

「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

脳の老化における最大の問題は神経細胞の不可逆的退行性変化による可塑性の減退である。この研究では、神経細胞の可塑性因子とその発現を制御するシグナル伝達物質、転写制御因子の神経特異性に注目してその機能を明らかにし、またそれらの連携によって形成される神経可塑性の老化にともなう減退のメカニズムを解明し、脳における可塑性制御の観点から老化脳の保護の可能性を探る。Shc 系シグナル分子は動物の寿命制御にも神経系の分化と機能制御にも深く関わっていることがわかってきた。また、神経細胞の骨格となる微小管とアクチンの再編成誘導が神経可塑性の分子基盤として重要であること、そこに、N-Shc や SCG10 がかわることがわかった。「脳の老化」は“神経の骨粗鬆症”としてとらえることが可能となった。

### 2. 研究実施内容

#### (1) 神経遺伝子制御に関して:

神経機能に直結した神経特異的遺伝子の多くはNRSFあるいはRESTとよばれる神経選択的サイレンサー(NRS)制御因子の支配下にある。この転写因子の発見、遺伝子の単離、機能解明については、すでにこれまでの当研究部とそれに競合する欧米の研究室から、様々な貢献がなされた。本プロジェクトに関して、我々は、今年度、以下の事実を解明した。

非神経組織での NRS: NRS による制御は神経系以外の組織でもありうることがわかった。これは、京都大学医学部第2内科のグループとの共同研究で、心臓で強い発現のみられる ANP や BNP 遺伝子の転写調節を調べる過程で明らかとなった(Kuwahara et al., 2001)。

NRS レポートリー: ヒトゲノムプロジェクトがほぼ完了したのを受けて、我々は、遺伝子データベース上の NRS の広がりを探索した(泉ら、未発表)。その結果、これまでにわかっていた20種をはるかに超えて、さらに多くの候補が新たに浮上した。個々の新規遺伝子について実験的検証をするつもりはないが、この結果は、NRS-NRSF システムの普遍性をさらに強化することになった。

NRSF 遺伝子プロモーター: NRSF 遺伝子を単離し、そのプロモーター活性を検討した結果、プロモーターのみでは非神経選択的な発現は保証されないことから、転写後調節の重要性がでてきた(Kojima et al., 2001)。

NRSF と転写コア因子との相互作用: NRSF による転写抑制のメカニズムに関して、我々は数年前、

転写補因子 mSin3 を介してヒストン脱リン酸化酵素をリクルートし、クロマチン構造を変えるというメカニズムを提唱していた。しかし、N 末と C 末の転写抑制ドメインの活性に違いがみられたことから検討を進めた結果、NRSF が転写の基本因子 TBP に直接結合し、転写開始を阻害することがわかった(村井ら、投稿準備中)。

NRS-NRSF システムと脳老化: NRS-NRSF システムが崩れると、生体における神経遺伝子の発現に大きな狂いが生じる。そのため、老化過程での神経組織でのこの制御がどの程度保持されているか興味もたれた。NRSF の発現は、そのターゲットとなる SCG10 の発現とほぼ完璧な相補パターンを示した。老若ラットの脳神経組織で NRSF の発現、活性を比較すると、老齢動物でも比較的よく発現が保たれていることがわかった(Mori et al., 2002)。このことから、NRS-NRSF システムはかなり厳密に制御されていると考えられた。

NRSを用いた神経特異的遺伝子導入: 神経系細胞種特異的遺伝子導入を目指し、Cre/loxPのシステムを用いたアデノウイルス2重感染のシステムによって、ニューロン特異的、あるいはアストロサイト特異的発現を可能にするウイルスベクターを作成した。ニューロン特異的プロモーターとしてSCG10 プロモーター、アストロサイト特異的プロモーターとしてGFAPプロモーターを用い、それぞれの細胞種特異的発現をする Cre 発現ウイルスを作成した。これらウイルスを培養系にてCre誘導性GFP発現ウイルスと2重感染させると、細胞種特異的にCre/loxPシステムが働き、CAGプロモーターからの強いGFPの発現が誘導された。さらに、この細胞種特異的発現はラット脳内へウイルス接種することでも確認された(木山ら、投稿中)。

## (2) 神経シグナルについて:

Shc 遺伝子は現在唯一知られるマウスの長寿命遺伝子である。我々は、数年前、Shc には神経特異的に発現する類似遺伝子 N-Shc と Sck が存在することを明らかにしていた。今年度の研究で以下の事実が明らかとなった。

Shc ゲノム: マウスの Shc 関連遺伝子群すべてを単離しゲノム構造解析の結果、全長未知だった Sck の構造を解明した(Kojima et al., 2001)。Shc, Sck, N-Shc いずれも N 末に CH2ドメインをもつ長い分子が存在することが判明した。N-Shc にも p66-Shc と同様、リン酸化されるセリンが散在し、実際、神経細胞においても、酸化ストレス下に N-Shc のリン酸化がおこっている可能性が示唆された(若尾、未発表)。N-Shc の生理機能を知るために、網膜視神経系の発達と視神経切断後の再生応答の過程での N-Shc の挙動を観察した。その結果、in vivo で神経栄養因子 BDNF 刺激下に N-Shc が活性化されることがわかった(Nakazawa et al., 2002)。この観察は、神経再生誘導時に N-Shc シグナルが動くことを示唆した。

アクチン骨格再編シグナル: 一方、N-Shc 活性化によりアクチン骨格系の再編成が誘起されるが、N-Shc には従来知られていなかった新たなシグナルアウトプット領域があり、そこにアクチン骨格再編成へのシグナルを流す Crk アダプターが結合することを知った(Nakamura et al., 2002)。さらに、N-Shc に特異的に結合する分子を探索した結果、250kD の新たな RhoGAP 分子を単離した。この蛋白質は分子の N 末に GAPドメインをもち、C 末に N-Shc との結合部位がある。C 末で神経栄養因子の受容体 TrkA にも結合したので、この分子を Grit (GTPase Regulator

Interacting with TrkA)と命名(Nakamura et al., 投稿中)。Grit の発現は神経系、神経栄養因子シグナル等膜上の活性化シグナルを N-Shc, Crk を介してアクチン骨格制御へとつなげる新規分子と考えられた。神経活性化の調節因子、神経再生の制御因子となる可能性もあり、今後、老化脳での働きが注目される。

N-Shc 遺伝子欠損と脳機能異常: 我々は、N-Shc の遺伝子欠損マウスを入手して行動学的解析を進めた結果、脳に異常があることを見た(宮本、未発表)。今後は、電気生理学と生化学の面からこの観察を補強し、N-Shc 遺伝子の神経機能や神経生存への効果を見極めたい。

N-Shc と GPCR との機能連関: 我々 GPCR の中で Ca<sup>2+</sup>を動員するタイプ (Gq を介する) の受容体 muscarinic m1、並びに 5HT<sub>2c</sub> 受容体刺激において、N-Shc, Sck, Shc のすべてが、m1、5HT<sub>2c</sub> 受容体刺激後に起こるシグナルの脱感作を促進する事がわかった。脱感作は受容体自身、G-protein、IP<sub>3</sub> 受容体などのリン酸化により起こると考えられているが、アダプター蛋白による脱感作の増強は IP<sub>3</sub> 受容体、あるいは IP<sub>3</sub> によって起こる細胞内 Ca<sup>2+</sup>の放出の機構が抑制されることにより起こっているものと結論された(Uesono et al., 投稿中)。

### (3) 神経突起伸展分子について:

神経特異的遺伝子である SCG10 ファミリー(SCG10, SCLIP, RB3)は微小管崩壊活性を持ち、構造可塑性に深く関与することが期待される。ラット海馬初代神経細胞において、SCG10 の発現を抑制すると、微小管が過度の安定化をおこし神経突起伸展が抑制された。逆に、SCG10 膜会合領域欠損体を細胞内導入すると、短時間では、神経繊維中の微小管束をほぐすことが観察された。この時、成長円錐内の微小管は突起伸展停止型から成長型への移行がみられた。一方、長時間では、神経突起の委縮が見られた。この様な微小管動態への SCG10 効果は種々の欠損体を用いた実験より、C 末の tubulin 結合領域だけでなく、リン酸化部位が多く見られる制御領域が必須であることが明らかになり、結合により遊離の tubulin 濃度を下げるといよりも微小管に対するカタストロフ活性に起因すると考えられた(森井ら、投稿準備中)。

### (4) ウプサラとの共同研究:

ウプサラ大学 PET センターと共同で、遺伝子発現をみるための PET 用標識化合物として、オリゴヌクレオチドの標識合成を行い、標識自身は成功した。標識オリゴヌクレオチドを小動物に投与し、標的細胞への取り込み、DNA/RNA 画分への取り込みについて検討したところ、標的細胞への取り込みに特異性が見出せないこと、DNA/RNA 画分への取り込みはかなり高いものの蛋白質画分にもかなり集積しており、2本鎖オリゴヌクレオチドやブリッジ型 RNA を使う方法論などでその解決を図ることとし、さらにその簡便な標識方法について検討をしている。nGAPs の in vivo in situ hybridization に向けた特異的核酸配列についても検討を行った。一方、遺伝子発現の核内受容体イメージングに向けてレチノール酸やステロイド類縁体の標識を行い、マイクロ PET を用いて PET イメージングを開始した。また、脳神経細胞保護作用を見出した新規脳型プロスタサイクリン受容体の PET イメージングに成功した(渡辺ら、未発表)。

### 3. 研究実施体制

#### 老化制御グループ

- ① 研究分担グループ長名 森 望(国立長寿医療研究センター分子遺伝学研究所／部長)
- ② 研究項目
  1. NRSF と TBP の結合を介した転写抑制メカニズムの解析
  2. 神経突起伸長・回路形成での SCG10 の機能解析
  3. リン酸化依存性制御因子の探索
  4. 老化脳における遺伝子変動の解析

#### ノックアウト・トランスジェニックグループ

- ① 研究分担グループ長名 森 望(国立長寿医療研究センター分子遺伝学研究所／部長)  
高田慎治(基礎生物学研究所／教授)
- ② 研究項目
  1. N-Shc の 3Y/F 変異体トランスジェニックマウスの解析
  2. N-Shc 遺伝子欠損マウスの解析

#### シグナルグループ

- ① 研究分担グループ長名 森 望(国立長寿医療研究センター分子遺伝学研究所／部長)
- ② 研究項目
  1. N-Shc 新規アウトプットシグナルの解析:膜受容体活性化からアクチン骨格制御へ
  2. p250RhoGAP(Grit)の機能解析

#### チャネルグループ

- ① 研究分担グループ長名 上園保仁(長崎大学医学部薬理学講座／講師)
- ② 研究項目
  1. Shc 系シグナルアダプター分子と G 蛋白共役受容体との機能関連の解析:カエル卵を用いた電気生理学的解析

#### 可塑性グループ

- ① 研究グループ長名 渡辺恭良(大阪市立大学医学部生理学講座／教授)  
今村一之(理化学研究所／研究員)
- ② 研究項目
  1. ネコ視覚野可塑性における両眼競合の分子・細胞基盤の解明、および
  2. マイクロPETによる老化脳解析

#### 神経再生グループ

- ① 研究グループ長名 木山 博資(大阪市立大学医学部解剖学講座)
- ② 研究項目
  1. 老化に伴う GDNF 受容体遺伝子の発現動態
  2. 損傷神経におけるシグナルクロストーク

#### 4. 研究成果の発表

##### (1) 論文発表

- Kuwahara K, Saito Y, Ogawa E, Takahashi N, Nakagawa Y, Naruse Y, Harada M, Hamanaka I, Izumi T, Miyamoto Y, Kishimoto I, Kawakami R, Nakanishi M, Mori N and Nakao K. The neuron-restrictive silencer element-Neuron-restrictive silencer factor system regulates basal and endothelin 1-inducible atrial natriuretic peptide gene expression in ventricular myocytes. *Mol. Cell. Biol.* 21 (6) 2085-2097 (2001)
- Tanaka M, Ito S, Matsushita N, Mori N and Kiuchi K. Promoter analysis and characteristics of the 5'-untranslated region of the mouse glial cell line-derived neurotrophic factor gene. *Mol. Brain Res.* 85 91-102 (2001)
- Ohya S, Tanaka M, Oku T, Furuyama T, Mori N, Giles WR, Watanabe M, and Imaizumi Y. Regional expression of the splice variants of Kv4.3 in rat brain and effects of C-terminus deletion on expressed K<sup>+</sup> currents. *Life Sci.* 68, 1703-1716 (2001)
- Maekawa S, Morii H, Kumanogoh H, Sano M, Naruse Y, Sokawa Y, Mori N. Localization of neuronal growth-associated, microtubule-destabilizing factor SCG10 in brain-derived raft membrane microdomains. *J. Biochem.* 129, 691-697 (2001)
- Kojima T, Murai K, Naruse Y, Takahashi N, and Mori N., Cell-type non-selective transcription of mouse and human genes encoding neural-restrictive silencer factor. *Mol. Brain Res.* 90 (2), 174-186 (2001)
- Kojima T, Yoshikawa Y, Takada S, Sato M, Nakamura T, Takahashi N, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, and Mori N., Genomic organization of the Shc-related phosphotyrosine adapters and characterization of the full-length Sck/ShcB: Specific association of p68-Sck/ShcB with pp135. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 284, 1039-1047 (2001)
- Nishitani H, Hirose E, Uchiyama Y, Nakamura M, Umeda M, Nishii K, Mori N and Nishimoto T. Full-sized Ran-BPM cDNA encodes a protein possessing a long stretch of proline and glutamine within the N-terminal region, comprising a large protein complex. *Gene* 272, 25-33 (2001)
- Nakamura T, Komiya M, Gotoh N, Koizumi S, Shibuya M, and Mori N. Discrimination between phosphotyrosine-mediated signaling properties of conventional and neuronal Shc adapter molecules. *Oncogene* 21, 22-31 (2002)
- Mori N, Mizuno T, Murai K, Nakano I, and Yamashita H. Effect of age on the gene expression of neural-restrictive silencing factor NRSF/REST. *Neurobiol. Aging* 23, 255-262 (2002)
- 森 望 Q & A: ヒトの寿命はどうして違うのですか？また、寿命を規定する遺伝子は見つかっているのですか？*Clinical Neuroscience* 19 (5), 605 (2001)

- 森 望 老化研究へのノックアウト:筋萎縮性側索硬化症研究の新展開、蛋白質・核酸・酵素 46 (13) pp1999-2000 (2001)
  - 中村岳史、森 望 チロシンリン酸化アダプター分子 Shc ファミリーの多様な機能と神経系での新たな展開、生化学 73(11) pp1322-1325(2001)
  - 森 望 「脳の老化と寿命制御」わかる実験医学シリーズ『老化研究がわかる』pp107-113 (羊土社)
  - 中澤 徹、玉井 信、森 望 網膜の発生・再生過程における神経栄養因子シグナル応答 in 「網膜・視神経の発生と再生」福田淳(編集)Molecular Medicine(中山書店) 39, 28-37 (2002)
  - 森井博史、中澤 徹、森 望 神経突起伸展関連分子の多様性と視神経再生応答における役割 in 「網膜・視神経の発生と再生」福田淳(編集)Molecular Medicine(中山書店) 39, 148-156(2002)
  - 森 望:老化と寿命制御におけるシグナル伝達 in 「ここまで分かった形づくりのシグナル伝達:細胞極性・細胞運動制御から情報伝達破綻による疾病まで」竹縄忠臣・帯刀益夫(編集)実験医学 増刊 20 (2) 367-375(羊土社) (2002)
- (2) 特許出願  
なし