

- Sugioka, R., Tsujimoto, Y., and Matsuda, H. BH4 peptide derivative from Bcl-xL attenuates ischemia/reperfusion injury thorough anti-apoptotic mechanism in rat hearts. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 27:117-121, 2005
11. Zhang, L., Shimizu, S., and Tsujimoto, Y. Two distinct Fas-activated signaling pathways revealed by an anti-tumor drug D609. *Oncogene*, in press.
12. Nakagawa, T., Shimizu, S., Watanabe, T., Yamaguchi, O., Otsu, K., Yamagata, H., Inohara, H., Kubo, T., and Tsujimoto, Y. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic death. *Nature*, in press
- cell death induced by DNA damages  
International Symposium on "Recent Advances in Apoptotic Research"  
5/5~5/8, 2004  
Seoul, Korea
- Tsujimoto, Y.  
Regulation of non-apoptotic programmed cell death by the Bcl-2 family members  
12<sup>th</sup> Euroconference on Apoptosis  
9/17~9/20, 2004  
Crete, Greece
- Tsujimoto, Y.  
Regulation of apoptotic and non-apoptotic programmed cell death by Bcl-2 family.  
AACR Special Conference ""  
1/26~1/30, 2005  
Hawaii, USA
- (国内学会)  
辻本 賀英  
Regulation of cell death via mitochondrial channel  
第81回日本生理学会・シンポジウム  
平成15年5月3日  
札幌
2. 学会発表  
(外国学会)
- Tsujimoto, Y.  
Programmed cell death and Cancer:  
Two distinct forms of programmed
- 青戸 守、辻本 賀英  
Acinus 欠損マウスの解析  
第81回日本生理学会

平成15年5月3日

札幌

Y. Tsujimoto

Regulation of programmed cell death  
by Bcl-2 family of proteins  
16<sup>th</sup> International Congress of the  
IFAA

8/25, 2004

京都

清水 重臣、辻本 賀英

Bcl-2 ファミリー蛋白による  
non-apoptotic プログラム細胞死の制  
御

第27回日本分子生物学会年会

平成16年12月8日

神戸

中川崇、清水重臣、辻本賀英

サイクロフィリンDノックアウトマ  
ウスの解析

第27回日本分子生物学会年会

平成16年12月10日

神戸

中尾 齊仙、恵口 豊、児玉 高志、  
辻本 賀英

アポトーシス促進因子 Bax の活性化に  
伴う構造変化の解析

第27回日本分子生物学会年会

平成16年12月10日

神戸

新熊 忠信, 恵口 豊, 辻本 賀英

小胞体ストレス誘導性アポトーシス  
における Cytochrome c の役割

第27回日本分子生物学会年会

平成16年12月10日

神戸

杉岡 梨恵, 清水 重臣, 辻本 賀英

ミトコンドリア融合に関与する因子  
Fzo1 によるアポトーシス抑制

第27回日本分子生物学会年会

平成16年12月10日

神戸

水田健、清水重臣、辻本賀英

Bcl-2 ファミリー蛋白質非依存的シト  
クロム c 漏出機構の解析

第27回日本分子生物学会年会

平成16年12月10日

神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

厚生労働科学研究費補助金（痴呆・骨折臨床研究事業）  
分担研究報告書

アミロイド前駆蛋白および酸化ストレスによる神経細胞死の機序に関する研究

分担研究者 直井 信 岐阜県国際バイオ研究所 部長

共同研究者

赤尾幸博、松本健司、伊紅

岐阜県国際バイオ研究所

研究要旨

アルツハイマー病(AD)における主な病理所見として tau のリン酸化による neurofibrillary tangle の神経細胞内の蓄積と amyloid  $\beta$  protein ( $A\beta$ ) を含有する senile plaque の細胞外蓄積がある。Amyloid precursor protein (APP)から $\beta$ -、 $\gamma$ -secretase により生成される 40-42 アミノ酸からなる  $\beta$ -amyloid 1-40, 1-42 が原因物質であるとの Amyloid 仮説が一般に受け入れられている。神経伝達物質アセチルコリンの減少が主たる臨床症状である認知障害をもたらすと考えられるが、コリン細胞に変性をもたらす機序は未だ充分明らかにされていない。 $A\beta$  の蓄積が神経細胞の細胞死を惹起するメカニズムとして  $A\beta$  oligomer 細胞毒説、酸化ストレス説、microglia, reactive astrocyte による炎症説等があり、これらの因子の相互作用の結果細胞死が惹起されると現在考えられている。AD における神経細胞の保護薬の開発には細胞死の機序を検討することが必須となる。従来我々は神経毒、活性酸素等が神経細胞にアポトーシスを惹起する機構を系統的に研究し、その細胞死シグナルの活性化が主にミトコンドリアで段階的に起ることを報告して来た。即ち神経毒はミトコンドリア外膜に存在する標的タンパクと結合し、膜電位  $\Delta\Psi_m$  を低下させ、膜透過性を亢進し cytochrome c を細胞質内に流出し、caspase の活性化によりアポトーシスを惹起する。

一方、本研究班において rasagiline, selegiline (FP) などの propargylamine 誘導体が細胞死メカニズムの何処に作用し細胞死を抑制するかを明らかにしてきた。Propargylamine はミトコンドリアの膜透過性に関与するメガチャンネルである permeability transition pore (mPTP)を直接制御

することと、Bcl-2, Glia cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) の発現を増加することにより保護活性を示すことを見出してきた。

これらの成果から本年度は APP を過剰発現した細胞を作成し、APP そのものの増加がミトコンドリアの細胞死メカニズムに作用し神経細胞に脆弱性をもたらすかを検討した。また APP の蓄積による抗酸化能とミトコンドリアの細胞死機構を制御する Bcl-2 タンパクへの影響を研究した。

更に活性化酸素または窒素(reactive oxygen or nitrogen species, ROS/RNS)によるアポトーシス惹起の機序をミトコンドリアレベルで詳細に検討した。細胞死を惹起する刺激により異なった種の ROS/RNS が生成され、mPTP にたいする作用機序も異なることを見出した。このことから酸化ストレスによる神経細胞死を阻止する抗酸化機能をもつ神経保護薬の可能性を検討した。

#### A. 研究目的

神経変性疾患において酸化ストレス、ミトコンドリア機能障害、または神経毒によりニューロンに細胞死が惹起される。細胞死の型としてはアポトーシスとネクローシスがあるが、AD での細胞死はアポトーシスによるとの結果が報告されている。この誘因に関しては遺伝、環境因子が種々論じられているが、未だ定説に至っていない。しかし最終的な細胞死に至る過程は細胞に存在する共通のアポトーシス機構の活性化によることから、この機構を神経細胞の保護剤の標的とすることが考えられる。我々は既にパーキンソン病の細胞モデルにおいてドパミン細胞をアポトーシスから保護する活性が (-)deprenyl (selegiline, FK)、rasagilin 等の一連の propargylamine 誘導体にあることを発見した。その機序は propargyl-

amine 誘導体がミトコンドリアにおける膜透過性の変化を阻止し、下流の細胞死カスケイドが活性化することを阻止することによる。また propargylamine は神経細胞に存在する細胞死を制御する Bcl-2 と栄養因子を誘導することで広く神経細胞一般に保護活性を持つ可能性がある。一方抗酸化機能を持つ薬剤と食品により酸化ストレスを制御することで神経細胞を保護することも加齢に伴う長期の予防策として重要である。最終的には神経保護剤の検討から AD に神経細胞の細胞死を予防または修復する原因療法を確立することを本研究の目的とする。

#### B. 研究方法

Human wild type と 684 番目の His から Arg への変異を持つ APP を神経細胞のモデルである SH-SY5Y 細胞に発現さ

せた。この変異は A $\beta$ 1-40, A $\beta$ 1-42 のなかに存在する。Wild また変異 human APP の cDNA を EcoRI により処理した pIRES1neo eukarylc expression vector (Invitrogen) に挿入し、liposome 法により細胞に発現させた。発現 APP の RNA は quantitative real time RT-PCR で、タンパクは ELISA 法により定量した。APP, Bcl-2 の定量は Western blot 法によった。

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nitric oxide (NO), peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) は 5-(and-6-)-chloromethyl-2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-H<sub>2</sub>DCF-DA), また superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) は hydroethidine (HE) と fluorescence-activated cell sorter (FACS) を用い定量した。細胞死は propidium iodide (PI) を用い FACS によりアポトーシスとネクローシスに分類して定量した。

ミトコンドリア膜電位  $\Delta\Psi_m$  は蛍光色素 Mito-Tracker Green と Orange, または 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide [DiOC<sub>6</sub>(3)] を用い FACS で定量した。

### C. 研究結果

#### 1) Wild, mutated APP 過剰発現細胞の検討:

APP cDNA を導入した SH-SY5Y 細胞で APP の mRNA, 分子量約 110KDa, 140KDa のタンパクがともに増加していることを確認した。また A $\beta$ 1-40 濃度は Wild, Mutated APP 発現細胞の培地で増加が認められ A $\beta$ 1-42 は変異 APP 発現細胞の培地でのみ検出可能であった (図 1)。

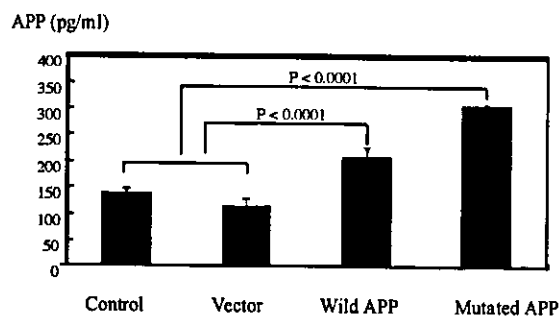


図 1。cDNA 導入による A $\beta$ 1-40 の増加。ELISA 法により対照(Control), Vector (IRES), Wild APP, Mutated APP を導入した SH-SY5Y 細胞の培地内の A $\beta$ 1-40 を定量した。APP 発現細胞での A $\beta$ 1-40 の増加が認められた。

Wild APP を発現した細胞では神経突起の伸展が見られず、シナプス形成の障害が示唆された。

#### 2) APP 過剰発現による細胞機能の変化:

Wild APP の発現により H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ONOO<sup>-</sup> を生成する SIN-1 等の酸化ストレスに対する細胞の感受性が増加した。またプロテアゾム阻害剤 PS-1 によっても細胞死が惹起された (図 2)。

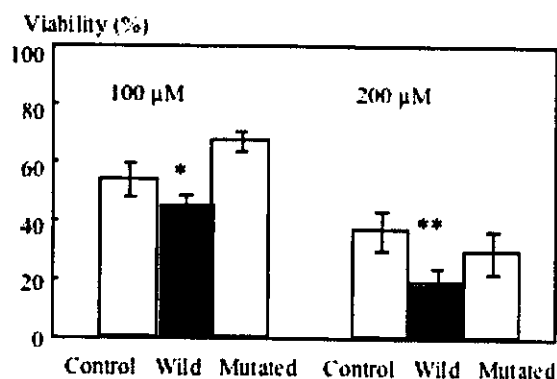


図 2。APP 過剰発現による H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に対する感受性の増加。ROS/RNS と 12 時間反応後の細胞生存率を測定した。\* < 0.05, \*\* < 0.01 from control

抗酸化能にたいする影響を検討する為、 $H_2O_2$ を添加後の ROS/RNS レベルを CM- $H_2DCF$ -DA と FACS により測定した (図 3)。Wild APP を発現した細胞でのみ DCF レベルの増加が認められた。この結果は Wild APP の発現により抗酸化機能が既に低下していることを示唆している。また最近 second radical scavenger としての機能が注目されているプロテアソーム活性も APP 発現細胞で著明に低下していた。

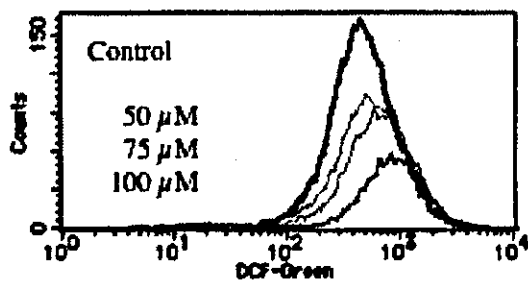


図 3. Wild APP 発現は細胞の抗酸化能を低下する。細胞に 50, 75, 100  $\mu$ M の  $H_2O_2$  添加し、24 時間後細胞内の ROS/RNS レベルを測定した。

アポトーシスシグナルの調節に重要な Bcl-2 にたいする APP 発現の影響を検討したところ Wild APP 発現細胞でのみ Bcl-2 タンパク量が低下し、APP の発現量と Bcl-2 量に負の相関が認められた。しかし Bcl-2 mRNA 量は変化せず転写後の Bcl-2 タンパクの恐らくは酸化による修飾が関与することが推定された。一方細胞死に関連する Bax は APP の発現には影響されなかった (図 4)。

酸化ストレスにより活性化される細胞内シグナルとして extracellular signal-

regulated kinase (ERK), p38, JNK などの mitogen-activated protein kinase (MAPK) が知られている。APP 発現による MAPK 系の影響を検討したところ、リン酸化 ERK が減少していた。此の結果の細胞機能への関与については現在検討中である。

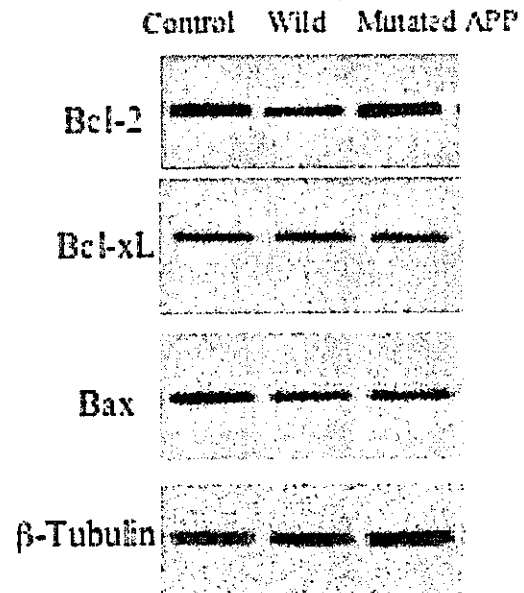


図 4. APP 発現による Bcl-2 関連タンパクの変化。細胞内の Bcl-2, Bcl-xL, Bax を Western blot 法により測定した。β-Tubulin は対照。Wild APP 発現細胞で Bcl-2 タンパクの著明な低下が認められた。

これらの結果から Wild APP の生成が細胞内で増加すると酸化ストレスを誘発され、抗アポトーシス機能を持つ Bcl-2 レベルが低下し、細胞の酸化ストレスへの感受性が増加していると考えられる。一方この実験条件での Mutated APP を発現した細胞では酸化ストレスにたいする脆弱性は認められず、細胞外での  $A\beta$ 1-42 の増加は細胞死に直接関与しない結果であった。

### 3) 酸化ストレスによるミトコンドリア膜電位の変化。

Fe, dopamine, L-DOPA, プロテアソーム阻害剤 PSI は SH-SY5Y 細胞にアポトーシスを惹起する (図 5)。この細胞死において酸化ストレスがミトコンドリアのアポトーシスシグナルを活性化するかを検討した。SH-SY5Y 細胞よりミトコンドリアを調製し、 $\Delta\Psi_m$  にたいする  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ , dopamine, L-DOPA の影響と ROS/RNS の生成を検討した。

Apoptotic cells (% of the total)

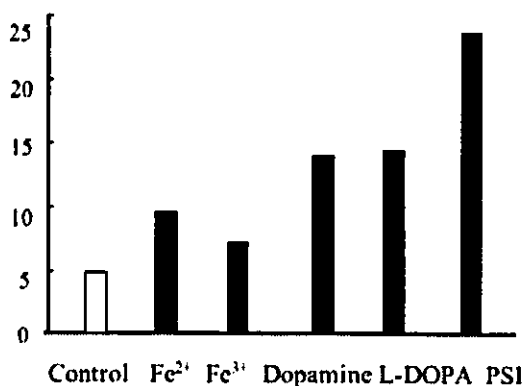


図 5。酸化ストレスによる細胞死の誘導。SH-SY5Y 細胞を 100  $\mu$ M  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ , dopamine, L-DOPA, 0.1  $\mu$ M PSI と 24 時間反応後のアポトーシスを PI-FACS により測定した。

単離ミトコンドリアの ROS/RNS レベルを  $H_2DCF-DA$  により測定した所、 $Fe^{2+}$ , neuromelanin,  $Fe^{3+}$  の順に ROS/RNS の増加が認められたが、dopamine, L-DOPA で変化しなかった(図 6)。しかし  $O_2^-$  を検出する HE では Dopamine, L-DOPA により増加が認められた (図 7)。即ち Fe による酸化ストレスでは

$H_2O_2$ , NO,  $ONOO^-$  が、Dopamine, L-DOPA では  $O_2^-$  が主に生成した。

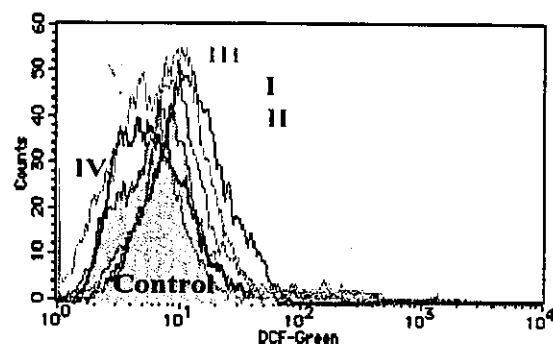


図 6。Fe, neuromelanin, dopamine, L-DOPA による酸化ストレスの増加。 $Fe^{2+}$  (I),  $Fe^{3+}$  (II), neuromelanin (III) により  $-OH$ , NO,  $ONOO^-$  が増加した。しかし dopamine (IV) と L-DOPA (V) は影響しなかった。

Fe, dopamine-L-DOPA による酸化ストレスモデルで抗酸化剤の効果を検討したところ、Fe の系では superoxide dismutase (SOD), NO scavenger である (-)-epigallocatechin gallate が著効を示したのにたいし、dopamine, L-DOPA の系では reduced glutathione (GSH), N-acetyl-L-cysteine (NAC), ascorbic acid, SOD が有効であった。これらの抗酸化剤は ROS/RNS の増加と  $\Delta\Psi_m$  の低下を共に阻止した。

SH 基を持つ抗酸化剤が有効であったことから、dopamine, L-DOPA から生成した ROS/RNS によりミトコンドリア構成タンパクの SH 基が酸化修飾され機能が低下し、 $\Delta\Psi_m$  が低下する機序があることを示唆している。

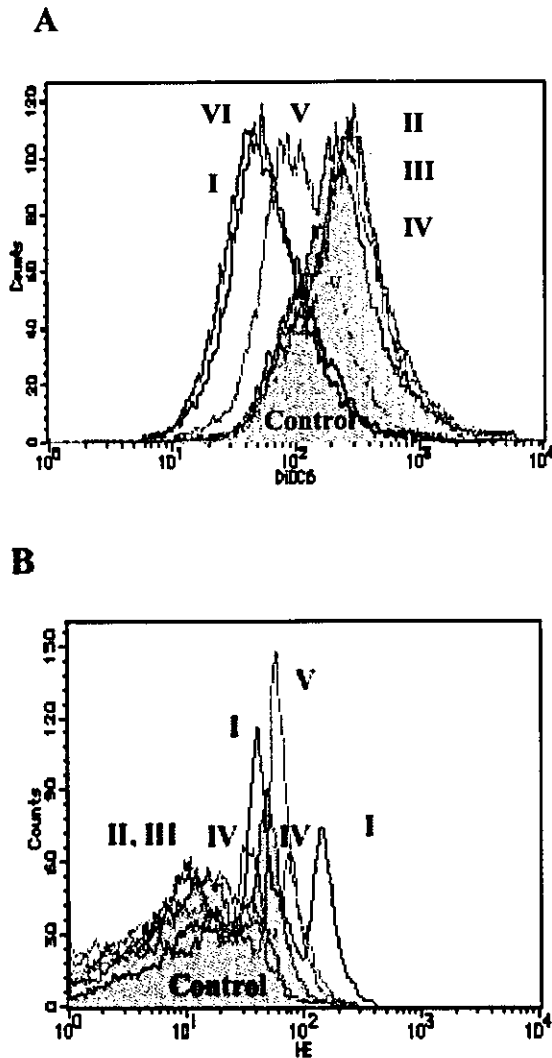


図 7. 抗酸化剤の $\Delta\Psi_m$ と ROS/RNS レベルへの影響。A:  $\Delta\Psi_m$  の DiOC<sub>6</sub>(3), B: ROS/RNS の HE を用いた測定。I: Dopamine, II: GSH, III: NAC, IV: ascorbic acid, V: SOD, VI: catalase.

## E. 結論

APP を過剰発現させた細胞モデルで抗酸化機能の低下の結果、酸化ストレスに対する細胞の脆弱性が増加することが明らかになった。酸化ストレスの条件により生成される ROS/RNS の種が異なり、それに従い有効な抗酸化剤の選択が必要であることが証明された。

従来我々はアポトーシスシグナルの制御から神経細胞を保護する方法を検討してきた。しかし今回の結果はミトコンドリアにおける膜透過性が酸化ストレスにより増加する機序を更に検討する必要があり、その制御もまた神経細胞の保護する手段として考慮すべきであることを示している。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Naoi M, Maruyama W, Shamoto-Nagai M, Yi H, Akao Y, Tanaka M. (2005) Oxidative stress in mitochondria: Decision to survival and death of neurons in neurodegenerative disorders. Mol. Neurobiol., in press.

- 2) Yi H, Maruyama W, Akao Y, Takahashi T, Iwasa K, Youdim MBH, Naoi M. (2005) *N*-Propargylamine protects SH-SY5Y cells from apoptosis induced by an endogenous neurotoxin, *N*-methyl(R)salsolinol, through stabilization of mitochondrial membrane and induction of anti-



- apoptotic Bcl-2. *J. Neural Transm.* In press.
- 3) Youdim MBH, Maruyama W, Naoi M. (2005) Neuropharmacological, neuroprotective and amyloid precursor processing properties of selective MAO-B inhibitor antiparkinsonian drug, rasagiline. *Drugs of Today*, in press.
  - 4) Naoi M, Maruyama W, Shamoto-Nagai M, Kato Y, Tanaka M. (2005) Oxidative stress in mitochondrial: The involvement in neurodegenerative diseases. In: *Oxidative Stress, Inflammation and Health*, Surh Y-J, Packer L. (eds.) *Oxidative Stress, Inflammation and Health*, Marcel Dekker, New York, in press.
  - 5) Maruyama W, Akao Y, Nitta A, Naoi M. (2005) Neuroprotection by rasagiline, *N*-propargyl-1*R*(+)-aminoindan, and related propargylamines is mediated by suppression of mitochondrial death signal and induction of anti-apoptotic genes. In: *Oxidative Stress, Inflammation and Health*, Surh Y-J, Packer L. (eds.) Marcel Dekker, New York, in press.
  - 6) Youdim MBH, Bar Am O, Yogev-Falach M, Weinreb O, Maruyama W, Naoi M, Amit T. (2005) Rasagiline: Neurodegeneration, neuroprotection, and mitochondrial permeability transition. *J. Neurosci. Res.* 79: 172-179.
  - 7) Nakagawa Y, Iinuma M, Matsuura N, Yi K, Naoi M, Nakayama T, Nozawa Y, Akao Y. (2005) A potent apoptosis-inducing activity of a Sesquiterpene lactone arucanolide, in HL60 cells: a crucial role of apoptosis-inducing factor. *J. Pharmacol. Sci.* 97: 242-252.
  - 8) Naoi M, Maruyama W, Nagy GM (2004) Dopamine-derived salsolinol derivatives as endogenous monoamine oxidase inhibitors: Occurrence, metabolism and function in human brains. *NeuroToxicol.* 25: 193-204.
  - 9) Maruyama W, Nitta A, Shamoto-Nagai M, Hirata Y, Akao Y, Youdim M, Furukawa S, Nabeshima T, Naoi M. (2004) *N*-Propargyl-1*R*-aminoindan, rasagiline, increases glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in neuroblastoma SH-SY5Y cells through activation of NF-kappaB transcription factor. *Neurochem. Int.* 44: 393-400.
  - 10) Maruyama W, Yi H, Takahashi T, Shimazu S, Ohde H, Yoneda K, Iwasa K, Naoi M. (2004) Neuroprotective function of *R*-(-)-(benzofuran-2-yl)-2-propylamino-pentane, [*R*-(-)-BPAP], against apoptosis induced by *N*-methyl(*R*)salsolinol, an endogenous dopaminergic neurotoxin, in human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Life Sci.* 75: 107-117.
  - 11) Shamoto-Nagai M, Maruyama W, Akao Y, Osawa T, Tribl F, Gerlach M, Zucca FA, Zecca L, Riederer P, Naoi

- M. (2004) Neuromelanin inhibits enzymatic activity of 26S proteasome in human dopaminergic SH-SY5Y cells. *J. Neural Transm.* 111: 1253-1265.
- 12) Akao Y, Seki N, Nakagawa Y, Yi H, Matsumoto K, Ito Y, Ito K, Funaoka M, Maruyama W, Naoi M, Nozawa Y. (2004) A highly bioactive lignophenol derivative from bamboo lignin exhibits a potent activity to suppress apoptosis induced by oxidative stress in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Bioorg. Med. Chem.* 12: 4791-4801.
- 13) Naoi M, Maruyama W. (2004) Monoamine oxidase and the inhibitors: Involvement in cell death and survival of neurons. In: Monoamine Oxidase inhibitors and their role in neurotransmission (drug development) Török TL, Klebovich I. (eds.), Medicina Publishing House, Budapest, 177-193.
- 14) 直井信、丸山和佳子 (2004) 神経毒によるパーキンソン病モデル: 細胞死機序の解明と神経保護薬の開発, 脳の科学 増刊「パーキンソン病のすべて」26:157-164.
- 15) 丸山和佳子、直井信 (2004) 神経保護薬、内科 93: 709-712
- 16) 丸山和佳子、直井信 (2004) Parkinson 病の発症機序-Up date, 医学のあゆみ、208: 477-481
- 17) 丸山和佳子、永井雅代、直井信 (2004) 弧発性パーキンソン病におけるドパミン神経選択的細胞死の機序: 酸化ストレスとプロテアソーム機能障害を結ぶもの *Prog. Med.* 24: 3054-3058
2. 学会発表
- 1) Maruyama W, Shamoto-Nagai M, Naoi M. Role of mitochondrial dysfunction and oxidative modification of protein in neurodegeneration of Parkinson's disease. 34<sup>th</sup> Annual Meeting, Society for Neuroscience, October 23, 2004, San Diego, USA
- 2) Naoi M, Maruyama W, Yi H, Shih JC, Chen K. Monoamine oxidase type A is the site to decide cell death and survival. 34<sup>th</sup> Annual Meeting, Society for Neuroscience, October 24, 2004, San Diego, USA
- 3) Naoi M, Maruyama W, Yi H, Akao Y, Chen K, Shih JC Type A monoamine oxidase determines cell death and survival, 11<sup>th</sup> Amine Oxidase Workshop, "Amine Oxidases: Function and Dysfunction", July 25-29, 2004, St. Andrews, Scotland
- 4) Maruyama W, Shamoto-Nagai M, Youdim MBH, Naoi M. Propargylamines protect neuronal cell death through induction of neuroprotective proteins, 11<sup>th</sup>

- Amine Oxidase Workshop, "Amine Oxidases: Function and Dysfunction", July 25-29, 2004, St. Andrews, Scotland
- 5) Naoi M, Maruyama W, Yi H, Shamoto-Nagai, Akao Y. Oxidative stress in mitochondrial: Decision to survival and death of neurons in neurodegeneration, ISN Satellite Meeting, "Oxidative Stress in Neurodegenerative Disorders", February 7-11, 2004, Guilin, China, p. 28-29.
  - 6) Yi H, Maruyama W, Akao Y, Naoi M. Induction of cell death by peroxy-nitrite: the intracellular mechanism and regulation, ISN Satellite Meeting, "Oxidative Stress in Neurodegenerative Disorders", February 7-11, 2004, Guilin, China. P. 62-64.
  - 7) . Maruyama W, Nitta A, Nagai-Shamoto M, Naoi M. Mechanism behind neuroprotection by propargylamines. Neuro 2004, September 21-23, 2004, 大阪
  - 8) Naoi M, Maruyama W, Nagai-Shamoto M. Involvement of neuromelanin in selective vulnerability of dopamine neurons in Parkinson's disease. Neuro 2004, September 21-23, 2004, 大阪
  - 9) Shamoto-Nagai M, Maruyama W, Isobe K, Akao Y, Osawa T, Naoi M. neuromelanin inhibits enzymatic activity of 26S proteasome in dopaminergic SH-SY5Y cells; Involvement in Parkinson's disease. 第77回 日本生化学会大会 2004年10月13-16日、横浜
  - 10) Maruyama W, Nagai M, Nitta A, Naoi M. Intracellular mechanism of neuroprotection by rasagiline an anti-Parkinson drug 第77回 日本生化学会大会、2004年10月13-16日、横浜
  - 11) 丸山和佳子、直井信 パーキンソン病のプロテアソーム障害における酸化修飾タンパクの関与 第45回日本神経学会総会、平成16年5月11-14日、東京
  - 12) 直井信、丸山和佳子 経口投与可能な神経保護薬 rasagiline の作用機序の検討 第45回日本神経学会総会、平成16年5月11-14日、東京
  - 13) 丸山和佳子、永井雅代、直井信 弧発性パーキンソン病におけるドパミン神経選択的細胞死の機序：酸化ストレスとプロテアソーム機能障害を結ぶもの 第12回カテコールアミンと神経疾患研究会、平成17年4月17日、東京
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし

厚生労働科学研究補助金（痴呆・骨折臨床研究事業）  
分担研究報告書

アミロイドβ蛋白産生の分子機構

分担研究者 駒野 宏人 国立長寿医療センター研究所 室長

研究要旨： アルツハイマー病ではアミロイド蛋白 (Aβ) の脳内蓄積機構の解明が重要な課題となっている。しかしながら、Aβ 産生機構について未だ不明な点が多い。Aβ はアミロイド前駆体蛋白 APP から β セクレターゼと γ セクレターゼと呼ばれるプロテアーゼによってそれぞれ生成される。このうち、γ セクレターゼについては、家族性アルツハイマー病原因遺伝子翻訳産物プレセニリン (PS) を含む複合体が担う、これまでにない新しいタイプのプロテアーゼであることが明らかとなってきた。しかしながら、γ セクレターゼの活性調節機構の詳細は不明である。我々は、Aβ 産生機構を明らかにするため、今年度は、PS 複合体の構成因子による γ セクレターゼ活性制御機構の解析を行った。その結果、PS 複合体の構成因子のうち、PEN-2 が活性に促進的に APH-1 が抑制的に作用した。したがって、細胞内の PS は、PS に結合する PEN-2 と APH-1 との量比により制御されている可能性が考えられた。

また、神経保護作用である Rasagiline の Aβ 産生に対する阻害効果を併せて解析した。その結果、Rasagiline は、Aβ 産生に対して弱い阻害効果を持つことが明らかとなった。

A. 研究目的

アルツハイマー病ではアミロイド蛋白 (Aβ) の脳内蓄積機構の解明が重要な課題となっている。しかしながら、Aβ 産生機構について未だ不明な点が多い。Aβ はアミロイド前駆体蛋白 APP から β セクレターゼと γ セクレターゼと呼ばれるプロテアーゼによってそれぞれ生成される。β セクレターゼは、新規の膜結合型アスパラギン酸プロテアーゼであることが明らかとなった。一方、γ セクレターゼについては、家族性アルツハイマー病原因遺伝子翻訳産物プレセニリンを含む

複合体が担う、これまでにない新しいタイプのプロテアーゼであることが明らかとなってきた。しかしながら、γ セクレターゼの活性調節機構の詳細は不明である。そこで、我々は、Aβ 産生調節機構を明かにするため、γ セクレターゼ活性の制御機構に注目し、プレセニリン複合体の構成因子による γ セクレターゼ活性制御機構の解析を行った。これらの解析は、Aβ 産生阻害のためのターゲット分子を同定するうえで重要な知見をあたえるものと期待される。

また、propargylamine 基をもつ Rasagiline や TV3324 は、神経保護作用

をもつことが明かにされている。これら薬剤が A $\beta$  産生に対して、阻害的に作用すれば、A $\beta$  毒性を抑制する有効なアルツハイマー病治療薬の候補になりうる。そこで、今年度は、これら薬剤が、A $\beta$  産生に対して阻害的に作用するかいなかを併せて解析した。

## B. 研究方法

PS 複合体構成因子、PEN-2、APH-1、nicastirin は、PCR 法によって単離した。レトロウイルスベクターを用いて、PS 複合体構成因子の遺伝子を線維芽細胞に導入し、細胞の A $\beta$  産生に及ぼすこれら遺伝子の影響を解析した。A $\beta$  の測定は、ELISA 法で定量した。遺伝子発現解析は、この遺伝子がコードする蛋白に対する特異抗体を用いてイムノブロット法により行った。Rasagiline や TV3324 の効果は、マウス由来の培養細胞株 Neuro 2a 細胞を、薬剤 (0.1  $\mu$ M および 1  $\mu$ M) で、1 日あるいは 3 日処理後、A $\beta$  の測定により解析した。

(倫理面への配慮)

本研究はすべて培養細胞を用いた実験なので、倫理面への配慮を必要とする該当事項はない。

## C. 研究結果

$\gamma$  セクレターゼ活性に必要な PS 複合体の構成因子として、PS 以外に、APH-1、ニカストリン(NCT)、PEN-2 と命名された膜蛋白が同定された<sup>1)</sup>。しかしながら、細胞中にある PS のうち、活性をもつ PS はわずか数 10% であろうと考えられており、その活性制御機構は不明な点が多い。分担研究者らは、まず、これら構成因子

のそれぞれについて A $\beta$  産生に及ぼす影響を詳細に解析した。その結果、まず、PS が細胞内でうける分子内切断 (エンドプロテオリシス) には、APH-1、NCT、PEN-2 の 3 つ共発現が必要であることは、これまでの報告と一致した結果を得た。一方、 $\gamma$  セクレターゼ活性に与えるこれらの因子の影響については、PEN-2 は、発現量依存的に  $\gamma$  セクレターゼ活性を促進し、NCT は、発現量をあげても活性に影響を与え、APH-1 は、発現量依存的にむしろ活性に抑制的であることが明らかとなった。また、PEN-2 の促進効果の分子機構を解析するため、活性部位に対する遷移状態を模倣した  $\gamma$  セクレターゼ阻害剤 L685, 458 に対する IC<sub>50</sub> を PEN-2 過剰発現細胞と正常細胞とで比較した。その結果、PEN-2 過剰発現で L685, 458 の IC<sub>50</sub> が約半分に下がる明らかとなった。この結果は、PEN-2 過剰発現によって、PS と基質 APP との親和性を増加していることを示唆するものであった。

また、神経保護作用のある Rasagiline や TV3324 の A $\beta$  産生に対する効果を解析したところ、Rasagiline は、0.1  $\mu$ M で 20% の阻害的に、作用したが、さらに高濃度 1  $\mu$ M では、この阻害の程度 10% 程度に、減少する傾向が認められた。TV33261 については、0.1  $\mu$ M および 1  $\mu$ M のどちらの濃度でも 20% ほどの A $\beta$  産生阻害効果が認められた。

## D. 考察

$\gamma$  セクレターゼ活性を担っていることが明らかとなった PS 複合体構成因子に

ついて  $A\beta$  産生における役割を解析した。その結果、PSに結合するPEN-2の量依存に  $g$  セクレターゼ活性が促進すること、また、APH-1は  $\gamma$  セクレターゼ複合体形成には必要であるが、過剰にPSに結合するとむしろ活性には阻害的に作用することを見出した。分担研究者らの結果は、細胞内のPSは、PSに結合するPEN-2とAPH-1との量比により、 $\gamma$  セクレターゼ活性が制御されることを強く示唆している。次に、分担研究者らは、PEN-2の作用機構を解析した。PS複合体中に存在するPSは、分子内で一カ所の切断を受けた生成されたNTFとCTFとがヘテロ二量体を形成している。従って、PSのNTFとCTFヘテロ二量体が分担研究者らセクレターゼ活性をもつ活性型PS複合体を形成していると予想されている。そこで、分担研究者らはPEN-2の分子機構として、PSのNTFとCTF複合体形成能の促進、あるいは、基質とPS複合体との親和性を促進するといういずれかの可能性があると考え解析を行った。その結果、PEN-2過剰発現は、PSのNTFとCTF複合体形成には影響せず、阻害剤を使った実験から、基質との親和性を促進していることを示唆する結果が得られた。おそらく、PS複合体と基質との結合部位の形成にPEN-2は関与しているのではないかと思われた。

一方、神経保護薬、Rasagiline およびTV33261は、弱いAb産生阻害効果が認められた。このうち、Rasagilineについては、有効な濃度領域があることが示唆された。今後は、これら薬剤がさらに有効に作用する条件を検討し、これら薬剤のAD治療薬としての有効性を見出す必要がある。具体的には、1)  $A\beta$  もつ神経

細胞毒性に対する、これら薬剤の神経保護効果があるか否か、および、2) 酸化ストレス等の、ストレス環境下による細胞のもつ  $A\beta$  産生変化に対して、これら薬剤の効果を解析する。

## E. 結論

本研究により、PS複合体の構成因子のうち、PEN-2が活性に促進的にAPH-1が抑制的に作用し、細胞内のPSは、PSに結合するPEN-2とAPH-1との量比により、 $A\beta$ 産生が制御されているという  $A\beta$ 産生分子機構が考えられた。

また、神経保護薬、RasagilineおよびTV33261については、弱いAb産生阻害効果が認められた。今後、これら薬剤のAD治療薬としての有効性をさらに検討するためには、1)  $A\beta$ もつ神経細胞毒性に対する、これら薬剤の神経保護効果、および、2) ストレス下での、細胞の  $A\beta$ 産生変化に及ぼす影響等を解析する必要がある。

F. 健康危険情報 該当なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Shiraishi H., Sai X., Wang H.-Q., Maeda Y., Kurono Y., Nishimura M., Yanagisawa K., and Komano H.  
PEN-2 enhances  $g$ -cleavage after the formation of Presenilin heterodimer. *J. Neurochemistry* 90: 1402-1413 (2004)

Shiraishi H., Wang H.-Q., Maeda Y., Kurono Y., Nishimura M., Yanagisawa K., and Komano H.  
Both presenilin C-terminal transmembrane domain and C-terminal

shot tail are critical for the formation of active  $\gamma$ -secretase complex 投稿中

## 2. 学会発表

Hiroto Komano

“Mechanism underlying the generation of amyloid  $\beta$ -protein”

International Symposium Meeting for “Longevity and Health”,

2004年9月20日, Jeju, Korea

Hiroto Komano

Mechanism underlying the regulation of presenilin-mediated  $\gamma$ -secretase activity

白石博久、王華芹、前田康弘、荒木亘、西村正樹、柳澤勝彦、駒野宏人

プレセニリンC末端配列の欠失によるAb産生の促進

第27回日本神経科学大会、第47回日本神経化学会大会合同大会Neuro2004 (2004年9月22日大阪)

白石博久、王華芹、前田康弘、荒木亘、西村正樹、柳澤勝彦、駒野宏人

プレセニリン膜ドメインによる $\gamma$ セクレターゼ活性の制御機構について

第23回日本痴呆学会 (2004年9月29日東京)

白石博久、王華芹、西村正樹、柳澤勝彦、駒野宏人

Roles of presenilin carboxyl-terminal tail in  $A\beta$  generation and presenilin endoproteolysis

第77回日本生化学大会 (2004年10月15日横浜)

H. Shiraishi, H.-Q. Wang, Y. Maeda, M. Nishimura, K. Yanagisawa and H. Komano  
Roles of presenilin carboxyl-terminal

tail in  $\gamma$ -secretase activity and presenilin endoproteolysis

34th Annual Meeting of Society for Neuroscience

San Diego, CA USA. Oct 23, 2004

駒野宏人

シンポジウム「家族性アルツハイマー病原因遺伝子 (APP および Presenilin) によるアミロイド $\beta$ 蛋白産生および神経機能調節機構について」

第27回日本神経科学大会・第47回日本神経化学会大会合同大会Neuro2004 (2004年9月22日 大阪)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

厚生労働科学研究費補助金（痴呆・骨折臨床研究事業）  
分担研究報告書

神経保護作用を有する疎水性ジペプチド Leu-Ile の結合蛋白の同定

分担研究者：新田淳美<sup>1</sup>

研究協力者：Xiaobo Cen<sup>1</sup>、大谷 晋<sup>1</sup>、丹羽美苗<sup>1</sup>、鈴木真紀子<sup>2</sup>、斉藤邦明<sup>2</sup>、清島満<sup>2</sup>、野田幸裕<sup>1</sup>、鍋島俊隆<sup>1</sup>

<sup>1</sup>名古屋大学大学院医学系研究科医療薬学・附属病院薬剤部

<sup>2</sup>岐阜大学大学院医学研究科・病態情報解析医学

---

疎水性ジペプチドの Leu-Ile は、グリア細胞株由来神経栄養因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor; GDNF) や脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor; BDNF) の産生を誘導する低分子化合物として見出された。しかし、その神経栄養因子誘導作用や神経保護作用のメカニズムについては、まったくわかっていない。そこで、本年度は、Leu-Ile の脳内結合蛋白の同定を行ったところ、Leu-Ile は、シャペロン蛋白である Hsc70 および Hsp70 と結合することが明らかとなった。

---

#### A.研究目的

GDNF は、胎児中胚葉由来ドーパミン作動性神経を始め運動神経細胞、海馬神経細胞、大脳皮質神経細胞などに対して保護作用を持ち(Houenou et al., 1996; Lin et al., 1993; Trupp et al., 1997; Wang et al., 1997)、パーキンソン病や脊髄損傷の治療薬としての応用も期待されている。厚生労働省の調査によると、日本国内のみでも、パーキンソン病の患者数は14万1千人(平成14年度患者調査)、脊髄損傷の患者数は10万人(平成13年身体障害児・身体障害者実態調査)となっており、多くの人々が、現在の医療技術では治療困難な神経変性疾患を抱えている。

文部科学省では、これらの疾患や動脈硬化症などの生活習慣病に対して再生医療を用いた新しい治療法の実用化を目指すため、平成15年度より「再生医療の実現化プロジェクト」に着手した。再生医療が実現すれば、これまでの医療を根本的に変革する革新的医療技術となりうる。その中

で、「幹細胞」を用いた再生医療を実現させるためには、細胞増殖や分化調節に関する機構の解明が必要である。初期神経発生にも深く関わりを持つ GDNF などの神経栄養因子は、神経幹細胞の増殖、分化に於いても重要な制御因子となると考えられている(Lee et al., 2005; Riaz et al., 2004; Roussa and Kriegstein., 2004; Tzeng et al., 2004; Yoo et al., 2003)。

本年度の本研究では、パーキンソン病や脊髄損傷などの治療への応用が期待されている GDNF を産生誘導することができる Leu-Ile の作用点や作用機序を調べるために、Leu-Ile の脳内結合タンパク質を同定した。Leu-Ile がどの様に GDNF を産生誘導しているのか、その作用機序を解明することが出来れば、新たな GDNF の発現調節機構を発見することができ、より効果的な GDNF 誘導剤の開発にも大きな進展が期待できるであろう。

#### B.方法



1、動物実験には、7週齢のICR雄性マウス（日本SLC、静岡）を使用した。なお、本研究は名古屋大学医学部動物実験指針およびPrinciples of Laboratory Animal Care (National Institutes of Health Publication 85-23, 1985)に基づいて行った。

2、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識したLeu-Ileとマウス脳内タンパク質との結合実験

ペントバルビタールによる麻酔下で7週齢のICR雄性マウスから全脳を摘出し、ホモジナイズバッファー（(0.25M NaCl, 5mM ethylenediamine tetracetic acid (EDTA), 1% TritonX-100, 0.25% dehydroacetic acid sodium salt monohydrate, 1mM phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF), 1μg/ml leupeptin, 1μg/ml aprotinin, 5μg/ml pepstatinA)を含む20mM Tris-HCl (pH7.4)）を加え、30秒間ホモジナイザー (heat systems, NY, USA) でホモジナイズした。この液を4°C10,000gで1時間遠心し、上清を回収したものを脳ホモジナイズ液として実験に用いた。NまたはC末端側にFITCを結合させたLeu-Ile (Thermo Electron Corporation, Ulm, Germany) (10 mg/ml) と脳ホモジナイズ液 (総タンパク質量6 mg/ml) を4°Cまたは37°Cで3時間反応させたのちサンプルバッファー (125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% 2-mercaptoethanol, 4% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% sucrose, 0.004% bromophenol blue) を同用量加え95°Cで5分間煮沸し、30 μgのタンパク質を10% ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。蛍光バンドの検出にはFluorImager595 (Molecular Dynamics, CA, USA) を用いた。

3、Affigel-10によるLeu-Ile結合タンパク質の精製

アガロースビーズ Affigel-10 (BIO·RAD, CA, USA) を30 ml シリンジ (テルモ、東京) に充填し (直径22 mm、高さ26.5 mm) これをカラムとした。カラムに100 mlの0.1 M 炭酸水素ナトリウム溶液 (pH 8.5) を流してビーズを洗浄し、0.1 M 炭酸水素ナトリウム溶液 (pH 8.5) に溶解したLeu-Ile (国産化学、東京) (30 mg/ml) とビーズを4°Cで3時間反応させた。0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) でビーズを洗浄し、ビーズに結合しなかったLeu-Ileを除去した後に、2-2-2と同様の脳ホモジナイズ液 (6 mg/ml) 20 ml をカラムに加え、Leu-Ileを結合したビーズと4°Cで一晩反応させた。100 mlの0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) でビーズを洗浄した後、Leu-Ileに結合したタンパク質を0.17 M glycine-HCl溶液 (pH 3) で溶出した。コントロールとしてLeu-Ileを結合させていないビーズを用い、同様の操作を行った。これを5-20% グラジュエントゲル (BIO·RAD) を用いて電気泳動し、銀染色「第一」キット (第一化学薬品、東京) を用いて銀染色を行った。

4、Leu-Ile結合タンパク質の trypsin 処理と質量分析

銀染色したゲルを蒸留水で10分間3回洗い、外科用メスを用いて目的のタンパク質を含むゲル片を切りだした。ゲル片に100 μlの脱色液 (18.5 mg/ml NaCl, 18.5 mg/ml CuSO<sub>4</sub>, 18.5 mg/ml Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) を5分間反応させ、ゲル片が透明になるまで蒸留水で洗浄した。acetonitrileによって脱水した後、ゲル片を真空遠心機で5分間乾燥させた。30 μlの10 mM dithiothreitol溶液をゲル片に浸透させ、室温で30分間反応させた後、dithiothreitol溶液を取り除き、100 mM iodoacetamideを30 μl加えてアルミホイルで遮光し、室温で30分間アルキル化した。再度ゲル片に

acetonitrile を加えて脱水、乾燥させ、10  $\mu$ l の trypsin (0.01  $\mu$ g/  $\mu$ l) (Promega, WI, USA) を浸透させた後、100 mM 炭酸水素アンモニウム液を 100  $\mu$ l 加えて 37°C で一晩反応させた。①5 % acetonitrile、0.1 % trifluoroacetic acid (TFA) を含む 100 mM 炭酸水素アンモニウム液、②50% acetonitrile、0.1 % TFA を含む 100 mM 炭酸水素アンモニウム液、③80 % acetonitrile、0.1 % TFA を含む 100 mM 炭酸水素アンモニウム液を順次加え、ゲル片からペプチド断片を溶出した。溶出物を乾燥させ、5 % acetonitrile、0.1 % ギ酸、0.1 % TFA を含む水溶液に溶かし、質量分析装置 Q-ToF2 (Micromass, Manchester, UK) を用いてペプチド断片の配列を分析した。分析結果はマスコットサーチ (Matrix Science, MA, USA) を用いて National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>) のデータベース検索を行った (Perkins et al., 1999)。スコア計算は Mowse アルゴリズムに基づいて行い、スコアが 44 以上のとき、統計学的に危険率 5%以下の信頼性があることを示す (Pappin et al., 1993)。

#### 5、ウエスタンブロットティング

質量分析に用いたサンプルに等容量のサンプルバッファーを加え 95°C で 5 分間煮沸し、5-20% グラジエントゲル (BIO-RAD) を用いて電気泳動を行った。ポリアクリルアミドゲルから semi-dry transfer 法により polyvinylidene fluoride (PDVF) 膜 (Millipore, MA, USA) へタンパク質を転写した後、膜をブロッキングバッファー (KPL, MD, USA) 中で、穏やかに攪拌しながら 2 時間室温でブロッキングした。

次に、PDVF 膜をブロッキングバッファーで 1000 倍に希釈した一次抗体 (rat

anti-Hsc70 antibody または rabbit anti-Hsp70 antibody (Stressgen, BC, Canada)) と 4°C で一晩反応させた。Tris buffer saline (TBS) (10 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 0.1% Tween-20) にて 15 分間 3 回洗浄した後、2 次抗体

(peroxidase labeled goat anti-rat IgG (H+L) antibody または peroxidase labeled goat anti-rabbit IgG (H+L) antibody (Kirkegaard & Perry Laboratories, MD, USA)) と室温で 2 時間反応させた。その後 TBS で 3 回洗浄し、ECL™ (Amersham Pharmacia Biotech, UK) を 1 分間反応させた。FPM100 (富士写真フィルム、東京) 現像機を用いて hyperfilm (Amersham Bioscience, NA, UK) に現像した。Hyperfilm に現像されたバンドの強度解析には ATTO Densito Graph (アトー、東京) を用いた。

#### 6、水晶発振子バイオセンサーによる heat shock cognate protein 70 (Hsc70) および heat shock protein 70 (Hsp70) と Leu-Ile の結合力の検討

水晶発振子マイクロバランス法は分子の結合・解離、重合・分解によって変化する水晶発振子の絶対重量の増減を振動数の変化でとらえることにより、蛍光物質などで標識することなく分子反応をナノグラムレベルで定量することができる (Motomiya et al., 2003; 岡畑と古澤, 2004; Sauerbrey, 1959)。水晶センサーチップ (イニシウム、東京) をピランハ溶液 (7.5 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 25 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) で 5 分間 2 回洗浄後、5mM 3,3-dithiodipropionic acid 溶液を 100  $\mu$ l センサーチップにのせて室温で 30 分間静置した。蒸留水で洗浄後、1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (100 mg/ml) と N-hydroxysuccinimide (100 mg/ml) の等量混合液 100  $\mu$ l をセンサーチ

ップにのせて室温で 30 分間静置し、蒸留水で洗浄した。

Leu-Ile、Pro-Leu (国産化学) または Ile-Pro (国産化学) (10 µg/ml) を含む 100 µl のリン酸緩衝液をセンサーチップにのせて室温で約 1 時間反応させ、ジペプチドをセンサーチップに固定化した。Pro-Leu および Ile-Pro は Leu-Ile と同じ疎水性ジペプチドであるが GDNF 産生誘導作用を示さないこと (Nitta et al., 2004) から、これらをネガティブコントロールとして用いた。

ジペプチドを固定化したセンサーチップを AFFINIX Q (イニシウム、東京) にセットし、リン酸緩衝液中で振動数を安定化させた後、Hsp70 (Stressgen) (1.79, 3.57, 7.14, 14.3, 28.6 nM) または Hsc70 (Stressgen) (1.79, 3.57, 7.14, 14.3, 28.6 nM) を含むリン酸緩衝液を逐次添加した。周波数変化は AFFINIX Q User Analysis (イニシウム) でモニターし、Hsp70 または Hsc70 とジペプチドの結合の程度を可視化した。周波数から濃度-結合飽和曲線を求め、解離定数 (Kd 値) を算出した。

#### 7、分子シミュレーションを用いた Hsc70 と Leu-Ile の結合部位の予測

Hsc70 は N 末端側から 44KD の ATPase ドメイン、18KD の基質結合ドメインおよび 10KD の C 末端ドメインに分けられ、それぞれの立体構造が既に明らかとなっているため、分子シミュレーションソフトウェア (MOE; Chemical Computing Group Quebec, Canada) を用いることによって Leu-Ile が Hsc70 のどの部位に結合しているのかを予測することができる。Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (SCSB) のデータベースサイトである protein data bank (PDB)

(<http://pd-beta.rcsb.org/pdb/Welcme.do>) から得られたそれぞれのドメインの 3 次元構造データ (3HSC (Flaherty et al., 1990)、7HSC (Morshausser et al., 1999) および 1UOD (Chou et al., 2003)) を利用し、MOE (分子力場: MMFF94x、カットオフ: 9.5 nm) を用いて Hsc70 と Leu-Ile の結合部位の解析を行った。

#### C. 結果

##### 1、FITC 標識した Leu-Ile による脳内結合タンパク質の検討

N または C 末端に FITC 標識した Leu-Ile とマウス脳ホモジナイズ液を反応させたものを電気泳動し、蛍光スキャナーによって画像を得た (Fig.1-A)。C 末端側に FITC 標識した Leu-Ile に比べて、N 末端側に標識した Leu-Ile の方がより多くのタンパク質と結合していたが、N および C 末端側に FITC 標識した Leu-Ile 両方に 70KD の大きさのタンパク質が結合した。また、それぞれの結合は 4°C と 37°C の温度差の影響をほとんど受けなかった。

##### 2、Leu-Ile 結合タンパク質の同定

アガロースビーズ Affigel-10 によって精製した溶出液を電気泳動し、銀染色した結果、2-3-1 で行った実験と同様に 70KD の大きさにバンドが認められた (Fig.1-B)。これが Leu-Ile と特異的に結合しているタンパク質であると考え、trypsin によって消化した後、Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight/time of flight-Mass spectrometry

(MALDI-TOF/TOF-MS) を用いてタンパク質の質量分析を行った。マスコットサーチを用いて NCBI nr のデータベースを検索したところ 10 本のペプチド鎖が heat shock cognate protein 70 (Hsc70) の配列と一致し、スコアが 496 であったことから、Hsc70 が

Leu-Ileの結合タンパク質である可能性が極めて高いと考えられた (Table.1)。Hsc70の抗体を用いて Affigel-10によって精製した溶出液のウエスタンブロッティングを行った結果、Hsc70と考えられるバンドが検出された (Fig. 1-C)。一方、Hsc70と81%の相同性を有するHsp70についてもウエスタンブロットを行ったが、バンドは検出されなかった (データ示さず)。Hsc70は恒常的に発現しているタンパク質であるが、Hsp70は熱や虚血などのストレスに暴露されたときに発現誘導されることが知られており (Dworniczak and Mirault., 1987)、今回実験に用いた脳が非ストレス下であったため、Hsp70とLeu-Ileとの結合が観察できなかつたと考えられる。

### 3、水晶発振子バイオセンサーによるHsc70およびHsp70とLeu-Ileの結合力の検討

Hsc70およびHsp70とLeu-Ileの結合活性について水晶発振子バイオセンサーを用いて測定した。Leu-Ile、Pro-LeuまたはIle-Proを結合させた水晶発振子にHsc70またはHsp70を反応させると、Leu-Ileを結合させたもののみ振動数が減少した (Fig.2-A)。95°Cで5分間インキュベートして熱変性させたHsc70およびHsp70を加えても、振動数が減少しなかったことから、熱変性させたHsc70およびHsp70はLeu-Ileと結合しないことが分かった (Fig.2-A)。Hsc70またはHsp70とLeu-Ileの解離定数を求めた結果、Hsc70は $K_d = 1.83 \times 10^{-8}$  M、Hsp70は $K_d = 1.24 \times 10^{-8}$  Mの強さでLeu-Ileと結合する事が分かった (Fig.2-B)。水晶発振子バイオセンサーによる実験ではHsc70のみでなくHsp70もLeu-Ileと結合することが示された。

### 4、分子シミュレーションを用いたHsc70とLeu-Ileの結合部位の予測

Hsc70はN末端側から44KDのATPaseドメイン、18KDの基質結合ドメインおよび10KDのC末端ドメインに分けられ、それぞれの立体構造が既に明らかとなっている (Chou et al., 2003; Flaherty et al., 1990; Morshauer et al., 1999)。Leu-Ileがどのドメインに結合しているのかを分子シミュレーションソフトウェア (MOE) を用いて解析し、相互ポテンシャルエネルギーを計算した結果、ATPaseドメインには-119.044 kCal、基質結合ドメインには-76.711 kCal、C末端ドメインには-64.337 kCalの強さでLeu-Ileが結合することが示された (Fig.3)。

### D. 考察

FITCを結合したLeu-Ileと脳ホモジナイズ液を反応させた実験では、70KDのタンパク質がLeu-Ileと特異的に結合することが示された。この時、反応温度を4°Cから37°Cに変化させても結合の程度に差がなかったことから、これらの結合は温度の影響を受けやすい酵素的な反応ではないと考えられる。Leu-Ileと特異的に結合する70KDのタンパク質の質量分析を行ったところHsc70が同定され、水晶発振子バイオセンサーによる実験ではHsc70のみでなくHsp70もLeu-Ileと特異的に結合する可能性が示唆された。

タクロリムスはFKBP12に結合する事でカルシニューリンの脱リン酸化作用を抑制し、interleukin2の産生を抑制することで免疫抑制作用を発現すると考えられている (Griffith et al., 1995; Schreiber et al., 1991)。Leu-Ileはタクロリムスの部分構造の類似体として得られたが、FKBP12には結合せず、カルシニューリン阻害活性を持たない事からも、Leu-Ileは免疫活性を抑