

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

目 次

文献No	課題番号			
20000937A	21008	血管壁細胞の抗血栓性機能の制御機構の解明と新規抗血栓薬の開発	加藤 久雄	1
938A	21019	組織内脂肪蓄積の予防及びGLUT4の発現増加を目指したインスリン抵抗性治療法の研究	江崎 治	14
939A	21045	慢性呼吸器疾患の発症機構の解明と医療への応用	斎藤 博久	18
940A	21052	閉経後骨粗鬆症の発症機構の解明とその予防と治療薬に関する研究	宮浦 千里	25
942A	21067	細菌感染に関与する病原遺伝子の発現機構の解明とその制御法の開発	渡辺 治雄	33
943A	21073	脳循環障害による神経細胞死の発症機序の解析と治療法の開発	内村 英幸	38
944A	21079	疾患モデルマウスを用いたβ-ガラクトシドシスの病態解析と治療への応用	松田潤一郎	46
945A	21081	精神疾患の分子メカニズムの解明と新しい診断・治療法の開発への応用	西川 徹	53
946A	21086	新しい生体防御調節物質の機能と作用の解析	鈴木 和男	60
948A	21089	感染症が誘発する自己免疫疾患病態の解明とその医療への応用に関する研究	大川原明子	68
949A	21092	生体膜脂質を介する細胞機能調節機構の解明とその医療への応用	西島 正弘	80
950A	21096	免疫・内分泌系による神経系の障害機構の解明とその制御	田平 武	88
951A	21102	移植免疫寛容とマイクロキメリズムに関する基礎的研究	木村 廣光	92
952A	21104	G蛋白質共役型受容体の個体レベルでのゲノム機能評価	辻本 豪三	98
953A	21107	難治性腎疾患の病態解明と医療への応用に関する研究	藤本純一郎	111
954A	21110	食細胞による感染防御機構の解明と医療への応用	綱脇 祥子	118
955A	21121	抗酸化機能調節に及ぼす運動と栄養の影響に関する研究	樋口 満	126
956A	21130	神経変性疾患における神経細胞死の分子機構の解析	桃井 隆	134
957A	21142	C型肝炎ウイルスに対するインターフェロン(IFN)の治療効果を増強する新薬の開発研究	小長谷昌功	144
958A	21150	グリア細胞の機能調節による神経疾患治療法の開発	高坂 新一	149
959A	21166	新規破骨細胞形成抑制因子(OCIF)とそのリガンドである破骨細胞分化因子(ODF)の生理的役割の解明と医療への応用	高橋 直之	160
960A	21177	コレステロール代謝・動脈硬化関連遺伝子の発現調節因子の検索	松本 明世	167
961A	21179	血圧調節物質・動脈硬化起因物質などに関する分子生物学的、生化学的研究	南野 直人	178
964A	21215	アトピー性皮膚炎自然発症(NC)マウスを用いた皮膚掻痒症の発症機序の解明と新規治療薬の創製	廣田 直美	183
965A	21224	ヒト血液細胞情報伝達の解明とオリゴヌクレオチドを用いた治療法の開発	湯尾 明	193
966A	21225	癌化とウイルス感染を制御する細胞内情報伝達分子を標的とする薬剤の探索	松田 道行	200

20000969A	21228	細胞内シグナル伝達の解明による創薬シーズの探索	上原 至雅	……	204
968A	21234	スフィンゴ脂質の情報伝達の研究と抗血栓症薬開発	望月 直樹	……	208
969A	21279	中枢神経系におけるATP受容体の機能の解析と医療への応用	井上 和秀	……	213
941A	22055	宿主の防御機能動態と感染機構の解明と医療への応用	高津 聖志	……	221
949A	22088	ビタミンE欠乏性脊髄小脳失調症の病態解明と治療法の確立に関する研究	水澤 英洋	……	228
962A	22183	炎症・アレルギー性疾患の発症機構の解明と医療への応用	清水 孝雄	……	233
963A	22194	コレステロール代謝を標的とした抗動脈硬化薬開発のための基盤研究	新井 洋由	……	237

神経変性疾患における神経細胞死の分子機構の解析

所 属 国立精神神経センター 神経研究所疾病研究第5部
研究者 桃井 隆

研究組織

分担研究者

- (1) 東京大学総合文化研究所 石浦章一
- (2) 秋田大学医学部解剖学教室 妹尾春樹
- (3) 共立薬科大学学生化学教室 笠原 忠
- (4) 自治医科大学小児科 桃井真里子
- (5) 旭ガラス中央研究所 磯合 敦
- (6) 雪印乳業生物学研究所 八木勇三

要旨

本研究では、細胞死に直接関与するカスパーゼ3、8、9の活性化を特異的に認識する抗体 anti-m3D175, anti-m8D378, anti-m9D353, anti-m9D368 を作成し、生体内における細胞死に伴ってカスパーゼ3、8、9の活性化を検出することに成功し、ハンチントン舞踏病などCAGトリプレットリピート病におけるポリグルタミン蓄積を原因とする神経細胞死に活性化カスパーゼ8の凝集が関与していることを明らかにした。アルツハイマー、パーキンソンなどの神経変性疾患の神経細胞死、あるいは神経毒による神経細胞死におけるカスパーゼファミリーの関与を明らかにすることが可能となるものと思われる。また、レチノイン酸によるP19 embryonal carcinoma(EC)細胞の神経分化の過程で、カスパーゼ3の活性化にともない、多くの細胞がDNA断片化をともなうアポトーシスに細胞死をひき起こす。昨年までの研究成果で、この活性化にはカスパーゼ3の上流であるカスパーゼ9の活性化が関与していること、またカスパーゼ9の活性化はBMP-4ファミリーにより活性化され、bFGFによりPI3K-Aktシグナルを介して特異的に抑制されることを明らかにした。本年度は1)カスパーゼ3、9の活性化をもたらす因子としてカスパーゼ8の発現がレチノイン酸により増大し、BMP-4シグナルにより活性化されることが明らかとなった。また2)免疫抑制剤であるFTY720がPI3Kを抑制し、カスパーゼ6を活性化すること、3)ミトコンドリア脳筋症のミトコンドリアはストレスに対して高い感受性をしめし、正常筋細胞より細胞死しやすいことが活性型カスパーゼの抗体を用いて明らかとなった。

1. 研究目的

神経細胞死には1) 発生過程での増殖能をもつ時期でのプログラムされた細胞死と、2) 最終分化し、増殖能をもたない成熟した神経細胞が疾患や虚血、ストレスなど外部要因により引き起こされる細胞死とがある。カスパーゼファミリーが、細胞死の実行過程を担うプロテアーゼカスケードを形成しており、その最後に位置するカスパーゼ3は、様々なアポトーシスの過程で活性化され、アポトーシスの実行過程に関与していることが強く示唆されている。また、このカスパーゼファミリーの活性化を制御する機構として種々の生存因子によるPI3K、AktによるBcl-2ファミリーのリン酸化の重要性示唆されている。一方、アルツハイマー病、トリプレットリピート病などの脳神経細胞変性疾患は、 β APやポリグルタミンの蓄積により引き起こされるが、その機構は依然不明である。神経変性疾患における細胞死の分子機構の解明を目的とし、昨年度は活性化カスパーゼ3とカスパーゼ3の上位に位置するカスパーゼ9の活性化とその制御機構に注目し、活性化カスパーゼ9に特異的に認識する抗体を作製し、プログラム細胞死におけるカスパーゼ9の活性化とその制御機構を明らかにした。本年度はカスパーゼ8の活性化型に対する特異抗体を作製し、これら抗体を用いて、神経変性疾患にみられる神経細胞死、プログラム細胞死、BMP-4、酸化ストレス、免疫抑制剤 (FTY720)、コルヒチンストレスによる細胞死、各種神経筋変性疾患における細胞死でのカスパーゼ活性化の分子機構の解析をおこなった。

2. 研究方法

1)カスパーゼ3、8、9の切断点を認識する抗体の作成

カスパーゼ3、9、8の活性化型に特異的な抗体は、切断部位に対してN末端に担体に結合させるためのシステイン(C)を付加した計6ペプチドを合成し、ペプチドをKLH(Keyhole limpet hemocyanin;シグマ)に結合させたものをウサギに免疫して作成し、アフィニティクロマトグラフィーにより精製した。

2)抗体の特異性の検討法

pFlag-CMV-2(コダック)を用いて、N端にFlagタグを付加したラットカスパーゼ2D394、マウスカスパーゼ6D162、マウスカスパーゼ8D387(DED領域欠損型)、マウスカスパーゼ9全長、D353およびD368はEcoRI断片を、Flag発現ベクターのEcoRIサイトにサブクローニングした。DNA配列はシークエンスにより確認した。

pEGFP(enhanced green fluorescent protein)-C1 vector(クローンテック)を用いて、N端にEGFPタグを付加したカスパーゼの発現系を作製した。マウスカスパーゼ-8全長、D387の断片は、pEGFP-C1のEcoRIサイトにサブクローニングした。培養細胞への遺伝子導入(トランスフェクション)はリン酸カルシウム法により行った。リン酸カルシウム法を用い、活性化型のカスパーゼを認識する抗体の特異性をイムノプロットおよびEGFP融合タンパク質と蛍光標識抗体を用いた二重染色で検討した。

2) DNA断片化の検出

DNA断片化の検出はPrigent *et al.*, (1993)の方法に従っておこなった。1.8% Nusieve agarose gel

に泳動し、DNA 断片化を検出した。

3)免疫染色

発達過程におけるマウス胎児を PBS を含む 4%パラホルムアルデヒドで一昼夜 4℃で固定した後、OTC コンパウンドを用いて包埋し、クリオスタットで 10 μ m の厚さに切り、組織切片を作製した。1 次抗体に浸し、3 日間 4℃に放置した。ベクタステイン ABC-PO (ウサギ IgG キット) peroxidase-conjugated avidin-biotin kit(ベクター製)を用いて染色した。

4) Apoptag による DNA 断片化の検出法

Apoptag, an in situ apoptosis detection kit (オンコジーン製)を用いて、DNA 断片化を検出した。発色として PBS に 3,3'-diaminobenzidine(DAB)を溶解しろ過した基質溶液 400 ml に対して過酸化水素水 26.8 μ l を加え反応させ、染色した後、蒸留水で洗浄し解析を行った。

5) 酵母を用いてのリコンビナントカスパーゼ 3 の作成

カスパーゼ 3 は、酵母 *Pichia* に相同組換えで導入し、AOX1 プロモーター下で大量発現を実現させた。この方法では自己活性化が認められ、Ac-Asp-Glu-Val-Asp-methylcoumarinamide (Ac-DEVD-MCA)の分解が認められた。カンプトテシンによる U937 細胞のアポトーシス誘導は、既報の通りに行った。

3. 研究成果

1) 活性型カスパーゼ 8 に対する抗体(anti-m 8 D 3 8 7)の作製と特異性

マウスカスパーゼ 8 の切断部位の N 末端側のアミノ酸配列のペプチドを合成し、ウサギに免疫し、精製し、ペプチド抗体 anti-m8D387 とした。FLAG 抗体と異なり、作製したカスパーゼ 8 の切断点に対する抗体(anti-m8D387)は、活性型の FLAG-カスパーゼ 8D387 と反応するものの、カスパーゼ 8 の全長には反応しなかった。カスパーゼ 8 のオートプロセッシングによる切断部位を anti-m8D387 を用いて調べた。COS 細胞にマウスプロカスパーゼ 8 をトランスフェクションすると、ヒトプロカスパーゼ 8 同様、12 時間後からオートプロセッシングによる切断が見られた。EGFP 標識したカスパーゼ 8 を COS 細胞に発現させ、抗体との反応性を調べたところ、その発現の初期には抗体に反応しない細胞が観察されたが、発現が進行するにつれ、ほとんどの細胞がそれぞれの抗体に陽性となった。以上の結果より、anti-m8D387 はオートプロセッシングによるマウスカスパーゼ 8 の断片を特異的に認識することが明らかとなった。この抗体は活性化されたマウスカスパーゼ 8 を免疫染色法により検出するのに有効であった。この抗体を用いた免疫染色で、CAGトリプレットリピート病の原因と考えられるポリグルタミン凝集による細胞死を調べたところ、核内で活性型カスパーゼ 8 がポリグルタミン凝集と共凝集して存在していることが明らかとなった。すなわち、ポリグルタミンの核内凝集過程で、カスパーゼ 8 が活性化し、共凝集したことが明らかとなった(桃井)。

2) 昨年までの研究で、P19EC 細胞は非凝集状態で RA (1 μ M) と BMP-4 を添加することにより、著明なカスパーゼ 3 の活性化およびカスパーゼ 9 のプロセッシングが促進した。しかし、BMP-4 単独ではカスパーゼ 3 の活性化およびカスパーゼ 9 のプロセッシングはおこらないこと

から、両者が相乗的に働いて、カスパーゼ3、9の活性化をもたらしていることが明らかとなった。本年度さらに研究をすすめた結果、RA (1 μ M) と培養するとカスパーゼ8の発現量が増大し、BMP-4によりカスパーゼ8が活性化することが、Bidの切断を引き起こし、下流のカスパーゼ9、3の活性化を誘導することが明らかとなった (磯合)。

3) カスパーゼ3の活性化と情報伝達系への影響

昨年来、我々はカスパーゼ3を大量発現させることに成功している。まず、酵母 *Pichia* ゲノムに相同組換えによってカスパーゼ3遺伝子を導入し、アルコールオキシダーゼ1のプロモーター下でメタノール添加によってカスパーゼを大量発現させた。カスパーゼ3は自己活性化し、活性型に変換した。抗ガン剤カンプトテシンを白血病細胞 U937 に添加すると、カスパーゼ3による細胞情報伝達分子の分解が見られた。特に、Cキナーゼのデルタとイプシロンが限定分解し、情報がここで途絶えることが判明した。カスパーゼ3の特異的阻害剤である Ac-DEVD-CHO によってCキナーゼの分解が抑制された (石浦)。

5) 免疫抑制剤 FTY720によるグリオーマ細胞死の分子機構

また、FAKの抗アポトーシス作用の解析をめざして、FAKがほとんど発現していないHL-60細胞株にFAKを過剰発現させた株を樹立し解析した。その結果、FAK過剰発現細胞株は酸化ストレスならびにエトポシド誘導アポトーシスに耐性を示した。また、PI3-キナーゼの活性化とAktのリン酸化、NF- κ Bの恒常的な活性化とInhibitor-of-Apoptosis (IAP) 遺伝子(cIAP-1, 2, XIAP)の発現が認められた。NF- κ Bに対する特異的阻害剤PDTCを用いた実験で、NF- κ Bの活性化を阻害すると生存率の低下が見られることから、NF- κ Bの恒常的な活性化がFAK過剰発現細胞株での抗アポトーシス作用に重要であると思われた。一方、397YをFに変異させたFAK(397FAK)過剰発現株はアポトーシスに耐性を示さず、むしろアポトーシスを促進した。397FAKおよび免疫抑制剤FTY720はヒトグリオーマ細胞にアポトーシスを誘導した。アポトーシス実行分子はカスパーゼ6であることを証明した。397FAKおよびFTY720はFAK-PI3-kinase-Aktのサバイバル経路を不活性化することにより、その下流にある抗アポトーシス分子NF κ BおよびXIAPの発現を抑制すると考えられた (笠原)。

6) Colchicineによる神経細胞死誘導の分子機構

コルヒチンおよび内在性のコルヒチン様物質として機能している可能性が示唆されている2-メトキシエストラジオールで誘発される神経細胞死がアポトーシスであることをヒト分化ニューロプラストーマSH-SY5Y細胞を用いた培養細胞モデル系で明らかにしている (Nakagawa-Yagi, Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 199, 807-817, 1994; Nakagawa-Yagi, Y. et al., *Life Sci.*, 58, 1461-1467, 1996)。本研究はこれらの知見を踏まえて、培養神経細胞および海馬組織レベルで認められる神経細胞死をシグナル伝達の面から解析した。

微小管を形成するチューブリンに結合性があるコルヒチンを細胞刺激するとPyk2 (402位 tyrosine 残基)のリン酸化の増大を示し、チューブリンに結合性がなく、また神経細胞死を誘発しない β -ルミコルヒチンはPyk2の tyrosine リン酸化に影響を与えないことをすでに前回報告している。さらに、コルヒチンがFak (397位 tyrosine 残基)のリン酸化に対して無影響であ

ることから、コルヒチンによる Pyk 2 リン酸化効果に選択性が存在することも報告している。今回の実験結果は、コルヒチンが Pyk 2 のプロテインレベルに影響がなく、Pyk 2 の tyrosine リン酸化レベルを特異的に増大させていることを明らかにした（八木）。

7) ミトコンドリア脳筋症における細胞死の分子機構

Apoptosis の進行性疾患への関与が明らかになり、ミトコンドリアが apoptosis の中心的役割を担うことが示されている。しかし、ミトコンドリア異常症における apoptosis の検討は少なく、その関与は明らかでない。各クローンを通常培地で 24 時間培養後、グルコース欠乏培地とグルコース含有培地に変更した。グルコース含有培地では全クローンで細胞死は誘導されなかった。グルコース欠乏培地では変異 mtDNA 含有率 0~70% のクローンではグルコース含有培地と同様に細胞死は誘導されず、生存率に差はなかった。変異 mtDNA 含有率 80% のクローンでは培地変更後、生存率は 12 時間後に 38%、24 時間後に 11.8% と低下しており、細胞死が誘導された。1.5 時間、3 時間、4.5 時間、6 時間と経時的に各抗体による蛍光抗体染色を行った。抗 cytochrome c 抗体は正常の細胞では細胞質に点状の染色性を示し、ミトコンドリアに一致した染色性と考えられたが、変異 mtDNA 含有率 80% のクローンにおいて培地変更後 1.5 時間で細胞質に瀰漫性に染色される細胞が確認された。抗活性型 caspase 抗体は培地変更後 3 時間で抗活性型 caspase-9 抗体が変異 mtDNA 含有率 80% のクローンにおいて細胞質が瀰漫性に染色される細胞が確認され、4.5 時間で抗活性型 caspase-3 抗体がやや核に強い染色性を示す細胞が確認された。細胞死の誘導されない変異 mtDNA 含有率 0% のクローン、グルコース含有培地での変異 mtDNA 含有率 80% のクローンでは陽性細胞は確認されなかった。一方、抗活性型 caspase-8,-12 抗体ではすべての条件で陽性細胞は確認されなかった（桃井（真））。

4. 考察

1) カスパーゼ 8 の活性化に必須なプロセッシング部位の特異抗体を作成し、カスパーゼ 8 の活性型を特異的に認識することに成功した。この活性型カスパーゼ 8 に対する抗体を用いて、C A G トリプレットリピート病の原因であるポリグルタミンの凝集が活性型カスパーゼ 8 の活性化をもたらすことを明らかにできた。このことにより、ポリグルタミン凝集によるカスパーゼ 8 の活性化がポリグルタミンによる神経細胞死の原因と考えられ、今後、他の変性蛋白蓄積を原因とする神経細胞死にこうしたカスパーゼの活性化が関与しているか否かの検討が重要と思われる。

2) また、BMP-4 は発生過程の菱脳、前脳、指間、歯芽の細胞死に関与することが知られており、いわゆる上皮のプログラム細胞死のシグナルの一つとして関与している。昨年度、BMP-4 は RA と協調して P19EC 細胞のカスパーゼ 9、3 の活性化を促進することを明らかにした。本年度は、レチノイン酸受容体が転写因子である点に着目し、R A が発現誘導する細胞死関連遺伝子を検索したところ、カスパーゼ 8 の発現が特異的に増大することが明らかとなった。さらに興味深いことに、BMP-4 の添加によりカスパーゼ 8 が活性化することが明らかとなった。カスパーゼ 8 の基質である Bid が切断されることから、切断された Bid がチトクローム c の流出を促し、カスパーゼ 9 を活性化し、その下流のカスパーゼ 3 が活性化される経路が明らかとなった。

3) ヒトグリオーマ細胞は抗癌剤に対し耐性を示すことが知られていたが、今回の実験で抗癌剤によって FAK-PI3-kinase-Akt のサバイバル経路の活性化がおきているのが、その一因と考えられた。このサバイバル経路の最初の分子 FAK の活性化制御は非常に重要である。今回使用した 397FAK および FTY720 によりこのサバイバル経路を遮断できることがわかった。

4) コルヒチンが Pyk 2 のプロテインレベルに影響がなく、Pyk 2 の tyrosine リン酸化レベルを特異的に増大させていることを明らかにした。近年、デキサメサゾン誘発ミエローマ細胞死が Pyk 2 リン酸化に依存し、FAK リン酸化に依存しないこと (Chauhan, D. et al., *Oncogene*, 18, 6733-6740, 1999) や Pyk 2 の過剰発現が細胞死を引き起こすこと (Xiong, W.C. et al., *J. Cell. Biol.*, 138, 529-539, 1997) が報告されている。今回の我々が得た実験結果は、コルヒチンによる神経細胞死のメカニズムに Pyk 2 の tyrosine リン酸化シグナル異常亢進が重要な役割を果たしている可能性を示唆しており、一般性のある現象かもしれない。今後、この点について詳細な検討をすることにより、神経細胞死の分子メカニズムの一端がさらに明らかとなるであろう。

5) 今回の検討では筋細胞をグルコース欠乏条件にすることで電子伝達系依存性の細胞死を誘導した。グルコースの欠乏により解糖系からの ATP、中間産物が得られず、エネルギーは電子伝達系の残存機能に依存する。筋細胞におけるこの条件での細胞死は変異ミトコンドリア DNA 含有率 80% で誘導されることが確認された。この結果は生体での筋細胞の閾値効果と矛盾しないものであった。さらに、免疫組織学的検討により、この細胞死には TUNEL 陽性で、cytochrome c の放出とそれに続く caspase-9,-3 の活性化を介した apoptosis の経路が作動していることが確認された。この apoptosis はミトコンドリアからの cytochrome c の放出、Apaf-1、caspase-9,-3 の活性化というミトコンドリアを介した apoptosis であった。apoptosis の過程には death receptor を介し、caspase-8 の活性化を伴う経路、ER stress による caspase-12 の活性化を伴う経路などいくつか存在している。今回の細胞死にはこれらの系は作動せず、ミトコンドリアを介した経路のみが作動していた。このことによりミトコンドリア機能の低下した細胞でもミトコンドリアを介した apoptosis は作動していることが証明された。

5. まとめ

1) カスパーゼ 8 の活性型のみを認識する抗体を作成し、CAG トリプレットリピート病におけるポリグルタミン凝集がカスパーゼ 8 の活性化とその凝集をもたらすことが明らかとなった。

2) レチノイン酸と BMP-4 による P19EC 細胞のカスパーゼ 3、9 の活性化と細胞死を誘導する機構として、レチノイン酸によりカスパーゼ 8 の発現が増大すること、また BMP-4 シグナルによりカスパーゼ 8 が活性化することが明らかとなった。

3) 神経細胞死に関わるカスパーゼ 3 の基質として、脳に発現する Cキナーゼイプシロンが同定された。また、Cキナーゼデルタもカスパーゼ 3 によって分解されることが明らかになった。

4) ヒトグリオーマ細胞は抗癌剤に対し耐性を示すことが知られていたが、今回の実験で抗癌剤によって FAK-PI3-kinase-Akt のサバイバル経路の活性化がおきているのが、その一因と考えられた。このサバイバル経路の最初の分子 FAK の活性化制御は非常に重要である。397FAK お

よび FTY720 は FAK-PI3-kinase-Akt のサバイバル経路を不活性化することにより、その下流にある抗アポトーシス分子 NFkB および XIAP の発現を抑制すると考えられた。また、アポトーシス実行分子はカスパーゼ 6 であることを証明した。

5) MELAS 培養筋細胞におけるグルコース欠乏条件という電子伝達系機能に依存した細胞死は変異ミトコンドリア DNA の割合が約 80% で誘導された。誘導された細胞死は cytochrome c の放出とそれに続く、caspase-9,-3 の活性化を伴う TUNEL 陽性の apoptosis の経路が作動していることが確認された。DCA は apoptosis には直接関与しないが、残存電子伝達系機能の賦活によりその細胞死を抑制したと考えられた。このクローン化筋細胞を用いた実験系は均一な条件の細胞で様々な外的条件の検討が可能であり、疾患モデルの実験系として有用と思われた。

6. 研究発表

1. Ozaki, H., Watanabe, Y., Takahashi, K., Kitamura, K., Tanaka, A., Urase, K., Momoi, T., Sudo, K., Sakagami, J., Asano, M., Iwakura, Y., Kawakami, K. Six 4, a putative myogenin gene regulator, is not essential for mouse embryonal development. *Mol. Cell. Biol.* (In press).
2. Fujita, E., Egashira, J., Urase, K., Kuida, K., and Momoi, T. Caspase-9 processing via feedback amplification loop in vivo. *Cell Death and Differentiation* (In press).
3. Takahashi, K., Kamiya, K., Urase, K., Fujita, E., Suga, M., Mori, H., Yoshikawa, Y., Ichimura, K., Kuida, K., and Momoi, T. Requirement of caspase-3 in the adult auditory system. *Brain Res* 894, 359-367 (2001)
4. Hisahara, S., Yuan, J., Momoi, T., Okano, H., Miura, M. Caspase-11 mediates oligodendrocyte cell death and pathogenesis of autoimmune-mediated demyelination. *J. Exp. Med.* 193, 111-122 (2001)
5. Kouroku, Y., Fujita, E., Urase, K., Tsuru, T., Setsuie, R., Kikuchi, T., Yagi, N.-Y., Miyata, N., Momoi, Y.M., and Momoi, T. Caspases, which are activated during generation of nuclear polyglutamine aggregates, are necessary for DNA fragmentation, but not sufficient for cell death. *J. Neurosci. Res.* 62, 547-556 (2000)
6. Zheng, Kuida, K., Momoi, T., Nicholson, Y., Lezbeq, Fravell, Deficiency of caspase-9 or caspase-3 induces the compensation of caspase. *Nature Medicine* 6, 1241-1247 (2000)
7. Ijiri, R., Tanaka, Y., Kato, K., Misugi, K., Nishihira, H., Toyoda, Y., Kitagawa, H., Nishi, T., Takeuchi, M., Aida, N., Momoi, T. Clinicopathologic study of mass-screened neuroblastoma with special emphasis on untreated observed cases. *Am. J. Surgical Pathology.* 24, 807-815 (2000)
8. Fujita, E., Urase, K., Egashira, J., Isahara, K., Uchiyama, Y., Motoyama, N., Kuida, K., and Momoi, T. Activation of caspase-9 in the nervous system of Bcl-xL deficient mice embryos. *Dev. Brain Res.* 122, 135-147 (2000)
9. Tanaka, M., Momoi, T., Marunouchi, T. In situ detection of activated caspase-3 apoptotic granule neurons in the developing cerebellum in slice culture and in vivo. *Dev. Brain Res.* 121, 223-228 (2000)
10. Kouroku, Y., Fujita, E., Mukasa, T. Momoi, M.Y., and Momoi, T.

Localization of active form of caspase-8 in mouse L929 cells induced by TNF and polyglutamin. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 270, 972-977 (2000)

11. Ikezoe, K., Yan, C., Momoi, T., Imoto, C., Minami, M., Ariga, M., Nihei, K., and Nonaka, I. A novel congenital myopathy with apoptotic changes. *Acta Neurology* 47, 531-536 (2000)

12. Hisahara S, Araki T, Sugiyama F, Yagami Ki, Suzuki M, Abe K, Yamamura Ki, Miyazaki Ji, Momoi T, Saruta T, Bernard CC, Okano H, and Miura M. Targeted expression of baculovirus p35 caspase inhibitor in oligodendrocytes protects mice against autoimmune-mediated demyelination. *EMBO J* 19, 341-348 (2000)

13. Sakaki, M., Takahashi, N., Sasagawa, N., Arahata, K. & Ishiura, S. Interaction between emerin and nuclear lamins. *J. Biochem.* 129, 321-327 (2001).

14. Usuki, F., Takahashi, N., Sasagawa, N. & Ishiura, S. Differential signaling pathways following oxidative stress in mutant myotonin protein kinase cDNA transfected C2C12 cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267,739-743 (2000).

15. Hata, S., Sato, T., Sorimachi, H., Ishiura, S. & Suzuki, K. A simple purification and fluorescent assay method of the poliovirus 3C protease searching for specific inhibitors. *J. Virol. Method* 84, 117-126 (2000).

16. Takahashi, N., Sasagawa, N., Suzuki, K. & Ishiura, S. The CUG-binding protein (CUG-BP) binds specifically to UG dinucleotide repeats in a yeast three-hybrid system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 277, 518-523 (2000).

17. Maruyama, K., Usami, M., Kametani, F., Tomita, T., Iwatsubo, T., Saido, T.C., Mori, H. & Ishiura, S. Molecular interactions between presenilin and calpain: inhibition of m-calpain protease activity by presenilin-1, 2 and cleavage of presenilin-1 by m-, μ -calpain. *Int.J.Mol.Med.* 5, 269-273 (2000).

18. Koike, H., Kouchi, Z., Kinouchi, T., Maeda, T., Sorimachi, H., Saido, T.C., Maruyama, K., Okuyama, A., Suzuki, K. & Ishiura, S. Metabolism of amyloid precursor protein in COS cells transfected with a β -secretase candidate. *Cytotechnology* 33, 213-219 (2000).

19. Kitagaki, H., Tomioka, S., Yoshizawa, T., Sorimachi, H., Saido, T.C., Ishiura, S. & Suzuki, K. Autolysis of calpain large subunit inducing irreversible dissociation of stoichiometric heterodimer of calpain. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 64, 689-695 (2000).

20. Tagawa, K., Taya, C., Hayashi, Y., Nakagawa, M., Ono, Y., Fukuda, R., Karasuyama, H., Toyama-Sorimachi, N., Katsui, Y., Hata, S., Ishiura, S., Nonaka, I., Seyama, Y., Arahata, K., Yonekawa, H., Sorimachi, H. & Suzuki, K. Myopathy phenotype of transgenic mice expressing active site-mutated inactive p94 skeletal muscle-specific calpain, the gene product responsible for limb girdle muscular dystrophy type 2A. *Human Mol.Genet.* 9, 1393-1402 (2000).

21. Ueno M., Sonoda Y., Funakoshi M., Mukaida N., Nose K., Kasahara T. Differential induction of JE/MCP-1 in subclones from a murine macrophage cell line, RAW264.7: Role of kB-3 binding protein.

Cytokine 12: 207-19, 2000

22. Sonoda Y, Matumoto Y, Watanabe S, Yokota E-A, Hanks S K, Kasahara T: Suppression of apoptosis by the overexpression of focal adhesion kinases in a human leukemic cell line, HL-60. *J Biol Chem* 275: 16309-16315, 2000
23. Adashi R, Matsui S, Kinoshita M, Nagaiishi K, Sasaki H, Kasahara T, Suzuki K: Nitric oxide induces chemotaxis of neutrophil-like HL-60 cells and traslocation of cofilin to plasma membranes. *Int J Immunopharmacol.* 22:855-864, 2000
24. Matsui S, Adashi R, Kusui K, Yamaguchi T, Kasahara T, Hayakawa T, and Suzuki K: U73122 inhibits the dephosphorylation and traslocation of cofilin in activated macrophage-like U937 cells. *Cell Signalling. Int. J. Immunopharmacol.* 22:855-864, 2000
25. Funakoshi M, Sonoda Y, Tago K, Tominaga S-I, and Kasahara T: Differential involvement of p38 mitogen-activated protein kinase and phosphatidyl inositol 3-kinase in the IL-1-mediated NF-kB and AP-1 activation. *Int J Immunopharmacol.* 2001 in press.
26. Sonoda Y, Yamamoto D, Sakurai S, Hasegawa M, Yokota E-A, Momoi T and Kasahara T: FTY720, a novel immunosuppressive agent, induces apoptosis in human glioma cells. *BBRC.* 281: 282-288, 2001

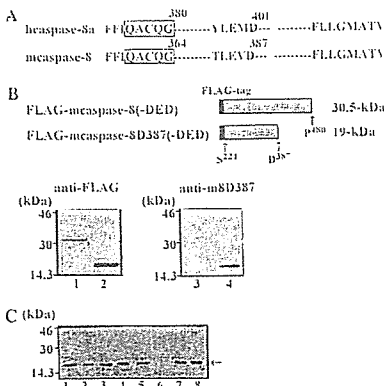


図 1 Preparation of antiserum against a cleavage site of mecaspase-S. (A) Amino acid sequences of the cleavage sites of hecaspase-8 and mecaspase-S. mecaspase-S has TLEVD³⁸⁷ similar to YLEMD⁴⁰¹, which is the cleavage site of hecaspase-Sa (18, 19). Open boxes indicate the consensus motif of caspase-S. (B) Immunoblot analysis of the autoprocessing fragment of FLAG-mecaspase-8 over-expressed in COS cells. FLAG-mecaspase-S (-DED) (lanes 1 and 3) and FLAG-mecaspase-8D387 (-DED) (lanes 2 and 4) were transfected into COS cells and their expression was examined by immunoblot analysis using anti-FLAG (lanes 1 and 2) and anti-m8D387 (lanes 3 and 4) 24 h after transfection. (C) Specificity of anti-m8D387 toward the peptide of the cleavage sites of other caspases. The anti-m8D387 reactivity against mecaspase-8D387 was examined by immunoblot analysis before preabsorption (lane 1) and after preabsorption with peptide of cleavage site of mecaspase-3 (GIETD, lane 2), hecaspase-4, -5 (LVVVD, lane 3), mecaspase-6 (LDMVD, lane 4), mecaspase-7 (GIQAD, lane 5), mecaspase-8 (TLETD, lane 6), mecaspase-9 (LDQLD, lane 7) or hecaspase-10 (SIEAD, lane 8). An arrow indicates the position of FLAG-mecaspase-8D387 (-DED).

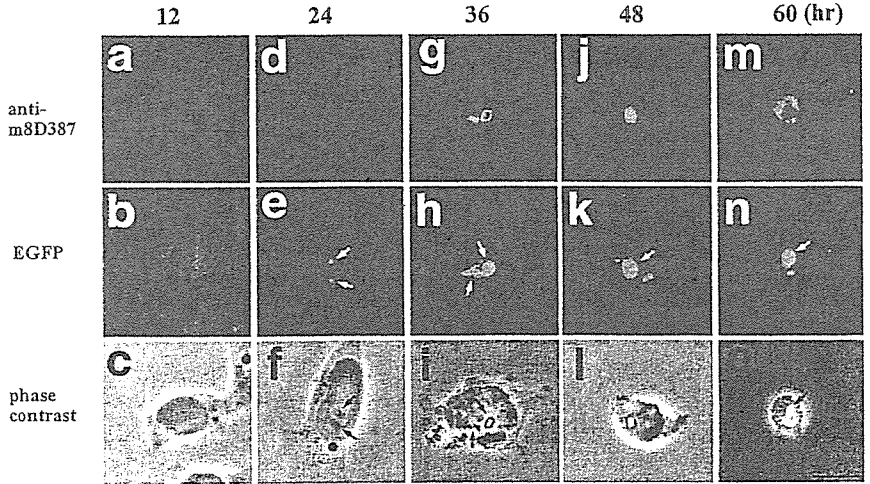


図 2 Detection of anti-m8D387 reactivity during appearance of Q72/NA. pEGFP-72CAG was transfected into P19 EC cells and expression of Q72 was examined at indicated times. a, d, g, j, m: Expression of Q72 (green). b, e, h, k, n: Expression of Q72 (green). c, f, i, l, o: Cells in phase contrast image. At 12 hr, Q72 was expressed homogeneously in cells (a-c). Cells expressing anti-m8D387-negative small Q72/NA appeared at 24 hr (d-f). Cells expressing anti-m8D387-positive large Q72/NA appeared and detached from dishes and showed round cell shape at 36 hr (g-i). Many cells expressing anti-m8D387-positive large Q72/NA showed morphologically apoptotic features with cell shrinkage at 48-60 hr (j-l, m-o). Anti-m8D387 reactivity was restricted to Q72/NA at 36-48 hr (g, j) but not restricted to Q72/NA and diffused into intracellular space at 60 hr (m). Arrows indicate the Q72 aggregates. Scale bar = 25 μ m.

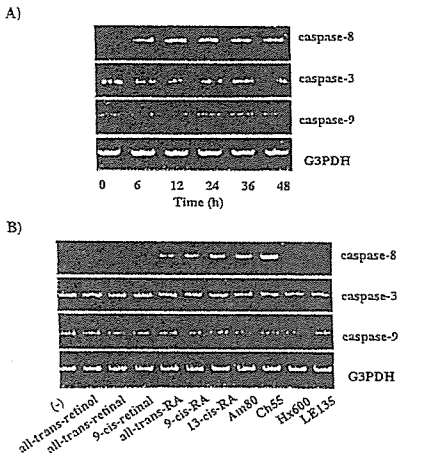


図 3 オールトランスレチノイン酸によるカスパーゼ 3, 8, 9 の発現の変動
 A) は、レチノイン酸添加後の時間経過によるカスパーゼ 3, 8, 9 の変化を示す。B) は各種天然レチノイドおよび合成レチノイド化合物におけるカスパーゼ 3, 8, 9 の発現を示す。

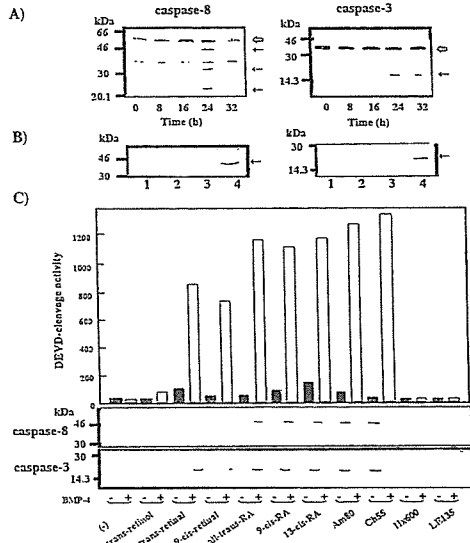


図 4 オールトランスレチノイン酸および BMP-4 によるカスパーゼ 8 の活性化
 A) 時間経過によるカスパーゼ 3, 8 の活性化。B) オールトランスレチノイン酸、BMP-4 によるカスパーゼ 3, 8 の活性化。レーン 1: 試薬無添加、レーン 2: オールトランスレチノイン酸添加、レーン 3: BMP-4 添加、レーン 3: オールトランスレチノイン酸および BMP-4 添加。C) 各種天然レチノイドおよび合成レチノイド化合物におけるカスパーゼ 3, 8 の活性化を示す。

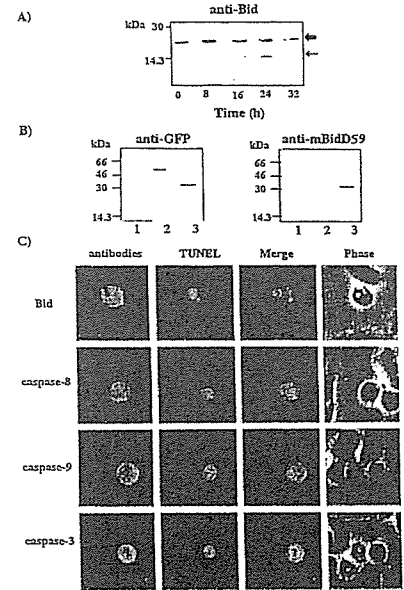


図 5 Bid の切断および Bid 抗体の作製
 A) 時間経過による Bid の切断。B) 作成した Bid 抗体の特異性を示す。C) オールトランスレチノイン酸および BMP-4 による Bid の切断、カスパーゼ 3, 8, 9 の活性化を蛍光免疫染色で検出した。

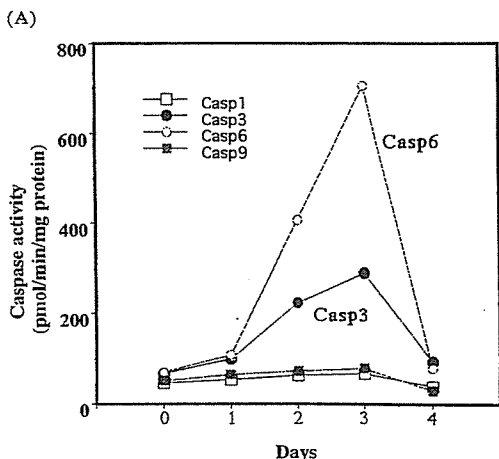


図 6 (A) Activation of caspase 3 and 6 after infection with Ade-397FAK (B) Detection of cleaved caspase 6 after infection with Ade-397FAK

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社