

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¹、大久保信孝^{1,2}、遠山正彌^{2,3} (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、³⁵S-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^{1,2}、遠山正彌^{1,2} (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

に着目し、これに付着するペプチドが Rho 活性化のサイレンサーとして機能することを見出した。以上よりニューロトロフィンが p75 を介して Rho を非活性化することで神経突起の伸展を促進しているが、MAG は同じ受容体を介してこれとは逆のシグナルを伝えていることがわかった。

P243 神経可塑性に関わるセリンプロテアーゼ・ニューロプシンの内在性特異的インヒビターの同定
加藤啓子（奈良先端大、CREST・JST）

ニューロプシンは、大脳辺縁系、特に海馬でその mRNA の高い発現が見られ、海馬スライスにおける LTP 増強作用や神経可塑性モデルの 1 つであるキンドリング動物の形成への関与が明らかとなっており、酸化ストレス時にもその mRNA の発現上昇が確認されている。また、ヒトアルツハイマー病において、コントロール群に比べ脳内で有意な mRNA の発現上昇が確認されており、アルツハイマー病の原因因子としても注目されている。ニューロプシンはセリンプロテアーゼであることから、その機能発現後、速やかに不活化されることにより脳内の恒常性が保たれると考えられ、特異的インヒビターによりニューロプシン活性がコントロールされていると考えられる。そこで本研究では、ニューロプシンの内在性特異的インヒビターを同定した。マウス大脳皮質・海馬ホモジネートより、リコンビナント・ニューロプシン (Baculo virus expression system) に結合する 2 種の蛋白質を精製し (SDS-耐性複合体を形成)、ペプチドシーケンスを行った結果、Serine Protease Inhibitor-3 (SPI3; ovalbumin serpin family) と Murinoglobulin 1 (MUG 1; pan-protease inhibitor) であることが明らかとなった。次に、この 2 種の蛋白質がニューロプシンの特異的インヒビターであることを、生化学的相互作用及び、脳内における発現分布を検討することにより証明した。1) リコンビナント・SPI3

(*Pichia pastoris* expression system) は、リコンビナント・ニューロプシンと SDS-耐性複合体を形成し、その結合平衡定数は $3.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であった。プロテアーゼと serpin family に属するインヒビターが特異的に作用する場合の結合平衡定数は $10^5 - 10^7$ であることが知られており、SPI3 がニューロプシン活性を非常に強く抑制することが示された。また、in situ hybridization 組織化学法によりニューロプシン mRNA と SPI3 mRNA の発現分布を比較したところ、共に海馬 CA1-3 の錐体細胞に発現していることが明らかとなった。2) マウス血清より精製した MUG 1 は、ニューロプシンと SDS-耐性複合体を形成し、ニューロプシンによるファイブロネクチン切断活性を有為に阻害した (ニューロプシン : MUG 1 = 1:2 (mole ratio), 76% 活性阻害)。免疫組織化学法により MUG 1 は、海馬における神経細胞及びその神経突起の細胞膜上に局在した。以上のことから、SPI3 と MUG 1 は、ニューロプシンの内在性特異的インヒビターであることが示された。MUG 1 は、痴呆症の原因因子の候補である $\alpha 2$ -macroglobulin に属する一方で、SPI3 は、虚血時にその mRNA 発現が海馬で上昇することが報告されている。今後は、酸化ストレス時における SPI3 によるニューロプシンの活性制御機構を解明し、治療薬としての応用を目指す。

P244 Signal sequence trap法による神経機能関連遺伝子のクローニング---新規 TNF Receptor Superfamily, TROY, の単離と局在

森川吉博¹、久岡朋子¹、田村志宣¹、北村俊雄²、仙波恵美子^{1,3}

(1和歌山県立医大、2東大医科研、3CREST・JST)

TNF family cytokines は pleiotropic な作用を示し、それらの受容体も、現在では 20 を超えるメンバーを有する superfamily を形成しており (TNFRSF)、その機能は細胞死の誘導、細胞増殖や分化など多岐にわたる。