

長寿命系痴呆モデルマウスの学習・記憶障害における 大脳皮質ホスホリパーゼC- β_1 活性調節機構の変異

宮本 篤

(札幌医科大学医学部薬理学講座助教授)

比較的長命な生理的老化痴呆モデルマウス (C57BL/6J) の学習・記憶障害と大脳皮質イノシトールリン脂質代謝情報伝達機構との関連を検討した。その結果、C57BL/6Jの学習・記憶障害マウスの大脳皮質では、ホスホリパーゼC- β_1 活性の二重調節 (促進・抑制) 機構に破綻をきたしていることが明らかになった。

キーワード： C57BL/6Jマウス、学習記憶障害、Gq蛋白質、ホスホリパーゼC- β_1

A. 研究目的

細胞情報伝達機構の理解は、あらゆる細胞において共通の命題である。細胞は、細胞外からの情報を選択的に認識し細胞内へと情報の変換・伝達を行う。この情報により個々の細胞は、的確な応答を起し、その集合体である組織そして生体が機能維持されている。この際、情報の選択を行うのが受容体であり、細胞内への情報の変換や伝達を担うのが細胞情報伝達機構と呼ばれるシステムである。細胞情報伝達の長い経路の中には、特異性の高い反応とそれほど特異性が低い経路が混在している。外来性のシグナルを受け取る為の受容体は、リガンドに対して非常に高い特異性を有しているが、そのシグナルが細胞の中に伝わると特異性の低い反応に引き継がれる。例えばcyclic AMPは、多くのホルモンに共通するセカンドメッセンジャーとして認知されており、この産生システムの鍵となる酵素がアデニル酸シクラーゼであり、異種受容体および異種GTP結合蛋白質

(G蛋白質)を介して相互に二重調節されている。

一方、イノシトールリン脂質代謝も細胞における重要な情報変換機構として認知されている。このイノシトールリン脂質代謝で主役を演ずるのがイノシトールリン脂質特異的ホスホリパーゼC (PLC)である。PLCは、ホスファチジルイノシトール三リン酸を加水分解してセカンドメッセンジャーであるジアシルグリセロールとイノシトール三リン酸を産生する酵素である。その活性化機構には受容体チロシンキナーゼによるものとG蛋白質によるものがある。近年、イノシトールリン脂質代謝の調節機構に、新たな作業仮説が提唱されている。すなわち、1) PLCアイソザイムには分子多様性が存在し現在まで3ファミリー (β , γ , δ) が単離されており、PLC分子種は異なる生理的機能と関係していると予想されること、2) PLC活性化機構にはアデニル酸シクラーゼ調節系との類似性が考えられ、活性化経路の多様性が注目されていること、3) 老化やアルツハイマー型痴呆症

を含む各種病態下でのPLC活性の調節異常が観察されている。

本研究では、細胞膜における情報変換・伝達機構に重要な役割を担っているPLCの情報変換酵素としての機能的役割を解明し、その活性化調節機構の老性変化の基礎的知見を得る目的で表記の研究課題に着手した。

B. 研究方法

実験には、正常飼育飼料を自由に与えた6, 15および30か月齢の雄性C57BL/6J系マウス(50%生存月齢:30.3か月)を使用した。ステップスルー試験において、グリット・ショック基盤付受動的回避実験装置(東洋産業CPP-106)および電気刺激装置(日本光電, SEN3301)を用いた。実験に先立ち、明室内にマウスを入れギロチンドアを開け、5分間明室と暗室を自由に移動させた。翌日、明室内にマウスを入れ30秒後にギロチンドアを開け、四肢を完全に暗室に移動するまでの反応潜時(L-naive)を測定した。翌日同様の反応潜時(L-before)を測定し、暗室に移動直後ギロチンドアを閉め2mA、2秒間の電気ショックを負荷し30秒後にギロチンドアを開けた。翌日より同様の再生試行を4日間繰り返し、反応潜時(L1, L2, L3 and L4)を測定した。行動薬理的評価後、動物を断頭屠殺後すみやかに脳を摘出し、大脳皮質を氷上で分割したのち大脳皮質膜分画を既報の方法で調製した。

大脳皮質膜標品における IP_3 の定量は既報に従いD-my o - IP_3 [3H] assay system (Amersham)により行った。また既報に従い大脳皮質膜標品におけるG蛋白質サブユニットおよびPLCアイソザイム(PLC- β_1 , PLC- γ_1 , PLC- δ_1)の蛋白質発現を特異的ポリおよびモノクローナル抗体を用いウエスタンブロッティング法で

検討した。化学発光法によりバンドを検出後、レーザーデンシトメーター(Molecular Dynamics)で解析した。

C. 研究結果および考察

ステップスルー試験において、6, 15および30か月齢のマウス群(12~18匹)では、L-naiveおよびL-beforeの反応潜時に顕著な相違は認められなかった。6か月齢のマウスでは強烈的な被ショック体験は長期記憶として保存されているものと考えられ、翌日再生試行を行っても全例のマウスは暗室に進入することなく、じっと明室内に留まった(L1 and L2)。またこれらの記憶は、再生試行の4日間ほとんど維持された。また15か月齢マウスにおいては、再生試行中ほぼ長期記憶として保存されていたが、6か月齢マウスとの比較で300秒以上の割合はやや減少していた。しかし30か月の老齢マウスでの記憶保持率(300秒以上の割合)は、L1で78%、L2で67%、L3で62%、L4で53%となり、再生試行の時間経過に依存して低下した。先に報告したように、ステップスルー試験によりC57BL/6Jマウスの記憶保持率は、加齢と共に低下することが確認され、また老齢の記憶消失群と記憶保持群の大脳皮質や海馬粗膜画分での比較では、明らかに両膜標品において違いが認められ、記憶消失群で膜流動性やNMDA受容体数の低下が顕著であった。

IP_3 [3H] assay systemにより、6か月齢マウス大脳皮質膜標品でのPLC活性化を反映する IP_3 産生を定量したところ、非刺激時において300-400 pmol/mg proteinの範囲で高値を示し、また5分間のインキュベーション下で不変であった。これまでPLC活性測定は、 3H inositolを前標識したスライスや 3H inositolを標識した膜標品での解析や、また膜標品と外来性

[³H]phosphoinositide substratesでの解析などが行われてきた。本実験により、大脳皮質膜標品でのIP₃定量が可能であることが確認された。

そこで大脳皮質膜におけるPLC活性化調節のG蛋白質による制御を知る目的で、GTPアナログによるIP₃産生の時間変化を検討した。GTP非水解性アナログとしてのGpp[NH]pの2分間の刺激は、時間経過に伴い高用量(100mM)でIP₃産生を有意に促進させたが、反対に低用量(10nM)でIP₃産生を有意に抑制した。そこでGpp[NH]pの2分間刺激による用量反応性を検討したところ、高用量(100mM)でIP₃産生を促進(52%)させたが、反対に低用量(10nM)でIP₃産生を抑制(25%)した。またGpp[NH]pの高および低用量によるIP₃産生の促進・抑制の両作用は、100mM GDPβSにより阻止された。またGTP非水解性アナログとしてのGTPγSによる2分間の刺激は、同様に高用量(100mM)でIP₃産生を促進(45%)させたが、反対に低用量(10nM)でIP₃産生を抑制(22%)した。マウス大脳皮質膜標品には、G蛋白質のサブユニットおよび分子量152kDaのPLC-β₁と分子量145kDaのPLC-γ₁蛋白質の豊富な発現が検出された。

そこで3種類の抗PLC抗体を膜に処理して、低用量Gpp[NH]pによるIP₃産生の抑制効果について検討した。抗PLC-γ₁や抗PLC-δ₁の処置は、低用量Gpp[NH]pによるIP₃産生抑制に影響を及ぼさなかったが、抗PLC-β₁の処置は有意に抑制効果を阻止した。これらの成績から、成熟(6か月齢)マウス大脳皮質におけるPLC-β₁活性は異なるG蛋白質サブユニットにより二重調節(促進・抑制)されていることが明らかとなった。

そこで老齢学習記憶障害マウス大脳皮質膜

におけるPLC活性化調節のG蛋白質による制御の変異を知る目的で、GTPアナログによるIP₃産生を検討した。GTP非水解性アナログとしてのGpp[NH]pの刺激は、高用量(100mM)でIP₃産生を成熟マウスより有意に促進させたが、反対に低用量(10nM)によるIP₃産生の抑制はほぼ成熟マウスと同程度であった。またGpp[NH]pの高および低用量によるIP₃産生の促進・抑制の両作用は、100mM GDPβSにより阻止された。またGTP非水解性アナログとしてのGTPγSによる刺激でも、同様の老性変化が確認された。老齢学習記憶障害マウス大脳皮質膜標品には、G蛋白質のサブユニットおよび分子量152kDaのPLC-β₁と分子量145kDaのPLC-γ₁蛋白質の豊富な発現が検出されたが、成熟マウスとの間に顕著な発現の相違は認められなかった。抗PLC-γ₁や抗PLC-δ₁の処置は、高用量Gpp[NH]pによるIP₃産生促進に影響を及ぼさなかったが、抗PLC-β₁の処置は老化に伴う有意な促進効果を阻止した。

D. 結語

老齢脳細胞情報伝達系におけるPLCの活性化機構を検討する目的で、マウス大脳皮質膜標品を用いGTP非水解性アナログによるイノシトール三リン酸産生(IP₃)の変化とPLC分子種との関連を検討した。老齢大脳皮質膜標品においてGTP非水解性アナログは高用量(100mM)によりIP₃産生を促進させたが、低用量(10nM)によりIP₃産生を逆に抑制した。以上の知見より、GTP非水解性アナログは用量によりPLC-β₁活性を制御すると考えられ、老齢大脳皮質膜において異なるG蛋白質を介したPLC-β₁活性の二重(促進および抑制)調節機構の破綻が存在している可能性が示唆された。した

がって、老化によるPLC活性化亢進における促進性・抑制性G蛋白質(α および $\beta\gamma$)サブユニットおよびこれらG蛋白質とPLC分子種との破綻した関連機構の解析が今後の課題である。

E. 研究発表

1. 論文発表

- ① 宮本 篤、大鹿英世： C57BL/6J老化モデルマウスの学習・記憶障害に対するニューロステロイドの作用，日薬理誌，108: 139P-142P, 1996
 - ② 宮本 篤、大鹿英世： 老化による学習記憶障害とシグナル伝達異常，神経行動薬理学研究の最前線-抗痴呆薬研究の最近の進歩-，編集：小野寺憲治，Prous Science, 117-123, 1997
 - ③ A. Miyamoto and H. Ohshika: Molecular diversity and double regulatory mechanism of activation of phospholipase C in rat brain. *Life Sci.*, 17/18: 1549-1553, 1998
- ### 2. 学会発表
- ④ A. Miyamoto and H. Ohshika: G protein regulation of phospholipase C activity in rat cerebral cortex. 16th Int. Soc. of Neurochem., 1997, Boston (*J. Neurochem.*, 69, S205, 1997)
 - ⑤ A. Miyamoto and H. Ohshika: Effects of neurosteroids on the impaired memory retention of aged C57BL/6J mice. 16th Congress of the Int. Association of Gerontology, 1997, Adelaide (Abstract p321)
 - ⑥ A. Miyamoto and H. Ohshika: Molecular diversity and double regulatory mechanism

of activation of phospholipase C in rat brain. 2nd Int. Symposium of Membrane Receptor-Signaling System, 1997, Sapporo (Abstract p95)

- ⑦ A. Miyamoto and H. Ohshika: Biochemical and pharmacological studies on brain aging in longevous C57BL/6J mice. 4th Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry, 1998, Seoul (*J. Neurochem.*, 70, S27, 1998)
- ⑧ A. Miyamoto and H. Ohshika: Effects of piracetam on the impaired memory retention of aged C57BL/6J mice. 13th Int. Congress of Pharmacology, 1998, Munchen (Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 358, R52, 1998)
- ⑨ 宮本 篤、小澤寛樹：老化およびアルツハイマー病における情報伝達変異. 第72回日本薬理学会年会シンポジウム”老年薬理学研究の動向と将来への展望”. 1999, 札幌 (*Jpn. J. Pharmacol.*, 79, 11P, 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

老化促進モデルマウス（SAM）の神経化学的、分子生物学的解析に関する研究

研究者 野村 靖幸 北海道大学大学院 薬学研究科 薬理学分野 教授

老化促進モデルマウス（SAM: senescence accelerated mouse）

P 10 系は鬱状態にあり、中脳領域のドパミン受容体や海馬のセロトニン受容体に異常が認められた。また P 10 系はヒト老化皮膚と共通する所見を示した。P 8 系にタマネギ抽出物を 2 ヶ月投与すると、学習記憶障害の改善作用を示した。ディファレンシャルディスプレイ法により P 8 系でグルタミンシンターゼ遺伝子の発現量が上昇していた。

A. 研究目的

老化促進モデルマウス（SAM: senescence accelerated mouse）の P 系は促進老化を示し、活動性の低下、脱毛、寿命短縮などの共通の老化所見を示すことが知られている。SAMP8 は学習記憶障害を示し、痴呆を主とする神経変性疾患の病態モデルとして、また脳の老化機構解析のモデルとして有用である。私たちはこれまでに SAMP8 の脳の神経化学的解析を行い、海馬においてムスカリン性アセチルコリン（mACh）受容体などの受容体数やプロテインキナーゼ C の量などが、対照群である SAMR1 と比較して、変化していることなどを示してきた。さらに、加齢に伴って大脳前頭部の萎縮とともにニューロンの脱落を自然発症する SAMP10 が、学習記憶障害の他に感情／情動障害を示すことを見いだした。また differential display 法を用いて SAMP8 の脳

において変化している遺伝子の単離同定を試みてきた。今回、1) SAMP10 脳でのセロトニン（5HT）やドパミン（D）受容体の変化、2) SAMP8 の空間認知機能障害に及ぼすタマネギ抽出物の影響と SAMP8 の皮膚の加齢変化、3) SAMP8 と R1 間における発現量の異なる遺伝子の単離、などに関する検討を行った。

B. 研究方法

1) 7-9 月齢の雄性 SAMP10 と SAMR1 を使用した。情動機能の測定は強制水泳実験法で行い、浮遊時間を各 1 分ごとに測定し計 8 分間行った。強制水泳実験法は、嫌悪刺激である水に対してマウスが泳いで回避しようとする行動を観察するものである。鬱病症状などの情動障害を有するマウスは回避行動をとらず長時間浮遊している。ドパミン受容体、セロトニン受容体に対する結合実験は、 $[^3\text{H}]$ quinpirol,

[³H]hydroxy DPAT などを用いて常法に従って行った。2) SAMP8 を用いてタマネギ抽出物の投与による空間認知機能に及ぼす影響をモリス水迷路法を用いて検討した。タマネギ抽出物の調製はタマネギを細切し、圧搾して得られた濾液を試料とした。薬物投与は1日1回経口投与にて、タマネギ抽出物(5 ml/kg)は8週間、連続して行った。また、皮膚に老化兆候の認められる SAMP10 について、表皮から皮下組織まで詳細な組織学的解析を行うことより、同マウスのヒト皮膚老化(光老化, 固有の皮膚老化)のモデル動物としての有用性を検討した。3) 6週齢 SAMP8 および R1 において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、その後シーケンシングを行い、同定した。

C. D. 研究結果および考察

1) 対照群である SAMR1 に比較し、SAMP10 では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。両者の間では自発運動量や運動機能に変化が見られないことが既に報告されており、P10 が情動障害(鬱病症状)を有すると考えられる。そこで次に神経化学的解析を行った。P10 脳の中脳領域(視床下部も含む)や大脳皮質では、D2 と D3 受容体に結合する [³H]quinpirol の結合量が有意に増加していた。この増加は最大結合量の増加によるものと考えられた。また線条体、海馬、小脳では P10 と R1 との間で変化が認められなかった。これに対して D1 受容体への [³H]SCH23390 の結合は、

測定した中脳領域、大脳皮質、海馬で P10 と R1 との間に変化はなかった。5HT1A 受容体への [³H]hydroxy DPAT の結合は、P10 の海馬では R1 に比較し有意に増加していた。しかし中脳領域では変化が認められなかった。

強制水泳実験において、アポモルヒネを1回投与したあるいはイミプラミンを3日間投与した ddY マウスでは浮遊時間の有意な短縮が観察された。これらの結果は SAMP10 におけるドパミン受容体やセロトニン受容体の変化が情動障害に関与していることを示唆している。また情動障害モデル動物として SAMP10 が有用である可能性が示された。

2) モリス水迷路学習を用いた空間記憶学習能力の測定実験において、SAMP8 は SAMR1 に比し、プラットホームへの逃避遊泳時間が有意に延長していたことより、学習記憶障害が成立していると考えられる。SAMP8 においてタマネギ投与群のプラットホームへの逃避遊泳時間は、対照の水投与群に比し有意に短縮したことより、タマネギには学習記憶障害への改善作用を有することが示唆された。

一方、SAMP8 において、皮膚に紫外線暴露がないにもかかわらず、加齢と共にヒトの光老化皮膚にみられる日光弾力線維症と類似した組織所見を示すことが報告された。そこで、同マウスのヒト皮膚老化(光老化, 固有の皮膚老化)のモデル動物としての有用性を検討した。SAMP10 とヒト光老化皮膚は、表皮ではメラニン量以外の点ではほぼ同様の組織学的特徴を有していた。また真皮ではヒト光老化皮膚の最大の特徴である日光弾力線維症、

エラスチンの増加が SAMP10 で認められた。さらに炎症性細胞数, グリコサミノグリカン量, 肥満細胞数, 毛細血管拡張および神経数の増加などは, ヒト光老化皮膚に一致する所見であった。また, 毛包数の減少, 脂腺の肥大増生および脂肪組織の萎縮は, 加齢によるヒト老化皮膚と共通する所見であった。したがって, SAMP10 は光老化のモデル動物としての有用性が示唆された。

3) ディファレンシャル・ディスプレイ法によって数種の差のある遺伝子を単離することに成功した。SAMP8 で有意に発現の上昇が認められる遺伝子を解析したところ, 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。現在, その詳細な解析を進めているところである。

E. 結論

SAMP 系のうち, P10 はドパミン・セロトニン神経系の異常を示すこと, P8 は皮膚老化のモデルとして有用であることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① Yasunobu Okuma and Yasuyuki Nomura: Senescence-Accelerated Mouse (SAM) as an Animal Model of Senile Dementia: Pharmacological, Neurochemical and Molecular Biological Approach. Jpn. J. Pharmacol. 78, 399-404, 1998.

2. 学会発表

- ②大熊康修, 村山俊彦, 渡辺律子, 石川晶子, 前川睦子, 野村靖幸: SAMP10

におけるうつ的情動障害と脳プロテインキナーゼCの変化, 第14回SAM研究会発表会, 1998.7 (京都)

③豊田正彦, 諸橋正昭, 上原孝, 大熊康修, 野村靖幸: 皮膚光老化のモデル動物としての senescence-accelerated mouse の有用性の検討 第1報: 定量的組織学的解析, 第20回日本光医学・光生物学会, 1998.7 (熊本)

④大熊康修, 村山俊彦, 渡辺律子, 石川晶子, 前川睦子, 野村靖幸: 老化促進モデルマウス SAMP10 における空間認知/情動障害と神経化学的異常, 第28回日本神経精神薬理学会, 1998.10 (東京)

⑤宮崎浩之, 大熊康修, 野村靖幸: 老化促進モデルマウス SAMP10 の空間認知学習障害および情動障害異常, 第8回神経行動薬理若手研究者の集い, 1999.3 (札幌)

⑥大熊康修, 村山俊彦, 上原孝, 野村靖幸: 抗痴呆薬開発のためのモデル動物としての老化促進モデルマウス (SAM) : その神経化学的特徴と薬物作用, 第72回日本薬理学会年会, 1999.3 (札幌)