

「脳を守る」
平成10年度採択研究代表者

遠山 正彌

(大阪大学 大学院医学系研究科 教授)

「脳虚血により引き起こされる神経細胞死防御法の開発」

1. 研究実施の概要

1) 脳血管障害後の痴呆の救済

脳梗塞等で起きる病的状態の代表は低酸素である。神経細胞は低酸素負荷によりすぐに細胞死を起こすがグリア細胞であるアストロサイトは低酸素負荷に対し耐性を示す。我々はアストロサイトは低酸素負荷を加えられると低酸素負荷下を生き抜く新たな遺伝子・蛋白発現を引き起こすと想定し、ORP150,RA301,RA410, SERP1の4種の新規遺伝子・蛋白の単離に成功した。これらの内、ORP150およびSERP1蛋白は小胞体に局在するストレス蛋白である。ORP150が虚血環境における神経保護因子であることを直接証明するため、神経細胞に特異的にORP150を発現させたトランスジェニックマウスを作成、中大脳動脈結紮モデルにおいて神経細胞死が約3分の1に抑制されることを証明した。また、その一つのメカニズムとして、ORP150が小胞体中存在するための分子シャペロンに比べATP親和性が高く、より厳しい虚血環境においても小胞体・ゴルジ間の小胞輸送を可能とし、このことによって神経保護因子の産生が高まることを示した。本年度は、1) 急性の神経細胞死のメカニズムとして知られているグルタミン酸毒性に関してもORP150が神経保護因子として働いていることを示し、さらに2) SERP1ノックアウトマウスを用いて、虚血環境下におけるSERP1の神経保護機作を解明する。

2) アルツハイマー病の神経細胞死防御機構の開発

アルツハイマー病(AD)は比較的若年で発症する家族性AD(FAD)と高年齢になって発症する孤発性AD(SAD)に分類される。近年の分子遺伝学の進歩により、家族性AD(FAD)の原因遺伝子が3種同定された。その内、第14番染色体に存在するpresenilin-1(PS1)遺伝子変異が原因となるケースが最も多い。我々はPS1の遺伝子変異による神経細胞死のメカニズムに着目し解析を進めた結果、PS1変異体は小胞体中存在するストレスセンサーIRE1のリン酸化障害を引き起こし神経細胞死を誘発することを見出した。つまり、ADは小胞体機能障害が引き金になっていると考えられる。一方、SADについてはその病理像がFADと同様であるにも関わらず発症原因が不明であった。我々は最近、SAD患者脳においては

PS2のエクソン5を欠失したスプライシング変種が高頻度に発現していることを見つけたし、この翻訳産物は強制発現させると細胞死を誘発し易くなることを明らかとした。これらの結果はFADにおいてはPS1の変異体が、SADにおいてはPS2のスプライシング変種が共に小胞体を起源とする細胞死を引き起こし、痴呆の原因となっていることを意味する。これらの翻訳異常産物による神経細胞死の機序あるいは翻訳異常産物の出現する機構を明らかにすればその機序の抑制により神経細胞を死から守ることができ、痴呆から救済しうる。本研究の目的はこれらの結果を基盤としてADに対する有効な治療薬開発にある。

2. 研究実施内容

. ORP150

- (1) ヒト病理標本においてORP150は急性期には神経細胞に発現するがその発現量は少ない。これに比し、虚血に抵抗性を示すアストログリアでは虚血垂急性期よりORP150の発現量は著増し、慢性期にまでその高い発現量は維持した。
- (2) 培養神経細胞においても神経細胞のORP150発現量はアストログリアのそれに比し少なく発現期間も短小であった。
- (3) PDGF promoterを用いたORP150トランスジェニックマウス (ORP150TG) では神経細胞に高いORP150の発現が維持され、低酸素環境に対しても明らかに抵抗性を示した。
- (4) GP-80を常に分泌しているMDCK細胞でORP50 antisense transformantsでは、低酸素下においてGP-80が小胞体に留まることが示され、また免疫沈降を用いた実験でORP150が他の小胞体分子シャペロンであるGRP78やGRP94に対してより高いATP親和性を持ち、低酸素環境における小胞輸送を可能とすることが示唆された。
- (5) 同様に、神経細胞においても、低酸素環境で産生される神経保護因子BDNF量はORP150TGの虚血脳で明らかに増加し、このことがORP150の神経保護活性の一因であると推定された。

. SERP 1

- (1) SERP1は68アミノ酸からなり、C末端付近に1回膜貫通領域を持つ小胞体に局在する蛋白であることがわかった。ラットの脳梗塞モデルにおいて梗塞巣周囲のペナンプラ領域に誘導を認め、虚血ストレスにおいて何らかの役割を果たす可能性が考えられた。
- (2) SERP1は小胞体の蛋白輸送チャネルSec61complexと小胞体で複合体を作っていることが証明されている。SERP1を発現できない細胞にマーカー蛋白としてRAGE(receptor for advanced glycosylation endopducts) を発現させるとRAGE自身の糖鎖による修飾が遅延し、小胞体内に留まることが示された。

このことはSERP1が小胞体内での蛋白修飾を加速させ、そのことによって小胞体負荷を軽減させることを示している。

現在、SERP1ノックアウトマウス (SEPR1 KO) を作成中で、homozygote F2を確認中である。このマウスの作成が確認し、中大脳動脈結紮モデルによってSERP1 KOマウスで神経細胞の虚血に対する挙動を解析する。

1) ストレスセンサー Ire1の活性制御に関する研究

これまでに家族性アルツハイマー病に関連したプレセニリン1(PS1)の変異体は小胞体(ER)ストレス時、ストレスセンサー蛋白質Ire1の活性化を阻害することを明らかにしてきた。さらに我々はPS1変異体はERストレスセンサー蛋白質のATF6およびPERKの活性化を阻害していることを明らかにした。今回、PS1変異体ノックインマウス由来線維芽細胞を用いてERストレス時のATF6のプロセッシングおよび核移行、またPERKおよびIre1 α のリン酸化をそれぞれの抗体を用いたウェスタンブロッティングにより検討した。ATF6は活性化されると小胞体膜近傍で90kDaの全長から50kDaの細胞質領域が切り出され、核に移行し分子シャペロンを誘導する。一方、PERKは活性化されるとオリゴマーを形成しリン酸化され、下流にシグナルを伝えて翻訳を調節する。PS1変異体ホモ型細胞では野生型細胞に比べATF6のプロセッシングおよび核移行が遅延しており、PERKおよびIre1のリン酸化が阻害されていた。この結果は、変異PS1はIre1 α を介するunfolded protein responseのシグナル伝達を障害させているだけでなく、ATF6による分子シャペロンの誘導、PERKを介するタンパク質翻訳抑制のシグナル伝達にも影響を与えている可能性を示唆する。

その他、Two-hybrid systemにより、Ire1からのシグナルがカスパーゼ-12の活性化につながることも明らかにしている(論文投稿済)。

2) PS2遺伝子スプライシング制御に関する研究

孤発性アルツハイマー病患者脳ではPS2遺伝子のエクソン5が欠損したスプライシング変種(PS2V)が発現していることをこれまでに明らかにしている。今回は、このバリエーション由来の蛋白質を特異的に検出するポリクローナルおよびモノクローナル抗体を作成し免疫組織学的にアルツハイマー病脳での発現を検討した。その結果、PS2Vは健常脳では全く検出されなかったが、孤発性アルツハイマー病患者脳13例中13例とも検出できた。この成果についてはJournal of Biological Chemistryに掲載された。また、PS2遺伝子の異常なスプライシングを引き起こす分子の精製に成功し、現在、アミノ酸配列の決定を終了した。

3. 主な研究成果の発表(論文発表)

Matsuzaki H, Tamatani M, Yamaguchi A, Namikawa K, Kiyama H, Vitek MP, Mitsuda N, Tohyama M., Vascular endothelial growth factor rescues

hippocampal neurons from glutamate-induced toxicity : signal transduction cascades.,FASEB J., 12(2001) 1096

Mitsuda N, Ohkubo N, Tamatani M, Lee YD, Taniguchi M, Namikawa K, Kiyama H, Yamaguchi A, Sato N, Ogihara T, Vitek MP, Tohyama M., Activated CREB Regulates Neuronal Expression of Presenilin-1.,J Biol Chem 276 (2001) 9688-9698.

Tamatani M, Matsuyama T, Yamaguchi A, Mitsuda N, Tsukamoto Y, Taniguchi M, Che YH, Ozawa K, Hori O, Nishimura H, Yamashita A, Okabe M, Yanagi H, Stern DM, Ogawa S, Tohyama M., ORP150 protects against hypoxia/ischemia-induced neuronal death.,Nature Med 7 (2001) 317-323

Yamaguchi A, Tamatani M, Matsuzaki H, Namikawa K, Kiyama H, Vitek MP, Mitsuda N, Tohyama M., Akt activation protects hippocampal neurons from apoptosis by inhibiting transcriptional activity of p53.,J Biol Chem 276 (2001) 5256-5264.

Ohkubo N, Mitsuda N, Tamatani M, Yamaguchi A, Lee YD, Ogihara T, Vitek MP, Tohyama M., Apolipoprotein E 4 Stimulates cAMP Response Element-binding Protein Transcriptional Activity through the Extracellular Signal-regulated Kinase Pathway.,J Biol Chem. 276 (2001) 3046-3053.

Tamatani M, Mitsuda N, Matsuzaki H, Okado H, Miyake S, Vitek MP, Yamaguchi A, Tohyama M., A pathway of neuronal apoptosis induced by hypoxia/reoxygenation : roles of nuclear factor-kappaB and Bcl-2.,J Neurochem 75 (2000) 683-93

Taniguchi M, Yamashita T, Kumura E, Tamatani M, Kobayashi A, Yokawa T, Maruno M, Kato A, Ohnishi T, Kohmura E, Tohyama M, Yoshimine T., Induction of aquaporin- 4 water channel mRNA after focal cerebral ischemia in rat.,Brain Res Mol Brain Res. 78(2000) 131-7.

Sato, N., Imaizumi, K., Manabe, T., Taniguchi, M., Hitomi, J., Katayama, T., Morihara, T., Miyoshi, K., Kudo, T., Takeda, M., Yoneda, T. & Tohyama, M. Increased production of β -amyloid and vulnerability to ER stress by an aberrant spliced form of presenilin-2 .(2001) *J Biol Chem* , 276(3) : 2108-2114

Mori, Y., Imaizumi, K., Katayama, T., Yoneda, T. & Tohyama, M. Two cis-acting elements in the 3' untranslated region of α -CaMKII regulate its dendritic targeting.,(2000) *Nature Neuroscience* , 3 (11) 1079-1084.

Yoneda, T., Imaizumi, K., Maeda, M., Yui, D., Manabe, T., Katayama, T., Sato, N., Gomi, F., Morihara, T., Mori, Y., Miyoshi, K., Hitomi, J., Yamada, S., Okabe, M. and

Tohyama, M., Regulatory mechanisms of TRAF2 mediated signal transduction by Bcl10, MALT lymphoma associated protein., (2000) *J.Biol.Chem.* 275(15) : 11114-20

Yamaguchi, A., Hori, O., D.M.Stern., E. Hartmann., Ogawa, S., and Tohyama, M., SERP1/RAMP4 stabilized membrane proteins during stress and facilitates subsequent glycosylation., *J. Cell.Biol.*, 147(1999)1195-1204.

Katayama, T., Imaizumi, K., Sato N., Miyoshi, K, Kudo, T., Hitomi, J., Morihara, T., Yoneda, T., Gomi, F., Mori, Y., Nakano, Y., Takeda, J., Tsuda, T., Itoyama, Y., Murayama, O., Takashima, A., G-Hyslop, P.H., Takeda, M. & Tohyama, M. Presenilin-1 mutation down-regulates the signalling pathway of unfolded protein response and increases vulnerability to ER stress, *Nature Cell Biol.* 1(1999)479-485.

Sato, N., Hori, O., Yamaguchi, A., J.C.Lambert., MC, CHarlin., P.A.Robinson., A.Delacourte., A.M.Schmidt., Furuyama, T., Imaizumi, K., Tohyama, M., and Takagi, T., A novel presenilin-2 splice variant in human Alzheimer's disease brain tissue., *J.Neurochem.*, 72(1999)2498-2505

R. Tacke., Tohyama, M., Ogawa, S., and J.L.Manley., Human Tra2 proteins are sequence-specific activators of pre-mRNA splicing., *Cell*, 93(1998)139-148

Yan S.D., Fu J., Soto C., Chen X., Zhu H., Mohanna F A., Collison K., Zhu A., Stern E., Saido T., Tohyama, M., Ogawa, S., Roher A., and Stern D., An intracellular protein that binds amyloid- β peptide and mediates Neurotoxicity in Alzheimer's disease., *Nature*, 389(1997)689-695