プロスタグランジン E₂ 合成酵素

中谷良人・村上 誠・工藤一郎*

mini review

INFLAMMATION AND REGENERATION

Prostaglandin E₂ synthase

Prostaglandin E synthase (PGES) catalyzes isomerization of PGH₂ to PGE₂ which exhibits potent and various biological activities. Here we report the molecular identification of two distinct glutathione-dependent PGESs, the terminal PGE₂-biosynthetic enzymes of the cyclooxygenase (COX) pathway. These PGESs exhibit unique functional coupling with two upstream COX isozymes, COX-1 and COX-2. Cytosolic PGES (cPGES), known as p 23, is constitutively and ubiquitously expressed and predominantly converts COX-1-derived PGH₂ to PGE₂. Microsomal PGES (mPGES), identical to MGST 1-L 1, is an inducible perinuclear enzyme that is functionally linked with COX-2 in marked preference to COX-1. Increased supply of arachidonic acid by explosive activation of cytosolic phospholipase A₂ allows COX-1 to be coupled with mPGES.

Rec. 12/25/2000, Acc. 1/25/2001, pp577~582

Yoshihito Nakatani・Makoto Murakami・Ichiro Kudo*

key words : prostaglandin E₂, prostaglandin E₂ synthase, cyclooxygenase, phospholipase A₂

プロスタノイドは通常は細胞内に貯蔵されており、細胞内で必要に応じて合成、放出され、その局所で多彩な作用を発揮し、生体のホメオスタシスの維持に関わる重要なオートコイドである。なかでも、生体内においてもっと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 (PG)E₂の生理活性は血管拡張、胃液分泌抑制、子宮収縮、気管支拡張、発熱や発痛、炎症反応など多岐にわたっている。PGE₂生合成経路はつぎのような複数の酵素を介した反応系で説明されている。すなわち、細胞が生理的、病理的なさまざまな刺激を受けると、ホスホリパーゼ A₂ (PLA₂)により生体膜リン脂質からアラキドン酸が遊離されたあと、このアラキドン酸がシクロオキシゲナーゼ (COX)により PGH₂に変換される。さらに、この PGH₂が PGE₂合成酵素 (PGES)により PGE₂に変換されるというものである。

PGE₂以外のプロスタノイド生合成の最終段階を触媒する酵素については一次構造が決定されているが、最近まで PGES については解明されていなかった。しかし最近になり、細胞内局在性の異なる二種類の PGES が同定された。一つは筆者らがラットの脳より精製、同定した細胞質型酵素であり、もう一つは Samuelsson らにより遺伝子クローニングがなされた膜結合型酵素である。以下本稿では当研究室の研究成果を中心に両 PGES の性状および機能について論じたい。

cPGES/p 23¹⁾

これまでグルタチオン (GSH)S-トランスフェラーゼ (GST)のいくつかの分子種が PGH₂を基質に PGE₂を産生することが示されてきた^{2,3)}が、厳密な基質特異性を有する PGES の同定には至っていなかった。

筆者らのグループはエンドトキシンを投与したラットの脳可溶性画分に無処理ラットのそれと比

* Department of Health Chemistry, School of Pharmaceutical Sciences, Showa University 昭和大学薬学部衛生化学教室

Human	1	MOPASAKWYDRRDYVITEFCVEDSKDVNVNFEKSKLTTSCLGGSDNIKHINEIDLFHCTDPNDSKHKRTDRSLCCCRKGESGOSWPRLTKERAKLNWLS	100
Mouse	1	MOPASAKWYDRRDYVITEFCVEDSKDVNVNFEKSKLTTSCLGGSDNIKHINEIDLFHCTDPNDSKHKRTDRSLCCCRKGESGOSWPRLTKERAKLNWLS	100
Rat	1	MOPASAKWYDRRDYVITEFCVEDSKDVNVNFEKSKLTTSCLGGSDNIKHINEIDLFHCTDPNDSKHKRTDRSLCCCRKGESGOSWPRLTKERAKLNWLS	100
Chicken	1	MOPASAKWYDRRDYVITEFCVEDSKDVNVNFEKSKLTTSCLGGSDNIKHINEIDLFHCTDPNDSKHKRTDRSLCCCRKGESGOSWPRLTKERAKLNWLS	100
	101	VDFNNWKDWEDDSDEDMNSFDRISEMMNMMGGDEVDLPEVDGADDSDSDDEKMPDLE	160
	101	VDFNNWKDWEDDSDEDMNSFDRISEMMDHMMGGDEVDLPEVDGADDSDSDDEKMPDLE	160
	101	VDFNNWKDWEDDSDEDMNSFDRISEMMDHMMGGDEVDLPEVDGADDSDSDDEKMPDLE	160
	101	VDFNNWKDWEDDSDEDMNSFDRISEMMNMMGGDEVDLPEVDGADDSDSDDEKMPDLE	160

図 1 各種動物における cPGES/p23 のアミノ酸配列
ヒトと一致するアミノ酸を白抜き文字で表した。

図 2 PGES と COX 分子種の機能的連関の解析
HEK293 細胞に各酵素の cDNA を導入し安定発現株を樹立したの
ち、培養上清にアラキドン酸を添加し、30 分間に遊離された PGE₂
量を測定した。親株細胞の PGE₂ 産生量を 1 とした際の相対値を縦
軸に示した。

較して高い PGES 活性が存在することを見出して
いた。本酵素活性は GSH 要求性で、GST の基
質として知られる 1-クロロ-2, 4-ジニトロベン
ゼン(CDNB)により強く抑制された。本酵素を精製
し、内部アミノ酸配列を解読した結果、先にプロ
ゲステロン受容体複合体の構成成分として同定さ
れていた p 23 とよばれる蛋白質⁴⁾と同一であるこ
とがわかった¹⁾(図 1)。

本蛋白質は高等動物間で非常に高い相同性を示
した。本酵素の精製リコンビナント蛋白質は
PGH₂を PGE₂に変換するが、PGD₂あるいは
PGF_{2α}にはほとんど変換しないことから、p 23 そ
のものが PGE₂を特異的に合成する活性を担うと
結論し、本 PGES を細胞質 PGES(cytosolic

PGES)という意味で cPGES/p 23 とよぶことに
した。cPGES/p 23 は酵素活性の発現に GSH が
必須であり CDNB により酵素活性が完全に阻害
されることがわかった。

したがって、エンドトキシン投与ラット脳可溶
性画分に検出された PGES 活性の大部分が本酵
素によるものと考えられる。一般的に細胞質型
GST ファミリーには N 末端に GSH の活性化に
必要なチロシン残基が存在することが知られてい
る⁵⁾。cPGES/p 23 の N 末端から 9 番目のチロシン
をアスパラギンに置換すると酵素活性をまったく
発揮しなくなることが明らかとなった。しかし、
cPGES/p 23 は代表的な GST の基質である
CDNB、1,2-ジクロロニトロベンゼン、臭化ニト

Human	1	MPAHS	VM	SSPA	PAFLLCSTLLVIKMY	VVAIT	TGOVRLRKKAFANPEDAL	RHGG	PQYCRSDPDVERCLRAHRNDMETIYPFLFLGFVYSFLGPNPFA	100
Mouse	1	MPSPGL	VMES	GQVL	PAFLLCSTLLVIKMY	AVAVIT	TGOVRLRKKAFANPEDAL	KRG	GLQYCRSDPDVERCLRAHRNDMETIYPFLFLGFVYSFLGPNPLIA	100
Rat	1	MTSLGL	VMENSQVL		PAFLLCSTLLVIKMY	AVAVIT	TGOVRLRKKAFANPEDAL	KRG	GLQYCRSDPDVERCLRAHRNDMETIYPFLFLGFVYSFLGPNPLIA	100

101	WMHFLV	FTGRV	VAHTVAYL	GKLRAP	IRSV	ITLAOL	PCAS	SMALQILWEA	ARHL	152
101	WIHFLV	VTGRV	VHTVAYL	GKLNPR	LRSGA	VLAQ	FSCF	SMALQILWEA	VAHHL	153
101	WIHFLV	VTGRV	VHTVAYL	GKLMNPR	IRSGA	VLAQ	FACF	SMALQILWEA	VAHHL	153

図3 各種動物における mPGES のアミノ酸配列
ヒトと一致するアミノ酸を白抜き文字で表した。

図4 ラット腹腔マクロファージにおける mPGES の LPS による発現誘導(A)とその発現誘導に対するデキサメタゾン(Dex)の抑制効果

ロフェネチル, エタクリン酸のいずれに対しても GSH 転移活性をまったく示さなかった。リコンビナント酵素の PGH₂ に対する Km 値は 14 μ M であり, 他の PG 分子種の合成酵素(造血器型 PGDS⁶⁾[200 μ M], リポカリン型 PGDS⁷⁾[14 μ M], 肝臓型 PGFS⁸⁾[25 μ M], 肺型 PGFS⁸⁾[10 μ M]) とほぼ同等の値を示した。哺乳動物培養細胞を用いた解析では, 調べたすべての細胞に有意な発現が観察され, 細胞内分布については細胞質に広く分布していることがわかった。

また, ラットにおける臓器分布を検討した結果, 広範な臓器に恒常的に発現していることがわかったが, 例外的に脳ではエンドトキシン投与による発現上昇が観察された。ラット線維芽細胞 3Y1 に cPGES/p 23 のアンチセンス DNA をトランスフェクションした細胞を Ca²⁺イオノフォアで刺激すると, 対照細胞にくらべて PGE₂産生量が大きく低下し, cPGES/p 23 は細胞内で実際に PGE₂産生を担うことが示唆された。最近 p 23 の C 末端 35 アミノ酸を除いた部分の立体構造が報告され, 二つの β シート構造により構成されたコ

ンパクトな構造をとることが示された⁹⁾。

つぎに, ヒト胎児腎由来細胞株 HEK 293 を用いて cPGES/p 23 とシクロオキシゲナーゼ (COX) の機能連関を, 両蛋白質を共発現させることによって調べた。培養上清にアラキドン酸を添加し, 産生される PGE₂量を測定した結果, cPGES/p 23 と COX-1 を共発現した細胞では COX-1 単独発現細胞と比較して PGE₂産生が著しく増大したが, cPGES/p 23 と COX-2 を共発現した場合には有意な PGE₂産生の亢進は観察されなかった(図 2A)。以上より, cPGES/p 23 は COX-1 と機能的に連関して, 即時的な PGE₂産生に深く関与すると予想した。

mPGES

筆者らは以前にラット腹腔マクロファージをエンドトキシンで刺激すると, 膜画分の PGES 活性が一過的に上昇することを見出していた¹⁰⁾。本 PGES 活性は GSH 要求性であるが, CDNB による阻害は受けないことから cPGES/p 23 と異なる酵素によるものと予想していた¹¹⁾。1999 年に, 遺伝子データバンクに MGST 1-L 1 (microsomal GST 1-like 1) の名称で登録されていた EST クローンが PGES 活性を有することが Jakobsson らにより報告された¹²⁾。本酵素は cPGES/p 23 と一次構造上の相同性は示さず, LTC₄合成酵素 (LTCS) や 5-リポキシゲナーゼ活性化蛋白質 (FLAP) と同じ MAPEG (エイコサノイド/グルタチオン代謝系膜結合蛋白質) ファミリーに分類されている(図 3)。

mPGES も cPGES 同様 CDNB を基質とした

表 1 cPGES/p23 と mPGES の性状の比較

	分子量	GSH 依存性	CDNB 感受性	細胞内分布	発現様式	機能連関する COX 分子種
cPGES/p23	23 kDa	あり	あり	細胞質	恒常的	COX-1
mPGES	15 kDa	あり	なし	膜画分	誘導的	COX-2

図 5 PGE₂ 生合成系関連酵素の機能連関の模式図
 正常型酵素を白抜き文字で、誘導型酵素を黒字で示した。

アッセイでは GST 活性を示さない。最近, LTCS や FLAP の阻害剤により mPGES の酵素活性が抑制されることが報告された¹³⁾。mPGES は GSH 依存性で分子量は約 15 kDa であり、ヒトの胎盤、精巣、乳腺、膀胱および前立腺に恒常的に遺伝子が高いレベルで発現しており、小腸および結腸などの臓器にも低い発現が検出されている。また、ヒト肺癌由来細胞である A 549 細胞を IL-1 β で刺激すると本酵素の発現が上昇することが示された¹²⁾。筆者らはマウスおよびラットの mPGES の cDNA をクローニングし、マクロファージ膜画分に検出された PGES 活性との異同を調べた。その結果、エンドトキシンによる PGES 活性上昇と並行して mPGES の遺伝子発現が上昇した(図 4 A)¹¹⁾。また、この PGE₂ 産生の上昇は抗炎症性ステロイドであるデキサメタゾンを共存させることにより強く抑制されることが知られているが、本現象と並行して mPGES の遺伝子発現も強く抑制

された(図 4 B)¹¹⁾。

したがって、エンドトキシン処理マクロファージで発現誘導される PGES 活性の大部分は mPGES が担っていること、抗炎症性ステロイドの作用の少なくとも一部は mPGES の阻害によることが考えられる。そのほかラット頭蓋冠由来初代培養骨芽細胞を IL-1 β で刺激すると mPGES の発現が著しく上昇することを見出している¹¹⁾。mPGES の活性発現に必須のアミノ酸の同定を変異蛋白質の活性を指標に検討した。膜結合型 GST 分子種で共通に保存されているアミノ酸のうち 3 箇所の変異体を作製し PGES 活性を測定した結果、110 番目のアルギニン残基が活性発現に重要であることがわかった¹¹⁾。

HEK 293 細胞発現系を用いた解析の結果、COX-2/mPGES 共発現細胞は COX-2 単独発現細胞と比較して顕著な PGE₂ 産生の亢進が観察されたが、本現象は COX-1/mPGES 共発現細胞ではほとんど観察されなかった(図 2 B)。しかし、COX-1/mPGES 共発現細胞株においても、細胞質 PLA₂(cPLA₂)をさらに共発現させることによってアラキドン酸の供給量を増大させると COX-2 発現細胞と同等の顕著な PGE₂ 産生が観察された。これらの結果は、mPGES はアラキドン酸の供給量が少ない場合には COX-2 と選択的に機能連関し、cPLA₂ が最大限に活性化しアラキドン酸の供給量が増大した場合には COX-1 とも機能連関することを意味している。さらに興味深いことに、COX-2 と mPGES を共発現させた細胞株では顕著な PGE₂ 産生が観察されると同時に形態的に変化をきたすことがわかった¹¹⁾。

近年、COX 阻害剤が大腸癌の発生頻度を低下させるという疫学的事実¹⁴⁾に加えて、大腸癌組織中の COX-2 の発現上昇が観察されること¹⁵⁾、および COX-2 欠損マウスでは大腸癌の発生率が著

しく低下すること¹⁶⁾が報告されている。cPLA₂についてもその欠損マウスにおいて腸内ポリープの減少が認められること¹⁷⁾、さらに cPLA₂のアダプター分子として機能することが示唆されている細胞骨格蛋白質であるビメンチン¹⁸⁾が悪性腫瘍でしばしば高発現が観察されることが知られている¹⁹⁾。これらの結果は、アラキドン酸代謝経路の産物が細胞増殖に関与することを示唆している。mPGES を COX-2 とともに過剰発現させた細胞株が細胞増殖亢進を示したことから、アラキドン酸代謝産物と細胞増殖との関連性が強く支持されたが、本現象のメカニズムについてはまったく不明であり今後の検討課題である。

ほかの PGES

渡辺らによりウシ心臓から電気泳動上の分子量が 31 kDa の膜結合型 PGES が見出されている^{20,21)}。本酵素は前出の cPGES や mPGES とは異なり GSH 非存在下でも有意な活性を発現するが、GSH およびほかの還元性化合物の存在下で活性が上昇する。現在までのところ本酵素の一次構造は報告されていない。

まとめ

動物細胞内に少なくとも 2 種類の PGES が存在し、細胞外刺激に対応した使い分けが行われていることが示唆された。表 1 に cPGES と mPGES の主な特徴の比較を、図 5 に予想される PGE₂ 産生関連酵素群の機能連関を示した。cPGES/p 23 は ATP が結合した熱ショック蛋白質 hsp 90 に会合すること²²⁾が報告されており、分子シャペロンとアラキドン酸代謝の関連性が注目される。一方、mPGES は β -アミロイド処理ラットアストロサイトで発現誘導されることが報告され、アルツハイマー病の進展との関連が示唆された²³⁾。このように PGES はさまざまな疾患に関与することが予想され、今後は生体内での各 PGES の機能分担が解明され、さまざまな病態の治療にフィードバックされることが期待される。

文 献

- 1) Tanioka T, Nakatani Y, Semmyo N, Murakami M, Kudo I : Molecular identification of cytosolic prostaglandin E₂ synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E₂ biosynthesis. *J Biol Chem* 275 : 32775-32782, 2000.
- 2) Ogorochi T, Ujihara M, Narumiya S : Purification and properties of prostaglandin H-E isomerase from the cytosol of human brain : identification as anionic forms of glutathione S-transferase. *J Neurochem* 48 : 900-909, 1987.
- 3) Meyer DJ, Muimo R, Thomas M, Coates D, Isaac RE : Purification and characterization of prostaglandin-H E-isomerase, a sigma-class glutathione S-transferase, from *Ascaridia galli*. *Biochem J* 313 : 223-227, 1996.
- 4) Johnson JL, Beito TG, Krco CJ, Toft DO : Characterization of a novel 23-kilodalton protein of unactive progesterone receptor complexes. *Mol Cell Biol* 14 : 1956-1963, 1994.
- 5) Allardyce CS, McDonagh PD, Lian LY, Wolf CR, Roberts GCK : The role of tyrosine-9 and the C-terminal helix in the catalytic mechanism of alpha-class glutathione S-transferases. *Biochem J* 343 : 525-531, 1999.
- 6) Urade Y, Fujimoto N, Ujihara M, Hayaishi O : Biochemical and immunological characterization of rat spleen prostaglandin D synthetase. *J Biol Chem* 262 : 3820-3825, 1987.
- 7) Urade Y, Fujimoto N, Hayaishi O : Purification and characterization of rat brain prostaglandin D synthase. *J Biol Chem* 260 : 12410-12415, 1985.
- 8) Suzuki T, Fujii Y, Miyano M, Chen LY, Takahashi T, Watanabe K : cDNA cloning, expression, and mutagenesis study of liver-type prostaglandin F synthase. *J Biol Chem* 274 : 241-248, 1999.
- 9) Weaver AJ, Sullivan WP, Felts SJ, Owen BA, Toft DO : Crystal structure and activity of human p 23, a heat shock protein 90 co-chaperone. *J Biol Chem* 275 : 23045-23052, 2000.
- 10) Naraba H, Murakami M, Matsumoto H, Shimbara S, Ueno A, Kudo I, Oh-ishi S : Segregated coupling of phospholipases A₂, cyclooxygenases, and terminal prostanoid synthases in different phases of prostanoid biosynthesis in rat peritoneal macrophages. *J Immunol* 160 : 2974-2982, 1998.
- 11) Murakami M, Naraba H, Tanioka T, Semmyo N, Nakatani Y, Kojima F, Ikeda T, Fueki M, Ueno A, Oh-ishi S, Kudo I : Regulation of prostaglandin E₂ biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E₂ synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 275 : 32783-32792, 2000.
- 12) Jakobsson PJ, Thorén S, Morgenstern R, Samuelsson B : Identification of human prostaglandin E synthase : a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 : 7220-7225, 1999.

- 13) Mancini JA, Blood K, Guay J, Gordon R, Claveau D, Chan CC, Riendeau D : Cloning, expression and upregulation of inducible rat PGE synthase during LPS-induced pyresis and adjuvant arthritis. *J Biol Chem* 276 : 4469-4475, 2001.
- 14) Thun MJ, Namboodiri MM, Calle EE, Flanders WD, Heath CW Jr : Aspirin use and risk of fatal cancer. *Cancer Res* 53 : 1322-1327, 1993.
- 15) Sano H, Kawahito Y, Wilder RL, Hashiramoto A, Mukai S, Asai K, Kimura S, Kato H, Kondo M, Hla T : Expression of cyclooxygenase-1 and-2 in human colorectal cancer. *Cancer Res* 55 : 3785-3789, 1995.
- 16) Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, Trzaskos JM, Evans JF, Taketo MM : Suppression of intestinal polyposis in *Apc*^{Δ716} knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2(COX-2). *Cell* 87 : 803-809, 1996.
- 17) Takaku K, Sonoshita M, Sasaki N, Uozumi N, Doi Y, Shimizu T, Taketo MM : Suppression of intestinal polyposis in *Apc*^{Δ716} knockout mice by an additional mutation in the cytosolic phospholipase A₂ gene. *J Biol Chem* 275 : 34013-34016, 2000.
- 18) Nakatani Y, Tanioka T, Sunaga S, Murakami M, Kudo I : Identification of a cellular protein that functionally interacts with the C2 domain of cytosolic phospholipase A₂. *J Biol Chem* 275 : 1161-1168, 2000.
- 19) Sato M, Hayashi Y, Yanagawa T, Yoshida H, Yura Y, Azuma M, Ueno A : Intermediate-sized filaments and specific markers in a human salivary gland adenocarcinoma cell line and its nude mouse tumors. *Cancer Res* 45 : 3878-3890, 1985.
- 20) Watanabe K, Kurihara K, Tokunaga Y, Hayashi O : Two types of microsomal prostaglandin E synthase : glutathione-dependent and-independent prostaglandin E synthases. *Biochem Biophys Res Commun* 235 : 148-152, 1997.
- 21) Watanabe K, Kurihara K, Suzuki T : Purification and characterization of membrane-bound prostaglandin E synthase from bovine heart. *Biochim Biophys Acta* 1439 : 406-414, 1999.
- 22) Grenert JP, Johnson BD, Toft DO : The importance of ATP binding and hydrolysis by hsp 90 in formation and function of protein heterocomplexes. *J Biol Chem* 274 : 17525-17533, 1999.
- 23) Satoh K, Nagano Y, Shimomura C, Suzuki N, Saeki Y, Yokota H : Expression of prostaglandin E synthase mRNA is induced in beta-amyloid treated rat astrocytes. *Neurosci Lett* 283 : 221-223, 2000.