

「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

神経軸索や樹状突起内の物質輸送の中核となる微小管(マイクロチューブル)の崩壊因子であるSCG10の新たな神経特異的ホモログ、RB3、SCLIPについても、同様の崩壊活性を確認した。神経可塑性にもっとも関連深いと思われるRB3についてそのリン酸化調節領域に特異的に結合する新たな分子を単離した。視神経再生誘導をかけるとRB3が一過的に誘導されることが判明した。BDNF等の神経栄養因子のシグナリングに係わるN-Shc/ShcCおよびその関連分子Sck/ShcBについて、全長構造を明らかにした。N-Shc/ShcCには従来予想された以上に新たなシグナルアウトプット領域があることがわかった。また、元のShcにアポトーシスにからむセリンリン酸化シグナルが入り、その部分の遺伝子欠損でマウスの寿命が延びると報告された。新たなアクチン結合蛋白質で神経細胞の突起先端に集約する分子を単離し、ClipinCと命名した。数々の神経特異的遺伝子の神経特異的な転写制御を決定づけるサイレンサー NRSについては、その制御因子NRSF/RESTの転写抑制の分子機構の一端を解明した。特に、N末のドメインで転写抑制補因子mSin3に結合し、その結果ヒストン脱リン酸化酵素HDACをリクルートし、クロマチン構造を変換して遺伝子発現を制御する分子機構が示唆された。また、NRSを利用した神経特異的ターゲティングを可能とするアデノウイルスベクターを開発した。

2. 研究実施内容

(1) 神経特異的転写制御(NRSF)の研究

イオンチャネルやシナプス関連分子等、約30種の様々な神経特異的遺伝子の発現を統括的に制御する神経選択的サイレンサー(NRS)を制御する核内転写因子の転写抑制ドメインを同定し、それがmSin3を介してヒストン脱リン酸化酵素(HDAC)をリクルートすることを明らかにした(Naruse et al., 1999)。これにより神経特異的遺伝子発現調節が染色体のクロマチン構造の変換をとともなうことが示唆され、実際HDACの阻害剤により非神経細胞が神経化しうることも明らかにした(Naruse et al., 1999)。また、NRSをアデノウイルスに適用すると任意の遺伝子のグリアでの発現を抑え神経だけで発現しうることを示し、脳の遺伝子治療へ

の応用の可能性を切り開いた (Miyaguchi et al., 1999)。さらにこの系をCre-loxPシステムとのコンビネーションで自在に誘導できるシステムの構築を進めた (Kiyama et al., 未発表)。一方、NRSが神経栄養因子BDNFの遺伝子制御にも関わっていることもわかった (Tabuchi et al., 1999)。さらに、NRSF遺伝子を単離し、そのプロモーターの解析を進めた (Kojima et al., 投稿中)。また、NRSFの神経特異的バリエーションを同定しその性状を解析した (Naruse et al., 投稿準備中)。

(2) 神経特異的シグナル伝達 (N-Shc) の研究

Shc関連遺伝子群 (Shc, N-Shc, Sck) の遺伝子を単離し、N-Shc, Sckの全長構造を明らかにした (Kojima et al., 投稿準備中)。N-Shc遺伝子のノックアウトマウスの作製を進めたが難航した (Takada et al., 未発表)。この間に、イタリアのPelicciのグループがp66-Shc遺伝子ノックアウトマウスを作製し、そのマウスが驚いたことに寿命延長を示すことが明らかとなった (森, 2000)。N-Shcが蛋白質リン酸化酵素PKC群のうちPKC deltaと特異的に結合し、その活性を抑えることを明らかにした (Ihara et al., 投稿準備中)。N-Shcのシグナルアウトプット領域 (CH1ドメイン) で従来予想されていた部位以外にも複数の新規チロシンリン酸化部位があることがわかった (Nakamura et al., 投稿準備中)。

また、今後、初代培養神経細胞や脳スライス切片への効率のよい遺伝子導入を計るため、N-Shcの野生型とチロシンリン酸化部位変異体 (DN体) を発現するアデノウイルスベクターを作成した。現在、3次ウイルスの段階で発現の確認をしている (Kiyama et al., 未発表)。

G蛋白質共役受容体 (GPCRs) は、cAMP増減、細胞内Ca²⁺動員、あるいはMAPキナーゼ活性化を引き起こすことにより細胞機能調節に預かっているが、そのシグナル伝達にN-ShcならびにSckアダプター蛋白が介するかどうかをGPCRとN-Shc、Sckを強制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Ca²⁺を動員するタイプの受容体刺激において、N-Shc、Sckの両方とも、受容体刺激後の脱感作を、おそらくIP₃受容体の機能を調節することにより促進していることが判明した。一方、チロシンキナーゼ型受容体のひとつであるIGF-1受容体はツメガエル卵細胞の成熟を指標とした実験系において、N-Shcのみを選択的に介して、IGF-1による卵の成熟作用を強めていることが判明した (Uesono et al., 投稿準備中)。

(3) 神経の構造可塑性関連分子 (nGAPs) の研究

SCG10関連遺伝子群のすべについて神経突起の骨格ともなる微小管/マイクロチューブの崩壊活性をもつことを明らかにした (Morii et al., 投稿準備中)。SCG10群のうち神経可塑性に関連深いと推察されたRB3のリン酸化制御領域を用

いて結合分子を探索した結果、微小管付随因子MAP1-LC3やGABA受容体裏内蛋白の関連分子を同定した（Hirose et al., 投稿準備中）。これはSCG10関連分子が神経の構造可塑性をいかに制御するかという分子メカニズムに迫る重要な発見である。SCG10群が視神経の再生過程でどう変動するかを解析する手始めとして、発達期の網膜でのSCG10遺伝子群の発現変動を解析した（Nakazawa et al., 2000）。視覚系の可塑性に応じてSCG10遺伝子の発現が変化することを明らかにした（Imamura et al., 投稿準備中）。微小管制御系としてのSCG10群以外に、神経系での発現の強い新規のアクチン結合蛋白を発見し、他の関連分子との対応関係を整理した上でClipinCと命名した（Nakamura et al., 1999）。

また、可塑性応答にともなうnGAPsの遺伝子応答をみるために、BDNFを注入したネコの視覚野及びLGNにおけるSCG10 family分子群の発現を調べた。特に若齢期（臨界期）と成獣（2歳以上）のネコで、ノーザン解析とin situハイブリダイゼーション法を用いて、感受性期内の仔猫及び、成獣中枢視覚系でのmRNA発現を検討した。その結果、仔猫のLGNニューロンにおいて、BDNF注入半球に選択的にSCG10 family分子群の発現が有意に増大していることが判明した。この発現増大によって、視覚野内でLGNニューロン軸索終末の分枝が異常に亢進した可能性が示唆された。（形態データについては現在、検討中。）さらに、我々の実験結果から、仔猫において、BDNF注入は、LGNニューロンばかりではなく注入を受けた半球の視覚野のニューロンにおいても、SCG10 family分子群の発現が増大することがわかった。in situ hybridizationの結果から、mRNAの増大が認められるのはすべての皮質ニューロンではないことがわかったが、どの細胞かについては検討中。少なくとも、第五層の大型の錘体細胞が陽性なので、これまで提唱されてきたように抑制性のニューロンが選択的ターゲットである可能性は低い。（ただし、その意義については今後慎重に検討する。）今回の発見の最も重要な点は、外来性BDNFのSCG10 family分子群の発現に対する影響は、感受性期に顕著で、成獣ではほとんど認められないことである。Trk B受容体が感受性期に限って視覚野に発現している可能性は少ないので、受容体からSCG10 mRNAの転写までの情報伝達経路に感受性期の可塑性を制御する分子スイッチがあることが想像された（Imamura et al., 投稿準備中）。

さらに、神経再生過程で、SCG10, SCLIP, Stathmin, RB3の発現がどのように変化するかを、舌下神経障害モデルを用いて検討した。この結果、SCG10, Stathmin, RB3では強い発現応答が認められたが、SCLIPにはなかった。現在、神経傷害修復過程における発現の詳細なプロファイルを検討中である（Kiyama et al., 未発表）。

(4) 老化脳における遺伝子変動に関する研究

ラットの老化過程におけるSCG10、NRSF、Shcそれぞれの関連分子の遺伝子変動を解析した。その結果、SCG10、NRSFはさほど変動しないが、Shc遺伝子の発現は老齢動物で若干ではあるが有為に低下している傾向が観察された (Mori et al., 未発表)。上述のようにShc遺伝子の発現が動物の寿命に影響する可能性が高まってきたので、今後はN-Shc, Sck遺伝子の発現変動と機能変化の可能性について探究を進めていく予定である。

3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

McNeill, T.H., Mori, N. and Cheng, W.-H. : Differential regulation of the growth-associated proteins, GAP-43 and SCG-10, in response to unilateral cortical ablation in adult rats. *Neuroscience* 90:1349-1360 (1999)

Nakamura T, Takeuchi K, Muraoka S, Takezoe H, Takahashi N, and Mori N: 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)

Tabuchi A, Nakatani C, Nakaoka R, Naruse Y, Kojima T, Mori N and 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, 233-237 (1999)

Miyaguchi K, Maeda Y, Kojima T, Setoguchi Y and Mori : Neuron-targeted gene transfer by adenovirus carrying neural-restrictive silencer element, *NeuroReport* 10, 2349-2353 (1999)

Naruse Y, Aoki T, Kojima T, and Mori N : Neural restrictive silencer factor recruits mSin3 and histone deacetylase complex to repress neuron-specific target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 13691-13696 (1999)

Nakazawa T, Nakano I, Furuyama T, Morii H, Tamai M, and Mori N : The SCG10-related gene family in the developing rat retina: Persistent expression of SCLIP and stathmin in mature ganglion cell layer. *Brain Res.* 861 (2) 399-407 (2000)

森 望 : リン酸化チロシンアダプター分子Shc (p66Shc) の遺伝子ノックアウトによるマウスの寿命延長、*Molecular Medicine* 37 (1) pp110-114 (2000)

森 望 : 単一遺伝子変異によるマウスの寿命延長、*蛋白質・核酸・酵素* 45 (2) pp176-177 (2000)