

類の脳虚血で、ORP150 は神経細胞に誘導もされるが、その発現量は少なく、発現期間はグリア細胞に比べて短いことが分かっており、一方、ORP150 を強制発現させた神経細胞は低酸素環境に対して抵抗性を示し、さらに、そのトランスジェニックマウスの神経細胞は明らかに虚血に対して抵抗性を示し、虚血耐性が生じている。さらに、ORP150 を強制発現させたトランスジェニックマウスでは虚血ストレスだけでなく、グルタミン酸毒性に対しても抵抗性を示すことが分かってきた。これに反して、ORP150 ノックアウトマウスでは、同部位で明らかにグルタミン酸に対する感受性が亢進していた。以上の事実は、神経細胞にとって興奮性アミノ酸が小胞体ストレスを惹起すること、さらに小胞体のストレス蛋白がグルタミン酸による神経細胞死を抑制していることを示している。我々は、現在、アデノウイルスを用いてラットの神経細胞に ORP150 を遺伝子導入することにより、虚血やグルタミン酸毒性に対する抵抗性を付与することができるかを検討中である。最終的にこのような遺伝子導入法をヒトに応用できるかは、今後の検討に待たなければならないが、ORP150 の神経細胞における発現量を増加させる薬剤のスクリーニングも平行して行っており、これらのアプローチによって神経細胞を虚血にだけでなく興奮性アミノ酸による神経細胞死から救済する方法を見いだしたい。

#### P240 孤発性アルツハイマー病における PS2 スプライシング変種の発現機構

眞部孝幸<sup>1,2</sup> (1 阪大院医, 2 CREST・JST)

近年、多くの神経変性疾患において特定遺伝子のスプライシング異常が報告されている。例えば、ALS 患者におけるグルタミン酸トランスポーターEAAT2 遺伝子、前頭側頭型痴呆(Front Temporal Dementia and Parkinsonism; FTDP) における tau 遺伝子および家族性アルツハイマー病における Presenilin-1 (PS1) などである。このうちアルツハイマー病 (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 変異体は小胞体に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だし、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。そこで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、痴呆から救済しようと考え、研究を進めている。今回は、このスプライシング変種由来の蛋白質 (PS2V) 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。また、PS2V 出現メカニズムを解明する目的で、PS2 pre-mRNA に結合して PS2 の正常なスプライシングを阻害するような物質、つまり選択的スプライシングを起こさせる因子の同定を試みた。まず低酸素刺激した SK-N-SH 細胞から細胞核抽出液を調製後、この抽出液を用いて独自の pre-mRNA 結合実験法を構築し、PS2 pre-mRNA に結合する約 20 kDa 蛋白質の存在を確認した。また、この結合蛋白質は PS2 pre-mRNA 中に存在する特徴的な配列に特異的に結合していることも明らかとなった。この結合蛋白質をその結合活性を指標に単離精製を行い、ペ

プチドシーケンスを行った。その結果、ある既知の蛋白質を得た (Factor X)。この Factor X 蛋白質について詳細な解析を行ったところ、PS2 の pre-mRNA へ直接結合し、低酸素刺激により核内での発現上昇 (speckle への蓄積) および PS2 pre-mRNA 結合能上昇などが確認された。さらに、この Factor X 蛋白質を SK-N-SH 細胞に強制発現させることにより PS2V の出現を確認した。また、Factor X 蛋白質はコントロール脳に比べ孤発性 AD 脳内で有意に発現していることが確認できた。これら結果は、この蛋白質のまったく新しい機能を証明するものであると共に、孤発性 AD 発症メカニズム解明の大きな足がかりとなる可能性が示唆された。

#### P241 家族性アルツハイマー病の原因遺伝子プレセニン-1 の発現調節機構の解析

満田憲昭<sup>1</sup>、大久保信孝<sup>1,2</sup>、遠山正彌<sup>2,3</sup> (1 愛媛大医、2 阪大院医、3 CREST・JST)

本研究では、家族性アルツハイマー病の原因遺伝子プレセニン-1 (PS-1) プロモーターに作用し、その発現を調節する転写因子を検索し、その転写調節機構を明らかにすることを目的とする。発現調節機構の解明こそが、PS-1 遺伝子の機能、ひいてはアルツハイマー病発症機構の究明に端緒を開くと考えるからである。我々は 4.5kb のヒト PS-1 プロモーター配列を解析し、転写開始位置の直前に存在する cAMP Response Element Binding Protein (CREB) の結合配列類似の配列 PS1-CRE に着目した。ヒト神経芽細胞腫細胞 SK-N-SH を用いた実験の結果、ヒト PS-1 プロモーター上に存在する PS1-CRE 配列が活性型の転写因子 CREB と結合し、下流の遺伝子の転写を促進することが分かった。(Electrophoretic mobility shift assay、ルシフェラーゼアッセイ) また NMDA や BDNF、MEK を過剰発現するアデノウイルスベクターの感染により CREB を活性化してやると、mRNA および蛋白レベルでの PS-1 の発現増加が観察された (ノーザンハイブリダイゼーション、<sup>35</sup>S-Met を用いたメタボリックラベル)。さらにその増加は Dominant-negative 型 CREB をあらかじめ過剰発現させておくことによって抑制された。これらの結果は、活性型 CREB が PS-1 プロモーターに作用して、その転写を調節していることを示している。

考察：この実験系は、脳特に神経細胞における PS-1 発現調節のモデルとして有用であると考えられる。また転写因子 CREB 同様、PS-1 自体も神経の可塑性や発生分化に関与している可能性を示唆する。

#### P242 MAG およびニューロトロフィンによる p75 を介した Rho の制御機構

山下俊英<sup>1,2</sup>、遠山正彌<sup>1,2</sup> (1 阪大院医、2 CREST・JST)

中枢神経の再生を阻害している因子の主役はミエリンであると考えられている。ミエリンの存在下では神経細胞は突起を伸展させることができず、また抗体などを使ってミエリンの機能を阻害することにより突起の伸展は促される。ミエリン中に存在する神経再生阻害作用を持つ蛋白として、現在までに myelin-associated glycoprotein (MAG) および Nogo が単離されている。myelin associated glycoprotein (MAG) の受容体は binding partner と機能的なシグナルを伝達する因子からなる。我々はこの機能的なシグナルを伝達する因子が neurotrophin receptor p75 であることを証明した。MAG は大人の DRG neuron の突起伸展を阻害するが、この効果は P75 ノックアウトマウスの DRG neuron は見られなかった。また p75 を発現する細胞では MAG は Rho を活性化したが、p75 を発現しない細胞では Rho の活性化は見られなかった。これらより MAG は p75 を介して、Rho を活性化することにより、神経突起の伸展を阻害していることが証明された。また MAG binding と p75 の細胞膜表面での局在が一致しており、binding partner と p75 が合わさり一つの受容体として機能していることが示唆された。さらに Rho の活性化部位と考えられる p75 の細胞内の五番目のヘリックス構造