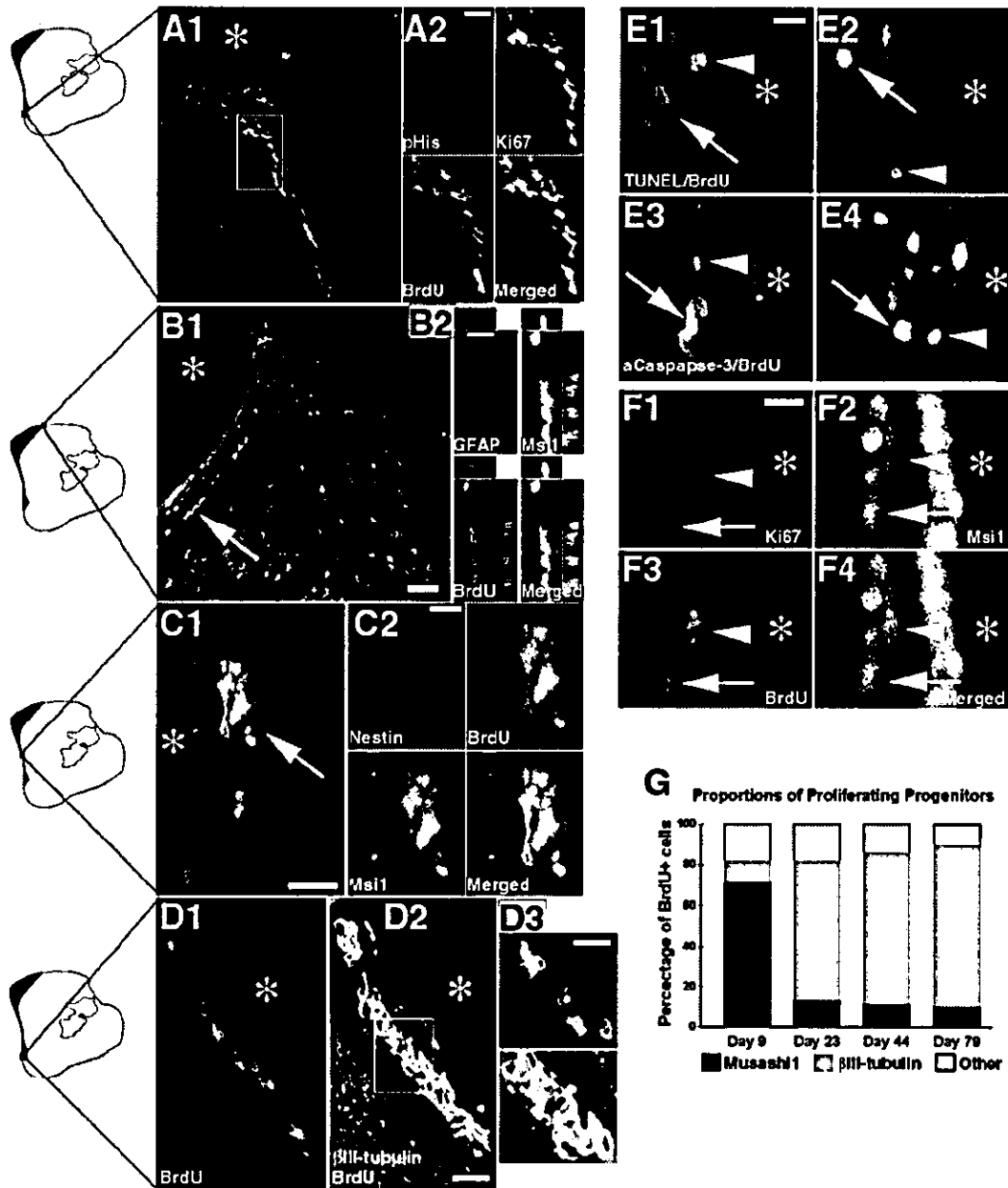


口演シンポジウム

「血管外膜を利用する脳再生療法の提案」

平成16年10月8日、名古屋国際会議場、名古屋



### 種々の細胞増殖・細胞特性マーカーを用いたBrdU陽性細胞の免疫組織化学的検索

**A:** 虚血後9日目の側脳室下帯：リン酸化ヒストンH3 (pHis3)、Ki67およびBrdUの免疫組織化学的3重染色。A1の四角内を拡大して、A2に示す。

**B:** 虚血後9日目の側脳室下帯：Musashi1(Msi1)、GFAPおよびBrdUの免疫組織化学的3重染色。B1の矢印に示すMusashi1+/BrdU+陽性の細胞集団はGFAPに陰性であることを、B2の3D画像で示す。

**C:** 虚血後9日目の側脳室下帯：Nestin、Musashi1およびBrdUの免疫組織化学的3重染色。Musashi1とNestinが同じ細胞に発現している。C1の像を、色別にC2に示す。

**D:** 虚血後9日目の側脳室下帯：bIII-tubulinとBrdUの免疫組織化学的2重染色。D2の四角内を拡大してD3に示す。

**E:** 虚血後9日目(E1、E3)と79日目(E2、E4)の側脳室下帯：BrdU/TUNEL(E1、E2)とBrdU/active caspase-3 (E3、E4)の免疫組織化学的2重染色。側脳室下帯のBrdU陽性細胞(赤)は矢印で示し、TUNEL陽性ないしcaspase陽性(緑)細胞は矢頭で示す。星印は側脳室を示す。

**F:** 虚血後79日目の側脳室下帯：Musashi1、Ki67およびBrdUの免疫組織化学的3重染色。すべて陽性の細胞を矢印で、BrdU陽性/Ki67陽性/Musashi1陰性の細胞を矢頭で示す。

**G:** 虚血後サル脳におけるBrdU/Musashi1陽性細胞、ないしBrdU/bIII-tubulin陽性細胞の割合。その他に、BrdU陽性/Musashi1陰性/bIII-tubulin陰性細胞を示す。

バー= B1(A1、B1)では50  $\mu$ m ; A2、B2、C1 および D2(D1、D2)では20  $\mu$ m ; C2、D3 および E1(E1-E4)では10  $\mu$ m ; F1(F1-F4)では5  $\mu$ m。

## 小胞体環境とオートファジー経路の解明

分担研究者 内山安男

### 研究要旨

低酸素-脳虚血負荷後の海馬CA1領域における遅延型神経細胞死とリソソームカテプシンDおよびオートファジーとの関連を検討し、オートファジーが誘導されたCA1錐体細胞が細胞死に陥ることを見いだした。今回、さらにこれを検証するために、CD欠損マウスとgreen fluorescent protein (GFP)とオートファジー関連タンパク質であるmicrotubule associated protein 1 light chain 3 (LC3)を融合したタンパク質 (GFP-LC3) を発現するトランスジェニックマウスを用いて、オートファジーと細胞死の関係を調べた。その結果、TUNEL陽性のCA1錐体細胞にはGFP-LC3陽性の顆粒が認められることが分かった。さらに電子顕微鏡による観察でも、死に行く細胞にはたくさんのオートファジー小体が見られた。

### A. 研究目的

オートファジーは、細胞が自らの構成成分を小胞体様の隔離膜で囲い込み、一般細胞質から隔離し、リソソームと融合することによって分解する現象であり、正常の細胞では代謝の恒常性維持に必須の現象である。通常、オートファジーの亢進に基づくリソソームの活性化は、細胞の生存を維持するために必要なアミノ酸や生理活性のあるモノマーの供給源として機能することが推測されている。しかし同時に、オートファジーの活性化に伴い細胞死が誘発される場合も知られている。それ故、オートファジーと細胞死を十分に検討する必要がある。

オートファジー性細胞死では、形態的に死に行く細胞にオートファゴソームがたくさん認められる、オートファジーのマーカータンパク質であるLC3は細胞質タイプのLC3-Iから膜結合型のLC3-IIへの変換がおこる、3メチルアデニン(3MA)などのオートファジー抑制剤でオートファジーを抑制すると細胞死も抑制される。3MAでオートファジーを抑制すると、オートファジーと関連するPI3Kのタイプ3のみならず細胞が生きるために必要なタイプ1も抑制し、AKTも抑制される。それ故、オートファジー性細胞死の実態が何かは不明である。オートファジーとどのくらい細胞死が一致するのか、電子顕微鏡レベルで、低酸素-虚血付加を

受けた神経細胞がどのように変化するかを調べる必要がある。私達は、これまでの実験から、リソソームカテプシンDがオートファジーと関連して細胞死に関わるプロテアーゼと推測している。その意味でも、オートファジーが誘導された神経細胞がいかにか、変化するかを知ることが重要である。

オートファジーが誘導されることで細胞死が起きる時に、オートファジー現象によって細胞死が起きるのか、オートファジーによって次の何か誘発されて細胞死に繋がるのか、現在は全く不明である。私達は、これまでの実験から、リソソームカテプシンDがオートファジーと関連して細胞死に関わるプロテアーゼと推測している。私達は、カテプシンDを欠損するマウスを解析して、同マウスが神経性セロイドリポフスチン蓄積症のモデルマウスになることを見いだした。神経細胞にリソソームが蓄積すること、同リソソームにはミトコンドリアのATP synthaseのサブユニットcが蓄積し、自家蛍光を発することが分かった。

本研究では、一過性脳虚血後の海馬CA1錐体細胞の遅延型神経細胞にオートファジーがいかにかに関与するのかを、オートファジーのマーカーであるLC3にGFPを融合したGFP-LC3を発現するマウスを用いて解析した。

## B. 研究方法

生後1週齢のGFP-LC3を発現したマウスを用いて、低酸素-脳虚血(H-I)負荷をかけ、その後の海馬CA1領域の錐体細胞の変化を観察した。これらマウスの片側総頸動脈を結紮し、1時間放置後37°Cに保温した容器(酸素濃度8%、窒素濃度92%に調節)に同マウスを40分間放置し、経時的にこれらマウスを免疫組織化学用(4%パラフォルムアルデヒド溶液、0.1 Mリン酸緩衝液、pH 7.4)と電子顕微鏡用(2%パラフォルムアルデヒド-2%グルタルアルデヒド溶液、0.1 Mリン酸緩衝液、pH 7.4)に灌流固定した後、海馬領域を含む脳を取り出し、それぞれパラフィンあるいはエポキシに包埋し、光学顕微鏡用の連続切片や電子顕微鏡用の超薄切片を作製した。光学顕微鏡用切片を用いて、TUNEL染色と内在性のGFP-LC3あるいは抗LC3抗体による2重染色を行った。電子顕微鏡用切片は、鉛とウランの二重染色を行った。

## C. 研究結果

野生型マウスとGFP-LC3マウスを用いて、海馬CA1領域における錐体細胞の生死をTUNEL染色で検討した。その結果、両マウスとも、同領域の錐体細胞が細胞死に陥る場合、虚血負荷後3日以内にTUNEL陽性になることが分かった。TUNEL陽性の細胞を見ると、GFP-LC3陽性の顆粒状蛍光が認められた。LC3の抗体で免疫二重染色をしても、TUNEL陽性細胞にはLC3陽性の顆粒状構造が認められた(図1)。電子顕微鏡的には、CA1錐体細胞の核周囲にオートファジー小体/オートリソソームがたくさん認められ、そのような細胞の核には凝縮したクロマチンの小片が見られた(図2)。

## D. 考察

GFP-LC3を発現するマウスに低酸素-脳虚血を負荷して、海馬CA1錐体細胞の変化を見た所、GFP-LC3陽性の顆粒が増えること、また、TUNEL陽性の錐体細胞には必ずGFP-LC3顆粒が見られることが分かった。また、電顕でも核の変化を示すCA1錐体細胞には、たくさんの

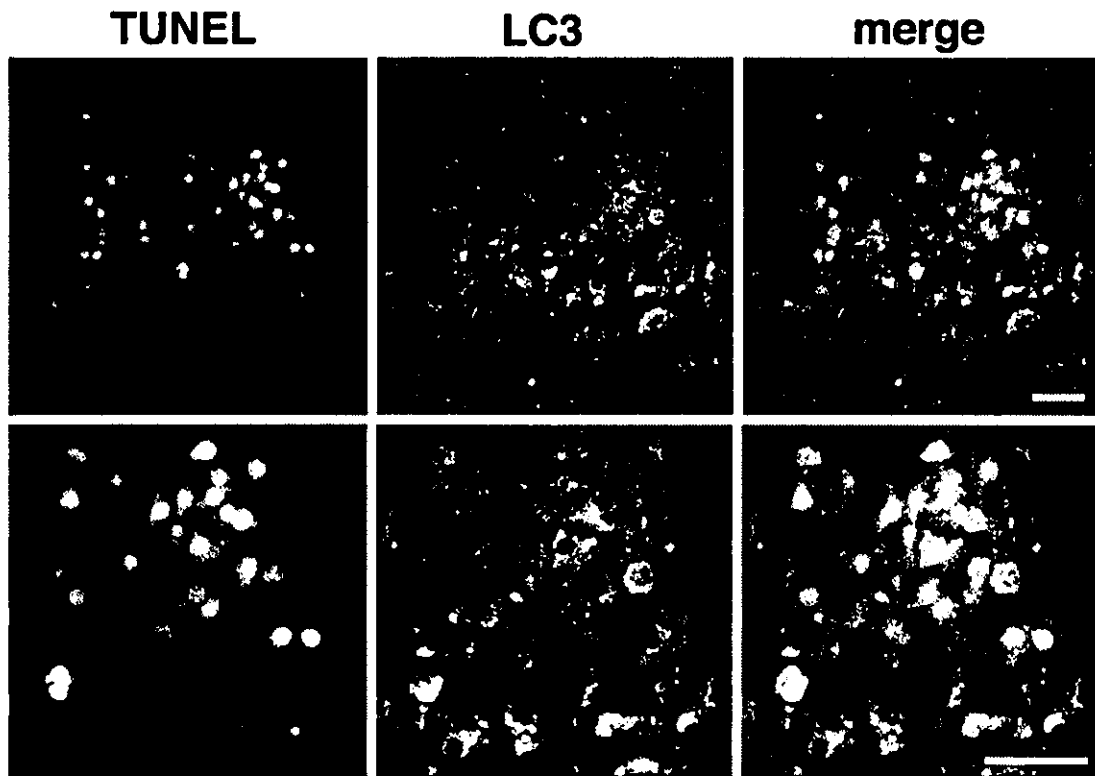


図1. 低酸素-脳虚血負荷3日後の海馬CA1錐体領域。GFP-LC3トランスジェニックマウス。GFPの顆粒状蛍光がTUNEL陽性細胞に見られる。

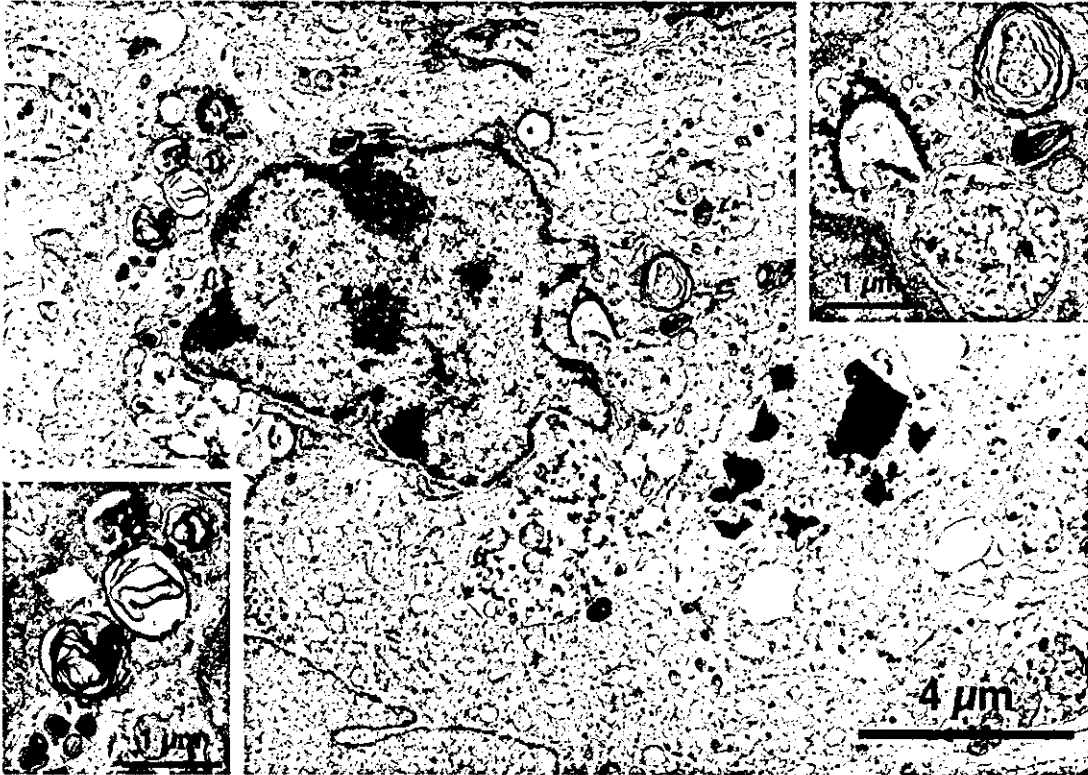


図2. 低酸素-脳虚血負荷3日後の海馬CA1錐体領域の神経細胞を示す。変形した核の近傍にはたくさんのオートファジー小体（インセット参照）が見られる。

オートファジー小体が認められた。これらの事実は、オートファジーの誘導が細胞死に必須の現象であることを示している。先に示した通り、細胞死を引き起こす因子としてのカテプシンDはオートファジーの顆粒で働く可能性があることが推測される。

#### E. 結論

一過性脳虚血後の海馬CA1錐体領域に見られる遅延型神経細胞死において、オートファジーのマーカであるGFPで標識したLC3のトランスジェニックマウスを用いて検討した。その結果、同遅延型神経細胞死には、LC3陽性の顆粒が誘導され、オートファジーがその死に必須であることが分かった。

#### F. 健康危機情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Lu Z, Dono K, Gotoh K, Shibata M, Koike M, Marubashi S, Miyamoto A, Takeda Y, Nagano H, Umeshita K, Uchiyama Y, Monden M (2005) Participation of autophagy in the degeneration process of rat hepatocytes after transplantation following prolonged cold preservation. *Arch Histol Cytol* 68: 71-80
2. Zhu C, Wang X, Xu F, Bahr BA, Shibata M, Uchiyama Y, Hagberg H, Blomgren K (2005) The influence of age on apoptotic and other mechanisms of cell death after cerebral hypoxia-ischemia. *Cell Death Differ* 12:162-176
3. Hashimoto N, Kido Y, Uchida T, Matsuda T, Suzuki K, Inoue H, Matsumoto M, Ogawa W, Maeda S, Uchiyama Y, Ohno S, Noda T, Kasuga M (2005) PKC $\delta$  in pancreatic  $\beta$ -cells mediates glucose-induced insulin secretion via the regulation of gene expression. *J Clin Invest* 115:138-145
4. Yu WH, Kumar A, Peterhoff C, Shapiro Kulnane L, Uchiyama Y, Lamb BT, Cuervo AM, Nixon RA (2004) Autophagic vacuoles are enriched in amyloid precursor protein-secretase activities: implications for beta-amyloid peptide overproduction and localization in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 2531-2540.
5. Tomiyama Y, Waguri S, Kanamori S, Kametaka S, Wakasugi M, Shibata M, Ebisu S, Uchiyama Y

- (2004) Early-phase redistribution of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor by U18666A treatment in HeLa cells. *Cell Tissue Res* 317: 253-264
6. Hanayama R, Tanaka M, Miyasaka K, Aozasa K, Koike M, Uchiyama Y, Nagata S (2004) Autoimmune Disease and Impaired Uptake of Apoptotic Cells in MFG-E8-Deficient Mice. *Science* 304:1147-1150
7. Mori Y, Akkapaiboon P, Yonemoto S, Koike M, Takemoto M, Sadaoka T, Sasamoto Y, Konishi S, Uchiyama Y, Yamanishi K (2004) Discovery of a second form of tripartite complex containing gH-gL of human herpesvirus 6 and observations on CD46. *J Virol* 78:4609-4616
8. Yoshizaki T, Inaji M, Kouike H, Shimazaki T, Sawamoto K, Ando K, Date I, Kobayashi K, Sahara T, Uchiyama Y, Okano H. (2004) Isolation and transplantation of dopaminergic neurons generated from mouse embryonic stem cells. *Neurosci Lett.* 363:33-37
9. Shiba, T., Shiba, Kametaka, S., Kawasaki, M., Shibata, M., Waguri, S., Uchiyama, Y., Wakatsuki, S. (2004) Insights into the phosphoregulation of  $\beta$ -secretase sorting signal by the VHS domain of GGA1. *Traffic* 5:437-448
10. Shimamura, M., Sato, N., Ohshima, K., Aoki, M., Kurinami, H., Waguri, S., Uchiyama, Y., Ogiwara, T., Kaneda, Y., Morishita, R. (2004) Novel therapeutic strategy to treat brain ischemia overexpression of hepatocyte growth factor gene reduced ischemic injury without cerebral edema in rat model. *Circulation* 109: 424-431

## 2. 学会発表

1. Koike M, Shibata M, Waguri S, Kominami E, Peters C, Figura K, Saftig P, Uchiyama Y (2004) Neuropathological features of mouse brains lacking cathepsins B and L. SFN meeting in San Diego
2. Shibata M, Koike M, Waguri S, Uchiyama Y (2004) Suppression of LC3, an autophagy marker protein, in PC12 cells by the SiRNA method. SFN meeting in San Diego

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)  
該当無し

厚生労働省科学研究補助金(こころの健康科学研究事業)  
分担研究報告書

ミトコンドリア脳筋症における小胞体ストレス細胞死

共同研究者 桃井 隆

研究要旨

ミトコンドリアは細胞の生存と死の両方に関与する重要な器官である。本研究はミトコンドリアDNA (mtDNA) の異常を原因とするミトコンドリア脳筋症、特にMELASと細胞死について解析をおこなった。約80%異常の変異mtDNAを含むクローン化したMELAS筋細胞クローン(2D2)ではグルコース欠乏条件下で、正常細胞にはみられない著しい細胞死が誘導された。解析した結果、2D2細胞ではミトコンドリア細胞死経路(カスパーゼ9-3)とともに、小胞体(ER)ストレス細胞死の経路(ヒトカスパーゼ4)が活性化することが明らかになった。MELASにおけるATP合成不全がユビキチン・プロテアソーム活性およびオートファジー形成を阻害することにより、ERからの排出を抑制し、ER内の不要、異常蛋白の蓄積を促進し、ERストレスに対する感受性を亢進することで、病態を引き起こしている可能性が考えられる。

A.研究目的

ミトコンドリア脳筋症は、細胞内のミトコンドリアの異常により、骨格筋、心臓の筋肉、中枢神経系などに障害を起こす疾患である。ミトコンドリア脳筋症MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes)は3243A→Gの遺伝子変異が高い頻度で見られ、ミトコンドリアのATP合成機能の欠損とこの疾患との関連が注目されている。

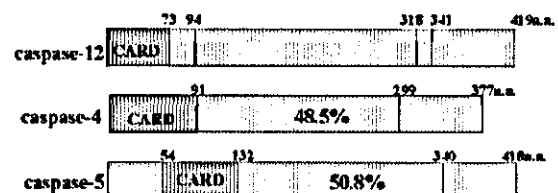
ミトコンドリアは生存に必須なATP合成を行うとともに細胞死誘導をもたらすチトクロームcが局在する小器官としても知られている。増殖因子の枯渇、Fas・TNF受容体や紫外線などのストレス刺激、放射線照射やDNAの損傷などが引き起こす様々な細胞死では、ミトコンドリアから細胞質への流出したチトクロームcが、細胞死の実行と担うシステインプロテアーゼであるカスパーゼ9を活性化する。

カスパーゼは哺乳類で12-14種類が存在するが、細胞死のシグナルにより上位に位置するイニシエーターカスパーゼ(カスパーゼ8, 9)が活性化されると、下位に位置するエフェクターカスパーゼ(カスパーゼ3)が切断され活性化され、いわゆるカスパーゼカスケードを介して細胞死がおこる。

一方、最近では細胞死の一因として、細胞小器官の一つである小胞体(Endoplasmic Reticulum:

ER)におけるストレス刺激が知られおり、マウスではERに局在するカスパーゼ12がERストレス刺激により活性化され、細胞死を誘導する。しかし、カスパーゼ12ヒトでは機能蛋白として発現せず、代わりにカスパーゼ4, 5がヒトで発現し、ERストレス細胞死に関与している。

マウスカスパーゼ12とヒトカスパーゼ4, 5



ERは蛋白の品質管理機構としてER内のストレスセンサーが蛋白の立体構造異常や糖鎖修飾異常を認識し、UPRレスポンスを介してシャペロンによる構造の修復をはかる。しかし、修復が十分されない異常蛋白はユビキチン・プロテアソーム分解系である小胞体関連分解系(ERAD)により分解される。さらに分解が十分されないERに局在するカスパーゼ12を介して小胞体ストレス細胞死(ERストレス細胞死)が誘導

される。われわれはこうしたERストレス細胞死にもミトコンドリアを介する細胞死の経路が関与することを報告してきた。

ERADにおけるはユビキチン・プロテアソーム分解系はATP依存性の分解系である。MELASなどのミトコンドリア脳筋症に見られるATP合成不全がいかなる分子機構で疾患を引き起こすかはこれまであまり調べられてこなかった。ミトコンドリアの異常は細胞ごとにその割合が異なることから、MELAS疾患筋細胞から0%と80%異常ミトコンドリアを保有する細胞株をクローニングし、また、カスパーゼ4の活性化型に反応する抗体を作製して、MELASにおけるATP合成欠損とERストレス細胞死との関係について解析を行った。

## B.研究方法

MELAS患者によりインフォームド・コンセントのもとに採取した生検筋細胞をOriSV40DNAにて不死化し、クローン化した。

正常および疾患細胞を通常培地からグルコース欠乏培地に変更し培養することで細胞死を誘導し、トリパンブルー染色により、生存率を計数し、比較した。また、カスパーゼの活性化と細胞死の関係については、グルコース欠乏培地で培養後、細胞を2%パラホルムアルデヒドを含むPBSにて固定し、活性化型カスパーゼ断片（カスパーゼ3、4、9）に対する特異抗体を用いた免疫蛍光染色とTUNELによる二重染色を用いて行った。

（倫理面での配慮）

また、MELAS細胞および組織実験については、自治医科大学小児科と共同研究を行い、自治医科大学小児科から診断と研究について家族に説明し、個人情報の倫理面を配慮した承諾書を用いて、家族よりインフォームドコンセントを得ている。

## C.研究成果

変異ミトコンドリアDNA(mtDNA)量が0%、50%、70%、80%以上と異なる量からなるクローン細胞を用いて行い。グルコース欠乏条件下の培養で、細胞死が引き起こされているか否か検討した。その結果、mtDNA量が0%、約50%、約70%のクローンではグルコースの有無で大きな生存率低下は見られず、約80-90%の生存率を示したが、mtDNA量が約80%以上のクローン(2D2)はグルコース欠乏条件下の時間経過とともに、顕著な生存率低下を示した(図1)。

グルコース欠乏条件下におけるチトクロームcの放出およびカスパーゼ3、カスパーゼ9、カ

スパーゼ4の活性化を検討した。その結果、正常細胞と異なり、クローン(2D2)ではチトクロームcのミトコンドリアからの細胞質への放出とカスパーゼ3、9の活性化が確認された。一方、ERストレス細胞死に関与するカスパーゼ4の活性化についても、クローン(2D2)で起きていることが観察された(図2)。また、グルコース欠乏が誘導する細胞死はカスパーゼ4の発現をsiRNAで抑制することによって、抑制が可能であった。

さらに、正常細胞にくらべ、2D2細胞はツニカマイシン、サブシガルジンに対する感受性が高く、低濃度でカスパーゼ4の活性化が誘導された。

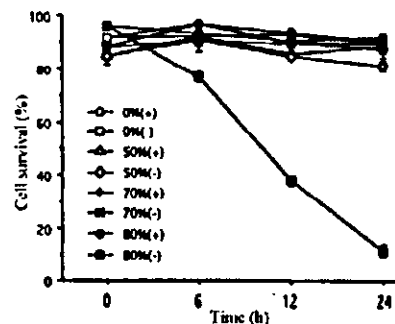


図1 glucose存在下、欠乏下でのMELAS筋細胞の生存率の変動  
0%: 変異mtDNA量が0%、50%: 変異mtDNA量が50%、  
70%: 変異mtDNA量が70%、80%: 変異mtDNA量が80%。  
(+): glucose含有、(-): 欠乏

## D.考察

正常細胞と異なり、グルコース欠乏により顕著な細胞死がクローン(2D2)で誘導されたが、この結果は変異mtDNA量が約80%を持つ患者の症状は約70%を持つ患者の症状より重度な症状を示すことと対応していた。また、MELASにおける細胞死にはチトクロームcに続くカスパーゼ9-3の活性化経路と小胞体ストレスによるカスパーゼ4の活性化経路が関与していることが示唆された。

すなわち、ミトコンドリア変異によるATP産生の低下が小胞体ストレス誘導を起こしやすけていることが考えられる。小胞体関連分解系(ERAD)であるはユビキチン・プロテアソーム分解系の活性はATPに依存することから、ミトコンドリアの機能障害によるATP産生の著しい低下がERADの蛋白分解能を低下させ、結果として、トランスロコンからのER内不要蛋白、異常蛋白の排出を阻害し、その結果ER内における立体構造異常蛋白の蓄積を増加させ、ERストレス細胞死の誘導に対し感受性を亢進した可能性が考えられる。



また、グルコースの欠乏はオートファジーの誘導を促進することが知られており、最近オートファジーは恒常的な蛋白分解にも関与していることが明らかになっている。オートファジー形成はユビキチン・プロテアソーム分解系と同様 ATP依存性であることから、ATPの欠乏は2D2細胞のオートファジー形成をも抑制し、その結果、不要蛋白の蓄積凝集が、ERストレスを誘導している可能性も考えられ、ERストレスとオートファジー形成との関係について検討を進めている。

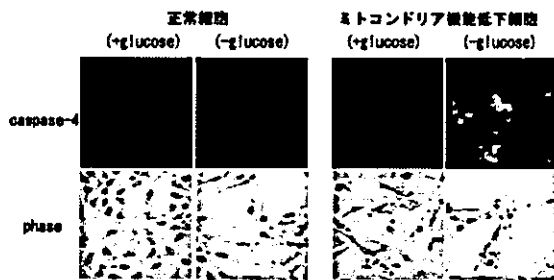


図2. ミトコンドリア機能低下細胞におけるカスパーゼ4の活性化  
正常細胞 (2D4) およびミトコンドリア機能低下細胞 (2D4) を  
glucose (+) または (-) 培地で培養し、caspase-4 抗体を用いて  
活性化を検出した。

## E. 結論

約80%の変異mtDNAを含むMELAS筋細胞ではグルコース欠乏によるATP合成不全による細胞死が誘導されトコンドリア細胞死経路（カスパーゼ9、3）以外に小胞体ストレスによるカスパーゼ4活性化の細胞死経路が活性化された。ATP合成不全がER内の不要、異常蛋白の蓄積を促進し、ERストレスに対する感受性を亢進することで、MELASの病態を引き起こしている可能性が考えられる。

## F. 健康危機情報

特になし。

## G. 研究発表

1. Fujita E, Urase K, Soyama A, Kouroku Y, Momoi T. Distribution of RA175/TS�C1/SynCAM, a member of the immunoglobulin superfamily, in the developing nervous system. *Dev Brain Res.* 154, 199-209, 2005
2. Momoi, T. Caspases involved in ER stress-mediated cell death. *J Chem Neuroanat.* 28, 101-

105, 2004

3. Nakamoto Y, Suda T, Momoi T, Kaneko S. Different procarcinogenic potentials of lymphocyte subsets in a transgenic mouse model of chronic hepatitis B. *Cancer Res.* 64, 3326-3333, 2004
4. Ganguly A., Oo TF, Rzhetskaya M, Pratt R, Yarygina O, Momoi, T, Kholodilov N, Burke RE, CEP11004, a novel inhibitor of the mixed lineage kinases, suppresses apoptotic death in dopamine neurons of the substantia nigra induced by 6-hydroxydopamine. *J Neurochem.* 8, 8469-8480, 2004.
5. Yoneda K, Furukawa T, Zheng YJ, Momoi T, Izawa I, Inagaki M, Manabe M, Inagaki N. An autocrine/paracrine loop linking keratin 14 aggregates to tumor necrosis factor alpha-mediated cytotoxicity in a keratinocyte model of epidermolysis bullosa simplex. *J Biol Chem.* 279, 7296-7303, 2004.

厚生労働省科学研究補助金(こころの健康科学研究事業)  
分担研究報告書

神経細胞樹状突起における小胞体からのカルシウム放出機構の解析

分担研究者 井上 貴文

研究要旨

1) シナプス刺激によるERからのカルシウム放出活性はシナプス可塑性に重要であるので、小脳プルキンエ細胞のシナプス形成期の生後2週齢と、ほぼ終了した4週齢の平行線維刺激によるカルシウム放出活性を比較したところ、前者にのみカルシウム放出活性の大きな一群を見だし、更に前者ではカルシウム放出活性とシナプス可塑性に相関があることがわかった。2) 培養海馬神経細胞の樹状突起中のER膜上のタンパク質の動態を観察した。IP3受容体の膜状での拡散にはアクチン骨格による負の制御が特異的に存在することを示した。

A. 研究目的

細胞内カルシウム放出チャンネルである1型イノシトール3リン酸受容体(IP3R1)は小脳プルキンエ細胞に非常に豊富に発現しており、ERからのカルシウム放出の主要な機能を担っている。細胞内カルシウム濃度の増加は、プルキンエ細胞におけるシナプス可塑性のモデルである長期抑圧現象(LTD)に必須であることが知られていたが、IP3Rのカルシウム放出活性もLTDに重要であることを明らかにしてきた。プルキンエ細胞樹状突起でのカルシウム動態はきわめて複雑な時間・空間的特性をもっており、細胞内メカニズムを厳密かつ精妙に制御していることが示唆されている。本研究は、このシナプス入力により駆動されるカルシウム動員機構を詳細に解明することを目的とする。さらにカルシウム放出機構の基盤である小胞体およびカルシウム放出チャンネルそのもののダイナミクスの解明もあわせて行う。

B. 研究方法

1) 小脳プルキンエ細胞樹状突起でのシナプス刺激によるカルシウム放出活性の測定は、マウス小脳より脳切片を作成し、プルキンエ細胞を正立顕微鏡により直視化にてパッチクランプ法を用いて、電気生理学的記録を行い、同時に細胞内にカルシウム色素を注入し、CCDカメラを用

いたカルシウムイメージング法にてカルシウム濃度の変化を測定した。

2) 神経細胞樹状突起中に存在する高速に移動するERの観察には、初代培養マウス海馬神経細胞に、蛍光タンパク質GFPと融合させたERタンパク質の遺伝子をリン酸カルシウム法を用いて導入し、蛍光顕微鏡を用い細胞が生きた状態でERタンパク質の動態を観察した。

C. 研究結果

小脳皮質の生後発達に伴うカルシウム放出活性の変化を検討した。50Hz・数回の刺激で得られる二相性のカルシウム濃度上昇によりカルシウム流入とカルシウム放出成分を分離した。カルシウム放出活性の生後発達に伴う変化を調べるため、異なる日齢のマウスを用いて二相性カルシウム上昇を観察した。2-3週齢のマウスのプルキンエ細胞ではカルシウム放出が相対的に大きく、4週齢以降では逆にカルシウム流入の方が大きかった。この生後発達に伴うカルシウム放出能の変化の役割を探ることを目的として、2週齢と4週齢のマウスを用いて平行線維・プルキンエ細胞シナプスのLTDの起こりやすさに差異がないか否かを検討した。2週齢では平行線維刺激のみでLTDを起こす場合が見られ、同時に測定したカルシウム放出活性の大きさとLTDの度合いに正の相関が見られた。同じ刺激方法では4週齢ではLTDは見られなかつ

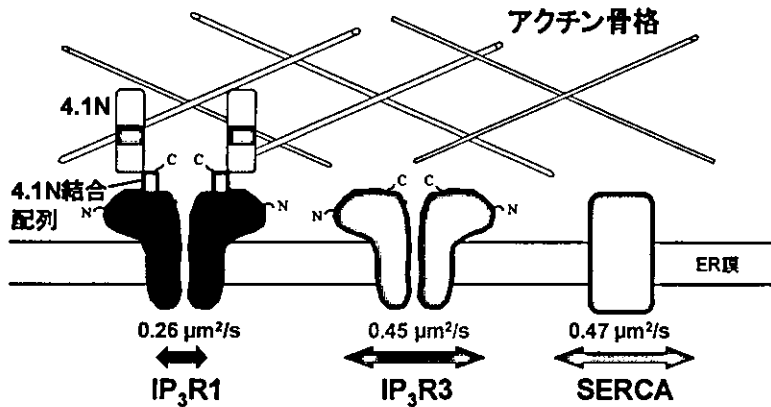


図 1型IP3受容体の拡散はアクチン骨格により制御されている。

1型IP3受容体のC末端に4.1Nタンパクが結合し、アクチン骨格と橋渡しをすることで同受容体の拡散速度は、4.1N結合配列を持たない他のER膜タンパク質 (3型IP3受容体とSERCA) より遅い。

た (投稿準備中)。

2) 樹状突起のER膜上に存在するER膜タンパク質の動態をFRAP(fluorescence recovery after photobleach)法にて検討したところ、アクチン骨格によりER膜タンパクの拡散が負に制御されていることを見いだした。この現象は他のER膜タンパク(SERCA、3型IP3受容体)には見られず、1型IP3受容体(IP3R1)に特有であった。さらにこの負の制御はアクチン・スペクトリン結合タンパク4.1NとIP3R1との結合によりもたらされていることをつきとめた (Fukatsu et al., 2004)。

#### D. 考察

- 2週齢から4週齢は小脳皮質が発達・成熟を遂げる時期であり、その時期にカルシウム放出活性が大きく変化をすることは、シナプス結合の可塑的変化や成熟化にシナプス後部のカルシウム放出能が関与している可能性を示唆する。
- 近年シナプス入力の場合である神経棘 (スパイン) における活動依存的なアクチン線維の再構築が注目を集めている。アクチン骨格の変化によるIP3R1のスパインへの活動依存的な動員機構が存在するとすれば、シナプス可塑性を制御するカルシウム放出機構それ自体の動態に注目する必要がある。

#### E. 結論

神経細胞樹状突起はそれ自体が複雑な構造を持ち、小区画ごとに独立の情報処理をした上で、細胞体に加工した情報を送っている。この局所的な情報処理には、シナプス入力活動に応じてシナプス強度を変化させてゆく可塑性、樹状突起そのものの形態の変化などが含まれるが、こうした現象にERはカルシウム放出を通じて大

きな役割を果たしている。本研究ではカルシウム放出能そのものが発生過程を通じて制御されていることを明らかにし、また、カルシウム放出チャンネルそのものの動態の制御という概念を提唱した。今後ERのカルシウム放出能及びカルシウム放出チャンネルの動態を更に詳細に明らかにしてゆくことは、生理的あるいは病理的状态でのER機能を理解・制御するための重要な基盤になると考えている。

F. 健康危機情報  
なし。

#### G. 研究発表

- Miwako Iwai, Yoko Tateishi, Mitsuharu Hattori, Akihiro Mizutani, Takeshi Nakamura, Akira Futatsugi, Takafumi Inoue, Teiichi Furuichi, Takayuki Michikawa, Katsuhiko Mikoshiba. Molecular cloning of mouse type 2 and type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and identification of a novel type 2 receptor splice variant. *The Journal of Biological Chemistry*, 280: 10305-10317 (2005).
- Yoko Tateishi, Mitsuharu Hattori, Tomohiro Nakayama, Miwako Iwai, Hiroko Bannai, Takeshi Nakamura, Takayuki Michikawa, Takafumi Inoue, Katsuhiko Mikoshiba. Cluster formation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor requires its transition to open state. *The Journal of Biological Chemistry*, 280: 6816-6822 (2005).
- Keishi Otsu, Akinori Kuruma, Eri Yanagida, Satoshi Shoji, Takafumi Inoue, Yoshiyuki Hirayama, Hiroshi Uematsu, Yukichi Hara, Seiko Kawano. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase and its functional couplings with Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchangers in mouse embryonic stem cells during differentiation into cardiomyocytes. *Cell Calcium*, 37:137-151 (2005).
- Hiroko Bannai, Kazumi Fukatsu, Akihiro Mizutani, Tohru Natsume, Shin-ichiro Iemura, Tohru Ikegami, Takafumi Inoue, Katsuhiko

- Mikoshiha. An RNA-interacting protein SYNCRIP (heterogeneous nuclear ribonuclear protein Q1/NSAPI) is a component of mRNA granule transported with inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 mRNA in neuronal dendrites. *The Journal of Biological Chemistry*, 279:53427-53434 (2004).
5. Kazumi Fukatsu, Hiroko Bannai, Songbai Zhang, Hideki Nakamura, Takafumi Inoue, Katsuhiko Mikoshiha. Lateral diffusion of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 is regulated by actin filaments and 4.1N in neuronal dendrites. *The Journal of Biological Chemistry*, 279:48976-48982 (2004).
6. Iskandar Ismailov, Djanenkhodja Kalikulov, Takafumi Inoue, Michael J. Friedlander. The kinetic profile of intracellular calcium predicts long-term potentiation and long-term depression. *The Journal of Neuroscience*, 24:9847-9861 (2004).
7. Kristi A. Kohlmeier, Takafumi Inoue, Christopher S. Leonard. Hypocretin/Orexin peptide signaling in the ascending arousal system: Elevation of intracellular calcium in the mouse dorsal raphe and laterodorsal tegmentum. *Journal of Neurophysiology*, 92:221-235 (2004).
8. Weihua Cai, Chihiro Hisatsune, Kyoko Nakamura, Takeshi Nakamura, Takafumi Inoue, Katsuhiko Mikoshiha. Activity-dependent expression of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 in hippocampal neurons. *The Journal of Biological Chemistry*, 279:23691-23698 (2004).
9. Chihiro Hisatsune, Yukiko Kuroda, Kyoko Nakamura, Takafumi Inoue, Takeshi Nakamura, Takayuki Michikawa, Akihiro Mizutani, Katsuhiko Mikoshiha. Regulation of TRPC6 channel activity by tyrosine phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 279:18887-18894 (2004).
10. Mitsuharu Hattori, Akinobu Z. Suzuki, Takayasu Higo, Hiroshi Miyauchi, Takayuki Michikawa, Takeshi Nakamura, Takafumi Inoue, Katsuhiko Mikoshiha. Distinct roles of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor types 1 and 3 in Ca<sup>2+</sup> signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 279:11967-11975 (2004).
- 11.11. Tomohiro Nakayama, Mitsuharu Hattori, Keiko Uchida, Takeshi Nakamura, Yoko Tateishi, Hiroko Bannai, Miwako Iwai, Takayuki Michikawa, Takafumi Inoue, Katsuhiko Mikoshiha. The regulatory domain of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is necessary to keep the channel domain closed: Possible physiological significance of specific cleavage by caspase 3. *Biochemical Journal*, 377:299-307 (2004).
- 12.12. Hiroko Bannai, Takafumi Inoue, Tomohiro Nakayama, Mitsuharu Hattori, Katsuhiko Mikoshiha. Kinesin dependent, rapid, bidirectional transport of inositol-1,4,5-trisphosphate receptor containing particles in the dendrite of hippocampal neurons. *Journal of Cell Science*, 117:163-175 (2004).
2. 学会発表
1. C. Hisatsune, Y. Kuroda, T. Torashima, H. Hirai, T. Inoue, K. Mikoshiha. Implication of inositol-1,4,5-trisphosphate receptor type 1-mediated signaling in the regulation of dendritic outgrowth of Purkinje cells. 34th Annual Meeting of the Society of Neuroscience, San Diego, October 23-27 (2004).
2. 深津和美, 坂内博子, 張松柏, 中村秀樹, 井上貴文, 御子柴克彦. アクチン, 4.1NによるIP3受容体タイプ1の拡散制御. 日本生物物理学会第42回年会, 京都, 12月13-15日 (2004).
3. 坂内博子, 深津和美, 水谷顕洋, 夏目徹, 家村俊一郎, 池上徹, 井上貴文, 御子柴克彦. 神経細胞樹状突起における微小管依存的なRNA結合タンパク質SYNCRIPの輸送 -mRNA顆粒の構成要素として-. 日本生物物理学会第42回年会, 京都, 12月13-15日 (2004).
4. 松浦徹, 吉田学, 井上貴文, 宮脇敦史, 道川貴章, 御子柴克彦. イノシトール1,4,5三リン酸濃度変化の時空間的解析. 第27回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月8-11日 (2004).
5. 井上貴文, 坂内博子, 中山智博, 服部光治, 御子柴克彦. 神経細胞樹状突起におけるキネシン依存的な高速, 両方向性のER輸送. 第77回日本生化学会大会, 横浜, 10月13-16日 (2004).
6. 深津和美, 坂内博子, 張松柏, 中村秀樹, 井上貴文, 御子柴克彦. 神経細胞樹状突起におけるアクチン骨格, 4.1NタンパクによるIP3受容体タイプ1 拡散制御機構の解明. 第77回日本生化学会大会, 横浜, 10月13-16日 (2004).
7. 立石陽子, 服部光治, 中山智博, 岩井美和子, 坂内博子, 中村健, 道川貴章, 井上貴文, 御子柴克彦. イノシトール1,4,5-三リン酸受容体のクラスター形成機構の解析. 第77回日本生化学会大会, 横浜, 10月13-16日 (2004).
8. 岩井美和子, 立石陽子, 服部光治, 水谷顕洋, 二木啓, 井上貴文, 古市貞一, 道川貴章, 御子柴克彦. 新規2型イノシトール3リン酸受容体スプライシングアイソフォームの受容体細胞内局在における役割. 第77回日本生化学会大会, 横浜, 10月13-16日 (2004).
9. 久恒智博, 黒田有希子, 寅島崇, 平井宏和, 井上貴文, 御子柴克彦. IP3 type 1 受容体を介したPurkinje細胞樹状突起伸展の制御. 第77回日本生化学会大会, 横浜, 10月13-16日 (2004).

- 10.坂内博子, 深津和美, 水谷顕洋, 夏目徹, 家村俊一郎, 池上徹, 井上貴文, 御子柴克彦. RNA結合タンパク質SYNCRIPはmRNA granuleの構成要素である. 第77回日本生化学会大会, 横浜, 10月13-16日 (2004).
- 11.御子柴克彦, 道川貴章, 濱田耕造, 安東英明, 藤本一朗, 中村健, 坂内博子, 深津和美, 井上貴文, 松浦徹, 水谷顕洋, 張松柏, 山崎美佳. IP3レセプター・その構造と生理機能. 第77回日本生化学会大会, 横浜, 10月13-16日 (2004).
- 12.Keishi Otsu, Akinori Kuruma, Eri Yanagida, Takafumi Inoue, Satoshi Shoji, Yoshiyuki Hirayama, Hiroshi Uematsu, Masayasu Hiraoka, Yukichi Hara, Seiko Kawano. Functional development of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger during cardiomyogenesis in mouse embryonic stem cells. 第81回日本生理学会大会, 札幌, 7月2-4日 (2004). (*The Japanese Journal of Physiology*, 54 (suppl): 137 (2004)).

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

該当無し

研究成果の刊行

発表者氏名	論文タイトル	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
Kitao Y, Hashimoto K, Matsuyama T, Iso H, Tamatani T, Hori O, Stern DM, Kano M, Ozawa K, and Ogawa S.	ORP150/HSP12A regulates Purkinje cell survival: a role for endoplasmic reticulum stress in cerebellar development.	J Neurosci.	24	1486-96	2004
Bando Y, Tsukamoto Y, Katayama T, Ozawa K, Kitao Y, Hori O, Stern DM, Yamauchi A, Ogawa S.	ORP150/HSP12A protects renal tubular epithelium from ischemia-induced cell death.	FASEB J.	18	1401-3	2004
Hori O, Ichinoda F, Yamaguchi A, Taniguchi M, Koyama Y, Tohyama M, Stern D, Ozawa K, Kitao Y, Ogawa S.	Role of Herp in the endoplasmic reticulum (ER) stress response.	Genes Cells.	11	457-469	2004
Yamashima T, Tonchev AB, Vachkov IH, Popivanova BK, Seki T, Sawamoto K, Okano H.	Vascular adventitia generates neuronal progenitors in the monkey hippocampus after ischemia.	Hippocampus	14	861-875	2004
Takahashi N, Tonchev AB, Koike K, Murakami K, Yamada K, Yamashima T, Inoue M.	Expression of estrogen receptor-beta in the postischemic monkey hippocampus.	Neurosci Lett.	369	9-13	2004
Zhu C, Wang X, Xu F, Bahr BA, Shibata M, Uchiyama Y, Hagberg H, Blomgren.	The influence of age on apoptotic and other mechanisms of cell death after cerebral hypoxia-ischemia.	Cell Death Differ	12	162-176	2005
anayama R, Tanaka M, Miyasaka K, Aozasa K, Koike M, Uchiyama Y, Nagata S.	Autoimmune Disease and Impaired Uptake of Apoptotic Cells in MFG-E8-Deficient Mice.	Science	304	1147-1150	2004
Hashimoto N, Kido Y, Uchida T, Matsuda T, Suzuki K, Inoue H, Matsumoto M, Ogawa W, Maeda S, Uchiyama Y, Ohno S, Noda T, Kasuga M	PKC $\delta$ in pancreatic $\beta$ -cells mediates glucose-induced insulin secretion via the regulation of gene expression.	J Clin Invest.	115	138-145	2005
Fujita E, Urase K, Soyama A, Kouroku Y, Momoi T.	Distribution of RA175/TSLC1/SynCAM, a member of the immunoglobulin superfamily, in the developing nervous system.	Dev Brain Res.	28	101-105	2005
Yoneda K, Furukawa T, Zheng YJ, Momoi T, Izawa I, Inagaki M, Manabe M, Inagaki N.	An autocrine/paracrine loop linking keratin 14 aggregates to tumor necrosis factor $\alpha$ -mediated cytotoxicity in a keratinocyte model of epidermolysis bullosa simplex.	J Biol Chem.	279	7296-7303	2004
Mitsuharu Hattori, Akinobu Z. Suzuki, Takayasu Higo, Hiroshi Miyauchi, Takayuki Michikawa, Takeshi Nakamura, Takafumi Inoue, Katsuhiko Mikoshiba	Distinct roles of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor types 1 and 3 in Ca $^{2+}$ signaling.	The Journal of Biological Chemistry	279	11967-11975	2004
Iskandar Ismailov, Djanenkhodja Kalikulov, Takafumi Inoue, Michael J. Friedlander.	The kinetic profile of intracellular calcium predicts long-term potentiation and long-term depression.	The Journal of Neuroscience.	24	9847-9861	2004
Yoko Tateishi, Mitsuharu Hattori, Tomohiro Nakayama, Miwako Iwai, Hiroko Bannai, Takeshi Nakamura, Takayuki Michikawa, Takafumi Inoue, Katsuhiko Mikoshiba.	Cluster formation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor requires its transition to open state.	The Journal of Biological Chemistry,	280	6816-6822	2005

# ORP150/HSP12A Regulates Purkinje Cell Survival: A Role for Endoplasmic Reticulum Stress in Cerebellar Development

Yasuko Kitao,<sup>1</sup> Kouichi Hashimoto,<sup>2</sup> Tomohiro Matsuyama,<sup>4</sup> Hiroyuki Iso,<sup>5</sup> Takeshi Tamatani,<sup>1</sup> Osamu Hori,<sup>1,3</sup> David M. Stern,<sup>6</sup> Masanobu Kano,<sup>2</sup> Kentaro Ozawa,<sup>1</sup> and Satoshi Ogawa<sup>1,3</sup>

Departments of <sup>1</sup>Neuroanatomy and <sup>2</sup>Cellular Neurophysiology, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640, Japan, <sup>3</sup>Core Research for Evolutional Science and Technology, Japan Science and Technology, Kawaguchi 332-0012, Japan, Departments of <sup>4</sup>Internal Medicine and <sup>5</sup>Behavior Science, Hyogo College of Medicine, Nishinomiya 663-8501, Hyogo, Japan, and <sup>6</sup>Dean's Office, Medical College of Georgia, Augusta, Georgia 30912

The endoplasmic reticulum (ER) stress response contributes to neuronal survival in ischemia and neurodegenerative processes. ORP150 (oxygen-regulated protein 150)/HSP12A (heat shock protein 12A), a novel stress protein located in the ER, was markedly induced in Purkinje cells maximally at 4–8 d after birth, a developmental period corresponding to their vulnerability to cell death. Both terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotinylated UTP nick end-labeling analysis and immunostaining using anti-activated caspase-3 antibody revealed that transgenic mice with targeted neuronal overexpression of ORP150 (Tg ORP150) displayed diminished cell death in the Purkinje cell layer and increased numbers of Purkinje cells up to 40 d after birth ( $p < 0.01$ ), compared with those observed in heterozygous ORP150/HSP12A-deficient (ORP150<sup>+/-</sup>) mice and wild-type littermates (ORP150<sup>+/+</sup>). Cultured Purkinje cells from Tg ORP150 mice displayed resistance to both hypoxia- and AMPA-induced stress. Behavioral analysis, using rotor rod tasks, indicated impairment of cerebellar function in Tg ORP150 animals, consistent with the concept that enhanced survival of Purkinje cells results in dysfunction. These data suggest that ER chaperones have a pivotal role in Purkinje cell survival and death and thus may highlight the importance of ER stress in neuronal development.

**Key words:** apoptosis; [Ca]; cerebellum; death; Purkinje cell; glutamate; neuronal cell death; calbindin; cerebellar ataxia

## Introduction

Among cells constituting the CNS, neurons are especially vulnerable to fluctuations in the extracellular environment, including ischemic stress, trauma, and a range of infectious challenges. Moreover, within the general population of neurons, certain subsets display enhanced vulnerability to particular toxic insults. One mechanism often invoked to explain neuronal susceptibility to stress is their response to glutamate (Coyle and Puttfarcken, 1993). For example, in ischemia, glutamate toxicity is likely to exacerbate neuronal death, along with hypoxia, glucose deprivation, and the generation of reactive oxygen intermediates (Siesjö, 1988). Glutamate–receptor interaction ultimately triggers elevation of intracellular [Ca<sup>2+</sup>] ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>), the final common pathway of cell death attributable, at least in part, to activation of intracellular Ca<sup>2+</sup>-dependent proteinases, such as calpain/cathepsin, caspases, and p35 (Lee et al., 2000). Thus, cellular mechanisms that buffer these events could have a protective role, potentially early in the ischemic process.

In contrast, astrocytes are considerably more resistant to en-

vironmental challenge. On the basis of this phenotypic difference in cell behavior, we have cloned a stress protein induced by oxygen deprivation, ORP150 (oxygen-regulated protein 150), and have shown it to have a central role in cellular survival in hypoxia (Kuwabara et al., 1996; Ozawa et al., 1999). Subsequently, we analyzed neuronal expression of ORP150 and found that it contributes to maintenance of cell viability in ischemia, although the time course and level of ORP150 expression were quite different than in astrocytes (Tamatani et al., 2001). In hippocampal neuronal cultures, ORP150 induced in the endoplasmic reticulum (ER) in response to hypoxia stabilized [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, thereby suppressing activation of Ca<sup>2+</sup>-dependent proteinases (Kitao et al., 2001). Furthermore, adenovirus-mediated expression of ORP150 in the hippocampus suppressed, at least partly, delayed neuronal cell death (Miyazaki et al., 2002). These data suggest a central role for the ER-associated molecular chaperone ORP150 in the defense of neurons to environmental stress.

Cerebellar Purkinje cells represent a group of neurons highly vulnerable to ischemic and excitotoxic stress (Welsh et al., 2002). The effect of ischemic stress on Purkinje cells has been difficult to analyze *in vivo* because of methodological difficulties, especially in mice (Hata et al., 1993; Sieber et al., 1995). However, it has become clear that ischemia-related stress responses are operative during brain development, suggesting an overlap of basic cellular properties marshaled to deal with physiological and pathological environmental conditions (Calabrese et al., 2002). Therefore, a

Received Sept. 2, 2003; revised Dec. 15, 2003; accepted Dec. 15, 2003.

We thank F. Ichinoda (Department of Neuroanatomy, Kanazawa University Medical School) and K. Obata (Department of Internal Medicine, Hyogo College of Medicine) for expert technical support.

Correspondence should be addressed to Dr. Yasuko Kitao, Department of Neuroanatomy, Kanazawa University Medical School, 13-1 Takara-machi, Kanazawa City 920-8640, Ishikawa, Japan. E-mail: kitao@nanat.m.kanazawa-u.ac.jp.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.4029-03.2004

Copyright © 2004 Society for Neuroscience 0270-6474/04/241486-11\$15.00/0

strategy contributing to Purkinje cell survival in development might also lead to recognition of protective mechanisms relevant to pathophysiological situations.

In this report, we demonstrate that expression of ORP150 in the cerebellum occurs especially in Purkinje cells early after birth. Purkinje cell death observed in this developmental period was correlated with induction of ORP150, potentially representing incomplete protection attributable to insufficient endogenous expression of ORP150, compared with other cell types, such as astrocytes (Tamatani et al., 2001). Consistent with this concept, transgenic (Tg) mice with targeted neuronal overexpression of ORP150 displayed decreased Purkinje cell death and increased numbers of Purkinje cells in the cerebellum (with associated changes in cerebellar function), whereas the opposite was observed in mice heterozygous for deletion of the ORP150 gene (ORP150<sup>+/-</sup>; note that ORP150<sup>-/-</sup> mice display an embryonic lethal phenotype). These data suggest the role of ER stress, through induction of ORP150, and, potentially, other factors in modulating Purkinje cell vulnerability during development and postnatally in stress responses.

## Materials and Methods

**Animals.** Mice deficient in ORP150 were originally generated by Kitao et al. (2001). Germ line transmission of the mutationally inactivated ORP150 gene was achieved, and mice were backcrossed into the C57BL/6 strain (N10). Genotype assignment of offspring was determined by Southern blotting of genomic DNA from tails. Transgenic mice with targeted neuronal expression of wild-type ORP150 were made using the platelet-derived growth factor (PDGF) B-chain promoter (Sasahara et al., 1991). The latter animals were made and characterized as described (Tamatani et al., 2001). Offspring that carried the transgene were identified by Southern blotting and bred into the C57BL/6 strain (N10).

**Histochemistry.** Animals were perfused with paraformaldehyde (4%) under deep anesthesia, and brains were cut into parasagittal slices on a cryostat. Sections were processed for cresyl violet staining or for immunohistochemistry using anti-rabbit human ORP150 IgG (5 µg/ml; Kuwabara et al., 1996; Kitao et al., 2001; Ozawa et al., 2001), monoclonal mouse anti-calbindin D<sub>28k</sub> IgG (Sigma, St. Louis, MO; 1:1000 dilution), mouse anti-growth arrest- and DNA damage-inducible gene 153/CHOP (C/EBP-homologous protein) IgG (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; 1:100 dilution), mouse anti-Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL) IgG (Stressgen Biotechnologies Co.; 1:500 dilution), rabbit anti-HSP72 (72 kDa heat shock protein) IgG (Stressgen Biotechnologies Co.; 1:500 dilution), or mouse anti-activated JNK1 (Jun kinase 1) IgG (Sigma; 1:100 dilution). The density and size of Purkinje cells were calculated as described previously (Baader et al., 1998). In brief, every 10th section (10 µm thickness) was evaluated by counting the number of Purkinje cells. The mean Purkinje cell (PC) number per section was derived from five sections. For area measurements, every third section (40 µm thickness) was measured in a digital captured image using Photoshop software (Adobe Systems, Tokyo, Japan). The cell density and size were also measured in the granular cell layer according to the protocol by Kakizawa et al. (2000). In brief, mice were perfusion-fixed at 30 d after birth. After the staining of a sagittal section (10 µm thickness) with cresyl violet, granular cell density in lobules 4 and 5 was counted. In each case, two observers without knowledge of the experimental protocol evaluated sections, and experiments were repeated at least three times.

**Assessment of neuronal cell death in vivo.** Parasagittal cerebellar sections were evaluated by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotinylated UTP nick end-labeling (TUNEL) staining (Trevigen Apoptotic Cell System 2 terminal deoxynucleotidyl transferase-fluor *in situ* apoptosis detection kit; Trevigen, Inc.) and immunostaining with antibody to activated caspase-3 (Genzyme, Boston, MA; 0.3 µg/ml final concentration). Calbindin D<sub>28k</sub>-positive neurons were identified as Purkinje cells and counted in sections in three fields (magnification, 40×; Fan et al., 2001). Purkinje cells staining positively by either the TUNEL method or with anti-activated caspase-3 antibody were scored as dead cells. Neu-

rons in the other parts of the brain were identified by immunostaining with anti-MAP2 antibody (Kitao et al., 2001). Neuronal cell death was assessed by an overlapping distribution of either TUNEL or activated caspase-3 staining and MAP2-positive cells. In each case (studies involving TUNEL assay and immunocytochemistry), two observers without knowledge of the experimental protocol evaluated sections and experiments were repeated at least three times.

**Cell culture of cerebellar neurons.** Primary cultures of cerebellar cells were prepared from cerebella of mouse pups (embryonic day 18) as described by Netzeband et al. (1999), followed by determination of genotype by PCR (Kitao et al., 2001). In brief, cerebellar cortices were isolated from the surrounding tissue and then minced and triturated without enzymatic treatment in saline containing (in mM): 137 NaCl, 5.4 KCl, 0.17 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.22 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 33.3 glucose, 43.8 sucrose, and 10 HEPES-NaOH, pH 7.3. Cells were plated on 15 mm round coverslips (~10<sup>5</sup> cells per slip) coated with poly-L-lysine (Sigma). Cultures were then placed on a feeder layer of astrocytes, which were incubated in DMEM (Sigma) supplemented with horse serum (heat-inactivated, 10%), fetal calf serum (heat-inactivated, 10%), and glucose (5 gm/l). The medium was exchanged twice weekly, and experiments were performed after cells had been maintained for 9 d *in vitro*.

**Assessment of Purkinje cell death in vitro.** Purkinje cell death triggered by either excitotoxicity or oxygen deprivation was assessed as described by Brorson et al. (1995). In brief, cells plated on chamber slides were exposed to either AMPA (30 µM; Sigma) or vehicle (PBS) dissolved in HEPES-buffered saline containing tetrodotoxin (0.5 µM) and bicuculline (20 µM) for 20 min, as described (Brorson et al., 1995). After exchange of the medium, cells were further maintained under normoxic conditions for up to 24 hr. To determine cell viability in the setting of oxygen deprivation, cultures were either exposed to hypoxia, using a controlled environment chamber (Ogawa et al., 1990), or maintained in normoxia for up to 24 hr. In each experiment, cultures on chamber slides, treated in the same manner, were immunostained with antibody to calbindin D<sub>28k</sub>. Calbindin D<sub>28k</sub>-positive and -negative cells were counted to achieve totals of >100 for each condition by a blinded evaluator. Survival of calbindin D<sub>28k</sub>-positive neurons under each condition was calculated as relative survival based on the quotient of calbindin D<sub>28k</sub>-positive cells under that condition divided by calbindin D<sub>28k</sub>-positive cells present under control conditions. Similarly, the specific survival of calbindin D<sub>28k</sub>-negative neurons under each condition was calculated as relative survival based on the quotient calbindin D<sub>28k</sub>-negative cells under that condition divided by calbindin D<sub>28k</sub>-negative cells under control conditions. No qualitative change in the appearance of the calbindin D<sub>28k</sub> staining pattern was observed in surviving neurons. Survival of calbindin D<sub>28k</sub>-positive or -negative cells was determined by at least three separate experiments.

**Western blot and analysis.** Levels of ORP150 antigen in tissue extracts were determined semiquantitatively by immunoblotting, as described (Kuwabara et al., 1996). Tissue extracts were prepared in PBS containing NP-40 (1%), and proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene difluoride paper, followed by incubation with either anti-human ORP150 antibody (1 µg/ml) or anti-human β-actin antibody (1000× dilution; Sigma), the latter as an internal control. Where indicated, Western blotting using anti-KDEL monoclonal antibody (Stressgen Biotechnologies Co.; 0.2 µg/ml) was used to assess levels of GRP78 (78 kDa glucose-regulated protein; Ozawa et al., 1999). Densitometric evaluation was employed to assess ORP150 antigen using imaging software (Adobe Photoshop).

**Behavioral studies.** Mice were subjected to behavioral analysis 30 d after birth. After identification of genotypes (see above), animals were subjected to open-field and rotor rod tests. During the open-field test, animals were allowed to search freely in a square acrylic box (30 × 30 cm) for 20 min. The light attached to the sealing of the enclosure was on during the first 10 min (light period) and off during the later 10 min. On each x and y bank of the open field, two infrared rays were attached 2 cm above the floor at 10 cm intervals, making a flip-flop circuit between the two beams. The total number of beam crossings was counted for 10 min as traveling behavior of the animal (locomotion). On the x bank, the other 12 infrared rays were set 5 cm above the floor at 3 cm intervals, and



the total number of beam crossings was counted for 10 min as rearing behavior (rearing). The enclosure was washed with water and then 70% ethanol between each test to avoid the smell, which interferes with mouse behavior. In the rotor rod test, an animal was placed on a drum that was turned at a speed of 2.5 rpm for 30 sec. If the animal fell during the interval, the latency was recorded. If the mouse could maintain its position, the speed was accelerated by 2.5 rpm every 30 sec; i.e., to 5, 7.5, and 10 rpm at 30 sec intervals. Falling latency was then recorded. Each trial was repeated three times, and the mean latency of three trials was calculated for each mouse. Student's *t* test was used for statistical comparison.

**Electrophysiological analysis.** Parasagittal cerebellar slices (250  $\mu$ m thickness) were prepared from ORP150<sup>+/-</sup>, ORP150<sup>-/+</sup>, or Tg ORP150 mice as described (Kano et al., 1995). Whole-cell recordings were made from visually identified Purkinje cells using an upright microscope (BX50WI; Olympus Optical, Tokyo, Japan) at 31°C. Resistance of patch pipettes was 3–6 M $\Omega$  when filled with an intracellular solution composed of (in mM): 60 CsCl, 10 Cs gluconate, 20 TEA-Cl, 20 BAPTA, 4 MgCl<sub>2</sub>, 4 ATP, and 30 HEPES, pH 7.3, adjusted with CsOH. Pipette access resistance was compensated by 70–80%. Composition of the standard bathing solution was (in mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgSO<sub>4</sub>, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, and 20 glucose, bubbled with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>. Bicuculline (10 mM) was always added to block inhibitory synaptic transmission. Ionic currents were recorded with an Axopatch 1D patch-clamp amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA). Signals were filtered at 2 kHz and digitized at 20 kHz. On-line data acquisition and off-line data analysis were performed using PULSE software (HEKA). Stimulation pipettes (5–10 mm tip diameter) were filled with standard saline and used to apply square pulses for focal stimulation (duration, 0.1 msec; amplitude, 0–90 V). Climbing fibers were stimulated in the granule cell layer 50–100  $\mu$ m away from the Purkinje cell soma.

**Statistical analyses.** Unless indicated otherwise, statistical analysis was performed by either ANOVA followed by multiple-comparison analysis using the Newman–Keuls equation or two-way ANOVA followed by multiple-contrast analysis. Where indicated, data were analyzed by  $\chi^2$  analysis.

## Results

### Expression of ORP150 in developing brain

Immunoblotting was performed to compare levels of ORP150 in different regions of developing mouse brain. Expression of ORP150 in cerebral cortex (Fig. 1A), caudate putamen (Fig. 1B), and hippocampus (Fig. 1C) displayed a small, although nonsignificant, rise from the time of birth to postnatal days 8–20, when an apparent plateau was reached. Immunohistochemical analysis revealed low levels of ORP150 antigen in a range of neurons in the latter brain subregions on postnatal days 1, 4, and 10 (Fig. 1F–H, K–M, P–R, respectively). In contrast, ORP150 peaked 4–6 d after birth in cerebellum, with levels significantly above the baseline, by threefold to fivefold, on days 4–8 (Fig. 1D). Cerebellar ORP150 antigen detected immunohistochemically showed a parallel rise on postnatal day 4 (Fig. 1N) compared with days 1 and 10 (Fig. 1I, S). On the basis of Nissl staining of adjacent slices, ORP150 was localized predominantly to the Purkinje cell layer (Fig. 1T, V). Consistent with previous reports (Stacchiotti et al., 1997; Calabrese et al., 2002), inducible-type HSP70 was also expressed in the Purkinje cell layer (Fig. 1U). Another class of molecular chaperones, GRP78 and GRP94, displayed very low-level expression using anti-KDEL antibody in the cerebellum 4 d after birth (Fig. 1W) (Kitao et al., 2001). Expression of stress-related proteins, such as JNK (Urano et al., 2000) and CHOP (Wang et al., 1996), was also virtually undetectable on postnatal day 4 (Fig. 1X, Y, respectively).

In view of the role of ORP150 in stress-mediated neuronal cell death (Kitao et al., 2001; Tamatani et al., 2001), we examined whether there was a relationship between ORP150 expression and induction of ORP150 in the developing cerebellum. Immu-

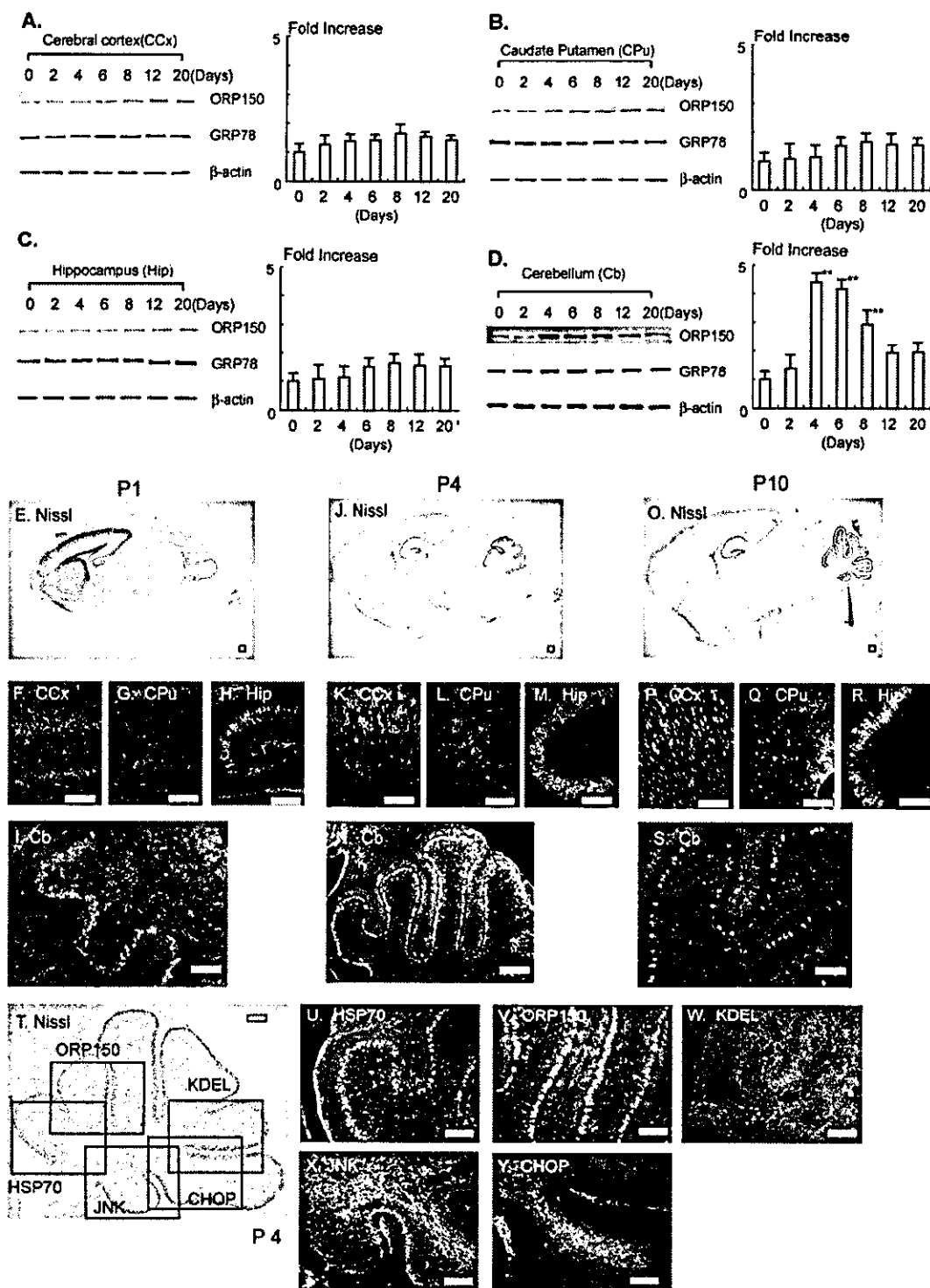
nohistochemical analysis with antibody to activated caspase-3 and TUNEL staining both showed ~2–3% positive neurons (i.e., MAP2-positive cells) in cerebral cortex, caudate putamen, and hippocampus (Fig. 2A–C). In contrast, there is an increase in cells labeled with activated caspase-3 antigen, the latter defined as Purkinje cells based on immunoreactivity with calbindin D<sub>28k</sub> (Brorson et al., 1995), 4–6 d after birth (Fig. 2D, E–H). DNA fragmentation, displayed by TUNEL assay, followed the increase in activated caspase-3 antigen (Fig. 2D, I–L). These data indicate that ORP150 expression appears to be maximal at a time corresponding to programmed death of Purkinje cells.

### Expression of ORP150 in cerebellum in genetically manipulated mice and the effect on Purkinje cell death

Our previous work demonstrated a protective effect of ORP150 on neuronal viability in the settings of ischemia and excitotoxicity. Thus, expression of ORP150 in Purkinje cells at a time corresponding to induction of cell death could denote insufficient expression of endogenous ORP150 to exert a protective effect. Alternatively, the function of ORP150 in the cerebellum might be quite different from what has been observed elsewhere (Tamatani et al., 2001). To address these issues, we turned to genetically manipulated mice: heterozygous for deficiency of ORP150 (ORP150<sup>-/-</sup>) and heterozygous transgenic with neuronal expression of ORP150 driven by the PDGF B-chain promoter (Tg ORP150).

Immunoblotting was performed to assess ORP150 antigen levels in ORP150<sup>+/-</sup>, wild-type (ORP150<sup>+/+</sup>), and Tg ORP150 mice in the cerebellum (Fig. 3). ORP150<sup>+/-</sup> animals displayed a relatively constant low level of ORP150 antigen up to 30 d after birth (Fig. 3A), compared with intermediate levels (following the expression pattern observed in Fig. 2D) in non-Tg littermates (wild-type; Fig. 3H) and constant high levels in Tg ORP150 animals (Fig. 3P). The latter were maintained up to postnatal day 120 (data not shown). Immunohistochemical analysis using antibodies to calbindin D<sub>28k</sub> and ORP150 showed decreased expression of ORP150 antigen in the Purkinje cell layer from ORP150<sup>+/-</sup> mice (Fig. 3B–G). Non-Tg littermates displayed time-dependent ORP150 induction, peaking at 4–6 d after birth (Fig. 3I–N). Tg ORP150 mice displayed uniform and strong staining in the Purkinje cell layer (Fig. 3Q–V). The latter high level of ORP150 expression was maintained at the latest time point evaluated, 30 d (data not shown).

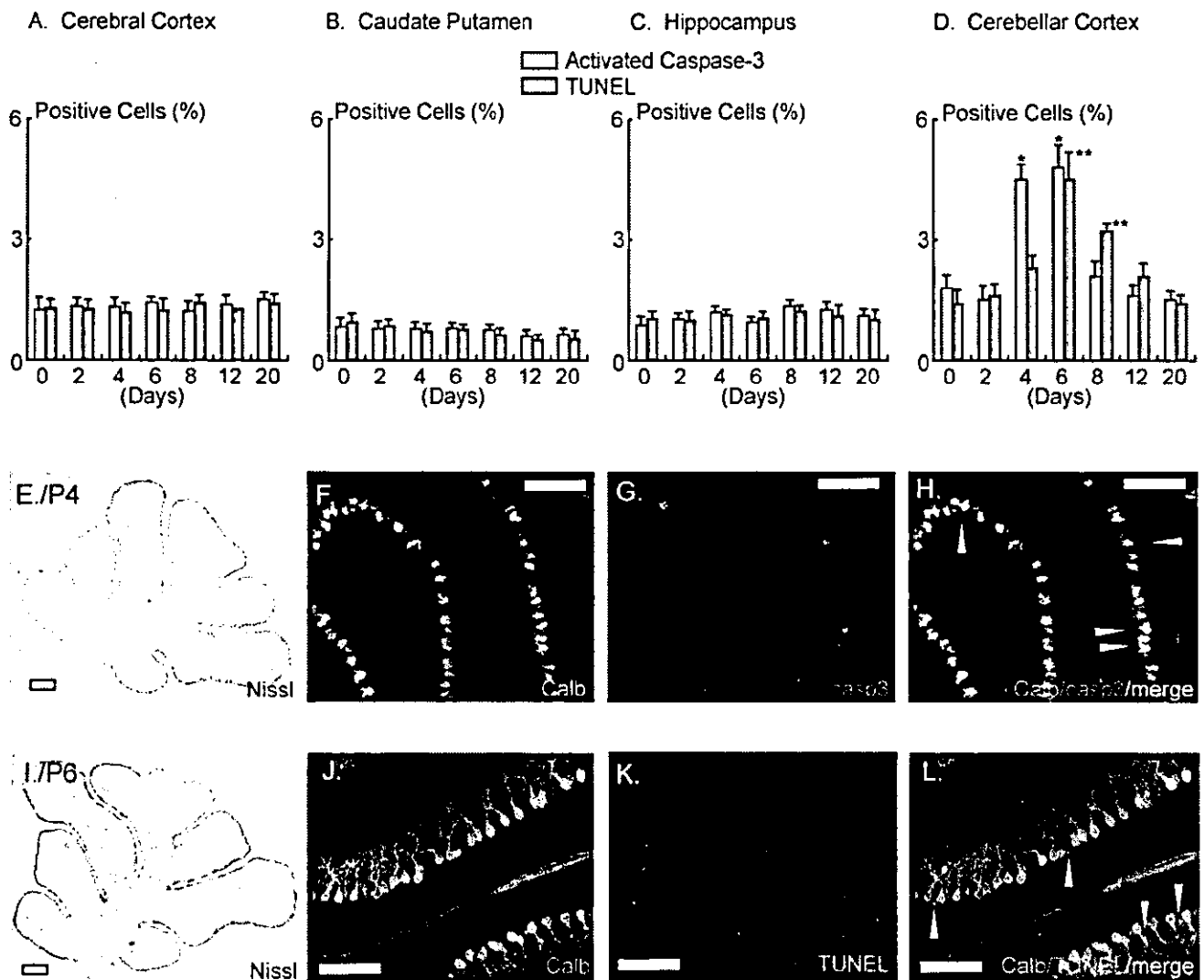
The key issue was to correlate levels of ORP150 expression with induction of apoptosis in the Purkinje cell layer, on the basis of TUNEL assay (Migheli et al., 1995) and immunostaining with antibody to activated caspase-3 (Selimi et al., 2000). In ORP150<sup>+/-</sup> mice, cell death in the Purkinje cell layer was apparent by TUNEL analysis [Fig. 4A–C, postnatal day 6 (P6), P10, arrowheads] and immunohistochemical staining with antibody to activated caspase-3 (Fig. 4D, P4, arrowheads). Both TUNEL (Fig. 4F–H, arrowheads) analysis and immunostaining (Fig. 4I, arrowheads) showed that signals related to Purkinje cell death tended to be fewer in wild-type littermates (ORP150<sup>+/+</sup>), although this difference was not statistically significant. Such evidence of programmed cell death in wild-type and ORP150<sup>+/-</sup> animals was strongly suppressed in Tg ORP150 mice (Fig. 4K–N). Image analysis demonstrated a significant reduction in TUNEL- and caspase-3-positive cells from Tg ORP150 animals on days 4–6, compared with wild-type and ORP150<sup>+/-</sup> animals (Fig. 4P, Q). Even by postnatal day 12, there were greater numbers of TUNEL-positive nuclei in the cerebellum of ORP150<sup>+/-</sup> animals compared with wild-type animals (Fig. 4P). The sup-



**Figure 1.** Expression of ORP150 in brain during postnatal development. *A–D*, Protein extracts prepared from cerebral cortex (CCx; *A*), caudate putamen (Cpu; *B*), hippocampus (Hip; *C*), and cerebellum (Cb; *D*) during development (0–20 d after birth) were subjected to Western blotting using antibody to ORP150 (top lanes), GRP78 (middle lanes), or β-actin (bottom lanes). In each blot, densitometric analysis of the ORP150 band intensity was performed and expressed by fold increase versus that on day 0; *n* = 6 per time point. \*\**p* < 0.01, multiple-comparison analysis followed by ANOVA. *E–S*, Mouse brain was perfusion-fixed on P1, P4, and P10. Tissue was either stained with cresyl violet (*E, J, O*) or immunostained with antibody to ORP150 (*F–I, K–N, P–S*). *T–Y*, Mouse brain (P4) was stained with cresyl violet (*T*). Adjacent sections were stained with antibody to inducible-type HSP70 (*U*), ORP150 (*V*), KDEL (which recognizes both GRP78 and GRP94; *W*), activated JNK (*X*), or CHOP (*Y*). Orientation of *U–Y* is indicated as an open box in *T*. Scale bars, 100 μm. Images representative of six experiments are shown.

pression of Purkinje cell death was generally observed in cerebellum because there were no anatomical differences (i.e., vermis or hemisphere) in the frequency of either TUNEL- or activated caspase-3-positive signals (data not shown).

We reasoned that if Tg ORP150 mice displayed strongly attenuated evidence of apoptosis in the Purkinje cell layer, then there might also be a difference in cell number in the cerebellum. The number of calbindin D<sub>28k</sub>-positive cellular profiles was used to

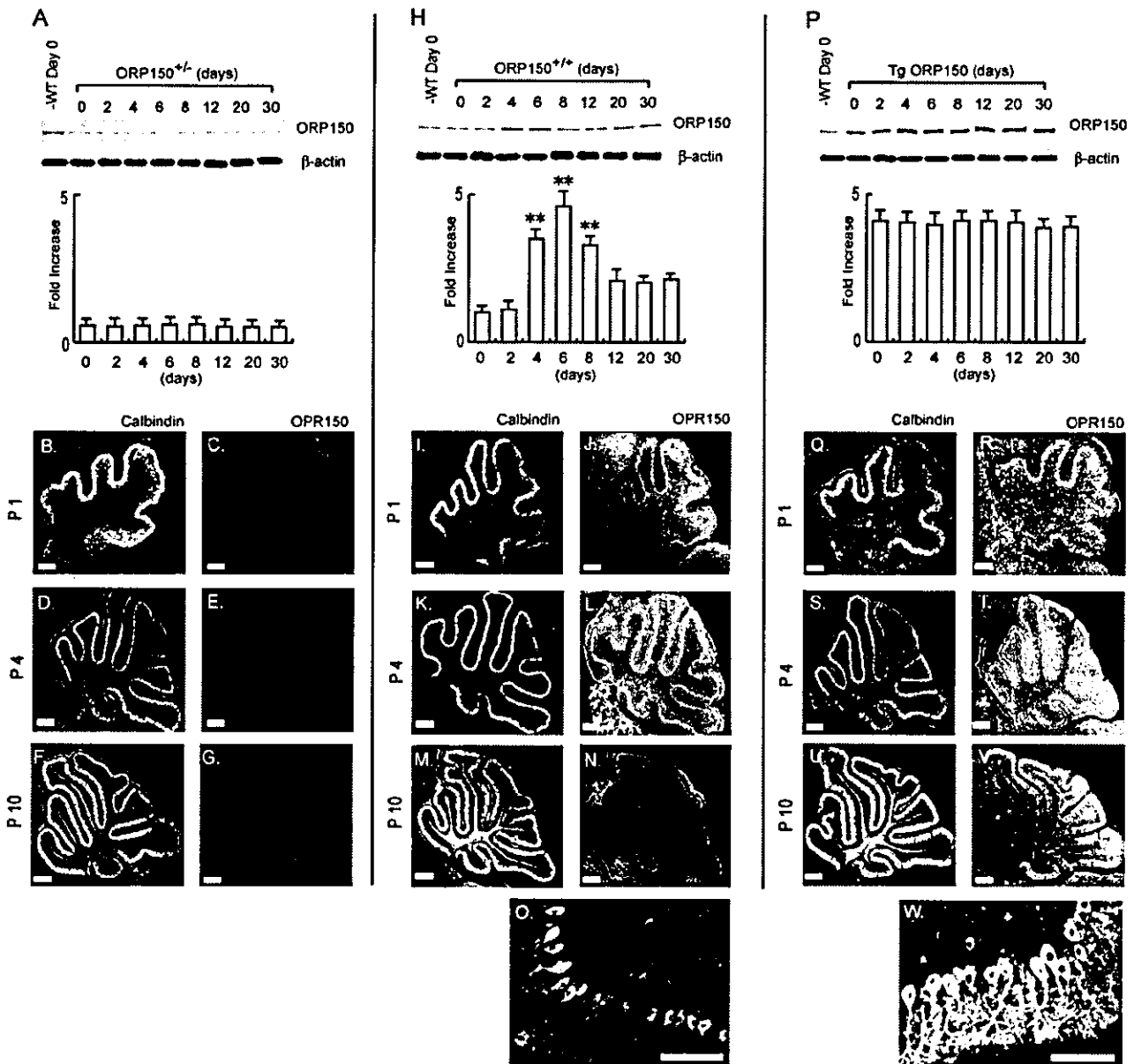


**Figure 2.** Cell death in the postnatal developing brain. *A–D*, Mouse brain was perfusion-fixed 0–20 d after birth. Cerebral hemispheres were then stained with antibody to activated caspase-3 or by the TUNEL method. The same sections were also visualized with either antibody to MAP2 staining (for *A–C*; data not shown) or calbindin D<sub>28k</sub> (for *D*; data not shown) to identify neurons (*A–C*) or Purkinje cells (*D*). Open bars represent the percentage of activated caspase-3-positive cells also positive for MAP2 (*A–C*) or calbindin D<sub>28k</sub> (*D*); shaded bars represent TUNEL-positive cells in each population;  $n = 6$  per experimental condition. \*\*\* $p < 0.01$  by multiple-comparison analysis followed by two-way ANOVA, compared with the values at day 0. *E–H*, Cerebellar sections prepared 4 d after birth were stained with cresyl violet (*E*), antibody to calbindin D<sub>28k</sub> (Calb; *F*), or activated caspase-3 (casp3; *G*). The merged image of *F* and *G* is shown in *H*. *I–L*, Cerebellar sections prepared 6 d after birth were stained with either cresyl violet (*I*), antibody to calbindin D<sub>28k</sub> (*J*), or using the TUNEL method (*K*). The merged image of *J* and *K* is shown in *L*. Scale bars, 100  $\mu\text{m}$ . Images representative of six experiments are shown.

identify Purkinje cells (Fan et al., 2001). Compared with wild-type controls (arbitrarily assigned a value of 1), there was a significant increase in Purkinje cells in Tg ORP150 mice (~30–40%). In contrast, there was a decrease in Purkinje cells (~20%) in ORP150<sup>+/-</sup> mice that did not achieve significance. Although assessed in different anatomical regions (Baader et al., 1998), no significant difference was observed in either population or cell size between vermis and hemisphere (data not shown). These data indicate that expression of ORP150 in Purkinje cells appears to have a protective effect in terms of cell death during early development, inconsistent with a previous report, which suggested that overexpression of human bcl-2 suppressed programmed Purkinje cell death (Zanjani et al., 1996). In contrast, there was no significant difference in either numerical density or size of granular cells (data not shown), which was assessed by the protocol described by Kakizawa et al. (2000).

#### ORP150 suppresses Purkinje cell death *in vitro*

To further analyze the effect of ORP150 on the Purkinje cell response to cell stress, cultured Purkinje cells were exposed to either hypoxia (Fig. 5A) or AMPA (Fig. 5C) for up to 24 hr, followed by assessment of cell viability using immunohistochemical criteria (Brorson et al., 1995). Incubation of cultured Purkinje cells under hypoxic conditions (Fig. 5A) or in the presence of AMPA (Fig. 5C) decreased the number of calbindin D<sub>28k</sub>-positive cellular profiles (compared with untreated controls). Cultures prepared from Tg ORP150 mice displayed relative resistance of calbindin D<sub>28k</sub>-positive cells to each of these stimuli, compared with Purkinje cells from ORP150<sup>-/-</sup> or wild-type mice. Although we predicted that there might be a notable difference in the response to stress between calbindin D<sub>28k</sub>-positive cells from ORP150<sup>-/-</sup> mice and those from non-Tg mice, the former potentially showing greater vulnerability to cell death



**Figure 3.** Expression of ORP150 in cerebellum of genetically manipulated mice. Immunoblotting was performed on protein extracts from ORP150<sup>+/-</sup> mice (A), non-Tg littermates (ORP150<sup>+/+</sup>; H) or Tg ORP150 mice (P) at postnatal days 0–30 using antibody to ORP150 (top lanes) or  $\beta$ -actin (bottom lanes). In each panel, densitometric analysis of ORP150 band intensity was performed, and statistical analysis of four representative experiments is shown. Values are expressed as fold increase versus antigen level of ORP150 in non-Tg littermates at the time of birth;  $n = 6$  per time point.  $**p < 0.01$ , multiple-comparison analysis followed by ANOVA. B–G, ORP150<sup>+/-</sup> mice were perfusion-fixed at P1, P4, and P10. Cerebellar hemispheres were then subjected to immunostaining using antibody to calbindin D<sub>28k</sub> (B, D, F) or ORP150 (C, E, G). I–O, ORP150<sup>+/-</sup> mice were subjected to immunostaining for calbindin D<sub>28k</sub> (I, K, M) and ORP150 (J, L, N) antigen. O, Higher magnification of N. Q–W, Tg ORP150 mice were subjected to immunostaining for calbindin D<sub>28k</sub> (Q, S, U) or ORP150 (R, T, V). W, Higher magnification of V. Scale bar, 100  $\mu$ m. Images are representative six experiments.

compared with the latter, this difference proved barely discernible in cell culture. Micrographs (Fig. 5E–J) of wild-type cultures display representative fields revealing calbindin D<sub>28k</sub>-positive cells under quiescent conditions (Fig. 5E,H) or after exposure to hypoxia (Fig. 5F) or AMPA (Fig. 5I). Note the evident decrease in calbindin D<sub>28k</sub>-positive cells in cultures from wild-type animals compared with results using cultures from Tg ORP150 mice (Fig. 5G,J).

In contrast, calbindin-negative cells, which mostly represent granular neurons (Brorson et al., 1995), were relatively resistant to both hypoxia (Fig. 5B) and AMPA (Fig. 5D), regardless of mouse genotype, compared with calbindin D<sub>28k</sub>-positive neu-

rons. Because expression of ORP150 was similarly decreased in calbindin D<sub>28k</sub>-positive and -negative neuronal populations *in vitro* from ORP150<sup>+/-</sup> mice (data not shown) and similarly increased in calbindin D<sub>28k</sub>-positive and -negative neuronal populations *in vitro* from Tg ORP150 mice (data not shown), these data suggest a special effect of ORP150 on Purkinje cell viability.

**Behavioral and cerebellar function in Tg ORP150 mice**

To assess whether suppression of neuronal cell death in Tg ORP150 mice altered cerebellar function in a more global way, behavioral testing was performed using two motor tasks, open-field (Fig. 6A) and rotor rod (Fig. 6B) tasks (Shahbazian et al.,