

「脳を守る」

平成9年度採択研究代表者

森 望

(国立長寿医療研究センター 部長)

「老化脳における神経の可塑性制御の分子基盤」

1. 研究実施の概要

脳は老化するにともない様々なレベルで応答性が欠如する。その原因は、神経細胞の外界刺激に即応した反応性（可塑性）の低下にあると考えられる。神経可塑性の主体は、神経の連結部であるシナプス直下から神経骨格と神経小胞のダイナミックス制御にある。我々は、神経の突起伸展の制御因子 nGAPs と、その神経細胞に特異的な遺伝子発現を統括制御する転写因子 NRSF/REST、さらに神経栄養因子による nGAPs 誘導にかかわる神経特異的なシグナル伝達分子 N-Shc に関する研究を総合して、神経可塑性の分子基盤を明らかにし、老化にともなうその減退の主な因を探り、それを補う方策を考えることによって『脳を守る』研究を進めている。これまでの研究で、nGAPs を制御する微小管関連の蛋白質の存在、転写因子 NRSF/REST による転写抑制のメカニズム、さらに N-Shc 類似のシグナル分子で脳内で機能する Sck との構造的、機能的差異が明らかになった。

2. 研究実施内容

(1) 神経特異的遺伝子制御

様々な神経特異的遺伝子の発現制御の中核を担う NRSF による転写抑制メカニズムについて、非常に大きな進展があった。NRSF は N 末と C 末に独立した転写抑制ドメインもつこと、N 末の転写抑制は mSin3 を介してヒストン脱アセチル化酵素 HDAC をリクルートすることによること、C 末の抑制はそれとは異なり恐らくは TATA-box に結合する基本転写因子の何かを介して直接転写開始複合体形成を阻害する可能性がみえた。非神経細胞で HDAC の阻害剤であるトリコスタチン A を作用させると、興味深いことに神経選択的サイレンサー NRSE 制御下にある神経特異的遺伝子の発現が観察された。以上の結果から、NRSF による神経特異的遺伝子の転写制御のメカニズムの概要が見え始めたといえる。

(2) 神経突起伸展関連分子

神経可塑性の基礎となる微小管制御因子 SCG10 の分布、機能を追及する過程で、関連分子 RB3, Sclip の存在が明らかとなり、それらの脳内での詳細な分布を明ら

かにし、また、それぞれの微小管崩壊活性を比較検討した。SCG10 関連分子による神経突起伸展の分子機構を知る目的で結合蛋白を検索した結果、GEF2 およびその関連分子が特異的に結合することがわかった。微小管制御系としての SCG10 遺伝子群の他に、神経突起先端の動きに関与する新たなアクチン調節因子として ClipinC を単離同定した。

(3) 神経特異的シグナル伝達分子

Shc 系アダプター分子 Shc、N-Shc、Sck について、特に PKC との機能連関について、Cos-7 細胞を用いた共発現系で解析を進めた。その結果、N-Shc は PKC-beta II および PKC delta と特異的に結合すること、その結合は PKC のチロシンリン酸化に依存すること、PKC delta と N-Shc との結合は PKC 活性を減弱させる傾向が明らかになった。

シグナルグループ (住友電工バイオメディカル研)

リン酸化チロシン経路のアダプター分子である Shc と N-Shc はその構造が非常によく保存されているが、その発現パターンは対照的であり、N-Shc には神経特異的な機能があると推測される。今年度は、この2つの分子の生化学的な相違点を見出すことを研究の目標とした。(i) NGF による MAPK(Erk)の活性化: N-Shc を入れた場合の活性化の程度は、Shc の場合の半分以下である。しかしながら、N-Shc 3F(221/222/304F)変異体 (Grb2 が結合できない) を入れると、wild type N-Shc に比べて、Erk 活性化の度合いがさらに低下したことから、N-Shc もまた Erk 活性化の媒介分子である (ただし、その程度は Shc よりも弱い) と考えられた。(ii) Shc の場合、主要なチロシンリン酸化部位は Y239/240, Y317 の2ヶ所であるのに対し、N-Shc にはそれに相当する残基 (Y221/222, Y304)以外に高度にリン酸化されるチロシンが存在した (Y259/260, Y286)。これらのチロシン残基が、N-Shc 特異的な effector の結合部位となっている可能性について現在検討中である。

チャンネルグループ (産業医科大学)

G protein-coupled receptors (GPCRs) 刺激によるシグナルは上記アダプター蛋白を介して伝わるのか、さらに GPCR からのシグナルはアダプターに応じ分別して伝えられるのかについて、GPCR、イオンチャンネル、ならびに N-Shc、Sck を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞を用い、受容体によるイオンチャンネル活性の修飾を指標として検討した。その結果、GPCR の中で Gq に共役するタイプ、すなわち細胞内 Ca^{2+} を上昇させるタイプの受容体刺激のみ、その下流に N-Shc、ならびに Sck が位置し、Gs 共役型、Gi 共役型 GPCR の下流には N-Shc、Sck は関与していないという結果を得た。

ノックアウトグループ (京都大学理学部実験発生生物学研センター)

N-Shc 遺伝子の変異体マウスを作製することを目的として、N-Shc 遺伝子ター

ゲティング用ベクターを ES 細胞に遺伝子導入した。スクリーニングの結果、相同組み替えにより N-Shc 遺伝子座が破壊された細胞株 3 種を樹立した。このうち 2 つの ES 細胞クローンをマウスの胚盤胞に顕微注入し、常法に従ってキメラマウスの作製を試みた。その結果、これまでに各々の ES 細胞クローンから合計して 5 匹のキメラマウスが得られた。それらのうち一方の ES 細胞クローン (E1B) 由来のキメラマウスからは各々 40 匹程の F1 マウスが生まれているがその中に N-Shc ヘテロ変異体はなく、この ES 細胞由来の細胞が germline に存在している可能性は低かった。他方の ES 細胞クローン (E8F) 由来のキメラマウスは現在野生型マウスと交配をしており、germline transmission をおこした個体を選別中である。

可塑性グループ (大阪バイオサイエンス研究所)

昨年度、ネコ大脳皮質視覚野における nGAPs の mRNA は、眼優位可塑性の感受性期のオンセットよりやや早い時期にその発現のピークを持つことを見いだしたので、平成 10 年度からは、まず、完全暗室飼育された成熟ラットの視覚野及び、年齢対応の対象動物の視覚野から RNA を抽出し、cDNA サブトラクション法によりそれぞれの状況下で発現の異なる分子を検索した。予備的スクリーニングの結果、暗室飼育で発現が著しく減少しているいくつかの分子を見い出した。また、大脳皮質の機能構築や可塑性調節に神経栄養因子が関与していることが示されてきているが、我々は、脳由来神経栄養因子(BDNF)に注目し、BDNF が視覚野の神経連絡の形成に及ぼす影響と nGAP の発現の関連を明らかにする目的で、感受性期内の子猫の一侧視覚野に外来性の BDNF を浸透圧ミニポンプを用いて局所的に持続注入後、大脳視覚野及び外側膝状体における SCG10 mRNA の発現を調べた。SCG10mRNA が、BDNF 注入した視覚野及び LGN で著しく発現増加していることを観察した。

神経再生グループ (旭川医科大学)

損傷神経の修復過程の分子メカニズムを解明するために、ラット舌下神経損傷モデル系を用い、神経再生関連遺伝子の探索を行った。得られた遺伝子の中で、神経損傷後に発現が増加するものについては、さらに Axotomy Induced Neuron Death の系で、軸索損傷後の発現動態を検討した。これにより、軸索損傷によって運動ニューロンが生存する場合発現が上昇し、細胞死を起こす場合発現が低下する分子を絞り込んだ。この結果、フリーラジカルの消去系分子群やグルタミン酸毒性抑制分子などの多くが、このような発現動態を示すことが明らかになった。これらの分子の発現が神経細胞生存には本当に必要なのかを確認するために、アデノウイルスを用いて動物に遺伝子を導入し、神経細胞死を抑制できるかを検討した。その結果、一部の遺伝子を導入したものでは、神経細胞死の明らかな抑制が認められた。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

- T. Nakamura, S. Muraoka, R. Sanokawa and N. Mori
N-Shc and Sck, two neuronally expressed Shc adaptor homologs: Their differential regional expression in the brain and roles in neurotrophin and Src signaling.
J. Biol. Chem. 273, 6960-6967 (1998)
- K. Tanabe, S. Kiryu-Seo, T. Nakamura, N. Mori, H. Tsujino, T. Ochi and H. Kiyama
Alternative expression of Shc family members in nerve-injured motoneurons.
Mol. Brain Res. 53, 291-296 (1998)
- E. Nishihara, T. Furuyama, S. Yamashita and N. Mori
Expression of copper trafficking genes in the mouse brain.
NeuroReport 9, 3259-3263 (1998)
- T. H. McNeill, N. Mori and H.-W. Cheng
Differential regulation of the growth-associated proteins, GAP-43 and SCG10, in response to unilateral cortical ablation in adult rats.
Neuroscience 90, 1349-1360 (1999)
- T. Nakamura, K. Takeuchi, S. Muraoka, H. Takezoe, N. Takahashi and N. Mori
A neurally-enriched coronin-like protein, ClipinC, is a novel candidate for an actin cytoskeleton-cortical membrane linking protein.
J. Biol. Chem. 274, 13322-13327 (1999)
- Miyaguchi K, Maeda Y, Kojima T, Setoguchi Y, Mori N
Neuron-targeted gene transfer by adenovirus carrying neural-restrictive silencer element.
NeuroReport ; 10 (11):2349-2353 (1999)
- Tabuchi A, Nakatani C, Nakaoka R, Naruse Y, Kojima T, Mori N, Tsuda M
Silencer-mediated repression and non-mediated activation of BDNF and c-fos gene promoters in primary glial or neuronal cells.
Biochem Biophys Res Commun; 261 (2): 233-237 (1999)