

ノックアウトマウスを用いたホスホリパーゼ A₂ 受容体の機能解析

横田 恭 則

塩野義製薬・創薬研究所, 〒553-0002 大阪市福島区鷺洲 5-12-4

Functional Analysis of Phospholipase A₂ Receptor by Gene Knockout Studies

Yasunori YOKOTA

Shionogi Research Laboratories, Shionogi & Co., Ltd., 5-12-4, Sagisu, Fukushima-ku, Osaka 553-0002, Japan

(Received September 4, 2000)

Phospholipase A₂ receptor (PLA₂R) is a type I transmembrane glycoprotein related to the C-type animal lectin family and mediates a variety of biological responses elicited by group IB secretory phospholipase A₂ (sPLA₂-IB). In the present study, we have shown the evidence that a novel type of sPLA₂, sPLA₂-X, also acts as one of the high-affinity ligands for mouse PLA₂R. We then generated PLA₂R-deficient mice and found that the knockout mice exhibited the resistance to an endotoxic shock with reduced plasma levels of proinflammatory cytokines, such as TNF- α and IL-1 β . *In situ* hybridization analysis revealed that the expression of PLA₂R transcript was markedly enhanced in type II alveolar epithelial cells and a subset of splenic lymphocytes in accordance with the elevated expression of sPLA₂-IB and TNF- α mRNAs during endotoxic shock. In addition, the elevated expression level of TNF- α transcript was significantly reduced by the deficiency of PLA₂R, suggesting that PLA₂R plays a role in the regulation of TNF- α expression in these cell types. We then synthesized a specific sPLA₂ inhibitor, indoxam, which blocked the binding of sPLA₂-IB and X to PLA₂R. Indoxam was found to suppress the elevation of the plasma level of TNF- α and prolonged the survival of endotoxin-challenged mice. The inhibitory effects of indoxam were abolished by the deficiency of PLA₂R, demonstrating the involvement of PLA₂R in the progression of endotoxic shock. We also detected and characterized a soluble form of PLA₂R protein in the plasma of mouse with anti-PLA₂R antibody, and showed its potential role as an endogenous sPLA₂ inhibitor. Taken together, a series of studies with PLA₂R-knockout mice have elucidated a critical role of PLA₂R in the regulation of the development of endotoxic shock.

Key words—phospholipase A₂ receptor; secretory phospholipase A₂; endotoxic shock; TNF- α ; inhibitor; soluble receptor

はじめに

ホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) は、グリセロリン脂質の *sn*-2 位の脂肪酸を加水分解し、遊離脂肪酸とリゾリン脂質を産生する酵素であり、生体組織に広く分布する。^{1,2)} 本酵素は、リン脂質を水解する作用により生体膜リン脂質のリモデリングや生体防御反応に関与するほか、アラキドン酸カスケードの開始酵素として、プロスタグランジン、ロイコトリエン、トロンボキサン、血小板活性化因子などの生理活性脂質の産生を介して様々な病態や生理作用に関与する。³⁾ 現在までに PLA₂ 活性を担う酵素として、多様な分子種が同定され、哺乳動物の PLA₂ としては、その局在性、Ca²⁺ 要求性、基質特異性、一次構造などに基づいて、分泌型 PLA₂ (sPLA₂)、細胞質型 PLA₂ (cPLA₂)、Ca²⁺ 非依存型 PLA₂ (iPLA₂) などのグループに分類されている。⁴⁾

このうち sPLA₂ は細胞外に分泌される低分子量

(13—15 kDa) の PLA₂ の総称で、分子内に多くのジスルフィド架橋を持ち、PLA₂ 活性発現に mM オーダーの Ca²⁺ を必要とし、分子内の活性中心部位には His-Asp 残基のペアが保存されているなどの特徴を持つ。現在までに 9 種類の sPLA₂ (IB, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X) の存在が知られているが、これらのうち IB 型 sPLA₂ (sPLA₂-IB) は最も古くから知られていた PLA₂ であり、膵液中に多量に含まれることから、当初、食餌中のグリセロリン脂質の消化酵素であると考えられ、膵型 PLA₂ と呼ばれてきた。しかし、筆者らは、肺、脾臓、腎臓、卵巣などの消化器系以外の組織においても sPLA₂-IB の発現が見られることに着目してその生理的意義について解析を行った。その結果、sPLA₂ を特異的に認識する受容体 (PLA₂ 受容体) を発見し、sPLA₂-IB が PLA₂ 受容体を介して多彩な生理反応を惹起することを明らかにした。⁵⁾

本稿では、PLA₂ 受容体の構造や発現について簡単に紹介した後、本受容体の *in vivo* の生理機能を解明する目的で筆者らが作製した受容体欠損マウスの解析から得られた最新の知見、すなわち本受容体の炎症病態での役割や新しい sPLA₂ リガンド、並びに血中に存在する可溶性受容体の発見などについて紹介する。

1. PLA₂ 受容体の構造と発現

筆者らは、まず、マウス Swiss 3T3 細胞やラット血管平滑筋細胞などの細胞表面に存在する ¹²⁵I 標識 sPLA₂-IB 高親和性結合部位として、PLA₂ 受容体を同定した。⁶⁾その後、種々の哺乳動物の組織粗膜画分においても同様の sPLA₂-IB 結合部位を検出し、⁷⁾最も高い結合活性が検出されたウシ黄体膜から、sPLA₂-IB アフィニティーカラムを用いることにより本受容体の精製に成功した。⁸⁾精製された PLA₂ 受容体は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で約 180 kDa の分子量を示す糖タンパク質であり、N 結合型糖鎖がリガンド結合に不可欠であった。⁹⁾さらに、部分アミノ酸配列を決定することにより、ウシ sPLA₂-IB 結合タンパク質をコードする cDNA をクローニングし、全アミノ酸配列を決定した。¹⁰⁾cDNA 配列から予想される PLA₂ 受容体は膜 1 回貫通型のクラス I 膜タンパク質で、N 末端側の高システイン領域、フィブロネクチンタイプ II リピート様ドメイン、8 個の carbohydrate recognition domain (糖認識ドメイン、CRD) 様のドメインからなる大きな細胞外領域と C 末端側の短い細胞内領域から成っており (Fig. 1)、マクロファージマンノースレセプター、樹状細胞に発現する DEC-205、内皮細胞に発現する lambda タンパク質などと構造的相関があり^{11,12)} VI 型 C-タイプレクチンサブファミリーを形成する。現在では、マウス、¹³⁾ヒト、¹⁴⁾ウサギ¹⁵⁾の受容体も

クローニングされており、種間で 80% 以上のアミノ酸同一性がある。

フィブロネクチンタイプ II リピート様ドメインは、コラーゲン結合への関与が示唆されているが、高システイン領域同様、その役割は明確にされていない。PLA₂ 受容体の細胞外領域のほとんどは 8 個の CRD 様ドメインであり、欠変異体を用いた解析により、sPLA₂-IB 結合には 3—5 番目の CRD 様ドメインが必要である。¹³⁾通常、CRD は Ca²⁺ 依存的に糖鎖に結合する活性を持つが、PLA₂ 受容体の CRD は糖結合に必要な 5 アミノ酸残基がすべて他のアミノ酸に置換されており、ウサギ PLA₂ 受容体を例外として糖結合能を持たない。PLA₂ 受容体の細胞質ドメインは、low density lipoprotein (LDL) 受容体でみられる coated-pit を介したクラスリン依存的なエンドサイトーシスに不可欠な共通配列を有しており、実際に sPLA₂-IB は PLA₂ 受容体を介して細胞内に取り込まれ分解を受ける。⁷⁾そのモチーフの欠失によってリガンド-受容体複合体の取り込みが消失することから、LDL 受容体に類似した機構により、受容体を介して sPLA₂ の取り込みが起これと考えられる。

PLA₂ 受容体の発現に関しては、ノーザンブロットにより mRNA の発現を解析した場合には種間で若干の差違がみられる。ヒトでは肺、腎臓、胎盤などに発現が見られるのに対し、¹⁴⁾マウスでは肺、脾臓、生殖器官の組織をはじめとして普遍的に発現が見られる。¹³⁾最近、筆者らは、マウス PLA₂ 受容体の細胞外領域部分のみからなるリコンビナントタンパク質をウサギに免疫することによりマウス PLA₂ 受容体特異抗体を作製し、免疫組織化学的手法によりマウスにおける PLA₂ 受容体発現細胞種を特定した。¹⁶⁾その結果、肺では II 型肺胞上皮細胞を中心とした肺胞上皮に、脾臓では一部のリンパ球において

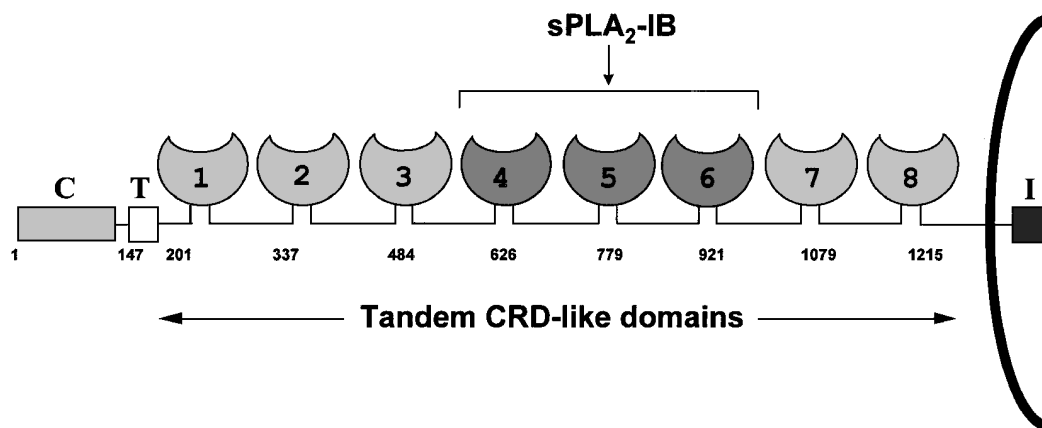


Fig. 1. Structure of the PLA₂R

Amino acid residue numbers corresponding to the NH₂-terminal residue in each domain are indicated below the schematic drawing. C: Cys-rich region, T: fibronectin type II repeat-like domain, 1—8: CRD-like domains 1—8, I: intracellular region. CRD3 to CRD5 domains are essential recognition regions for sPLA₂-IB.

受容体の発現を検出した。¹⁶⁾ *In situ* hybridization 法による解析でも同様な発現が観察されており、生殖器系の組織においては、精巣ではライディッヒ細胞で、卵巣では卵胞小嚢及び卵管の粘膜固有層で発現が認められている (投稿準備中)。

2. PLA₂ 受容体の内因性リガンド

前述のように、PLA₂ 受容体は sPLA₂-IB 結合タンパク質として 1991 年に発見された。その当時、哺乳類の sPLA₂ は IB 型と IIA 型の 2 種類しか知られていなかったが、ここ数年のうちに DNA データベースをもとにして次々と新しいタイプの sPLA₂ 分子がクローニングされてきた。その結果、sPLA₂-IB 以外にも PLA₂ 受容体に親和性を示す sPLA₂ が見つかってきており、特に筆者らは、1997 年にクローニングされた X 型 sPLA₂ (sPLA₂-X) タンパクを精製し、本 sPLA₂ が IB 型とともに内因性の PLA₂ 受容体リガンドとして機能することを最近発見した。¹⁷⁾ 各 sPLA₂ の特徴と受容体との関係について以下に述べる。

sPLA₂-IB は、まず不活性型の前駆体として産生され、トリプシンやプラスミンのようなセリンプロテアーゼによって 7 アミノ酸からなる N 末端プロペチドが切断されて活性型酵素となる。活性型 sPLA₂-IB はマウス、ラット PLA₂ 受容体に対し高い親和性 (K_d=約 1 nM) をもって結合し、多彩な生理反応を惹起することが知られており¹⁸⁾ (Fig. 2)、この結合には酵素活性を必要としない。¹⁹⁾ しかし、sPLA₂-IB 前駆体は PLA₂ 受容体に結合できず、受容体への結合にはプロテアーゼによる活性化が必要である。⁹⁾ 一方、ヒト受容体においては M. Lazdunski らにより放射性標識したヘビ毒 sPLA₂

の一種である OS₁ をプローブとして用いた結合阻害実験で調べられており、sPLA₂-IB の親和性は約 400 nM と低い。¹⁴⁾ この場合、プローブとして用いた OS₁ 自身の結合親和性も他の動物種受容体に比べて 20—40 倍も低いことから、sPLA₂ に対するヒト PLA₂ 受容体の結合様式はマウスやラットとは異なる可能性も考えられる。最近では、sPLA₂-IB に対する高親和性部位の存在がヒト膀胱癌由来 MIAPa-Ca-2 細胞²⁰⁾ やヒト単球 THP-1 細胞²¹⁾ において報告されており、ヒト PLA₂ 受容体が sPLA₂-IB を高い親和性で認識するためには何らかのアクセサリー分子が必要かもしれない。

IIA 型 sPLA₂ (sPLA₂-IIA) はサイトカインなどの刺激により分泌され、ヒトでは敗血症や急性膵炎などの患者の血液中や炎症浸出液中に増加が認められることから炎症病態の進展に関与すると考えられてきた。²²⁾ しかしながら、sPLA₂-IIA を遺伝的に欠損するマウス系統 (C57BL/6, 129SvJ など) が存在することが分かり、²³⁾ このマウスは大腸ガンになりやすいほかは特に炎症時にも差は見られない。さらに最近になり、IIC 型、²⁴⁾ IID 型、²⁵⁾ IIE 型、²⁶⁾ IIF 型、²⁷⁾ V 型²⁸⁾ といった II 型ファミリーに分類される新規の sPLA₂ が次々と発見され、炎症時における sPLA₂-IIA の役割については再評価されつつある。ラット及びヒトにおいて sPLA₂-IIA は PLA₂ 受容体には結合しないが、マウスでは 7—13 nM と sPLA₂-IB に比べて 5—10 倍も弱いながらも結合することが確認されている。¹⁸⁾ しかし、sPLA₂-IIA が PLA₂ 受容体の機能的なリガンドとして作用しているかについての報告はまだない。他の II 型ファミリー分子については、マウスにおいて IID 型

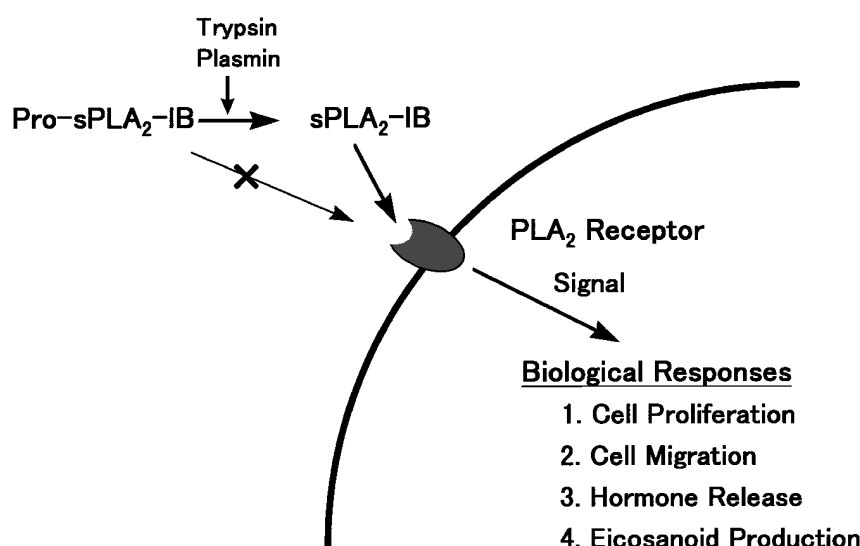


Fig. 2. Schematic Diagram of sPLA₂-IB-Induced Biological Responses via the PLA₂R

The PLA₂R recognizes a mature form of sPLA₂-IB, but does not bind to its pro-form, pro-sPLA₂-IB. Therefore, the receptor binding is regulated by the rate of cleavage of pro-sPLA₂-IB by proteases, such as trypsin and plasmin. The enzymatic activity of sPLA₂-IB is not required for the binding to the receptor. As a consequence of receptor binding, sPLA₂-IB elicits a variety of biological responses, including cell proliferation, cell migration, hormone release, and eicosanoid production via some intracellular signal transduction mechanisms.

sPLA₂ (sPLA₂-IID) がマウス PLA₂ 受容体に結合しないことが報告されている以外に,²⁹⁾ 受容体への結合性については不明である。

sPLA₂-X は 1997 年に発見され,³⁰⁾ 最近の我々のグループをはじめとした解析から, sPLA₂-IB や II 型ファミリー sPLA₂ に比べて極めて強力なアラキドン酸遊離能を持つことが明らかとなり, 炎症病態時における脂質メディエーターの産生に関与する sPLA₂ 分子として注目を浴びている。³¹⁾ 構造的には, sPLA₂-IB と IIA ファミリーを特徴づけるジスルフィド結合を両方持つとともに, sPLA₂-IB に特徴的なプロペプチド構造や sPLA₂-IIA に特徴的な C 末端の extension 配列を併せ持ち, sPLA₂-IB と IIA のハイブリッド型とも呼ぶべき構造的な特徴を有する。筆者らは, マウス sPLA₂-X のクローニングに成功し, リコンビナントマウス sPLA₂-X タンパクを抗ヒト sPLA₂-X 抗体との交差性を利用して精製した。³²⁾ さらに, マウス sPLA₂-X 標識体が, PLA₂ 受容体を内因性に発現するマウス骨芽 MC3T3-E1 細胞やマウス PLA₂ 受容体を強制発現させた CHO 細胞に対し, sPLA₂-IB と同程度の高い親和性で結合することを示した。¹⁷⁾ また, マウス肺組織で検出される X 型特異的結合活性が PLA₂ 受容体欠損マウス由来の肺組織では認められないことから, マウスでは sPLA₂-X が PLA₂ 受容体にのみ特異的に結合することが確認された。後述するように, PLA₂ 受容体は炎症病態に関与することが知られており, sPLA₂-X が強力なアラキドン酸遊離作用を示す酵素活性とともに, PLA₂ 受容体の内因性リガンドとして機能することによっても炎症病態に深く関与している可能性が考えられる。

これまでに, マウスでは受容体リガンドについての知見が蓄積されつつあるが, ヒトについてはまだ結論が出ておらず, ヒト PLA₂ 受容体の内因性リガンドが何であるのか明らかにすることは疾病との関連を考える上でも非常に重要なことであり, 今後, 我々に課された重要な課題であると考えている。

3. PLA₂ 受容体欠損マウスの解析³³⁾

3-1. PLA₂ 受容体欠損マウスの作製と表現型
PLA₂ 受容体の機能解析は, これまで培養細胞や組織片に sPLA₂-IB を添加させることによって惹起される *in vitro* での作用について検討がなされ, その作用は, ①細胞増殖作用, ②遊走能亢進, ③ホルモン分泌, ④エイコサノイド産生の 4 種類に大別できる。しかしながら, *in vivo* での役割については不明であったことから, 筆者らは, 実際の生体内での PLA₂ 受容体の役割を明らかにするために, PLA₂ 受容体を欠損するマウスを作製し解析を行った。マウス PLA₂ 受容体遺伝子の第一エキソンを標的として, 常法により, PLA₂ 受容体遺伝子変異マウスを作製した。ノーザンブロット, ウェスタンブロットによりホモ変異マウスでの PLA₂ 受容体 mRNA 及

び PLA₂ 受容体タンパクの欠損を確認した。また, ホモ変異マウスでは野生型マウスで見られた各臓器での sPLA₂-IB 結合活性も消失していた。こうして得られた PLA₂ 受容体欠損マウスは, 11 回以上 C57BL/6J 系統のマウスと戻し交配を行った後に以下の実験に用いた。PLA₂ 受容体欠損マウスはメンデルの法則による確率どおりに正常に生まれ, 成長過程においても特に異常は見られなかった。血液パラメータや組織学的な解析結果も正常で, PLA₂ 受容体はホメオスタシス維持に必須の分子ではないことが明らかとなった。また, PLA₂ 受容体は生殖系において高い発現がみられ, ホルモン分泌に関与することが予想されたことから生殖機能についても注目していたが, 繁殖能にも特に異常は見られなかった。

3-2. sPLA₂ のクリアランス 前述のように, PLA₂ 受容体の細胞内領域には LDL 受容体などに見られるエンドサイトーシスのコンセンサス配列が存在し, sPLA₂-IB を結合して細胞内に取り込み分解することが知られている。また筆者らは, 新たに PLA₂ 受容体のリガンドとして同定した sPLA₂-X も sPLA₂-IB と同様に PLA₂ 受容体を介して細胞内に取り込まれ, 分解されることも明らかにしている (投稿準備中)。PLA₂ 受容体は血管内皮及び平滑筋細胞に発現が見られることから, PLA₂ 受容体が血中から sPLA₂ をクリアランスするレセプターとして機能している可能性が考えられた。そこで, PLA₂ 受容体欠損マウスにおける血中からの sPLA₂ のクリアランスについて検討した。野生型及び PLA₂ 受容体欠損マウスにブタ sPLA₂-IB を静脈内投与し, 血中からの消失速度を比較した。しかしながら, 両マウスともに投与数分後には sPLA₂-IB は血中から劇的に減少し, 両マウス間で差は認められなかった。すなわち, 血中の sPLA₂-IB は腎臓などでのクリアランスの影響が大きく, 少なくとも血中からの sPLA₂-IB のクリアランスには積極的な PLA₂ 受容体の関与はないものと考えられた。しかしながら, 局所的に産生された sPLA₂ を除去する可能性は否定されたわけではなく, 特に, 強力なアラキドン酸遊離能を持つ sPLA₂-X が局所で産生された場合には多量のアラキドン酸やエイコサノイドの産生を回避するため, 速やかに sPLA₂-X を除去する必要があり, そのような場合に, PLA₂ 受容体がクリアランスレセプターとして機能している可能性は十分に考えられる。

3-3. エンドトキシンショックモデルでの解析
正常時での表現型に変異が見られなかったことから, 次に, 病態モデルでの解析を行った。*In vitro* での解析によると, 肺の気管支や腎糸球体メサンギウム細胞では sPLA₂-IB により PLA₂ 受容体を介して炎症性プロスタノイドの産生が惹起され, これが肺や腎臓の炎症病態を発症あるいは進展させること

が知られていたことから,^{34,35)}これらの炎症性メディエーターが病態に密接に関与すると考えられるエンドトキシンショックモデルで解析を行った。まず、LPSを腹腔内に投与し生存時間の比較を行った結果、20 mg/kg及び30 mg/kgの2通りの投与量いずれでも野生型マウスに比較してPLA₂受容体欠損マウスでは有意な生存時間の延長が認められ (Table 1), PLA₂受容体欠損マウスがLPSの致死作用に対して抵抗性を示すことが明らかとなった。

次にsPLA₂-IBの関与を調べるために、致死限界量のLPSをマウス腹腔内に投与し、その後マウスPLA₂受容体のリガンドとなり得るブタsPLA₂-IBを静脈内投与して生存率を比較した。その結果、野生型マウスではsPLA₂-IBの投与により有意な死亡率の上昇が認められたが (Fig. 3), PLA₂受容体欠損マウスではsPLA₂-IBの効果は見られず、sPLA₂-IBがPLA₂受容体を介するエンドトキシンショック病態の悪化に関与することが示された。先述したように、sPLA₂-IBやXは前駆体として産生されトリプシンやプラスミンといったセリンプロテアーゼにより活性化される。^{36,37)}血管内皮細胞などではLPS刺激時にプラスミンなどのプロテアーゼの活性化が起ることが知られており、また好中球ではTNF- α などによりsPLA₂-IBの活性化の亢進が認められている。³⁸⁾実際に、急性肺疾患患者の血漿や尿からはsPLA₂-IBの活性化に伴って放出されるプロペプチド量が増加することが報告されており、³⁹⁾エンドトキシンショック時には局所でsPLA₂-IBあるいはXが活性化されPLA₂受容体を介して病態の形成や進展に関与すると考えられる。

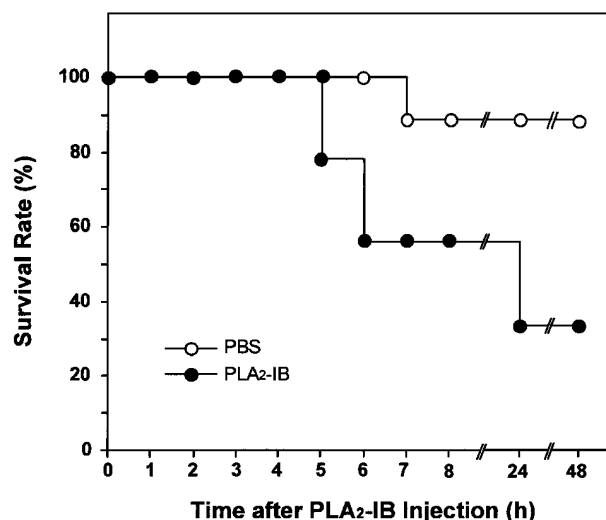
エンドトキシンショック時にはTNF- α やIL-1 β などのサイトカイン及び一酸化窒素 (NO) の産生亢進が誘導され、これらの因子が病態の発症や進展に関与することが各関連分子のノックアウトマウスを用いた解析から明らかになっている。⁴⁰⁻⁴⁴⁾そこで、LPS投与後のこれら因子の血中濃度について比較を行った。その結果、PLA₂受容体欠損マウスでは野生型マウスに比べて有意に低いTNF- α 及びIL-1 β の血中濃度が観察された (Fig. 4)。また、NOについては有意ではなかったがPLA₂受容体欠損マウ

Table 1. Lethality of PLA₂R-Deficient Mice in Endotoxic Shock

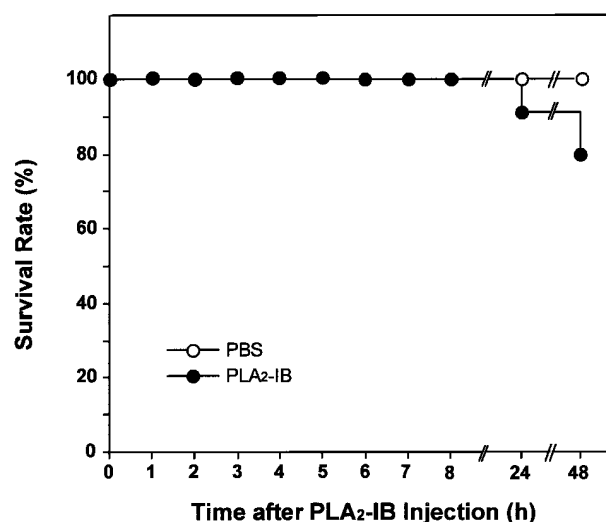
LPS mg/kg	Lethality: dead/total (% mortality)	
	PLA ₂ R ^{+/+}	PLA ₂ R ^{-/-}
20	5/14(36%)	0/15(0%)*
30	12/13(92%)	7/14(50%)*

Mice were intraperitoneally administered at the indicated doses of LPS. The lethality in each experiment was scored at 24 h after LPS injection.

* $p < 0.05$ versus wildtype mice, as determined by Fisher's exact test.



(a)



(b)

Fig. 3. Effect of Exogenous sPLA₂-IB on Endotoxic Shock

After administration of a sublethal dose of LPS (10 mg/kg), sterile PBS (○) or porcine sPLA₂-IB (●: 50 mg/kg) was injected at 17 h in wildtype mice (A: PBS: $n=9$, sPLA₂-IB: $n=9$) or PLA₂R-deficient mice (B: PBS: $n=5$, sPLA₂-IB: $n=11$). Each point represents the survival rate (%) of mice after sPLA₂-IB injection. Statistical significance was determined by the Log-rank test (A: $p=0.0175$, B: $p=0.3286$).

スで低下する傾向が見られた。したがって、これらメディエーターの産生低下がPLA₂受容体欠損マウスがエンドトキシンショック抵抗性を示す要因の1つであると考えられた。

これらのメディエーターの中で、TNF- α は中心的な役割を担う分子であり、LPS投与後60—90分という最も早い時間に血中濃度がピークを迎え、IL-1 β やNOなどの他のメディエーターの産生を誘導する。今回用いたマウス系統 (C57BL/6J) では、肺、脾臓などがTNF- α の主な産生臓器であり、PLA₂受容体の発現とよく一致した。そこで、in

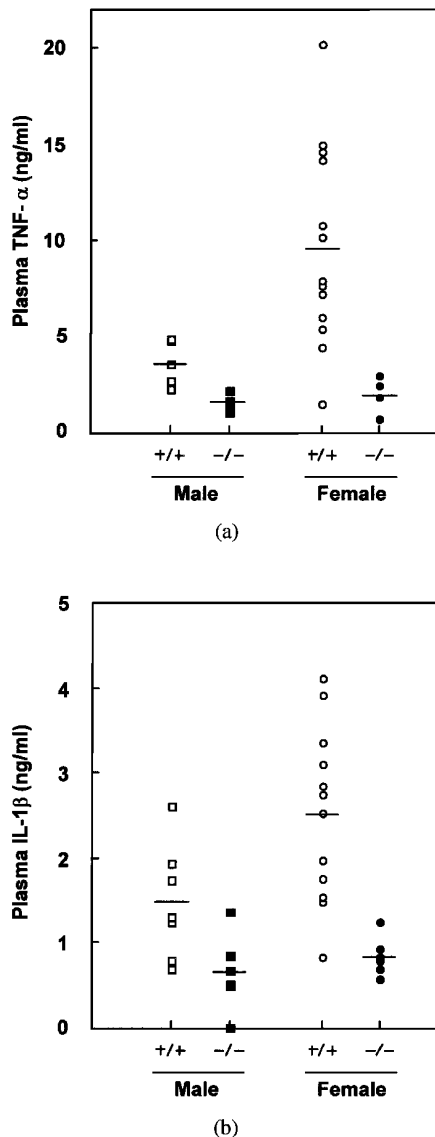


Fig. 4. Plasma Levels of TNF- α and IL-1 β Elevated after LPS Treatment in PLA₂R-Deficient Mice

Mice were injected intraperitoneally with LPS (30 mg/kg). Blood was collected 1 h later for the assay of TNF- α (A) or 5 h later for the assay of IL-1 β (B). Levels of these cytokines in plasma of wildtype mice (open symbols) and PLA₂R-deficient mice (closed symbols) were determined by ELISA (squares for males; circles for females). Statistical significance was determined by the Mann-Whitney test (TNF- α , male: $p=0.0143$, female: $p=0.0092$, IL-1 β , male: $p=0.0321$, female: $p=0.0005$).

situ hybridization 法により LPS 投与 60 分後の細胞レベルでの TNF- α mRNA 発現分布について調べた (投稿準備中). 肺における発現は, 正常時では肺胞上皮に弱いシグナルが認められるだけであったが, LPS 刺激 60 分後には PLA₂ 受容体を発現する II 型肺胞上皮細胞を含む肺胞の広い範囲で TNF- α mRNA の劇的な上昇が認められた. しかしながら, PLA₂ 受容体欠損マウスにおけるシグナルは野生型マウスよりも弱く, 血中レベルと良く相関する結果が得られた. また, PLA₂ 受容体 mRNA の発現も, LPS 投与 60 分後には II 型肺胞上皮細胞に局限した

形で顕著な発現増強が認められた. さらに, リガンドとして機能する sPLA₂-IB の発現についても同様に調べた結果, 正常時には肺胞上皮に弱いシグナルが認められるだけであったが, LPS 投与により PLA₂ 受容体とほぼ同じ位置で発現増強が認められた. 以上の結果から, 肺においては sPLA₂-IB, PLA₂ 受容体及び TNF- α はいずれも II 型肺胞上皮細胞で発現しており, エンドトキシンショック時に発現が上昇することが示された. II 型肺胞上皮細胞は肺 surfactant を産生し肺機能の維持にあたるほか, 様々なサイトカインや増殖因子を産生して免疫調節も行う多機能な細胞であり, この細胞で産生された sPLA₂-IB がオートクライン的に PLA₂ 受容体に作用してサイトカイン産生を促している可能性が示唆される. また, II 型肺胞上皮細胞に隣接して存在する単球やマクロファージでもサイトカインの産生が行われると考えられているが, これらの細胞には PLA₂ 受容体は発現しておらず, II 型肺胞上皮細胞において PLA₂ 受容体を介して産生された何らかのメディエーターが周辺の単球やマクロファージの機能を制御している可能性も考えられる. 一方, 脾臓では TNF- α の発現は赤脾髄及び白脾髄に見られ, LPS 刺激によりシグナルの増強が見られた. 脾臓でも, 肺の場合と同様に LPS 投与後の PLA₂ 受容体欠損マウスにおけるシグナルは野生型マウスよりも弱かった. また, PLA₂ 受容体, sPLA₂-IB の発現はともにリンパ球画分に見られ, LPS によるシグナルの増強が認められたが, その細胞種を同定するまでには至っていない.

従来, エンドトキシンショック病態形成には, サイトカインにより誘導される sPLA₂-IIA が関与すると考えられてきたが, 今回得られた結果は, sPLA₂ が PLA₂ 受容体を介してサイトカイン産生自体を制御することにより病態の形成や進展に関与する可能性を示している点で興味深い. これまで PLA₂ 受容体のリガンドとして sPLA₂-IB を考えてきたが, 強力なアラキドン酸遊離作用を持つ sPLA₂-X が新たに PLA₂ 受容体のリガンドとして機能する可能性が示されたことにより, 今後は sPLA₂-IB のみならず sPLA₂-X の作用も考慮した上で *in vivo* での受容体機能解析を進めていく必要があると考えている.

4. sPLA₂ 阻害剤 Indoxam を用いた PLA₂ 受容体機能の解析

エンドトキシンショック時における sPLA₂/PLA₂ 受容体経路の重要性をより明確にする目的で, sPLA₂ に作用して PLA₂ 受容体への結合を特異的に阻害する薬剤を創製してエンドトキシンショックモデルにおける効果について調べた.⁴⁵⁾ 1-oxamoylindolizine 誘導体である indoxam⁴⁶⁾ (Fig. 5) は sPLA₂-IB 及び sPLA₂-X の PLA₂ 受容体への結合を強力に阻害するとともに sPLA₂-IB, sPLA₂-IIA,

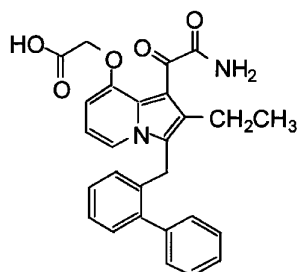


Fig. 5. Chemical Structure of Indoxam

sPLA₂-X の酵素活性も阻害する。しかし、cPLA₂ や膜リパーゼに対しては阻害効果を持たず、indoxam の効果は sPLA₂ に特異的である。Indoxam は sPLA₂-IIA を強力に阻害し、sPLA₂-IIA もエンドトキシンショック病態に関与することが知られていることから、まず sPLA₂-IIA を持つ Balb/c 系統と自然欠損している C57BL/6J 系統のマウスにおいて、LPS 投与後の TNF- α 産生に対する indoxam の効果について比較した。その結果、indoxam は TNF- α 産生を抑制し、両系統のマウスでその程度に違いは見られなかった (Table 2)。すなわち、indoxam によって阻害される TNF- α 産生経路には sPLA₂-IIA は関与しないと考えられた。そこで以下の実験では、sPLA₂-IIA の影響をなくすために sPLA₂-IIA を欠損する C57BL/6J 系統のマウスを用いて解析を行った。その結果、indoxam の前投与により LPS によって誘導される TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、NO の産生が有意に抑制され (Table 3)、投与量依存的に生存時間の延長が見られた (Fig. 6)。この結果は PLA₂ 受容体を欠損する場合とよく対応するものであった。次に、PLA₂ 受容体欠損マウスにおける indoxam の TNF- α 産生抑制効果について調べた結果、野生型マウスでみられた indoxam による TNF- α 産

Table 2. Effect of Indoxam on Plasma TNF- α Levels in LPS-Treated Balb/c or C57BL/6J Mice

Strain	Vehicle	Indoxam
Balb/c	1.04 \pm 0.12 ng/ml	0.66 \pm 0.11 ng/ml*
C57BL/6J	3.19 \pm 0.39 ng/ml	2.11 \pm 0.31 ng/ml*

Plasma TNF- α levels were measured at 75 min after injection of LPS (*E. coli*, 50 μ g/kg) and D-galactosamine (250 mg/kg) in Balb/c (PLA₂-IIA^{+/+}) or C57BL/6J (PLA₂-IIA^{-/-}) mice. Plasma TNF- α was not detectable in either strain of LPS-untreated mice. Values are means \pm SEM. * p < 0.05 versus vehicle-treated mice, as determined by Mann-Whitney test.

Table 3. Effect of Indoxam on Plasma Cytokines and NO Metabolites levels in LPS-treated C57BL/6J Mice

	Vehicle	Indoxam
TNF- α	8.17 \pm 1.54 ng/ml	4.31 \pm 0.97 ng/ml*
IL-1 β	558 \pm 46.0 pg/ml	316 \pm 78.7 pg/ml*
IL-6	127 \pm 19.5 ng/ml	78.7 \pm 9.39 ng/ml*
NO metabolites	212 \pm 10.4 μ M	161 \pm 10.5 μ M*

Plasma TNF- α levels were measured at 70 min after injection of LPS (*S. typhosa*, 3 mg/kg) and plasma levels of IL-1 β , IL-6 and NO metabolites were examined at 5 h later. In LPS-treated mice, plasma levels of cytokines were not detectable and plasma levels of NO metabolites was 20 μ M. Values are means \pm SEM. * p < 0.05 versus vehicle-treated mice, as determined by Mann-Whitney test.

生抑制効果は PLA₂ 受容体欠損マウスでは消失していたことから (Fig. 7), indoxam の効果は sPLA₂ /PLA₂ 受容体経路を遮断することによることが確かめられた。以上 indoxam を用いた解析からも、エンドトキシンショック時には PLA₂ 受容体を介して sPLA₂-IIA に依存しない経路によりサイトカインが誘導されることが明らかとなった。ラットやヒトにおいては、サイトカインにより誘導された

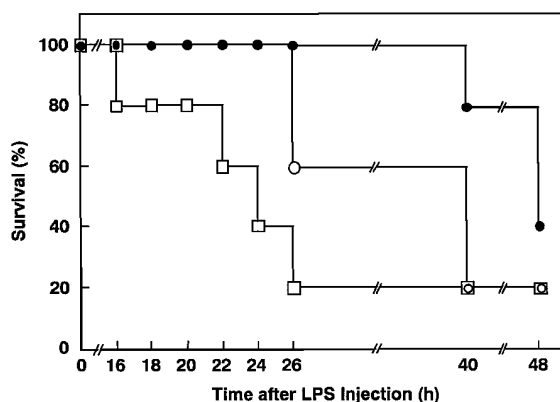


Fig. 6. Effect of Indoxam on Lethal Effects of Murine Endotoxic Shock

After pretreatment with various doses of indoxam for 30 min, LPS (*S. typhosa*, 25 mg/kg) was intraperitoneally injected and their survivals were monitored. ●: 50 mg/kg, ○: 10 mg/kg, □: 0 mg/kg. Statistical significance of dose dependence was determined by Tarone test. p = 0.0072.

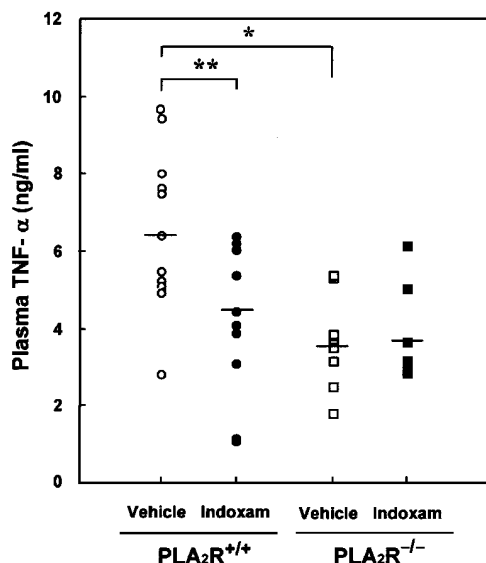


Fig. 7. Effect of Indoxam on the Elevation of Plasma TNF- α Levels in LPS-Treated PLA₂R-Deficient Mice

After pretreatment with saline or indoxam (50 mg/kg) for 30 min, LPS (*S. typhosa*, 3 mg/kg) was injected into wildtype and PLA₂R-deficient mice and plasma TNF- α levels at 70 min after LPS treatment were measured. TNF- α was not detectable in plasma of either type of mice under no treatment with LPS. Statistical significance was determined by Mann-Whitney test (* $p=0.006$ between LPS-treated wildtype mice and PLA₂R-deficient mice, ** $p=0.030$ between vehicle- and indoxam-pretreated wildtype mice). Statistical significance was not detected between vehicle- and indoxam-pretreated PLA₂R-deficient mice ($p=0.916$).

sPLA₂-IIA が炎症病態の悪化を引き起こすことが知られており、indoxam は sPLA₂ の PLA₂ 受容体への結合を阻害するとともにサイトカインによって誘導された sPLA₂-IIA の酵素活性を阻害するという dual な効果により、エンドトキシンショック病態に対し有効な薬剤として期待される。

5. 可溶性 PLA₂ 受容体の発見と機能

ヒト腎臓では選択的スプライシングにより可溶性 PLA₂ 受容体をコードする遺伝子産物の存在する可能性が示唆されていたが、¹⁴⁾ 実際に機能的なタンパクに翻訳されているかどうかについての報告はなく、その同定や存在意義については不明のままであった。そこで筆者らは、作製した PLA₂ 受容体欠損マウスを negative コントロールとして使用し、マウス血中における可溶性 PLA₂ 受容体の存在について検討を行った。まず、マウス PLA₂ 受容体の細胞外領域部分に特異的なポリクローナル抗体とモノクローナル抗体を作製し、PLA₂ 受容体検出のためのサンドイッチ ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) 系を構築した。¹⁶⁾ この検出系を用いて調べた結果、野生型マウスの血漿サンプルで容量依存的なシグナルが検出された (Fig. 8)。このシグナルは、PLA₂ 受容体欠損マウス由来の血漿サンプルでは検出されなかったことから、血中に可溶性 PLA₂ 受容体が存在すると考えられた。¹⁶⁾ さらに、¹²⁵I-sPLA₂ に対する結合実験の結果、野生型マウスの

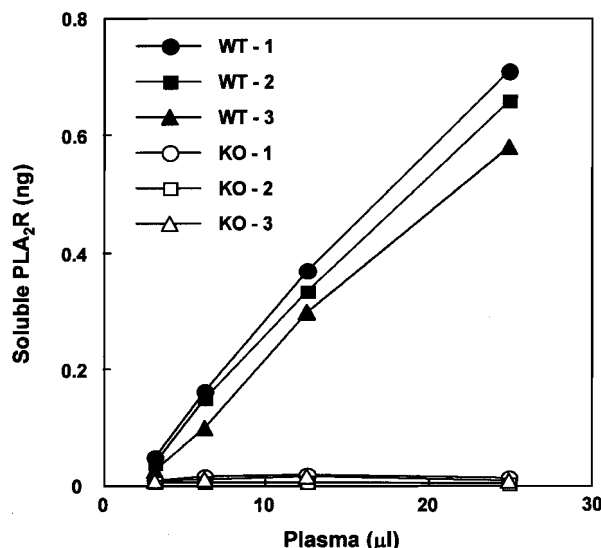


Fig. 8. Detection of Soluble Form of PLA₂R in Mouse Plasma

Plasma samples were prepared from three wild-type and PLA₂R-deficient mice, and the existence of the soluble form of PLA₂R was examined by the sandwich ELISA. The amount of soluble PLA₂R was then calculated as the amount of recombinant sPLA₂R protein from the standard curve. Each point represents the mean value of duplicate measurements.

血漿サンプルでのみ sPLA₂-IB 及び X への結合活性が観察されたことから、血中に存在する可溶性 PLA₂ 受容体はリガンド結合能を持つ機能的な分子であることが確認された。そこで、sPLA₂-IB アフィニティカラムにより可溶性 PLA₂ 受容体を部分精製し、PLA₂ 受容体特異抗体を用いたウエスタンブロットを行った結果、野生型マウス血中からは膜結合型 PLA₂ 受容体とほぼ同じ約 180 kDa の位置に単一なバンドが得られたが、欠損マウスからは検出されず、血中に存在する可溶性の受容体は、PLA₂ 受容体の細胞外領域をほぼ完全な形で持つ分子であると推定された (投稿準備中)。ノーザンブロットや RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) による解析では、ヒトで報告されたような選択的スプライシングによると思われる可溶性 PLA₂ 受容体をコードする mRNA は検出できなかったことから、マウス血中の可溶性 PLA₂ 受容体は、膜表面 PLA₂ 受容体が何らかのプロテアーゼにより shedding されることにより血中に遊離されたものと考えている。

PLA₂ 受容体の細胞外領域のみからなるリコンビナント可溶性 PLA₂ 受容体は、sPLA₂ リガンドに対し膜結合型 PLA₂ 受容体とほぼ同程度の親和性を保持しており、sPLA₂ の膜結合型 PLA₂ 受容体への結合を拮抗的に阻害するとともに、その酵素活性も強力に阻害する。^{19,47)} 筆者らは、新たに受容体内因性リガンドとして同定した sPLA₂-X についても、可溶性 PLA₂ 受容体の阻害効果を確認している (投稿準備中)。したがって、マウス血中に存在する

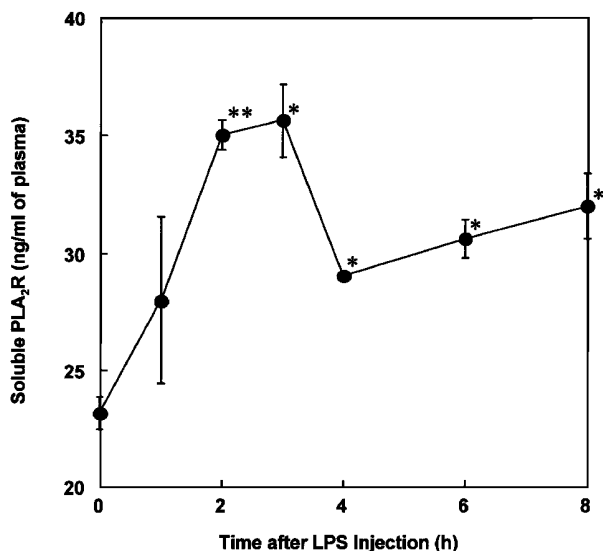


Fig. 9. Elevation of Plasma PLA₂R Level after LPS Treatment

C57BL/6J mice were intraperitoneally injected with 10 mg/kg of LPS, and their plasma samples were prepared at the indicated times. The amount of the soluble form of PLA₂R was measured and each point represents the mean value \pm SEM of four mice examined. Statistical significance between 0 h and each time point was determined by Student's paired two-tailed *t* test (**p* < 0.05, ***p* < 0.01).

可溶性 PLA₂ 受容体は、血中に出現した活性型 sPLA₂-IB 及び X の酵素活性、結合活性を抑制する内因性の inhibitor として機能していると考えられる。血圧下降など強力な生理活性を示すヘビ毒 sPLA₂ の作用に対して、ヘビは自らを防御するために血中にヘビ毒 sPLA₂ に対する inhibitor (PLI) を保有していることが知られている。PLI は構造的に α , β , γ の 3 種類に分類されており、このうち PLI α は PLA₂ 受容体と同じく CRD を持つ分子で、20 kDa のサブユニットのホモ 3 量体を形成し、III 型 C-タイププレクチンサブファミリーに分類される血清マンナン結合タンパク質や肺胞 surfactant protein A などと同様の構造をとる。⁴⁸⁾ PLI α の CRD も糖結合能を持たず、sPLA₂ をリガンドとしその活性を阻害する点でマウス血中の可溶性 PLA₂ 受容体と共通するところがあり興味深い。すなわち、筆者らが発見した可溶性 PLA₂ 受容体は、内因性 sPLA₂ あるいはヘビ毒などの外来 sPLA₂ の酵素活性を中和するとともに PLA₂ 受容体を介した様々な生体反応を抑制する哺乳類の PLI として機能している可能性があり、ヘビから哺乳類にいたる進化の過程で、sPLA₂ に対する防御機構が生体内に保存されている可能性を示している。実際に、エンドトキシンショックモデルでの血中の可溶性 PLA₂ 受容体量を測定すると、LPS 投与後に一過的な上昇が見られ、2—3 時間で最大となる¹⁶⁾ (Fig. 9)。既に述べたように、エンドトキシンショックモデルでは sPLA₂-IB 及び PLA₂ 受容体の発現は LPS 投与 60

分後で上昇しており、TNF- α の血中濃度は LPS 投与 60—90 分後で最大となる。可溶性 PLA₂ 受容体がこれより少し遅れて上昇するという事は、可溶性受容体の役割が過剰な sPLA₂/PLA₂ 受容体経路の活性化を中和することにあるのではないかと考えられる。

ヒトにおいても、腎でみられた選択的スプライシング産物からの翻訳物が機能する可能性やマウスと同様に膜表面 PLA₂ 受容体が shedding を受けることにより可溶性が産生される可能性は十分に考えられる。sPLA₂-IB の活性化が起ることが知られている肺障害や腎障害あるいは急性膵炎患者での血中可溶性 PLA₂ 受容体のレベルを測定することにより、今後、各種疾患における可溶性受容体の役割がより明確になるであろう。

6. おわりに

以上、本研究では PLA₂ 受容体欠損マウスを作製しその解析を行うことにより、これまで培養細胞や組織片を用いた *in vitro* の研究では見出せなかったエンドトキシンショック時における PLA₂ 受容体のサイトカイン産生制御機構の存在を示すことができた。さらに、sPLA₂ 特異的阻害剤 indoxam を用いることにより、従来、炎症に関与する sPLA₂ として考えられてきた sPLA₂-IIA 以外の sPLA₂ が PLA₂ 受容体によるサイトカイン産生に関与すること、及び sPLA₂/PLA₂ 受容体結合阻害剤がエンドトキシンショックに有効である可能性を示した。また、PLA₂ 受容体欠損マウスをコントロールとして用いることにより、PLA₂ 受容体の発現細胞を同定するとともに、新規の sPLA₂ である sPLA₂-X がマウス PLA₂ 受容体のリガンドとして機能し得ることやマウス血中に可溶性 PLA₂ 受容体が存在し内因性の inhibitor として機能し得ることを明らかにした。以上の解析から、sPLA₂/PLA₂ 受容体経路が炎症病態時において肺、脾臓においてサイトカイン産生を制御しているという新たな生体内での役割が提示されるとともに、その内因性抑制機構としての血中可溶性受容体の存在が明らかとなり、本システムが病態発生に伴って時間的あるいは空間的に精巧に制御されていることが示された。今後、マウスで得られた受容体に関する知見がヒト PLA₂ 受容体の真のリガンドの同定やヒト血中の可溶性受容体の存在、あるいは病態時における受容体発現レベルの解析など多くの問題点を解決することにより、sPLA₂/PLA₂ 受容体系に対する阻害剤の創薬への適用の可能性を考えていきたい。

謝辞 本研究は塩野義製薬・創薬研究所において行われたものであり、終始、ご指導、ご鞭撻を賜り、かつ本総説に対してもご助言を頂いた有田 斉 創薬研究所長並びに花崎浩二 主管研究員に厚く御礼

申し上げます。また、本研究を推進するにあたりご協力頂きました多くの共同研究者の皆様にご心より感謝いたします。

REFERENCES

- 1) Vadas P., Pruzanski W., *Lab. Invest.*, **55**, 391–404 (1986).
- 2) Arita H., Nakano T., Hanasaki K., *Prog. Lipid Res.*, **28**, 273–301 (1989).
- 3) Dennis E. A., *J. Biol. Chem.*, **269**, 13057–13060 (1994).
- 4) Dennis E. A., *Trends Biol. Sci.*, **22**, 1–2 (1997).
- 5) Ohara O., Ishizaki J., Arita H., *Prog. Lipid Res.*, **34**, 117–138 (1995).
- 6) Arita H., Hanasaki K., Nakano T., Oka S., Matsumoto K., *J. Biol. Chem.*, **266**, 19139–19141 (1991).
- 7) Hanasaki K., Arita H., *J. Biol. Chem.*, **267**, 6414–6420 (1992).
- 8) Hanasaki K., Arita H., *Biochim. Biophys. Acta*, **1127**, 233–241 (1992).
- 9) Fujita H., Kawamoto K., Hanasaki K., Arita H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **209**, 293–299 (1995).
- 10) Ishizaki J., Hanasaki K., Higashino K., Kishino J., Kikuchi N., Ohara O., Arita H., *J. Biol. Chem.*, **269**, 5897–5904 (1994).
- 11) Taylor M. E., Conary J. T., Lennartz M. R., Stahl P. D., Drickamer K., *J. Biol. Chem.*, **270**, 14047–14055 (1990).
- 12) Jiang W., Swiggard W. J., Heufler C., Peng M., Mirza A., Steinman R. M., Nussenzweig M. C., *Nature*, **375**, 151–155 (1995).
- 13) Higashino K., Ishizaki J., Kishino J., Ohara O., Arita H., *Eur. J. Biochem.*, **225**, 375–382 (1994).
- 14) Ancien P., Lambeau G., Mattei M.-G., Lazdunski M., *J. Biol. Chem.*, **270**, 8963–8970 (1995).
- 15) Lambeau G., Ancien P., Barhanin J., Lazdunski M., *J. Biol. Chem.*, **269**, 1575–1578 (1994).
- 16) Yokota Y., Ikeda M., Higashino K., Nakano K., Fujii N., Arita H., Hanasaki K., *Arch. Biochem. Biophys.*, **379**, 7–17 (2000).
- 17) Yokota Y., Higashino K., Nakano K., Arita H., Hanasaki K., *FEBS Lett.*, **478**, 187–191 (2000).
- 18) Cupillard L., Mulherkar R., Gomez N., Kadam S., Valentin E., Lazdunski M., Lambeau G., *J. Biol. Chem.*, **274**, 7043–7051 (1999).
- 19) Kishino J., Kawamoto K., Ishizaki J., Verheij H. M., Ohara O., Arita H., *J. Biochem.*, **117**, 420–424 (1995).
- 20) Fonteh A. N., Samet J. M., Surette M., Reed W., Chilton F. H., *Biochim. Biophys. Acta*, **1393**, 253–266 (1998).
- 21) Kinoshita E., Handa N., Handa K., Kajiyama G., Sugiyama M., *FEBS Lett.*, **407**, 343–346 (1997).
- 22) Green J.-A., Smith G. M., Buchta R., Lee R., Ho K. Y., Rajkovic I. A., Scott K. F., *Inflammation*, **15**, 355–367 (1991).
- 23) Kennedy B. P., Payette P., Mudgett J., Vadas P., Pruzanski W., Kwan M., Tang C., Rancourt D. E., Cromlish W. A., *J. Biol. Chem.*, **270**, 22378–22385 (1995).
- 24) Tischfield J. A., Xia Y. R., Shih D. M., Hlisak I., Chen J., Engle S. J., Siakotos A. N., Winstead M. V., Seilhamer J. J., Allamand V., Gyapay G., Lusic A. J., *Genomics*, **32**, 328–333 (1996).
- 25) Ishizaki J., Suzuki N., Higashino K., Yokota Y., Ono T., Kawamoto K., Fujii N., Arita H., Hanasaki K., *J. Biol. Chem.*, **274**, 24973–24979 (1999).
- 26) Suzuki N., Ishizaki J., Yokota Y., Higashino K., Ono T., Ikeda M., Fujii N., Kawamoto K., Hanasaki K., *J. Biol. Chem.*, **275**, 5785–5797 (2000).
- 27) Valentin E., Ghomashchi F., Gelb M. H., Lazdunski M., Lambeau G., *J. Biol. Chem.*, **274**, 31195–31202 (1999).
- 28) Chen J., Engle S. J., Seilhamer J. J., Tischfield J. A., *J. Biol. Chem.*, **269**, 2365–2368 (1994).
- 29) Valentin E., Koduri R. S., Scimeca J.-C., Carle G., Gelb M. H., Lazdunski M., Lambeau G., *J. Biol. Chem.*, **274**, 19152–19160 (1999).
- 30) Cupillard L., Koumanov K., Mattei M.-G., Lazdunski M., Lambeau G., *J. Biol. Chem.*, **272**, 15745–15752 (1997).
- 31) Hanasaki K., Ono T., Saiga A., Morioka Y., Ikeda M., Kawamoto K., Higashino K., Nakano K., Yamada K., Ishizaki J., Arita H., *J. Biol. Chem.*, **274**, 34203–34211 (1999).
- 32) Morioka Y., Saiga A., Yokota Y., Suzuki N., Ikeda M., Ono T., Nakano K., Fujii N., Ishizaki J., Arita H., Hanasaki K., *Arch. Biochem. Biophys.*, **381**, 31–42 (2000).
- 33) Hanasaki K., Yokota Y., Ishizaki J., Itoh T., Arita H., *J. Biol. Chem.*, **272**, 32792–32797 (1997).
- 34) Kanemasa T., Arimura A., Kishino J., Ohtani M., Arita H., *FEBS Lett.*, **303**, 217–220

- (1992).
- 35) Kishino J., Ohara O., Nomura K., Kramer R. M., Arita H., *J. Biol. Chem.*, **269**, 5092-5098 (1994).
- 36) Mukherjee A. B., Miele L., Pattabiraman N., *Biochem. Pharmacol.*, **48**, 1-10 (1994).
- 37) Nakano T., Fujita H., Kikuchi N., Arita H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **198**, 10-15 (1994).
- 38) Rae D., Sumar N., Beechey-Newman N., Gudgeon M., Hermon-Taylor J., *Clin. Biochem.*, **28**, 71-78 (1995).
- 39) Rae D., Porter J., Beechey-Newman N., Sumar N., Bennett D., Hermon-Taylor J., *Lancet*, **344**, 1472-1473 (1994).
- 40) Pasparakis M., Alexopoulou L., Episkopou V., Kollias G., *J. Exp. Med.*, **184**, 1397-1411 (1996).
- 41) Pfeffer K., Matsuyama T., Kundig T. M., Wakeham A., Kishihara K., Shahinian A., Weigmann K., Ohashi P. S., Kronke M., Mak T. W., *Cell*, **73**, 457-467 (1993).
- 42) Erickson S. L., de Sauvage F. J., Kikly K., Carver-Moore K., Pitts-Meek S., Gillet N., Sheehan K. C., Schreiber R. D., Goeddel D. V., Moore M. W., *Nature*, **372**, 560-563 (1994).
- 43) Li P., Allen H., Banerjee S., Franklin S., Herzog L., Johnston C., McDowell J., Paskind M., Rodman L., Salfeld J., Towne E., Tracey D., Wardwell S., Wei F.-Y., Wong W., Kamen R., Seshadri T., *Cell*, **80**, 401-411 (1995).
- 44) MacMicking J. D., Nathan C., Hom G., Chartrain N., Fletcher D. S., Trumbauer M., Stevens K., Xie Q., Sokol K., Hutchinson N., Chen H., Mudgett J. S., *Cell*, **81**, 641-650 (1995).
- 45) Yokota Y., Hanasaki K., Ono T., Nakazato H., Kobayashi T., Arita H., *Biochim. Biophys. Acta*, **1438**, 213-222 (1999).
- 46) Hagishita S., Yamada M., Shirahase K., Okuda T., Murakami Y., Ito Y., Matsuura T., Wada M., Kato T., Ueno M., Chikazawa Y., Yamada K., Ono T., Teshirogi I., Ohtani M., *J. Med. Chem.*, **39**, 3636-3658 (1996).
- 47) Ancien P., Lambeau G., Lazdunski M., *Biochemistry*, **34**, 13146-13151 (1995).
- 48) Okumura K., Inoue S., Ikeda K., Hayashi K., *Biochim. Biophys. Acta*, **1441**, 51-61 (1999).