

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月25日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590074

研究課題名（和文） プロスタグランジン E2 の産生系と分解系のクロストーク機構の解析

研究課題名（英文） Studies on the crosstalk between biosynthesis and degradation of prostaglandin E2

研究代表者 中谷 良人 (NAKATANI YOSHIHITO)

昭和大学・薬学部・講師

研究者番号：80266163

研究成果の概要（和文）：代表的な生理活性脂質であるプロスタグランジン E2 (PGE₂)の産生の最終段階を触媒する酵素である細胞質型 PGE 合成酵素(cPGES/p23)は、PGE₂ を細胞内で不活性化する酵素である 15-ヒドロキシ PG デヒドロゲナーゼ(15-PGDH)の発現を促進することが明らかになった。この結果は、PGE₂ 産生酵素である cPGES/p23 が PGE₂ の不活性化経路を調節する可能性を示唆するものである。

研究成果の概要（英文）：We revealed that cytosolic prostaglandin E synthase (cPGES/p23) which isomerizes PGH₂ to PGE₂, promotes the expression of 15-hydroxyPG dehydrogenase (15-PGDH), which catalyzes the inactivating conversion of the PGE₂ 15-OH to a 15-keto group. This result suggests that the PGE₂-inactivating pathway is controlled by the PGE₂ biosynthetic enzyme, cPGES/p23.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：プロスタグランジン E₂、cPGES/p23、15-PGDH

1. 研究開始当初の背景

中枢から末梢において多彩な生理活性を有し、生体内に最も豊富に存在するプロスタノイドであるプロスタグランジン E₂ (PGE₂)は生体のホメオスタシスの維持のみならず、炎症性疾患、発熱、動脈硬化、脳梗塞、癌などの様々な疾患に関与することが示されてきた。しかし、PGE₂ の生合成経路の最終段階をつかさどる PGE 合成酵素(PGES)は、最近までその本体が同定されていなかった。申請者は細胞質型 PGES (cPGES)をラット脳可溶性画分より精製し構造決定に成功した。23 kDa の本酵素の触媒活性はグルタチオン依

存性であり、生体内の広範な臓器に恒常的に分布し、アラキドン酸カスケードの上流に位置するシクロオキシゲナーゼ(COX)のうち常在型酵素である COX-1 と機能的に連関して即時的 PGE₂ 産生に関与することを示した。cPGES の一次構造は、既に分子シャペロンタンパク質のひとつである熱ショックタンパク質 90 (Hsp90)と結合するタンパク質として同定されていた p23 と同一であることがわかった。生体内においてプロスタノイドの産生量は厳密に調節されていることが知られている。例えばアラキドン酸代謝経路の最も上流に位置する細胞質ホスホリパーゼ A₂α

(cPLA₂α) は細胞内カルシウム濃度上昇および MAP キナーゼによるリン酸化により活性化される。申請者はこれまでに *in vitro* で cPGES/p23 が Hsp90 と結合することにより酵素活性が上昇すること、Hsp90 により調節されるタンパク質の一つであるプロテインキナーゼ CK2 によるリン酸化で最大の酵素活性を示すことを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

cPGES/p23欠損に伴って、いくつかの遺伝子群の発現が顕著に低下したことから、cPGES/p23を遺伝子転写調節関連因子として注目し、本現象へのcPGES/p23の関与メカニズムを分子レベルで解き明かすことを目指す。申請者がcPGES/p23と相互作用する分子として同定したYAF-2の寄与、cPGES/p23がPGE₂産生を介して機能するのか、あるいは分子シャペロン系を介して機能するのかを明らかにすることを旨とする。

これまでの研究では PGE₂ の産生系と分解系に関する研究がそれぞれ独立して行われてきた。しかし、実際の生体内では産生と分解のバランスにより局所の PGE₂ 濃度が決定されているはずである。PGT は細胞外からの PGE₂ の取り込みに、15-PGDH は取り込んだ PGE₂ の不活性化に関わることが示唆されているので、cPGES/p23 欠損により PGT や 15-PGDH などの PGE₂ の分解系に関わる遺伝子の発現が低下したことは、cPGES/p23 がこれらの遺伝子発現のスイッチを入れ、組織中の PGE₂ 量を調節している可能性を示唆している。本研究では本現象の分子メカニズムを解明することで、組織内 PGE₂ 量の調節機構の全貌が明らかになると考える。

3. 研究の方法

(1) 15-PGDH による細胞外 PGE₂ 濃度調節
cPGES/p23 欠損マウス胎児より線維芽細胞を調製し、15-PGDH 発現プラスミドを遺伝子導入した際の細胞外 PGE₂ 濃度を検討した。また、cPGES/p23 に特異的な shRNA を発現する培養線維芽細胞株(3Y1)を樹立し、インターロイキン 1β で刺激した際の PGE₂ 産生を検討した。

(2)15-PGDH のプロモーター解析

PG 類の分解に関わる 15-PGDH の遺伝子発現に対する cPGES/p23 の効果を、それぞれの遺伝子の 5' 上流領域をクローニングし、ルシフェラーゼ発現系を用いたプロモーターアッセイで明らかにする。申請者が cPGES/p23 を介した即時的 PGE₂ 産生を起こすことを明らかにしているラット線維芽細胞株 3Y1 に cPGES/p23 発現ベクターと PGT あるいは 15-PGDH のプロモーター領

域の下流にルシフェラーゼ遺伝子を連結したレポーターベクターを共発現して、ルシフェラーゼ活性を測定し転写活性を調べた。

4. 研究成果

(1)cPGES/p23 欠損線維芽細胞では顕著に 15-PGDH の発現低下が観察される。本細胞に 15-PGDH を一過的に強制発現すると、空ベクターを導入した場合に比べて、細胞外の PGE₂ 濃度が有意に低下した。この結果は、細胞外の PGE₂ 濃度が 15-PGDH の発現量により調節されている可能性を示唆している (図 1)。

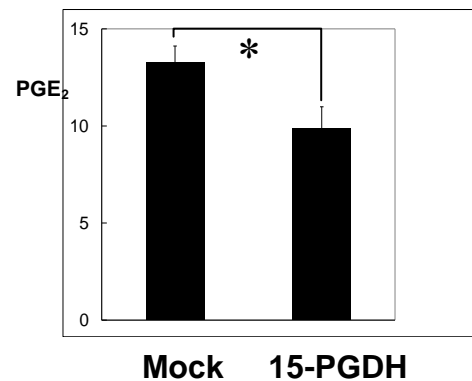


図 1 cPGES/p23 欠損線維芽細胞に対する 15-PGDH 強制発現の効果

ラット培養線維芽細胞株 3Y1 に cPGES/p23 に対する shRNA を恒常的に発現可能なプラスミドを導入し、安定発現株を樹立した。cPGES/p23 ノックダウン細胞は 15-PGDH の発現低下が観察された。本細胞株をインターロイキン 1β で刺激して遅発的 PGE₂ 産生を惹起すると、コントロール細胞を用いた場合と比較して、有意な細胞外 PGE₂ 濃度の上昇が観察された (図 2)。

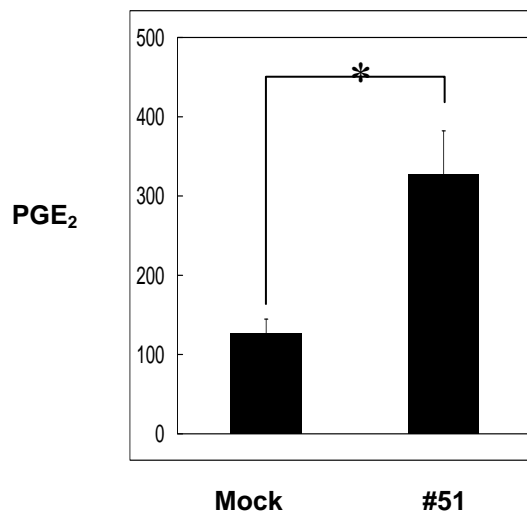


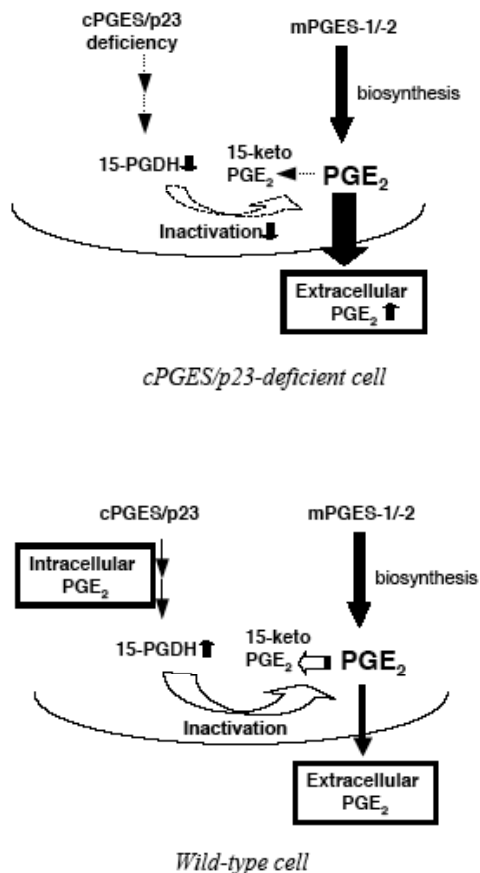
図 2 cPGES/p23 ノックダウン細胞(#51)の

遅発的 PGE₂ 産生

これまでの研究で cPGES/p23 は遅発的 PGE₂ 産生にはほとんど関与しないことを明らかにしてきた。本研究でも cPGES/p23 ノックダウンは遅発的 PGE₂ 産生に影響しないことが想定されるので、15-PGDH の発現低下が細胞外の PGE₂ 濃度の上昇に寄与したことが考えられた。

(2)マウスの 15-PGDH プロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子上流に導入したベクターを cPGES/p23 発現プラスミドあるいは cPGES/p23 (Y9N) (酵素活性欠失変異体) 発現プラスミドと共に 3Y1 細胞にトランスフェクションし、レポーター遺伝子アッセイを行った。cPGES/p23 発現プラスミドを導入した場合、有意な転写活性の上昇が検出された。これに対して cPGES/p23 (Y9N) 発現プラスミドの場合は、転写活性の上昇が見られなかった。従って、cPGES/p23 が 15-PGDH の転写活性化に関与することが示唆された。さらに、この現象は cPGES/p23 の酵素活性を持たない変異体を発現した場合には観察されなかったので、15-PGDH の転写活性化には cPGES/p23 の産物である PGE₂ が寄与することが考えられた。

以上の解析から、以下のようなスキームが考えられた。



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 3 件)

(1) Nakatani Y, Hokonohara Y, Tajima Y, Kudo I, Hara S. Involvement of the constitutive prostaglandin E synthase cPGES/p23 in expression of an initial prostaglandin E2 inactivating enzyme, 15-PGDH. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 94:112-117 (2011)

(2) Yoda E, Hachisu K, Taketomi Y, Yoshida K, Nakamura M, Ikeda K, Taguchi R, Nakatani Y, Kuwata H, Murakami M, Kudo I, Hara S. Mitochondrial dysfunction and reduced prostaglandin synthesis in skeletal muscle of Group VIB Ca²⁺-independent phospholipase A2γ-deficient mice. *J Lipid Res.* 51:3003-3015 (2010)

(3) Kamei D, Murakami M, Sasaki Y, Nakatani Y, Majima M, Ishikawa Y, Ishii T, Uematsu S, Akira S, Hara S, Kudo I. Microsomal prostaglandin E synthase-1 in both cancer cells and hosts contributes to tumour growth, invasion and metastasis. *Biochem J.* 425:361-371 (2009)

[学会発表] (計 8 件)

(1) 中谷良人、高村茜、中坪智美、原俊太郎、cPGES/p23 の細胞内機能の解析 日本薬学会第 132 年会、平成 24 年 3 月 29 日、札幌

(2) 中谷良人、岡村恵理子、無藤大地、加倉井優、大本俊介、原俊太郎、細胞質型プロスタグランジン E 合成酵素 cPGES/p23 の解析 フォーラム 2011 衛生薬学・環境トキシコロジー、平成 23 年 10 月 27 日、金沢

(3) 岡村浩志、高村茜、中谷良人、原俊太郎、ケラチノサイトの細胞生存に対するプロスタグランジン E2 の影響 日本薬学会第 131 年会、平成 23 年 3 月 30 日、静岡

(4) 岡村浩志、高村茜、中谷良人、原俊太郎、ケラチノサイトを用いたプロスタグランジン E2 の細胞死への関与の解析 第 83 回日本生化学会大会、平成 22 年 12 月 10 日、神戸

(5) 岡村浩志、中谷良人、原俊太郎、ケラチノサイトを用いたプロスタグランジン E2 の細胞死への関与の解析 フォーラム 2010 衛生薬学・環境トキシコロジー 平成 22 年 9 月 9 日

(6) Involvement of cytosolic prostaglandin E synthase (cPGES/p23) in PGE₂ signal termination

Yoshihito Nakatani, Masahiro Okada,

Yutaka Hokonohara, Ichiro Kudo,
Shuntaro Hara

2010 Keystone Symposia Bioactive Lipids:
Biochemistry and Diseases 平成22年6
月9日、京都

(7) 桑田浩、原田和佳、讓原千尋、滝雄貴、
依田恵美子、中谷良人、原俊太郎、細胞内ホ
スホリパーゼ A2 による走化性因子産生の制
御 第52回日本脂質生化学会 平成22
年6月14日、伊香保

(8) Yoshihito Nakatani, Ichiro Kudo,
Shuntaro Hara

Biosynthesis of prostaglandin E2 in
embryonic fibroblasts

3rd Pan Pacific Symposium on Stem Cells
Research 平成22年4月17日、台北

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中谷 良人 (NAKATANI YOSHIHITO)

昭和大学・薬学部・講師

研究者番号：80266163