：①神経科学 ②薬理学 ③脳 ④脳神経疾患 ⑤脂質

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病原因タンパク質のアミロイド β を神経細胞に作用させると、プロスタグランジン D₂ (PGD₂) が一過性に産生され、アポトーシスが誘発された [Yagami et al., *Br J Pharmacol* **2001**, 134, 673]。また、アルツハイマー病患者死後脳の海馬アストロサイトにおいて分泌型ホスホリパーゼ A₂ (sPLA₂) が産生

され、アミロイド β をアストロサイトに作用させると sPLA₂ が分泌される (*J. Neuroinflammation* **2006** 3, 28)。sPLA₂を神経細胞に作用させると、PGD₂ が一過性に産生され、アポトーシスが誘発された [Yagami et al., *Mol Pharmacol* **2002**, 61, 114]。Conventional eicosanoids 中 PGD₂ のみに神経細胞毒性を見出されたが、その受容体拮抗剤によって抑制さ

れず、大脳皮質細胞膜に $[^3\text{H}]\text{PGD}_2$ の特異的結合部位は検出されなかった。我々は、 PGD_2 がその非酵素的代謝産物 15 デオキシ-デルタ 1 2, 1 4-プロスタグランジン J_2 (15dPGJ_2) を介してアポトーシスを誘導していることを突き止め[特許 2000-300775]、他グループからも追認された (*Neuroreport* **2001**, 12, 839)。 15dPGJ_2 は、核内受容体 peroxysome-proliferator activated receptor γ (PPAR γ) を介して炎症活性などの生理作用を示す。しかし、PPAR γ activator に神経細胞毒性は検出されず、むしろ PPAR γ を介する神経細胞保護作用が報告されている (*J Neurosci.* **2000**, 20, 6862)。

15dPGJ_2 は細胞膜を透過して生理作用を示している信じられてきたが、T 細胞 (Th2) において 15dPGJ_2 膜受容体 (CRTH2) が報告されている。CRTH2 は PGD_2 に対し高親和性を示すことから DP2 とも呼ばれているが、 15dPGJ_2 が DP2 を介して神経細胞死を誘発している可能性は、1) DP2 アゴニストである 15dPGD_2 に神経細胞毒性は検出されず、2) DP2 に親和性を示さない PGA_2 に神経細胞毒性および 15dPGJ_2 特異的結合部位への親和性が検出されたことから否定されている。

我々は、 $[^3\text{H}]\text{15dPGJ}_2$ の特異的結合部位を大脳皮質細胞膜上に検出し、ヒル係数が 1 より小さいことから少なくとも 2 種類の負の協調性を示す結合部位が存在することを見出した。アポトーシス誘導能と特異的結合部位に対する親和性に相関性が認められ、 15dPGJ_2 は膜特異的膜結合部位を介してアポトーシスを誘導していると考えられた (Yagami *et al.*, **2006**, *Neurosci. Res.* 55, S58)。我々は、ビオチン標識 15dPGJ_2 を用い、膜標的タンパク質の分離・同定に成功した。

2. 研究の目的

(1) PPAR γ および CRTH2 非依存性 15dPGJ_2 細胞毒性

- ① 15dPGJ_2 細胞毒性
- ② $[^3\text{H}]\text{15dPGJ}_2$ 結合実験

(2) 15dPGJ_2 膜標的タンパク質の同定

- ① ビオチン標識 15dPGJ_2 細胞毒性
- ② 15dPGJ_2 膜標的タンパク質の同定

3. 研究の方法

(1) PPAR γ および CRTH2 非依存性 15dPGJ_2 細胞毒性

① 15dPGJ_2 細胞毒性

細胞毒性は MTT アッセイにより評価した。繊維芽細胞および肝細胞に対し 15dPGJ_2 による細胞毒性は検出できなかった。一方、大脳皮質神経細胞および気管支平滑筋細胞においては、濃度依存的な 15dPGJ_2 細胞毒性が検出された。同様に、繊維芽細胞および肝細胞に対しアミロイドタンパク質

による細胞毒性は検出できなかったが、大脳皮質神経細胞および気管支平滑筋細胞においては、濃度依存的なアミロイド細胞毒性が検出された。 15dPGJ_2 細胞毒性は、PPAR γ アゴニストで模倣されず、PPAR γ アンタゴニストで抑制されなかった。

② $[^3\text{H}]\text{15dPGJ}_2$ 結合実験

大脳皮質神経細胞および気管支平滑筋細胞より細胞膜画分を調製した。いずれの細胞膜においても $[^3\text{H}]\text{15dPGJ}_2$ に対する特異的結合部位が検出された。特異的結合部位に対する親和性は、 $15\text{dPGJ}_2 > \Delta 12\text{PGJ}_2 > \text{PGJ}_2 > \text{PGD}_2$ となり、 15dPGJ_2 が最も強かった。大脳皮質神経細胞および気管支平滑筋細胞にたいする毒性を評価した結果、 $15\text{dPGJ}_2 > \Delta 12\text{PGJ}_2 > \text{PGJ}_2 > \text{PGD}_2$ となり、 15dPGJ_2 が最も強く、膜特異的結合部位と細胞毒性との関連を支持する結果となった。

(2) 15dPGJ_2 膜標的タンパク質の同定

① ビオチン標識 15dPGJ_2 の細胞毒性

15dPGJ_2 の分子量が 316.4 であるのに対し、ビオチン標識 15dPGJ_2 の分子量は 626.9 とほぼ倍である。ビオチン標識 15dPGJ_2 も濃度依存的に神経細胞死を惹起し、 LD_{50} は約 $1\ \mu\text{M}$ で 15dPGJ_2 の LD_{50} とほぼ同程度であった。細胞死により、ビオチン標識 15dPGJ_2 は 15dPGJ_2 と類似の形態的变化も誘導し、神経細胞毒性においてビオチン標識 15dPGJ_2 と 15dPGJ_2 の力価は同程度であることが確認された。

② 15dPGJ_2 膜標的タンパク質の同定

神経細胞膜 ($400\ \mu\text{g}$) に $1\ \mu\text{M}$ ビオチン標識 15dPGJ_2 を 4 度終夜で結合させ、等電点と分子量を指標に 2 次元電気泳動で展開させた。抗ビオチン抗体でウエスタンブロットし、 15dPGJ_2 膜標的タンパク質のスポットを得た。 $1\ \mu\text{M}$ ビオチン標識 15dPGJ_2 に非標識 15dPGJ_2 を $10\ \mu\text{M}$ 或いは $100\ \mu\text{M}$ 添加し、特異的結合の確認された 2 2 のスポットを得た。シプロルビーで染色したゲルより、相当する 2 2 スポットを切り出し、トリプシン消化を行い、質量分析を行い、2 2 のスポットは 1 1 種のタンパク質に同定された。

4. 研究成果

同定された 1 1 種のタンパク質は、解糖系酵素 (PKM1: Pyruvate kinase M1, Enolase1: non-neuronal enolase α , Enolase2: neuronal enolase γ , GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), 分子シャペロン (Hspa8: Heat shock cognate 71 kDa protein, TCP-1 α : T-complex protein 1 subunit α) および細胞骨格 (Actin β , CapZ α -2:

F-actin-capping protein subunit α -2, internexin α , Tubulin β 2b, GFAP: Glial fibrillary acidic protein) であった。Actin β は、他の細胞で 15d-PGJ₂ 標的タンパク質として既に報告されている (*Biochemistry* **2007** 46:2707)。15d-PGJ₂ 標的タンパク質 PKM1, Enolase 2, GAPDH はアミロイド β と、GAPDH, Hspa8 はアミロイド前駆タンパク質と、GAPDH, Tublin \cdot はアミロイド斑と、Actin β , Tublin β はタウタンパク質と相互作用することが報告されており (*J Neurochem* **2005**, 94, 617)、我々の提唱する 15d-PGJ₂ 神経変性メディエーター仮説を強く支持する結果となった。

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 3 件)

- ① Yamamoto Y, Fujita M, Kouhama H, Yamamori M, Nakamura T, Okamura N, Yagami T. 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 enhanced the anti-tumor activity of camptotecin against renal cell carcinoma independently of topoisomerase-II and PPAR γ pathways. *Biochim Biophys Res Commun* 2011; in press
- ② Yamamoto Y, Takase K, Kishino J, Fujita M, Okamura N, Sakaeda T, Fujimoto M, Yagami T. Identification of novel protein targets for modification by 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 in neuronal plasma membrane. *PLoS ONE* 2011; 6(3): e17552
- ③ Yagami T, Takase K, Yamamoto Y, Ueda K, Takasu N, Okamura N, Sakaeda T, Fujimoto M. Fibroblast growth factor 2 induces apoptosis in the early primary culture of rat cortical neurons. *Exp Cell Res*. 2010; 316 (14): 2278-2290.

[学会発表] (計 9 件)

- ① Yagami T. Biological Effects of Blood Glucose Level Control Pharmaceutical Sciences World Congress 2010, November 14-18 (New Orleans, Louisiana, USA) (invited).
- ② Yamamoto Y, Takase T, Fujita M, Okamura N, Sakaeda T, Yagami T. Camptothecin enhanced anti-tumor activity of 15-deoxy- Δ 12, 14-prostaglandin J2 in renal cell carcinoma. *J Pharmacol Sci*. 2011; 115 (Sup 1): 278P 第 84 回日本薬理学会年会 P3J19-2 2011. 3. 24 (横浜)
- ③ 田路千明、藤田恵、澤田京子、山森元博、

山本泰弘、高瀬堅吉、矢上達郎、岡村昇 腎臓がん細胞における 15-deoxy- Δ 12, 14-prostaglandin J2 の抗腫瘍効果 日本薬学会第 131 年会 29P-0780、2011. 3. 29 (静岡)

- ④ 藤尾弥希、藤田恵、田路千明、澤田京子、山森元博、山本泰弘、高瀬堅吉、矢上達郎、岡村昇 腎臓がん細胞におけるトログリタゾンの抗腫瘍効果に対する p38 MAPK 経路の役割 日本薬学会第 131 年会 29P-0781 2011. 3. 29 (静岡)
- ⑤ Yagami T, Yamamoto Y, Takase K, Okamura N, Sakaeda T. Identification of novel protein targets for 15-deoxy- Δ 12, 14-prostaglandin J2 in neuronal plasma membranes. 第 33 回日本神経科学大会 01-7-3-2 2010. 9. 2 (神戸)
- ⑥ 藤田恵、田路千明、澤田京子、山本泰弘、高瀬堅吉、矢上達郎、岡村昇. 腎臓がん細胞におけるトログリタゾンの抗腫瘍活性の検討 日本薬学会第 130 年会 28P-pm362Q 2010. 3. 28 (岡山)
- ⑦ Yamamoto Y, Takase K, Matsumoto J, Yoshida T, Nakamura T, Okamura N, Sakaeda T, Okamura K, Yagami T. *J Pharmacol Sci*. 2010; 112 (Suppl): 260P. Hypoxia induced upregulation of VEGF in renal cell carcinoma via VHL-independent pathways. 第 83 回日本薬理学会年会 P3J-21-3 2010. 3. 18 (大阪)
- ⑧ Yagami T, Takase K, Yamamoto Y. Identification of novel protein targets for modification by 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 in neuronal plasma membranes. *Neurosci Res*. 2009; 65 (Suppl): S245 第 32 回日本神経科学大会 P3-112 2009. 9. 18 (名古屋)
- ⑨ Yagami T, Takase K. A possible involvement of 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 in amyloidosis. *Neurosci Res*. 2008; 61 (Suppl): S146. 第 31 回日本神経科学大会 P3-q13. 2008. 11 (東京)

[その他]

ホームページ

http://www.himeji-du.ac.jp/faculty/dp_pharm/pharm/ph3/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢上 達郎 (YAGAMI TATSUROU)

姫路獨協大学・薬学部・教授

研究者番号：00363812

(2)研究分担者

高瀬 堅吉 (TAKASE KENICHI)

姫路獨協大学・薬学部・講師

研究者番号：80381474