

平成10年度厚生科学研究費補助金
(長寿科学総合研究事業)
総括研究報告書及び分担研究報告書

老化及び老化に伴って生じる疾病での情報伝達変異


主任研究者	竹縄 忠臣 (東京大学医科学研究所)
分担研究者	下濱 俊 (京都大学医学部神経内科学)
	安藤 進 (東京都老人総合研究所生体膜部門)
	宮本 篤 (札幌医科大学医学部)
	野村 靖幸 (北海道大学大学院薬学研究科)

様式A(4)

厚生科学研究費補助金研究報告書

平成11年4月5日

厚生大臣 宮下 創平 殿

フリガナ タケナワ タダオミ 
氏名 竹 縄 忠 臣
(所属施設 東京大学医科学研究所)

平成10年度厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）に係わる研究事業を完了したので次のとおり報告する。

研究課題名（課題番号）： 老化及び老化に伴って生じる疾病での情報伝達変異(H10-長寿-059)

国庫補助金精算所要額： 金 7,700,000円也

1. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要版及びこれを入力したフロッピーディスク（別添1のとおり）
2. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書（別添2のとおり）
3. 厚生科学研究費補助金分担研究報告書（別添3のとおり）
4. 研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
The Embo Journal, 17, WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac	1998	Oxford University Press	H. Miki, S. Suetsugu, and <u>T. Takenawa</u>
Biochem. and Biophys. Res. Com., 243, Differential Expression of Rat Brain Phospholipase C Isozymes in Development and Aging	1998	Academic Press	<u>S. Shimohama</u> , Y. Sumida, S. Fujimoto, Y. Matsuoka, T. Taniguchi, <u>T. Takenawa</u> , and j. Kimura
Jpn. J. Pharmacol., 78, Senescence-Accelerated Mouse(SAM) as an Animal Model of Senile Dementia: Pharmacological, Neurochemical and Molecular Biological Approach	1998	Hokkaido University	Y. Okuma, and <u>Y. Nomura</u>

5. 研究成果による特許権等の知的財産権の取得状況

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
総括研究報告書

老化及び老化に伴って生じる疾病での情報伝達変異

主任研究者 竹縄 忠臣（東京大学医科学研究所教授）

老化に伴って細胞内情報伝達がどの様に変化するか、正常な老化と病的な老化における変化や、老化に伴って生じる疾病で変異が生じているか検討した。

[研究組織]

- 竹縄忠臣（東京大学医科学研究所教授）
- 下濱 俊（京都大学医学部神経内科助手）
- 安藤 進（東京都老人総合研究所生体膜部門部長）
- 宮本 篤（札幌医科大学医学部助教授）
- 野村靖幸（北海道大学薬学部薬効学教授）

A. 研究目的

すべての細胞は細胞内情報伝達によって機能を調節され、正常な活動を営んでいる。細胞内情報伝達の乱れは細胞の機能を狂わせ、各種疾病の原因となる。チロシンキナーゼ情報伝達系は、細胞の増殖、分化や神経の高次機能など複雑な生命現象の情報伝達を司る。我々は7年前にチロシンキナーゼの下流にあるアダプター蛋白質としてAsh/Grb2を見つけた。Ash/Grb2はチロシンキナーゼの下流にあり、チロシンリン酸化部位にSH₂ドメインを介して結合し、更にSH₃ドメインを介してプ

ロリンに富む配列を持つ蛋白質と結合してシグナルを下流へ伝える。我々はAsh/Grb2に結合してシグナルを下流へ伝える蛋白質を採るため、Ash/Grb2のアフィニティクロマトグラフィを用いて、牛脳より結合蛋白質を採った。するとSos(180KDa)、Synaptojanin(150KDa)、Dynammin(100KDa)及びN-WASP(65KDa)が採れてきた。N-WASPは構造的にWisskott-Aldrich syndrome Protein(WASP)と良く似ていた。本蛋白質は神経系に多く発現していたので、Neural WASP、N-WASPと名づけた。そこでN-WASPの生理作用と神経機能への関与を調べることにした。

B. 研究方法

1. WAVEの生理作用を明らかにするため、WAVEの各種変異体を作成し、Cos7細胞へ発現させた。又、各種GST融合蛋白質を作り、大腸菌に発現させ、蛋白質を採った。
2. 6ヶ月齢と25ヶ月齢の雄Wistarラットの大脳皮質からFicoll密度勾配遠心法によりシナプトソームを調製した。このシナプトソーム

を1 mMリン酸緩衝液(PH 7.4)による低調処理を行った後、遠心により粗膜分画を得た。更に、シヨ糖密度勾配遠心法によりシナップス膜を得たL型チャンネルブロッカーとして ^3H]PN200/110、N型チャンネルには ω -conotoxin GVIA、P/Q型チャンネルには ω -conotoxin MVIICを用いた。

3. 年齢および死後剖検までの時間に差のない13例のアルツハイマー病(AD)群と12例の対照群とした。特に抗体を用いたイムノブロット解析および免疫組織化学解析を行った。

4. 7~9ヶ月齢のSAMP10(老化促進マウスP系10)とコントロールのSAMRIを用いた。情動機能の測定は強制水泳実験法で行った。ドーパミン受容体、セロトニン受容体に対する結合実験は ^3H]quinpirol、 ^3H]hydroxy DPATを用いて行った。6週齢SAMP8およびRIにおける発現量の異なる遺伝子の単離はディファレンシャル・ディスプレイ法を用いて行った。発現量に差のある遺伝子をPCRを用いて増幅させ、その後シーケンスを行い、同定した。

C. 研究結果

1. WASPと相同性の高いWAVEを採り、機能解析を行った。WAVEをCos7細胞へ発現させるとアクチンのクラスター化を引き起こした。一方、内在性のWAVEの細胞内局在をNIE細胞を用いて調べた。WAVEは細胞質内にドット状に、また膜ラフリング部位に濃縮していた。活性型Racを発現させるとNIE細胞は膜ラフリングを形成するが、その時、細胞質中のWAVEは減少し、膜ラッフルに存在するWAVEが増加した。WAVEのVCA領域に変異を入れたドミナントネガティブWAVE

は活性型Racによるラフリング形成を阻害し、野性型WAVEによるラッフル形成は不活性型Racで阻害されないことから、WAVEはRacの下流にあって、アクチン重合を促進し、膜ラッフル形成を生じると考えられた。一方、WAVEはRacと直接結合しなかったものの、WAVEとRacを共発現した細胞のlysateをWAVEの抗体で免沈したところ、Racも共沈してきたので、WAVEはRacと複合体を作っていることが予想された。

2. 25ヶ月齢の老齢シナップス膜では、L型、N型、P/Q型チャンネルの B_{max} 値、すなわち最大結合数が6ヶ月齢に比べ、それぞれ50%、35%、52%と著明に減少していた。このことから、老齢ラットの脳皮質シナップスにおいてVDCCの数が減少していることが明らかとなった。リガントに対する親和性はL型チャンネルで増大が老齢シナップスで認められたが、N型、P/Q型への親和性は変わらなかった。

3. AD群では対照群に比べ、膜分画でBcl-2、Bcl-X、Bak、Bad、caspase-2、caspase-3の蛋白質レベルがまた、細胞質分画でcaspase-3の蛋白質レベルが有意に増大していた。AD脳海馬CA3領域ニューロンのBcl-2免疫反応性が対照脳に比べ、増大していた。

4. SAMP10では対照群に比べ、強制水泳実験開始後1~3分間での浮遊時間が有意に増大していた。両者間での自発運動量や運動機能に変化が認められないことから、P10が情動障害を有すると考えられた。次に、神経化学的解析を行った。P10の中脳領域や脳皮質では、D2とD3受容体に結合する ^3H]quinpirolの結合量が増加していた。この増加は最大結合量の増加によるものと考えられた。

ディファレンシャル・ディスプレイ法によってSAMP10で有意に上昇している遺伝子を解析

し、数種の遺伝子を単離した。一つは、グルタミンシンターゼであった。他のクローンは未知遺伝子であった。

D. 考察

1. アクチン線維の構築パターン、及びその制御機序は3種に分けられている低分子量G蛋白質がその制御にかかわり、Rhoはアクチンのストレスファイバーの構築を、Racはアクチンの膜ラッフル化を、Cdc42はアクチンのマイクロスパイク形成を司ることが明らかになっている。我々はN-WASPがCdc42によって活性化され、マイクロスパイクの形成を、WAVEがRacによって活性化され、膜ラッフル形成を引き起こすことを証明した。N-WASPとWAVEは両者ともアクチン結合領域VCAドメインを持つ。これらのことから、N-WASPがCdc42の下流にあって、アクチンの重合を促す機序とWAVEがRacの下流にあってアクチン重合を促す機序は同じであろうと考えられた。しかし一方は、マイクロスパイク形成を生じ、一方は膜ラッフルを生じる。この違いはどこから来ているのだろうか？ アクチンを重合させる機序は同じであるが、その部位と重合にかかわる下流分子を変えることにより、形を変えているのであろうと想像される。
2. Bmax値の著明な減少が老齢シナプスのL型、N型、P/Q型チャンネルに認められたが、これは老齢シナプスにおいてカルシウムチャンネル数の減少を示している。これがCa²⁺流入の低下とそれに続くアセチルコリン放出の低下の要因となっていると思われる。一方、神経終末に存在するVDCC密度も加齢によって減少することから、VDCC蛋白質発現に加齢変化があると考えられる。
3. 膜分画において細胞死を抑制するBcl-2お

よびBcl-X量がAD群で増加していた。一方、細胞死を促進するBakおよびBad量も増加していた。一方、アポトーシス実行分子と考えられるcaspase-3およびcaspase-2がそれぞれ膜分画および細胞質分画において増加していた。免疫組織化学的にAD脳海馬CA3領域ニューロンのBcl-2免疫反応性が対照脳脳に比べ増大しており、AD脳において細胞死誘因ストレスを回避するためにBcl-2およびBcl-Xの発現が高まっている可能性が考えられる。

4. SAMP10ではD2とD3受容体の[³H]quinpirol結合量が増加していたが、これは最大結合量の増加によるものと考えられた。しかし、D1受容体への[³H]SCH23390の結合は変化なかった。

E. 結論

1. WAVEはRacの下流にあってアクチン重合を促進し、膜ラッフル形成を引き起こす。WAVEの下流にはプロフィリンがあって、アクチンの実際の重合を司っている。
2. 前シナプスのVDCC密度が老齢で著明に減少していた。このことが膜分極によるCa²⁺流入低下と、それに続くアセチルコリン放出低下の要因となっている。
3. AD脳では細胞死に関与する分子の発現を増大させる機構が作動していることが示された。
4. SAMP系のうち、P10はドバミン、セロトニン系の異常を示す。

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

老化に伴って生じる情報伝達変異

分担研究者 竹縄 忠臣 東京大学医科学研究所教授

Ash/Grb2はチロシンキナーゼのシグナルを下流へ伝えるアダプター蛋白質でRasへシグナルを伝え、細胞増殖シグナルを発生させる。更に、N-WASPやWAVEとも結合し、細胞骨格再編を促し、細胞分裂、細胞運動亢進へのシグナルも伝えていた。

キーワード：N-WASP、WAVE、アクチン、プロフィリン

A. 研究目的

すべての細胞は細胞内情報伝達によって機能を調節され、正常な活動を営んでいる。細胞内情報伝達の乱れは細胞の機能を狂わせ、各種疾病の原因となる。チロシンキナーゼ情報伝達系は、細胞の増殖、分化や神経の高次機能など複雑な生命現象の情報伝達を司る。我々は6年前にチロシンキナーゼの下流にあるアダプター蛋白質としてAsh/Grb2を見つけた。Ash/Grb2はチロシンキナーゼの下流にあり、チロシンリン酸化部位にSH₂ドメインを介して結合し、更にSH₃ドメインを介してプロリンに富む配列を持つ蛋白質と結合してシグナルを下流へ伝える。我々はAsh/Grb2に結合してシグナルを下流へ伝える蛋白質を採るため、Ash/Grb2のアフィニティクロマトグラフィーを用いて、牛脳より結合蛋白質を採った。するとSos(180KDa)、Synaptojanin(150KDa)、Dynammin(100KDa)及びN-WASP(65KDa)が採れてきた。N-WASPは構造的にWisskott-Aldrich syndrome

Protein(WASP)と良く似ていた。本蛋白質は神経系に多く発現していたので、Neural WASP、N-WASPと名づけた。そこでN-WASPの生理作用と神経機能への関与を調べることにした。

N-WASPはCdc42によって活性化され、アクチン線維の重合を促し、フィロポジアを形成する蛋白であった。しかし、N-WASPのC末のコフィリン様ドメインに変異を入れたN-WASPはフィロポジア形成能を失っていた。この部位が機能発現に重要であることがわかったので、この部位に相同性を有する蛋白質を採り、機能解析を目指した。

B. 研究方法

1. WAVEのcDNAクローニング

ジーンバンクのデータベース上にコフィリン様ドメインを持つ蛋白質がリストされていた。(D87459)。本遺伝子はWASPと構造類似性を示し、プロリンに富む配列とパープロリン、コフィリン様ドメイン(VCA)を持っていたが、機能解析は全くなされていなかった。

この遺伝子をもらい受け、実験に使用した。

2. WAVEのCos7細胞への発現

myc-tagをつけたWAVEをCos7細胞へエレクトロポレーション法で導入した。

3. 抗体作成

WAVEのC末を大腸菌にて発現し、蛋白を精製後、ウサギに免疫し、ポリクローナル抗体を作成した。

4. VPH及びProR変異WAVEの作成

Δ VPH及び Δ ProR変異体はPCR法にて作成した。

5. アクチン結合アッセイ

アクチンはトリ胸筋より調製した。モノマーアクチン結合実験： 様々な濃度のアクチンモノマーをGST-WAVE融合蛋白質とインキュベートし、結合するアクチンを検出した。

C. 研究結果

1. WAVEのCos7細胞への発現

WAVEをCos7細胞へ発現したところ、WAVEの発現はアクチンのクラスター形成を促し、WAVEとアクチン線維は共存した。

2. WAVEはプロフィリンを介したアクチンのクラスター化を生じる。

WAVEはプロリンに富む配列を持ち、プロフィリンに結合する。このプロフィリンの結合がアクチン線維のクラスター化に必要であるかどうか調べた。そのために、プロフィリンのH115E変異体を使った。このプロフィリン変異体はアクチンとのみ結合できず、その他のプロフィリン結合蛋白質とは結合できる性質を持っており、ドミナントネガティブ体として働く。WAVEとプロフィリン変異体を共発現したところ、アクチンのクラスター化は完全に阻害された。

3. 内在性WAVEの膜ラッフル部位での蓄積

NIE115細胞を用いて内在性WAVEの細胞内局在を免疫蛍光抗体染色法にて調べた。WAVEは細胞質内にドット状に存在し、更に膜ラッフリング部位に濃縮していた。又、アクチン線維をファロイジンで染色したところ、WAVEのラッフリング部位への局在が認められた。NIE115細胞にRacのドミナントアクティブ体Rac1G12Vを発現させると、細胞質に存在したドット状のWAVEが減少し、膜ラッフリング部位へ移行した。

4. WAVEとRacの相互作用

WAVEと活性Racを発現している細胞から調製したCell lysateをWAVEの抗体で免沈し、Racが結合してくるかどうか調べた。すると、Racが免疫沈降物中に含まれていることがわかった。しかし、不活性型Racを発現した細胞からの免疫沈降物中には含まれなかった。

5. Δ VPHWAVEはアクチンのクラスター化を生じない。

WAVEのC末端のバープロリン、コフィリン様部位の欠損WAVEはもはやアクチン結合活性を失っていた。この欠損WAVEをCos7細胞に発現させたところ、アクチンのクラスター化は認められなかった。

6. WAVEはRacの下流で働く。

活性型RacをCos7細胞に発現させると、それだけで膜ラッフリングの形成が起こる。更に活性型Racと Δ VPH WAVEを共発現すると、膜ラッフリング形成は阻害された。一方、WAVEと不活性型Racを共発現した場合は、WAVEの存在部位にアクチンのクラスターが形成された。

D. 考察

N-WASPはチロシンキナーゼの下流に存在

し、Ash/Grb2と結合している。チロシンキナーゼの活性化を受けて、Cdc42が活性化されると、N-WASPは活性化され、アクチンの重合を引き起こし、フィロポジア形成を促す。一方、WAVEはRacの下流にあって活性化され、膜ラフリングを生じた。N-WASPによるマイクロスパイク形成やWAVEによる膜ラフリング形成ともプロフィリンのアクチン結合能を欠いた変異体で抑制されることから、これらの蛋白質の下流にプロフィリンが存在し、実際のアクチン重合にたづさわっているものと思われた。WAVEの膜ラフリング能はRacのドミナントネガティブ体によっても阻害されないことから、Racの下流にWAVEがあり、アクチンの重合を促して膜ラフリングを生じていると考えられた。しかし、WAVEはRacと共沈してくるものの、直接の結合は認められなかったことから、RacとWAVEの間に別の蛋白質が存在し、情報を受け渡していると考えられた。

E. 結論

WASPと相同性のあるWAVEを採り、機能解析を行った。WAVEはRacの下流にあって、アクチンの重合を促進し、膜ラフリングを生じさせる蛋白質であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miki, H., Sasaki, T., Takai, Y., and Takenawa, T.; Induction of filopodium formation by a WASP related actin depolymerizing protein N-WASP Nature 391, 93-97 (1998)
- 2) Yu, H., Fukami, K., Watanabe, Y., Ozaki, S., and Takenawa, T.; Phosphatidylinositol

4,5-bisphosphate reverses the inhibition of RNA transcription caused by histon H1. Eur. J. Biochem. 251, 281-287 (1998)

- 3) Miki, H., and Takenawa, T.; Direct binding of the verprolin-homology domain in N-WASP to actin is essential for cytoskeletal reorganization. Biochim. Biophys. Res. Commun. 243, 73-78 (1998)

- 4) Matuoka, K., and Takenawa, T.; Downregulated expression of the signaling molecules Nck, c-Crk, Grb2/Ash, PI 3-kinase p110 and WRN during fibroblast aging in vitro. Biochim. Biophys. Acta 1401, 211-215 (1998)

- 5) Shimohama, S., Sumida Y., Fujimoto S., Matsuoka Y., Taniguchi T., Takenawa, T., Kimura J.; Differential expression of rat brain phospholipase C isozymes in development and aging. Biochem. Biophys. Res. Commun. 243, 210-216 (1998)

- 6) Shimohama, S., Sasaki, Y., Fujimoto, S., Kamiya, S., Taniguchi, T., Takenawa, T., and Kimura, J.; Phospholipase C isozymes in the human brain and their changes in Alzheimer's disease. Neuroscience 82, 999-1007 (1998)

- 7) Fukami, K., and Takenawa, T.; Regulation of α -actinin and vinculin functions by polyphosphoinositides. In The 1998 Molecular Biology Intelligence Unit Book, Gprotein, Cytoskeleton and Cancer. edited by Klaus Aktories (Springers and DG Landes) in press

- 8) Takenawa, T., Miki, H., Itoh, T., and Sakisaka, T.; Ash/Grb2 downstream signaling---signals to cytoskeleton. in Hokkaido University medical Library series vol. 37. 41-

- 44 (1998) Cytoskeleton and G proteins in the regulation of cancer. edited by N. Kuzumaki Hokkaido University
- 9) He, H., Watanabe, T., Zhan, X., Huang, C., Schuurin, E., Fukami, K., Takenawa, T., Kumar, C.C., Simpson, R.J., and Maruta, H.; Role of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in Ras/Rac-induced disruption of the cortactin-actomyosin II complex and malignant transformation Mol. Cell Biol. 18, 3829-3837 (1998)
- 10) Suzuki, T., Miki, H., Takenawa, T., and Sasakawa, C.; Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein is implicated in the actin-based motility of *Shigella flexneri* H. EMBO J. 15, 2767-2776
- 11) Yu, K., Fukami, K., Itoh, T., and Takenawa, T.; Phosphorylation of PLC-gamma-1 on tyrosine residue 783 by PDGF regulates re-organization of the cytoskeleton Exp. Cell Res. 243, 113-122 (1998)
- 12) Itoh, T., Ijuin, T., and Takenawa, T.; Identification of a novel phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase; evidence for its phosphorylation and translocation in response to mitogenic signals J. Biol. Chem. 273, 20292-20299 (1998)
- 13) Suetsugu, S., Miki, H., and Takenawa, T.; The essential role of profilin in the assembly of actin for microspike formation. EMBO J., 7, 6516-6526 (1998)
- 14) Miki, H., Suetsugu, S., and Takenawa, T.; WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin-polymerization induced by Rac. EMBO J., 17, 6932-6941 (1998)
- 15) Hiroyama, M., and Takenawa, T.; Purification and characterization of a lysophosphatidic acid-specific phosphatase Biochem. J., 336, 483-489 (1998)
- 16) Nagano, K., Fukami, K., Minagawa, T., Watanabe, Y., Ozaki, C., and Takenawa, T.; A Novel Phospholipase C δ 4 (PLC δ 4) Splice Variant as a Negative Regulator of PLC The Journal of Biol. Chem., 274, 2872-2879 (1999)

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

アルツハイマー病におけるアポトーシス関連
蛋白質の変動—加齢変化との関係

分担研究者 下濱 俊 京都大学医学部神経内科学助手

アルツハイマー病群では対照群に比べ、膜分画でBcl-2、Bcl-x、Bak、Bad、caspase-2、caspase-3の蛋白質レベルが、また、細胞質分画でcaspase-3の蛋白質レベルが有意に増大していた。Bcl-2の発現はE19で最大であり生後は著減した。Bcl-xの発現はE19より96週齢まで認められた。BakはE19で発現していたが生後は急減した。BadはE19をピークに漸減し4週齢以後は著減した。caspase-2は4週齢より96週齢までその発現が認められた。caspase-3の発現はE19をピークに漸減し4週齢以後は著減した。アルツハイマー病では脳の発達期に見られる細胞死に関与するアポトーシス関連分子の発現を増大させる機構が作動していることが示唆された。

キーワード：アルツハイマー病、アポトーシス、Bcl-2、カスパーゼ、老化、加齢

A. 研究目的

アルツハイマー病(AD)は初老期・老年期に進行性の痴呆をきたす原因不明の神経変性疾患であり、解決すべき最大の問題は、ニューロンが変性し、ニューロン死に至る機序の解明であるこの問題を解決することにより、今後、ニューロンの変性を防止し、再生を促し、機能の修復を図る方法の開拓が可能となりうる。

AD剖検脳でTUNEL染色が行われ、ニューロンおよびグリアの細胞死の少なくとも一部はアポトーシスである可能性が推定されている(1-4)。本研究では、アポトーシス調節作用のあるBcl-2およびcaspaseファミリー蛋白質

(Bcl-2、Bcl-x、Bax、Bak、Bad、caspase-2およびcaspase-3)、のAD脳における変動について検討した。また、ADは老化とともに著増する疾患であるが、正常な加齢でアポトーシス調節蛋白質がどのように制御されているかは不明である。加齢に伴う脳内Bcl-2ファミリー及びcaspaseファミリー蛋白質の変動についても検討した。

B. 研究方法

年齢および死後剖検までの時間に差のない13例のAD群と12例の対照群を対象とした。検索部位は側頭葉とした。特異抗体を用いたイムノプロット解析および免疫組織化学的解析

を行った。胎仔 (E19)、生後1週齢から96週齢のWistarラット雄より大脳皮質を抽出しこの脳組織より膜分画および可溶性分画を超速心法により調製した。各分画について特異抗体を用いたイムノプロット解析を施行した。

C. 研究結果

AD群では対照群に比べ、膜分画でBcl-2、Bcl-x、Bak、Bad、caspase-2、caspase-3の蛋白質レベルが、また、細胞質分画でcaspase-3の蛋白質レベルが有意に増大していた。AD脳海馬CA3領域ニューロンのBcl-2免疫反応性が対照脳に比べ増大していた。

アポトーシス抑制作用のあるBcl-2は、膜分画に存在しその発現量はE19で最大であり、生後は2週齢までに半減しその後4週齢から96週齢までE19の1/4程度であった。Bcl-xは、膜分画では29/30 kDaのBcl-XβがE19より漸増し4週齢をピークに96週齢まで漸減した。細胞質分画では26/27 kDaのBcl-XαがE19、1週齢をピークに発現し、2週齢以後著減した。アポトーシス促進作用のあるBaxは、膜分画及び細胞質分画ともにE19をピークに2週齢まで発現が多く、4週齢以後著減した。Bakは、膜分画に存在し、E19で発現していたが生後は急減した。Badは、主に膜分画に存在し、E19をピークに漸減し4週齢以後は著減した。caspase-2は4週齢より96週齢までその発現が認められた。caspase-3の発現はE19をピークに漸減し4週齢以後は著減した。

D. 考察

今回の研究では、膜分画において細胞死を抑制するBcl-2およびBcl-x量がAD群で対照群と比較して増加していた。また、細胞死を促進するBakおよびBad量も増加していたが、Bax

および量には有意な差は認められなかった。一方、アポトーシス実行分子と考えられているcaspase-3およびcaspase-2がそれぞれ膜分画および細胞質分画、また膜分画において増大していた。免疫組織化学的にAD脳海馬CA3領域ニューロンのBcl-2免疫反応性が対照脳に比べ増大しており、ADにおいて細胞死誘因ストレスを回避するために代償的にBcl-2およびBcl-xの発現が高まっている可能性、あるいは、Bcl-2やBcl-xの減少およびBakやBadの増大によりニューロンの細胞死が促進されている可能性が示唆された。

一方、神経系の発生・成熟・老化に伴い、脳内Bcl-2ファミリー及びカスパーゼ蛋白質は、それぞれ特異的にその発現が制御されていることが示唆された。特に、発生・生後の段階でのニューロンのアポトーシスが見られる時期に多くのアポトーシス関連蛋白質の増大が認められることが明らかになった。また、これまで老化に伴ってニューロン死もおこりその機構としてアポトーシス現象が示唆されていたが、今回の研究でラット脳2年(ヒトでは70-80歳に相当)の時点でも特にアポトーシス関連蛋白質の増大は認められなかった。それに対し、AD脳では脳の発達期に見られる細胞死に関与するアポトーシス関連分子の発現を増大させる機構が作動していること、およびアルツハイマー病は単なる老化の延長ではないことが示唆された。

E. 結論

アルツハイマー病では脳の発達期に見られる細胞死に関与するアポトーシス関連分子の発現を増大させる機構が作動していることが示唆された。

F. 引用文献

- 1) Barinaga M: Is apoptosis key in Alzheimer's disease ? Science 281: 1303-1304, 1998
- 2) Wang L et al, Ichi-1, and Ice/ced-3 related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death. Cell 78: 739-750, 1994
- 3) Davies AM, The Bcl-2 family of proteins, and the regulation of neuronal survival. Trends Neurosci., 18: 355-358, 1995
- 4) Yang E et al., Bad, a heterodimeric partner for Bcl-xL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. Cell 80: 285-291, 1995

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shimohama S et al: Phospholipase C isozymes in the human brain and their changes in Alzheimer's disease. Neuroscience, 82: 999-1007, 1998
- 2) Matsushima H, Shimohama S et al: Reduction of platelet phospholipase C- $\delta 1$ activity in Alzheimer's disease associated with a specific apolipoprotein E genotype ($\epsilon 3/\epsilon 3$). Int. J. Mol. Med., 1: 91-93, 1998
- 3) Kitamura Y, Kamoshima W, Shimohama S et al: Nitric oxide donor-induced p53-sensitive cell death is enhanced by Bcl-2 reduction in human neuroblastoma cells. Neurochem. Int., 32: 93-102, 1998
- 4) Kawakami N, Takemasa H, Yamaguchi T, Hayakawa T, Shimohama S et al: Indication of a protein kinase C-independent pathway for NADPH oxidase activation in human neutrophils. Arch. Biochem. Biophys., 349: 89-94, 1998
- 5) Shimohama S et al: Nicotinic $\alpha 7$ receptors protect against glutamate neurotoxicity and neuronal ischemic damage. Brain Res., 779: 359-363, 1998
- 6) Imura T, Shimohama S et al: Genetic variation in the ciliary neurotrophic factor receptor alpha gene and familial amyotrophic lateral sclerosis. Ann. Neurol., 43: 275, 1998
- 7) Shimohama S et al: Differential expression of rat brain phospholipase C isozymes in development and aging. Biochem. Biophys. Res. Commun., 243: 210-216, 1998
- 8) Kitamura Y, Shimohama S et al: Alteration of proteins regulating apoptosis, Bcl-2, Bcl-x, Bax, Bak, Bad, ICH-1 and CPP32, in Alzheimer's disease. Brain Res., 780: 260-269, 1998
- 9) Shimohama S et al: Differential expression of protein kinase C- α and $-\beta$ II in rat septum and changes following fimbria-fornix lesion. Brain Res., 781: 341-345, 1998
- 10) Tanaka S, Kawamata J, Shimohama S et al: Inferior temporal lobe atrophy and APOE genotype in Alzheimer's disease: X-ray CT, MRI and Xe-133 SPECT studies. Dement. Geriatr. Cogn. Disord., 9: 90-98, 1998
- 11) Shimohama S et al: Mutation in the pleckstrin homology domain of the human phospholipase C- $\delta 1$ gene is associated with loss of function. Biochem. Biophys. Res. Commun., 245: 722-728, 1998
- 12) Kihara T, Shimohama S et al: Stimulation

- of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors inhibits beta-amyloid toxicity. *Brain Res.*, 792: 331-334, 1998
- 13) Shimohama S et al: Alteration of myo-inositol monophosphatase in Alzheimer's disease brains. *Neurosci. Lett.*, 245: 159-162, 1998
- 14) Tsuji T, Shimohama S et al: m-Calpain (calcium-activated neutral proteinase) in Alzheimer's disease brains. *Neurosci. Lett.*, 248: 109-112, 1998
- 15) Hasegawa H, Hiki K, Sawamura T, Aoyama T, Okamoto Y, Miwa S, Shimohama S et al: Purification of a novel endothelin-converting enzyme specific for big endothelin-3. *FEBS Lett.*, 428: 304-308, 1998
- 16) Sawada H, Ibi M, Kihara T, Urushitani M, Akaike A, Kimura J, Shimohama S: Dopamine D2-type agonists protect mesencephalic neurons from glutamate cytotoxicity: Mechanisms of neuroprotective treatment against oxidative stress. *Ann. Neurol.*, 44: 110-119, 1998
- 17) Fujimoto S, Tsuda J, Kawakami N, Shimohama S: myo-Inositol monophosphatase exhibits zinc ion-dependent tyrosine phosphatase activity. *Gen. Pharmacol.*, 31: 469-475, 1998
- 18) Shimohama S et al: Differential expression of rat brain synaptic proteins in development and aging. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 251: 394-398, 1998
- 19) Shimohama S et al: Intracellular receptors for activated C-kinase (RACK1) are unaltered in Alzheimer's disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.*, 12: 384-386, 1998
- 20) Urushitani M, Shimohama S et al: Mechanism of selective motor neuronal death after exposure of spinal cord to glutamate: Involvement of glutamate-induced nitric oxide in motor neuron toxicity and nonmotor neuron protection. *Ann. Neurol.*, 44: 796-807, 1998
- 21) Hattori N, Kitagawa K, Higashida T, Yagyu K, Shimohama S et al: Cl⁻-ATPase and Na⁺/K⁺-ATPase activities in Alzheimer's disease brains. *Neurosci. Lett.*, 254: 141-144, 1998
- 22) Kitamura Y, Ota T, Okazaki M, Kamimura J, Tooyama I, Kimura H, Shimohama S et al: Kainic acid-induced neuronal loss and glial changes in the hippocampal CA3 of p53-deficient mouse. *Neurosci. Lett.*, 255: 57-60, 1998
- 23) Sawada H, Ibi M, Kihara T, Urushitani M, Akaike A, Shimohama S: Estradiol protects mesencephalic dopaminergic neurons from oxidative stress-induced neuronal death. *J. Neurosci. Res.*, 54: 707-719, 1998
- 24) Shimohama S et al: Differential expression of rat brain Bcl-2 family proteins in development and aging. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 252: 92-96, 1998
- 25) Tsuda J, Kimura T, Tanino H, Shimohama S et al: Characterization of high- and low-molecular weight zinc-dependent acid phosphatases in bovine liver. *Biol. Pharmacol. Bull.*, 21: 1218-1221, 1998
- 26) Kitamura Y, Ota T, Matsuoka Y, Tooyama I, Kimura H, Shimohama S et al: Hydrogen

- peroxide-induced apoptosis mediated by p53 protein in glial cells. *Glia*, 25: 154-164, 1999
- 27) Kitamura Y, Shimohama S et al: Increased expression of cyclooxygenases and peroxisome proliferator-activated receptor- γ in Alzheimer's disease brains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 254: 582-586, 1999
- 28) Kitamura Y, Taniguchi T, Shimohama S: Apoptotic cell death in neurons and glial cells: Implications for Alzheimer's disease. *Japan J. Pharmacol.*, 79: 1-5, 1999
- 29) Kihara T, Shimohama S et al: Effects of nicotinic receptor agonists on beta amyloid beta sheet formation. *Japan J. Pharmacol.*, in press, 1999
- 30) Shimohama S et al: Changes in caspase expression in Alzheimer's disease: Comparison with development and aging. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press, 1999
- 31) Kawakami N, Takemasa H, Okamura N, Hayakawa T, Shimohama S et al: Participation of cytosolic protein phosphatase in regulation of NADPH oxidase in polymorphonuclear leukocytes. *Biol. Pharm. Bull.*, 22, in press, 1999
- 32) Kihara T, Shimohama S et al: Nicotinic receptor stimulation protects neurons against glutamate- and β -amyloid-induced cytotoxicity. In *Proceeding of the 6th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders*, John Wiley & Sons, in press, 1999
- 33) Sawada H, Shimohama S: MPP⁺ and glutamate in degeneration of nigral dopaminergic neurons. In *Proceedings of the Third International Symposium on the Treatment of Parkinson's Disease*, Elsevier, in press, 1999
- 34) 長谷川浩史、下濱 俊 他：エンドセリンと神経系。最新医学、53: 311-315, 1998
- 35) 漆谷 真、下濱 俊 他：グルタミン酸毒性と選択的運動ニューロン死。最新医学 53: 1117-1123, 1998
- 36) 景山 卓、下濱 俊 他：神経系におけるトランスポーターの役割。最新医学 53: 2118-2122, 1998
- 37) 下濱 俊：アルツハイマー病とホスフォリパーゼC- δ 1分子異常。(特集：老年痴呆の分子生物学) 医学のあゆみ 187: 127, 1998
- 38) 下濱 俊：ALSの病因についての最近の知見。日本ALS協会 近畿ブロック会報 28: 27-32, 1998
- 39) 下濱 俊 他：総論；神経系疾患の遺伝子学。最新医学 1998年増刊号：臨床遺伝子学 '98、最新医学社、pp.147-164, 1998
- 40) 下濱 俊：老年者における痴呆。老年学大辞典(北 徹 監修)、西村書店、pp.238-244, 1998
- 41) 下濱 俊 他：ニコチン性受容体刺激によるアミロイド β タンパク誘発神経細胞死の抑制(特集：神経細胞死制御) 医学のあゆみ、印刷中
- 42) 下濱 俊 他：神経変性疾患における細胞死と酸化ストレス。臨床神経、印刷中
- 43) 景山 卓、下濱 俊：疾患編：神経・運動器疾患：8 遺伝性疾患。わかりやすい内科学(井村裕夫編)、文光堂、印刷中
- 44) 大江田知子、下濱 俊：疾患編：神経・運動器疾患：9 代謝性疾患。わかりやすい内科学(井村裕夫編)、文光堂、印刷中
- 45) 漆谷 真、下濱 俊：疾患編：神経・運動器疾患：

- 10 運動ニューロン疾患。わかりやすい内科学 (井村裕夫編)、文光堂、印刷中
- 46) 木原武士、下濱 俊: 抗痴呆薬: 脳代謝改善薬、脳循環改善薬とその作用機序。臨床精神医学講座第14巻 精神科薬物療法 (松下正明編)、中山書店、印刷中
2. 学会発表
- 47) 衣斐督和、前田武彦、金子周司、赤池昭憲、澤田秀幸、下濱 俊 他: 培養中脳神経細胞における活性酸素誘発神経毒性に対するプロモクリプチンの保護作用、第71回日本薬理学会年会、1998
- 48) 服部尚樹、北川香織、東田敏明、下濱 俊 他: アルツハイマー病脳におけるCl-ATPaseについて、第71回日本薬理学会年会、1998
- 49) 谷口隆之、北村佳久、下濱 俊 他: アルツハイマー病脳における転写因子NF- κ BおよびSTAT1蛋白質濃度の変化、第71回日本薬理学会年会、1998
- 50) 谷野浩子、墨田康男、藤本貞毅、下濱 俊: アルツハイマー病脳におけるイノシトールモノホスファターゼの変動。第118回日本薬学会年会、1998
- 51) 澤田秀幸、木原武士、漆谷真、下濱 俊 他: ドーパミンD2刺激薬の酸化ストレス誘発神経細胞死に対する抑制効果。第39回日本神経学会総会、1998
- 52) 井村徹也、下濱 俊 他: C6 glioma細胞におけるグルタミン酸トランスポーターの発現調節機構の検討、第39回日本神経学会総会、1998
- 53) 木原武士、漆谷真、澤田秀幸、下濱 俊 他: グルタミン酸誘発神経毒性に対するドーパミン受容体刺激薬の保護効果、第39回日本神経学会総会、1998
- 54) 下濱 俊: 神経変性疾患の細胞死と酸化ストレス、第39回日本神経学会総会、1998
- 55) 辻 輝之、下濱 俊 他: 二次元電気泳動画像データベースを用いた脳タンパクの検討—アルツハイマーでの変化。第39回日本神経学会総会、1998
- 56) 景山卓、下濱 俊 他: マウス継代脳血管内皮細胞(MBEC4)を用いたL-DOPAの脳血液関門輸送機構の解析、第39回日本神経学会総会、1998
- 57) 漆谷真、下濱 俊 他: 培養脊髄運動ニューロンの選択的脆弱性と一酸化(NO)の関係について、第39回日本神経学会総会、1998
- 58) 河崎洋志、下濱 俊 他: 神経成長因子によるBcl-2の発現誘導におけるMAPキナーゼとPI3キナーゼの役割、第39回日本神経学会総会、1998
- 59) 澤田秀幸、衣斐督和、木原武士、漆谷真、赤池昭紀、下濱 俊: 中脳培養細胞におけるエストラジオールの神経保護作用の機序、第21回日本神経科学・第41回日本神経化学合同大会、1998
- 60) 衣斐督和、久米利明、香月博志、金子周司、澤田秀幸、下濱 俊 他: 中脳ドパミンニューロンにおけるグルタチオン枯渇は一酸化窒素神経毒性に対する脆弱性を増大する、第21回日本神経科学・第41回日本神経化学合同大会、1998
- 61) 小川哲生、藤井 誠、鎌田英明、八木澤仁、平田肇、下濱 俊: ヒトPLC- δ 1遺伝子に見出されたミスセンス変異の解析、第71回日本生化学大会、1998
- 62) 景山卓、大江田知子、下濱 俊 他: マウス継代脳血管内皮細胞(MBEC4)におけるL-syatemの基質認識特性の解析、第71回日本生化学大会、1998

63) 下濱 俊他 : 加齢に伴う脳内Bcl-2ファミリー及びカスパーゼ蛋白質の変動、
第17回日本痴呆学会、1998

64) Shimohama S et al: Nicotinic receptor stimulation protects neurons against glutamate- and β -amyloid-induced cytotoxicity, The 6th International Conference on Alzheimer's disease and associated Disorders, Amsterdam, 1998

大脳シナプスにおけるカルシウムチャネル密度の加齢変化

安藤 進 (東京都老人総合研究所・副所長)

共同研究者: 田中康一 (東京都老人総合研究所・生体膜部門)

大脳皮質コリン性シナプスにおけるアセチルコリン放出が老齢動物で低下し、それは脱分極刺激による電位依存性のカルシウムイオン流入が減少するためであることを明らかにしてきた。本研究では、カルシウムイオン流入低下の要因を探るため、ラット大脳皮質から調製したシナプス膜への放射標識した各カルシウムチャネルサブタイプに特異的なブロッカーの結合実験を行い、シナプスにおける電位依存性カルシウムチャネル密度の加齢変化を調べた。その結果、老齢シナプスではL-, N-, P/Q型チャネル密度が顕著に減少していることが明らかとなった。

A. 研究目的

老化に伴う脳機能の低下は、シナプスにおける情報伝達障害によるとのシナプス老化仮説の検証を行ってきた。これまで、①大脳皮質コリン作動性シナプスにおいては加齢に伴って脱分極刺激によるアセチルコリン(ACh)放出が低下すること、②しかし、ACh合成系の活性は加齢変化を受けていないこと、③脱分極刺激によるカルシウムイオン流入量が老齢シナプスで減少していることを明らかにしてきた(1)。これらの結果から、放出の加齢低下は開口放出機構の障害、特に電位依存性カルシウムチャネル(VDCC)の異常によることが推定された。シナプスにおける脱分極刺激によるカルシウムイオン流入量低下の要因として、VDCC密度の減少が考えられる。本研究では、放射標識したVDCCブロッカーのシナプス膜への結合実験からVDCC密度の加齢変化を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

シナプス膜の調製: 6ヶ月齢と25ヶ月齢の雄性Wistarラットの大脳皮質からFicollの密度勾配遠心法(2)によりシナプトソームを調製した。このシナプトソームを1 mMのリン酸緩衝液(pH 7.4)による低調処理を行った後に遠心により粗膜分画を得た。粗膜分画からショ糖の不連続密度勾配遠心法(3)によりシナプス膜を得た。

結合実験: L型チャネルのブロッカーとして $[^3\text{H}]$ PN200/110, N型チャネルには $[^{125}\text{I}]\omega$ -conotoxin GVIA, P/Q型チャネルには $[^{125}\text{I}]\omega$ -conotoxin MVIIICをリガンドとして用いた。シナプス膜標品を種々の濃度の放射標識ブロッカーとともにインキュベートした後、シナプス膜に特異的に結合した放射活性から結合量を求めた。

C. 研究結果

図1は、トリチウムで標識したPN200/110（L型チャンネルブロッカー）を用いた結合実験のスキャッチャードプロットである。成熟ラットシナプス膜と老齢ラットシナプス膜で得られたプロットで明らかにX切片の値が異なっていることが明確に読みとれる。これらのプロットから求めた見掛けの B_{max} 値を表1に示す。25ヶ月齢の老齢シナプス膜では、L型、N型、P/Q型チャンネルの B_{max} 値、すなわち最大結合サイト数が6ヶ月齢に比べそれぞれ50%、35%、52%と顕著に減少していた。このことから、老齢ラットの大脳皮質シナプスにおいては、VDCCの数が減少していることが明らかとなった。

リガンドに対する親和性は、L型チャンネルでその増大が老齢シナプスで認められたがN型、P/Q型への各リガンドの親和性に加齢変化はなかった。

D. 考察

B_{max} 値の顕著な減少が老齢シナプスのL型、N型、P/Q型チャンネルに認められた。これは、老齢シナプスにおいてカルシウムチャンネル数の減少していることを示すものであり、カルシウムイオン流入低下とそれに引き続くアセチルコリン放出低下の要因となっていることが推察される。これまで、VDCC密度の加齢変化に対する研究として、0.5から18ヶ月齢のラット脳7つの異なる領域から調製した膜標品への結合実験がある(4)。それによると $[^3H]$ isradipine, $[^{125}I]$ w-conotoxin GVIAの二つのリガンドの結合量に加齢変化はないとしている。しかし、この報告では、脳組織から調製した膜標品を用いていることからシナプス膜以外の膜成分の混入によりシナプスでの変化が希釈されている可能性が高いうえ、老齢としているラットの月齢がたかだか18ヶ月齢であることから、老化過程でL型、およびN型VDCCは変化を受けないとする彼らの主

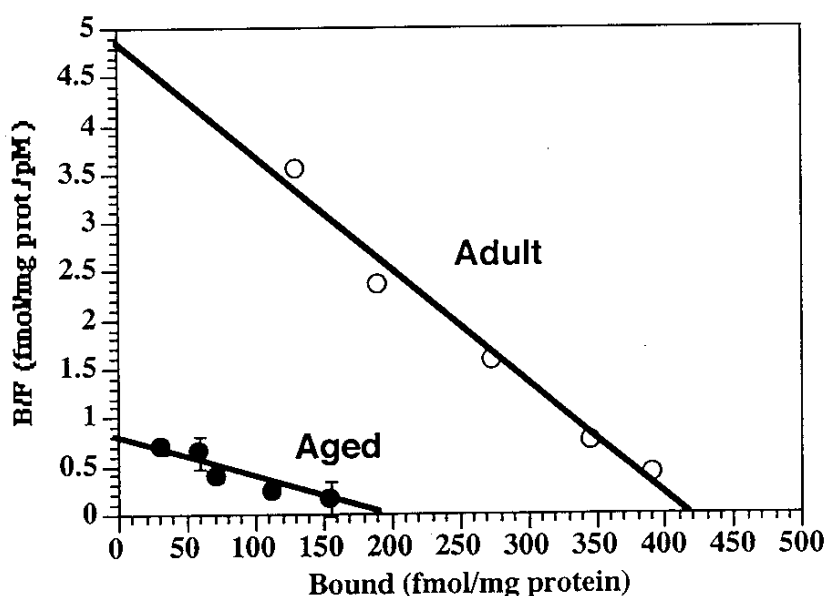


図1 PN200/110のシナプス膜への結合に対するスキャッチャードプロット（各群3匹ずつの平均で示す）

張には疑問が残る。これまで、VDCCサブタイプ存在比の加齢変化の研究から、脱分極刺激によるカルシウムイオン流入に対する各サブタイプの相対的貢献度が加齢と共に変化することを示した。本研究により神経終末に存在するVDCC密度も加齢によって減少することが明らかになった。これがカルシウムイオン流入低下の直接の要因となっていることが推察された。また、L型チャネルブロッカー結合に対するKd値が老齢シナプスで成熟動物シナプスに比べて大きな値を示すことが認められた。この結果は、L型チャネルのブロッカーを結合するサブユニット(おそらく、 $\alpha 1$ サブユニット)の加齢による構造変化を反映している可能性を示唆していると思われる。以上の結果から、VDCC蛋白質発現に加齢変化がある可能性が示唆された。

E. 結論

前シナプスのVDCC密度が老齢で顕著に減少していることが明らかとなった。このことが脱分極によるカルシウムイオン流入低下とそれに引き続くアセチルコリン放出低下の直接の要因となっている可能性が示唆された。

引用文献

- 1) Tanaka Y, Hasegawa A and Ando S (1966) *J. Neurosci. Res.* 43, 63-70
- 2) Booth RFG and Clark JB (1978) *Biochem. J.*, 176, 365-370
- 3) Tanaka Y and Ando S (1992) *J. Biochem.*, 112, 117-121

表1 電位依存性カルシウムチャネル密度(A)とリガンド親和性(B)の加齢変化

(A) Channel density (B_{max})

Ligand	Channel Type	B_{max} (fmol/mg protein)	
		6 months	25 months
PN 200/110	L	420.7 \pm 45.3	195.2 \pm 45.3
ω -CTX GVIA	N	205.8 \pm 33.0	72.4 \pm 25.0
ω -CTX MVIIIC	P/Q	3.4 \pm 0.9	1.8 \pm 0.2

(B) Channel affinity (K_d)

Ligand	Channel Type	K_d (pM)	
		6 months	25 months
PN 200/110	L	88.5 \pm 9.5	260.9 \pm 33.2
ω -CTX GVIA	N	13.2 \pm 1.6	24.6 \pm 9.5
ω -CTX MVIIIC	P/Q	0.9 \pm 0.1	0.9 \pm 0.3

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ando S., Tanaka Y., Waki H., Kon K. Iwamoto M and Fukui F.
"Gangliosides and sialylcholesterol as modulators of synaptic functions" In Sphingolipids as signaling modulators in the nervous system, (R.W. Ledeen, S.-I. Hakomori, A.J. Yates, J.S. Schneider and R.K. Yu eds.) *Ann. NY Acad. Sci.*, Vol.845, pp.232-239 (1998)
2. Suzuki H., Park S.J., Tamura M., Ando S.
"Effect of the long-term feeding of dietary lipids on the learning ability, fatty acid composition of brain stem phospholipids and synaptic membrane fluidity in adult mice: a comparison of sardine oil diet with palm oil diet" *Mech. Age. Develop.* 101: 119-128, (1998)
3. Furuse H., Waki H., Kaneko K., Fujii S., Miura M., Sasaki H., Ito K., Kato H. and Ando S. "Effect of mono- and tetra-sialogangliosides, GM1 and GQ1b, on long-term potentiation in the CA1 hippocampal neurons of the guinea pig" *Exp. Brain Res.* 123: 307-314, (1998)
4. Nakamura H., Kobayashi S., Ohashi Y. and Ando S.
"Age-changes of brain synapses and synaptic plasticity in response to an enriched environment"
J. Neurosci. Res. (in press)

2. 学会発表

1. Ando S., O-Acetylated gangliosides and N-glycolyl gangliosides: their significance in cancerology. 1st French-Japanese Meeting on Clinical Glycobiology, Lyon France, June 1998
2. 田中康一、脇初枝、安藤進、シアロ化合物による老齢マウス脳コリン作動性シナプス機能の改善、第41回日本神経化学会、東京、1998年9月
3. 脇初枝、朱宮正剛、安藤進、体内脂肪酸に対する低タンパク質低エネルギー飼育と加齢の影響、仙台、1998年9月