

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

神経細胞死による高次脳機能障害に対する多価不飽和脂肪酸の効果

分担研究者 山嶋哲盛

種々の脳疾患に合併する神経細胞死は記憶力、判断力および集中力の低下などの高次脳機能障害をもたらす。本障害は目に見えない、隠れた障害であるため障害者に対する社会的な救済措置は限られており、トータルな国家的損出は図り知れないものがある。現在、学術的には神経細胞の移植療法が研究開発され、神経栄養因子や神経保護物質の投与が検討されている。しかし、前者は開頭手術を要する上、後者も多くが高分子であるため血液-脳関門を通過し得ないという理由で脳内への直接投与を前提としており、健康長寿やサプリメントの観点からは現実的ではない。したがって、神経細胞が死に至る以前に、その原因の一つである神経細胞膜の過酸化障害を改善することは予防的治療となり得る。すなわち、脳再生を促すことが可能な健康食品の継続摂取は、「脳を守り、育む」上できわめて現実的でしかも確実な手法である。

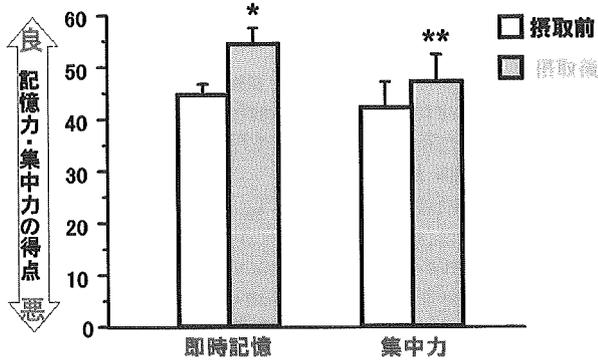
本研究においては、必須脂肪酸であるアラキドン酸とドコサヘキサエン酸をそれぞれ毎日240mg、3ヶ月間投与し、投与前後に高次脳機能进行评估した。プラセボとしてオリーブ油を用いた。高次脳機能評価には学習効果が非常に少ないアーバンス神経心理テスト日本版(山嶋哲盛他:脳と神経:54:463-471,'02)を投与前後に施行し、各項目(即時記憶、図形、言語、注意力、遅延記憶)の粗点変化を統計解析した。対象は、60歳以上の正常高齢者、発症後5年以上を経過した器質的脳疾患およびアルツハイマー病の各群10例およびプラセボ群10例の計40例とした。プラセボ群とアルツハイマー病では多価不飽和脂肪酸による有意の改善はなかった。しかし、正常高齢者では即時記憶と集中力が有意に改善した。さらに、器質的脳疾患では治療前には障害が完全に固定していたにもかかわらず、即時記憶と遅延記憶が著明な改善を示した。

高次脳機能障害は従来いかなる方法でも改善することは不可能で、本研究の成果は国際的にも初めてのもので、厚生行政上のインパクトも少なくはないと思われる。

A. 研究目的

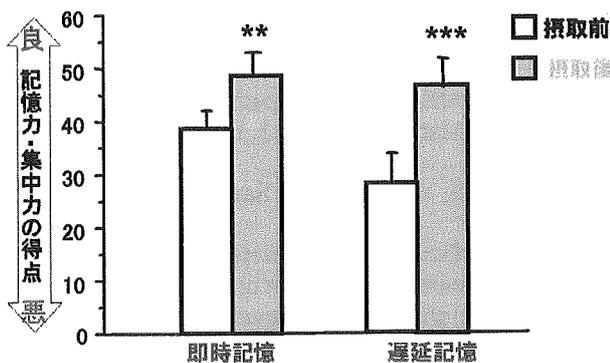
アラキドン酸は、魚介類や母乳、レバー、卵黄などに多く含まれる多価不飽和脂肪酸である。よく知られるドコサヘキサエン酸(DHA)やエイコサペンタエン酸(EPA)と同じく、脳の発達に重要な役割を果たすとして注目されている。乳幼児や老人においてはアラキドン酸は体内において必要十分量が合成できないため、サプリメントや人工ミルク等から直接摂取するのが望ましい。

医療の発達により、脳卒中や頭部外傷から生還して社会復帰する患者が増えている。見た目は元気で言語に不自由していても、家庭では電話の内容を覚えられなかったり、おっちょこちょいになったりする。社会的には、記憶力や注意力、認知機能が低下して仕事環境に適応することが難しい事例が近年増えており、これらの後遺症に対しては有効な治療法が皆無であるだけに大きな社会問題となっている。近年、外来性の神経幹細胞の投



【図1】健常高齢者の記憶力と集中力に対するARAおよびDHA含有油脂の効果

*, **: 摂取前に対して統計学的に有意差あり(p<0.05, p<0.01)



【図2】器質的脳障害患者の記憶力に対するARAおよびDHA含有油脂の効果

, *: 摂取前に対して統計学的に有意差あり(p<0.01, p<0.001)

与や内在性の神経再生の薬物賦括療法が有効な治療法として注目されているが、いずれも実用化していない。

脳の器質的疾患による膜脂肪酸への過酸化ストレスは、シナプス伝達効率を悪くし神経機能障害の原因となる。そこで、最も酸化されやすいアラキドン酸とDHAをサプリメントにより摂取すれば、高次脳機能障害を改善し得るのではないかという仮説に基づき、アラキドン酸とDHAから成る新規の組成物を用いてパイロットスタディを行った。

B. 研究方法

アラキドン酸とDHAからなる混合製剤を毎日それぞれ240mg、3ヶ月間投与し、その前後に高次脳機能を評価した。プラセボ群に対してはオリーブ油を用いた。高次脳機能

評価には学習効果が非常に少ないアーバンス神経心理テスト日本版(脳と神経: 54:463-471, '02: 添付の論文)を施行し、各項目(即時記憶、図形、言語、注意力、遅延記憶)の粗点変化を統計解析した。対象は、60歳以上の正常高齢者、発症後5年以上を経過した器質的脳疾患、およびアルツハイマー病の計30例とした。

C. 研究結果

健常高齢者にアラキドン酸およびDHA含有油脂を3ヶ月間摂取させたところ、即時記憶と集中力が摂取前に比べて有意に改善した(図1)。

次に、脳卒中や脳挫傷等の後遺症により、10年以上脳機能が改善しなかった器質的脳障害患者にアラキドン酸とDHAを3ヶ月間摂取させたところ、摂取前に比べて即時記憶と遅延記憶が有意に改善した(図2)。なお、プラセボ群とアルツハイマー病群では、いずれの項目においても有意の改善はみられなかった。

D. 考察

本研究の成果をまとめると、多価不飽和脂肪酸はアルツハイマー病における高次脳機能障害に対しては全く改善効果がみられなかった。しかし、正常高齢者では即時記憶と集中力が有意に改善した。一方、器質的脳疾患では治療前には障害が完全固定していたにもかかわらず、即時記憶と遅延記憶が著明な改善を示した。

戦後、世界最下位であった我が国の平均寿命は短期間のうちに他の先進諸国を追い越し、1984年から現在にいたるまで世界一の座を維持している。日本が世界最長寿国になった最大の理由は「感染症の克服」と「バランスの取れた日本食」にその秘密があるとされている。我が国においては欧米諸国に比べて総認知症患者に占めるアルツハイマー性認知症の割合が少ないことが知られている。これはひとえに日本人が欧米人に比べて圧倒的に多量の魚を食べるため、神経細胞の膜に取り込まれる良質の多価不飽和脂肪酸の摂取量が当然多くなり、神経細胞が過酸化ストレスから守られているためと推定される。

しかし、現在我が国においては、小児では「就学困難」「切れる子」「情緒不安定」、青壮年では脳卒中や頭部外傷による高次脳機能障害(いわゆる若年性認知症)、高齢者で

は老人性認知症が問題となっている。これらの問題に共通する因子として、食生活の欧米化や環境ホルモンの影響による神経細胞膜の過酸化障害が示唆されている。すなわち、魚に含まれる良質な脂肪酸の摂取が減る一方で、スナック菓子や食用油に微量含まれる酸化に弱い不飽和脂肪酸が細胞膜にダメージを与えていることが指摘されている。

身近にいる癌患者が化学療法を受けた場合にも、神経幹細胞の再生が阻害されるために同様の情緒不安定や学習・記憶障害などが見られる。しかし、これらの症状は一時的で、神経幹細胞の機能回復と共に症状は改善する。しかし、加齢に伴う生理的な現象として、あるいは脳卒中や脳外傷の後遺症として高次脳機能障害が見られる場合は、その回復は年単位に及び、終には固定的なものになってしまう。これは、神経幹細胞の再生能力に自ずと限界があるためと思われる。しかし、最近の研究成果で、ネズミにおいてアラキドン酸などの多価不飽和脂肪酸が神経幹細胞を賦活化し、LTPやP-300などの神経生理学的所見によって高次脳機能を改善し得ることが判明した。

我が国は高齢化人口の激増によって生産的な世代が漸減する一方で少子化が進んでおり、有効な対策がなされず今後さらに高次脳機能障害者が増加すると、21世紀の国家体制の維持をも揺るがしかねない。高次脳機能障害に対する多価不飽和脂肪酸の効果はそのまま老人性認知症の予防や治療にも応用し得るため、本研究の成果は高次脳機能障害者に大きな福音をもたらすであろう。

E. 結論

従来の研究報告で、アラキドン酸やDHAが神経細胞の伝達能力を高めたり、老齡ラットの学習・記憶力を改善したりする作用が確認されているが、実際に人間が服用して高次脳機能障害を回復する効果が明らかになったのは本研究が初めてである。疾患そのものは治癒したが社会生活に障害を遺す高次脳機能障害患者に対して、多価不飽和脂肪酸による脳再生療法が普及することが期待される。

F. 健康危機情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1: Morimoto N, Shimazawa M, Yamashima T, Nagai H, Hara H.

Minocycline inhibits oxidative stress and decreases in vitro and in vivo ischemic neuronal damage. *Brain Res.* 2005 May 17;1044(1):8-15. Epub 2005 Apr 13.

2: Shimazawa M, Yamashima T, Agarwal N, Hara H.

Neuroprotective effects of minocycline against in vitro and in vivo retinal ganglion cell damage. *Brain Res.* 2005 Aug 16;1053(1-2):185-94.

3: Tonchev AB, Yamashima T, Sawamoto K, Okano H. Enhanced proliferation of progenitor cells in the subventricular zone and limited neuronal production in the striatum and neocortex of adult macaque monkeys after global cerebral ischemia. *J Neurosci Res.* 2005 Sep 15;81(6):776-88.

4: Tonchev AB, Yamashima T. Differential neurogenic potential of progenitor cells in dentate gyrus and CA1 sector of the postischemic adult monkey hippocampus. *Exp Neurol.* 2006 Mar;198(1):101-13. Epub 2006 Jan 19.

5: Tonchev AB, Yamashima T, Sawamoto K, Okano H.

Transcription factor protein expression patterns by neural or neuronal progenitor cells of adult monkey subventricular zone. *Neurosci: (online)* 2006 March 31.

2. 学会発表

山嶋哲盛: The role of calpain in neurodegeneration. 第28回日本神経科学大会シンポジウム 平成17年7月27日(横浜)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

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

シナプス刺激による小胞体からのカルシウム放出活性は小脳プルキンエ細胞のシナプス可塑性に重要である。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プルキンエ細胞樹状突起内の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いだし、更に2週齢にのみ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。神経細胞樹状突起内の小胞体のカルシウム放出活性の発達段階による機能の変化を明らかにした。更に生体内での発火パターンに類似した短期バースト刺激によって誘導される10分程度持続する新たな短期のシナプス可塑性を見いだした。

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、小胞体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、特にIP3Rのカルシウム放出活性は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。本研究ではプルキンエ細胞樹状突起におけるカルシウムシグナル、特にカルシウム放出に注目し、生後発達過程における変化を調べた。刺激は平行線維の短期バースト刺激(50 Hzの頻度で5回)の繰り返しを用いた。この刺激を用いることで、細胞外からのカルシウム流入と細胞内カルシウムストアからのカルシウム放出を時間的に分離して観測できる。また、後シナプスでのカルシウム上昇はシナプス可塑性の成立に極めて重要な役割を果たしていることから、プルキンエ細胞樹状突起上に特徴的なカルシウム動態を誘導

する、この短期バースト刺激によってシナプス可塑性が誘導される可能性が考えられたので、検討を行った。

B. 研究方法

マウス小脳急性スライスを用い、プルキンエ細胞の細胞体からパッチクランプを行った。ACSF溶液(124 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 1.25 mM NaH₂PO₄, 20 mM D-glucose, 26 mM NaHCO₃, 10 μM bicuculline, 95% O₂ / 5% CO₂混合ガスで飽和)で記録チャンバー内を灌流しながら、全細胞記録モードで細胞内にカルシウム感受性色素(bis-fura-2)を含んだ電極内液(140 mM KCl, 10 mM Hepes, 4 mM NaCl, 4 mM MgATP, 4 mM NaGTP, 0.2 mM bis-fura-2; pH 7.3)を導入し、電気記録と同時にカルシウムイメージングを行った。

シナプス刺激にはスライス表面に置いたガラス電極を使用し、平行線維を刺激した。カルシウムイメージングは対物レンズからの落射照明で励起光を照射し、樹状突起における蛍光強度変化をCCDカメラで記録することで行った。

C. 研究結果

(1) カルシウム放出の生後発達に伴う変化

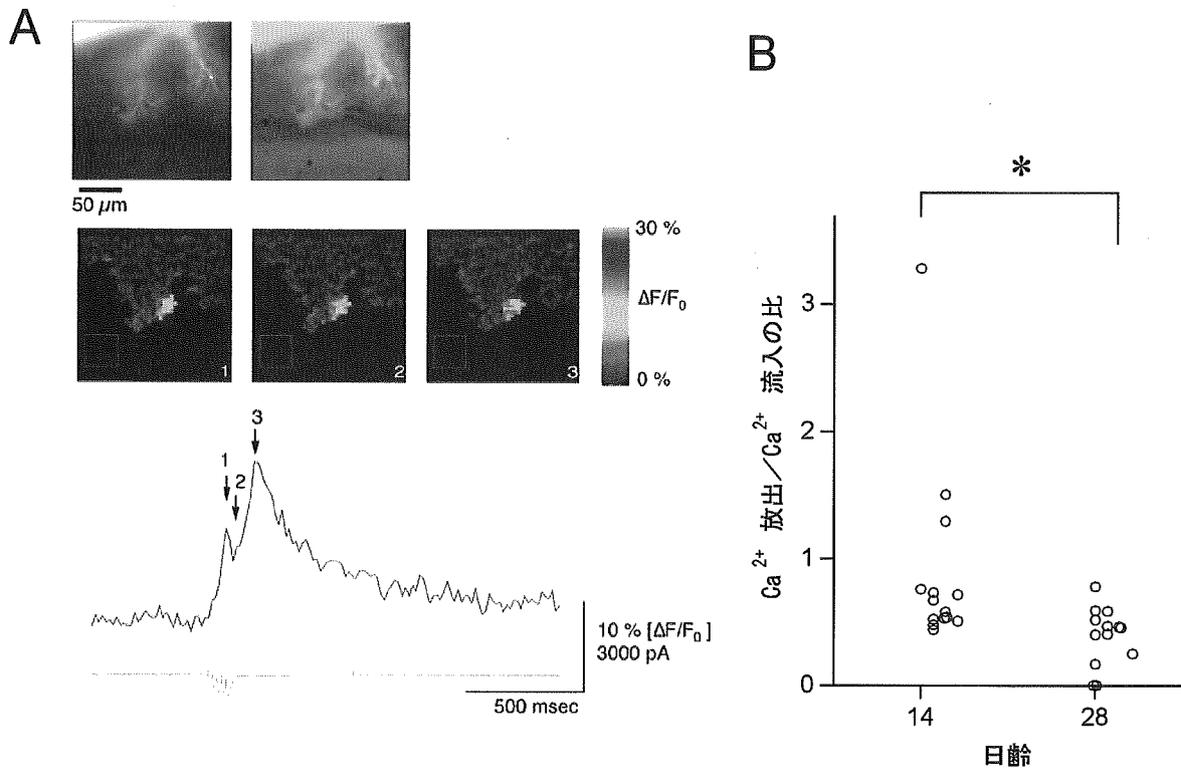


図1 平行線維刺激によるプルキンエ細胞樹状突起でのカルシウム上昇。(A) 2週齢においては二相性カルシウム上昇の遅いピーク(矢印3)は大きく、早いピーク(矢印1)よりも大きい例が多かった。上段の図は樹状突起部の蛍光画像(左)、及び同視野の微分干渉像との重ね合わせ(右)。右図ではスライス表面に置かれた刺激電極が見えている。中段の図はプロット中の各時点の蛍光強度変化を疑似カラーで示す。疑似カラー画像中のROI内の蛍光強度の時間変化(カルシウム濃度変化)を下段のグラフに示す。最下部の波形は膜電流記録。(B) 2週齢のプルキンエ細胞では4週齢に比べて有意に大きなカルシウム放出が観測された。

(1-1) 平行線維の短期バースト刺激(50 Hzの頻度で5回)によって誘導されるカルシウム上昇は、カルシウム流入によって構成される早いピークとそれに続くカルシウム放出による遅いピークからなる。マウスの週齢を様々に変えて実験を行うと、2週齢前後の幼弱な時期では遅いピークが早いピークに対して相対的に大きく、4週齢以降の小脳皮質が比較的成熟した時期では遅いピークは小さいことが分かった(図1A)。

(1-2) 薬理学実験によって細胞外からのカルシウム流入と細胞内カルシウムストアからのカルシウム放出を区別することを試みた。グループI代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)のアンタゴニストであるMCPG(1 mM)を投与することでカルシウム放出による遅いピークは消失した。MCPG投与前後のカルシウムパターンを比較することでカルシウム流入とカルシウム放出を分離して調べた結果、カルシウム放出は幼弱期のプルキ

ンエ細胞では高く、より成長した細胞では低いことが示された(図1B)。

(2) 平行線維の短期バースト刺激で誘導されるLTD

(2-1) 幼弱期である2週齢では、平行線維短期バースト刺激の反復(50 Hz 5回を1秒毎に10回反復)によって平行線維-プルキンエ細胞間シナプスにLTDが見られたが、より成長した4週齢ではLTDが誘導されなかった(図2)。更に2週齢においてはLTDの大きさには細胞ごとに差異があり、LTDの大きさはカルシウム放出の相対的な活性と有意な相関を示した。

(2-2) マウス1型IP3受容体の機能を阻害するモノクローナル抗体18A10をパッチ電極から細胞内に注入した所、カルシウム放出は減弱した。また、18A10導入によってLTD誘導が阻害された。すなわち、短期バースト刺激によるLTDの誘導にはカルシウム放出が必要

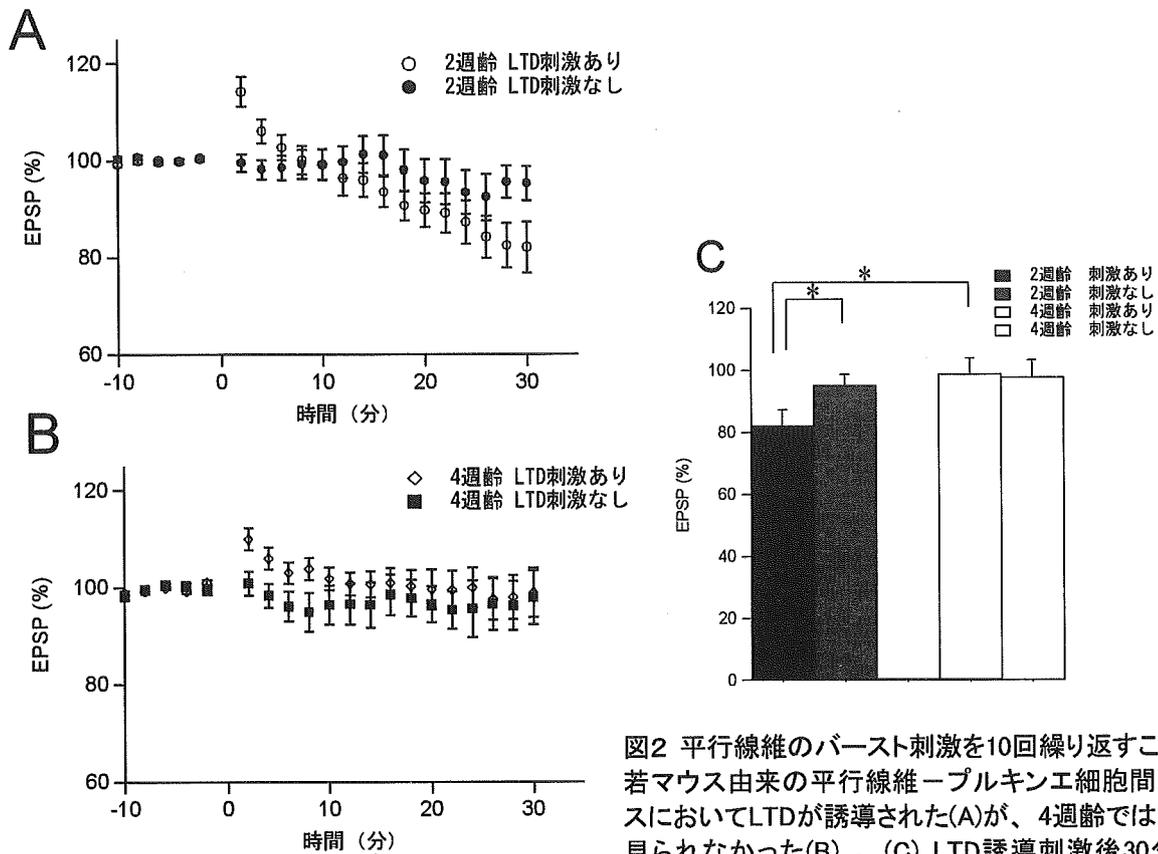


図2 平行線維のバースト刺激を10回繰り返すことで幼若マウス由来の平行線維-プルキンエ細胞間シナプスにおいてLTDが誘導された(A)が、4週齢ではLTDは見られなかった(B)。(C) LTD誘導刺激後30分でのEPSPの平均。

であり、両者には因果関係があることが示された。

(3) 平行線維の短期バースト刺激で誘導されるSTP

(3-1) 短期バースト刺激は反復回数を増やすと (50 Hz 5回を90回反復)、2週齢小脳スライス中の平行線維-プルキンエ細胞間シナプスにおいて、著明な短期増強 (short-term potentiation; STP) が観測された(図3)。

(3-2) STP 誘導によって Paired-pulse facilitation比 (PPF ratio) は刺激直後に上昇し、およそ20分間かけてゆっくりと刺激前の値に戻った。これはシナプス効率 (EPSPの大きさ) の変化と同様の経過をたどり、STPの発現が前シナプス性に起こっていることを示唆する。

(3-3) このSTPはプルキンエ細胞へのBAPTA導入によっても阻害されないこと、及びP/Q型カルシウムチャネルノックアウトマウスにおいても野生型と同様に観測されることから、後シナプスのカルシウム上昇に依存しないことが分かった。

この結果と上記のPPF実験から、短期バースト刺激によるSTPが前シナプス性に発現されることが強く示唆された。

D. 考察

本研究から以下のことが明らかにされた。

(1) プルキンエ細胞樹状突起において平行線維の短期バースト刺激で誘導されるカルシウム放出は、幼弱期 (2週齢前後) では大きく、成長とともに低下する。

(2) カルシウム放出が大きい2週齢前後では、短期バースト刺激の反復によって平行線維-プルキンエ細胞間シナプスにLTDが誘導された。カルシウム放出が小さい4週齢ではLTDは見られず、2週齢におけるLTDの大きさはカルシウム放出の活性と有意な相関を示した。

(3) 平行線維短期バースト刺激の反復回数を増やすと、前シナプス性のSTPが誘導された。短期バースト刺激を反復することで、幼弱期ではLTDが誘導され、より成熟した時期では誘導されないことから、幼弱期の大きなカル

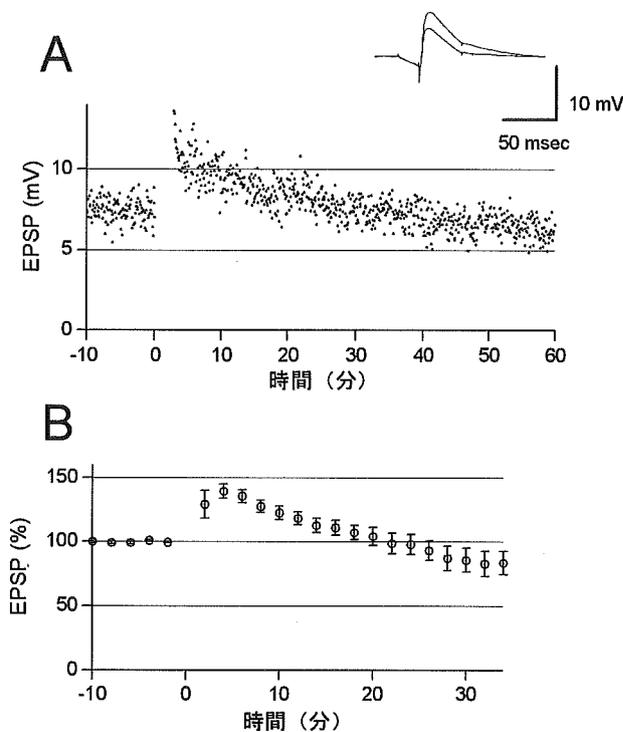


図3 平行線維のバースト刺激(50Hz, 5回)を1秒毎に90回反復して誘導された10-20分持続するSTP。(A)代表例。右上には誘導刺激前と誘導刺激5分後のEPSPを重ねて示す。(B)12例の平均。

シウム放出活性は小脳皮質の発達、回路網やシナプスの形成・制御などに重要な役割を果たしていることが示唆された。

成熟した平行線維-プルキンエ細胞間シナプスのLTD誘導によく用いられる平行線維と登上線維の同時刺激とは異なり、平行線維短期バースト刺激を60-120回反復することでもLTDが誘導され得ることがEilersらにより示されていた。本研究では、幼弱期においては10回の反復でもLTDが起こることから、このもう一つのLTD誘導経路が幼弱期においては活発に機能していることを示した。また、カルシウム放出活性とLTDの大きさが相関することから、幼弱期の高いカルシウム放出活性がこの時期のシナプス可塑性を制御する機構においてより大きな役割を果たしている可能性が示唆された。このバースト刺激によるLTD誘導の経路は、2週齢前後の小脳皮質における活発な神経回路の成長を支える重要な機構の一つである可能性が考えられる。本研究で用いた短期バースト刺激のパターン

は、感覚刺激によって誘起される生体内での平行線維の発火パターンと類似しており、実際にこのような可塑性が生体内で起こりうる可能性がある。また、この短期バースト刺激の反復回数を増やすとSTPが前シナプス性に誘導されることは、平行線維-プルキンエ細胞間シナプスはバースト刺激によって重層的に制御されていることを示している。

E. 結論

小脳プルキンエ細胞樹状突起における小胞体の機能、すなわちカルシウム放出活性の生後変化を明らかにした本研究は、今後の小脳皮質の生後発達に関する研究において、回路網の形成や調節、樹状突起や棘突起の形態変化における小胞体の役割を探る重要な基礎となる。また、生体内での発火パターンに類似した短期バースト刺激によって誘導される可塑性を解明したことは、小脳皮質が関与すると考えられている運動学習などの機構の研究に重要な寄与をすると考えられる。

F. 健康危機情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Toru Matsu-ura, Takayuki Michikawa, Takafumi Inoue, Atsushi Miyawaki, Manabu Yoshida, Katsuhiko Mikoshiba. Cytosolic inositol 1,4,5-trisphosphate dynamics during intracellular calcium oscillations in living cells. *The Journal of Cell Biology*, in press.
2. Kazumi Fukatsu, Hiroko Bannai, Takafumi Inoue, Katsuhiko Mikoshiba. 4.1N binding regions of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 342: 573-576 (2006).
3. Jun-Ichi Goto, Takafumi Inoue, Akinori Kuruma, Katsuhiko Mikoshiba. Short-term potentiation at the parallel fiber-Purkinje cell synapse. *Neuroscience Research*, 55: 28-33 (2006).
4. Hiroaki Kodama, Takafumi Inoue, Ryuichi Watanabe, Daisuke Yasutomi, Yutaka Kawakami, Satoshi Ogawa, Katsuhiko

Mikoshihba, Yasuo Ikeda, Masataka Kuwana. Neurogenic potential of progenitors derived from human circulating CD14⁺ monocytes. **Immunology and Cell Biology**, 84: 209-17 (2006).

5. Hiroaki Kodama, Takafumi Inoue, Ryuichi Watanabe, HidekataYasuoka, Yutaka Kawakami, Satoshi Ogawa, Yasuo Ikeda, Katsuhiko Mikoshihba, Masataka Kuwana. Cardiomyogenic potential of mesenchymal progenitors derived from human circulating CD14⁺ monocytes. **Stem Cells and Development**, 14: 676-686 (2005).

2. 学会発表

来馬明規, 井上貴文, 後藤純一, 二木啓, 御子柴克彦. P/Q型電位依存性カルシウムチャンネルノックアウトの小脳プルキンエ細胞シナプスにおける効果. 第28回日本神経科学大会, 横浜, 7月26-28日 (2005).

ほか

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

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 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|-----------|-----------|------|
| Bando Y., Katayama T., Taniguchi M., Matsuo N., Ishibashi T., Ogawa S., Tohyama M | RA410/Sly1 suppresses MPP+ and 6-hydroxydopamine induced cell death in SH-SY5Y cells. | Neurobiol. of Disease | 18 | 143-151 | 2005 |
| Ozawa K, Miyazaki T, Hori O, Kitao Y, Tamatani T, and Ogawa S | The ER chaperone 150 kDa Oxygen Regulated Protein (ORP150) improves insulin resistance in Type 2 Diabetes Mellitus. . | Diabetes | 54 | 657-663 | 2005 |
| Inagi R, Onogi H, Nangaku M, Ueyama H, Kitao Y, Ogawa S, Kurokawa K, Couser WG, and Miyata T. | Involvement of endoplasmic reticulum (ER) stress in podocyte injury associated with a novel transgenic model of serpinopathy. | Kidney International. | 68 | 2639-2650 | 2005 |
| Hori O, Miyazaki M, Tamatani T, Ozawa K, Takano K, Okabe M, Ikawa M, Hartmann M, Mai P, Stern M, Kitao Y, and Ogawa S | Deletion of SERP1/RAMP4, a component of the endoplasmic reticulum (ER) translocation sites, leads to ER stress | Mol. Cell. Biol. | In press. | | 2006 |
| Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K | Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration. | Nature | In press. | | 2006 |
| Zhu C, Xu F, Wang X, Shibata M, Uchiyama Y, Blomgren K, Hagberg H | Different apoptotic mechanisms are activated in male and female brains after neonatal hypoxia-ischaemia. | J Neurochem. | 96 | 1016-1027 | 2006 |
| Yoshida H, Kawane K, Koike M, Mori Y, Uchiyama Y, Nagata, S | Phosphatidylserine-dependent engulfment by macrophages of nuclei from erythroid precursor cells. | Nature | 434 | 754-758 | 2005 |
| Shimazawa M, Yamashima T, Agarwal N, Hara H | Neuroprotective effects of minocycline against in vitro and in vivo retinal ganglion cell damage | Brain Res. | 1053 | 185-194 | 2005 |
| Tonchev AB, Yamashima T, Sawamoto K, Okano H | Transcription factor protein expression patterns by neural or neuronal progenitor cells of adult monkey subventricular zone | Neurosci | In press | | 2006 |
| Toru Matsu-ura, Takayuki Michikawa, Takafumi Inoue, Atsushi Miyawaki, Manabu Yoshida, Katsuhiko Mikoshiba. | Cytosolic inositol 1,4,5-trisphosphate dynamics during intracellular calcium oscillations in living cells. | The Journal of Cell Biology | In press | | 2006 |
| Jun-Ichi Goto, Takafumi Inoue, Akinori Kuruma, Katsuhiko Mikoshiba. | Short-term potentiation at the parallel fiber-Purkinje cell synapse. | Neuroscience Research | 55 | 28-33 | 2006 |

小胞体ストレス

小川 智 堀 修

◎小胞体は真核生物がほかの細胞と情報伝達をするために発達させた細胞小器官であり、分泌蛋白だけでなく、細胞表面にターゲットされる膜蛋白などが小胞体を経由し細胞外に運ばれる。これらの蛋白は小胞体で複雑な高次修飾を受けてはじめて機能を発揮するようになるが、細胞内外の環境変化によって、これらの高次修飾が行えなくなった場合、小胞体内には“未成熟”な蛋白が異常に蓄積し、小胞体の構造的なストレスが引き起こされる。これを小胞体ストレスとよぶ。小胞体ストレスは細胞生物学的現象であったが、近年、この小胞体ストレスが神経変性疾患、悪性腫瘍、さらには糖尿病など多くの疾患で、その病態生理に深くかかわることが示されてきた。

Key word : UPR, ERAD, 細胞死, ユビキチン

● 小胞体の機能

真核生物の細胞体には核を取り巻くように脂質二重膜の構造物が分布しており、細胞質膜に向かって広がっていることから、この構造物は小胞体(endoplasmic reticulum)とよばれている。小胞体にはリボソームを豊富に含む粗面小胞体と、それを含まない滑面小胞体が存在し、前者は分泌蛋白や膜蛋白の高次修飾を、後者はステロイドやリン脂質など非蛋白性の分泌型メディエーターの生合成にかかわっている。小胞体における蛋白の高次修飾は、S-S結合や糖鎖の付加など、複雑な生合成過程であり、この過程において正しく修飾された“成熟”した蛋白だけが小胞体の品質チェック機構を通過し、Golgi装置に運ばれる(図1)。この経路を経て運ばれる蛋白には、さまざまなホルモンや免疫グロブリン、サイトカインだけでなく、細胞膜に運ばれる膜貫通型の受容体なども含まれている。これらの蛋白が高次修飾を受けることによって、精巧な分子構造が形づくられ、生体内での高度な細胞間情報伝達が可能となっている。換言すれば、小胞体は細胞がほかの細胞に対して影響を与えるための基幹路であり、単細胞生物から

多細胞生命への進化は小胞体によって可能になったといっても過言ではない(図1)。

● 小胞体ストレス蛋白

生体がその存続を危うくするようなストレス環境にさらされた場合、生体の構成要素である細胞は、それらのストレス環境を生きぬくためのさまざまなツールをつくり出す。培養細胞を低酸素環境に暴露することによって、ORPs(oxygen regulated proteins)に総称されるストレス蛋白群が誘

サイト
メモ

熱ショック応答と熱ショック蛋白

細胞を非致死的な高温環境に暴露することによって誘導されるストレス蛋白群を熱ショック蛋白とよぶ。この誘導は、大腸菌からヒト細胞にまで普遍的にみられるストレス応答である。真核生物では70, 90, 110 kDaのストレス蛋白が誘導され、おもにサイトソルに存在する蛋白が熱によって変性するのを防いでいる。生命の進化に伴い、酵母以降、より高度な生命体では小胞体が発達し、小胞体において蛋白の変性を防ぐ目的で、小胞体のストレス蛋白が発達した。小胞体ストレス蛋白には分子量78, 94, 150 kDaのものが知られており、それぞれ、70, 90, 110 kDaの熱ショック蛋白の類縁蛋白である。

Stress response in the endoplasmic reticulum
Satoshi OGAWA and Osamu HORI
金沢大学大学院医学系研究科神経分子標的学

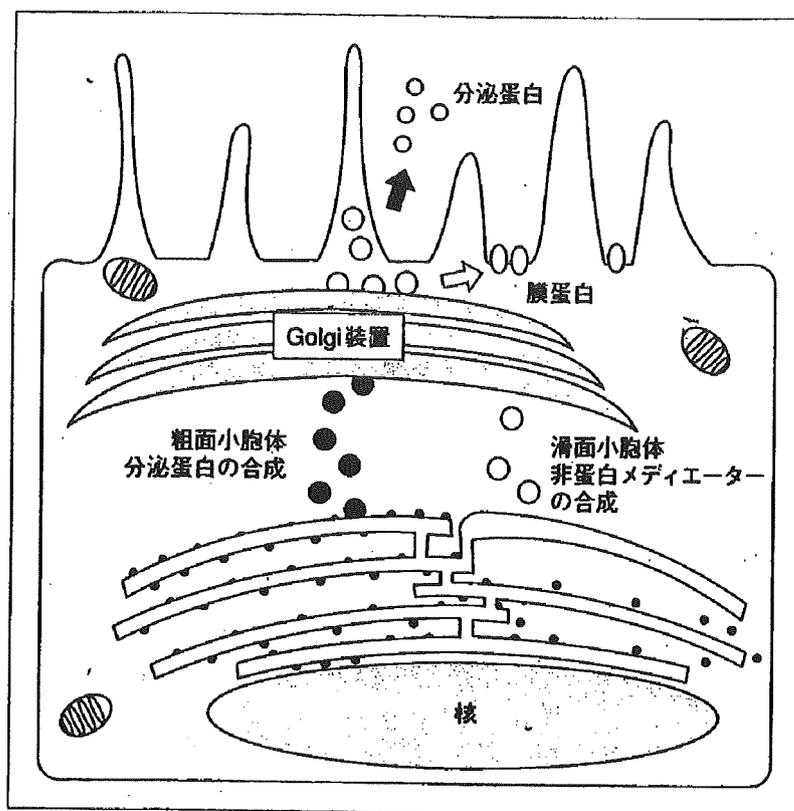


図 1 小胞体の機能と構造

導されることが知られている¹⁾。一方 glucose regulated proteins (GRPs) は Lee らによって提唱されたストレス蛋白群で、低グルコース環境で細胞内に誘導されるストレス蛋白群であり、小胞体で分子シャペロンの機能ももつとされる。ORPs の多くは GRPs と同一と考えられており、ORPs/GRPs は小胞体に誘導されるストレス蛋白群である²⁾。また、これらの小胞体ストレス蛋白は、小胞体内のカルシウムを枯渇させることによっても誘導される。

小胞体における蛋白の高次修飾がグルコースや酸素、カルシウムを必要とすることから、小胞体内腔において生合成途中の未熟な蛋白質は虚血や低酸素、カルシウムの代謝障害によって、小胞体内に異常な折り畳み構造をもつ蛋白質 (unfolded protein) の出現頻度を上昇させ、小胞体の構造的変化をもたらす。この変化は従来、電子顕微鏡で捉えられうる超微細変化であった。小胞体ストレス蛋白群が同定されたことによって、この現象が病理標本の免疫組織染色として解析されるようになり、小胞体ストレスが多くの疾患の主要な病態生理であることがわかってきた。

● Unfolded protein response (UPR) と endoplasmic reticulum dependent protein degradation (ERAD)

小胞体内腔においては、高次修飾の途中の未熟な蛋白が存在しているが、虚血、低酸素、アミノ酸飢餓などのストレスによって、これらの未成熟な蛋白は正常な折り畳みのできない蛋白として小胞体内に蓄積する。この構造的な小胞体ストレスに対して、基本的に細胞は UPR ならびに ERAD とよばれる小胞体特異的なストレス応答機構 (危機管理) を介して小胞体機能の披綻を回避しようとする。

UPR は小胞体内に異常蛋白が蓄積した場合に、蛋白全体の合成を抑制して小胞体内に流入する蛋白を減少させる機構と、GRP78 に代表される小胞体分子シャペロンを誘導して、小胞体内で異常蛋白が変性するのを抑える経路を起動する。この経路を伝達する小胞体内での環境感知機構として、現時点で 3 種類の小胞体膜貫通型蛋白の存在が知られている。

PERK (PKR-like endoplasmic reticulum kinase) は小胞体の構造変化を感知して自己リン酸によつ

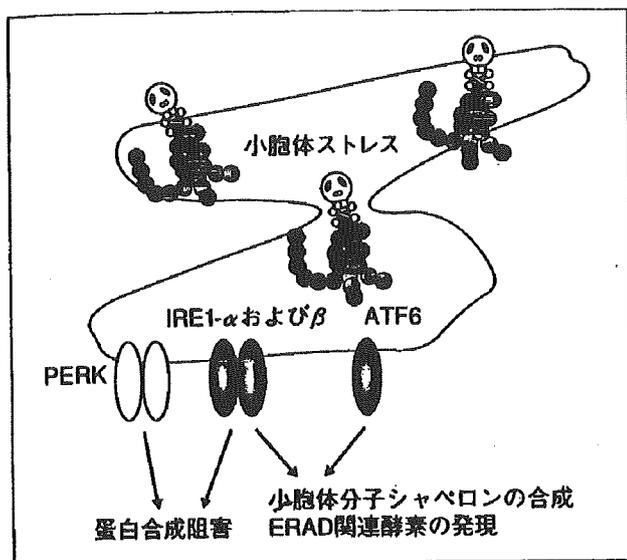


図2 小胞体ストレスとUPR

て活性化され、おもに小胞体ストレスによる蛋白合成の抑制に関与する³⁾。また、酵母から保存されているIRE1の経路も重要である。IRE1は小胞体膜貫通型のリボヌクレアーゼであり、小胞体内腔の領域により小胞体ストレスを感知、自己リン酸化によって活性化されるとXBP1 mRNAのスプライシングを行う。この経路によって産生されたXBP1蛋白は、ERSEおよびUPRE(unfolded protein response element)を介して小胞体分子シャペロンを誘導するとともに、ERADに関与する蛋白を誘導する⁴⁾。ATF6も小胞体膜に存在する膜貫通型蛋白であり、小胞体の構造ストレスを感知しS1PおよびS2Pによる2段階切断を受け、核移行し、小胞体分子シャペロンを誘導する⁵⁾(図2)。

ERADは小胞体内の異常蛋白質を細胞質側へ引きずり出し、ユビキチン化して、プロテアソームによって分解するシステムである⁶⁾。小胞体内の未熟な蛋白は小胞体ストレス下では、糖鎖の付与ができないために正常な折り畳み構造をとることができず(ミスフォールディング)、また、S-S結合を合成できないためサブユニット間の結合ができない(ミスアセンブリ)。また、これらの未熟な蛋白は活性酸素などの標的となり、容易に変性する。小胞体内で合成される蛋白の約30%が正常に折り畳まれず、ERADで分解されると考えられているが、小胞体ストレス下ではERADで分解される蛋白は指数関数的に増加する。

ERADの基本経路は、小胞体内でERADの基質となる蛋白質の識別、小胞体からサイトゾルへの逆行輸送、サイトゾルにおけるユビキチン化とプロテアソームによる分解の3つのステップよりなる(図3)。また、サイトゾルに引き出された変性蛋白は、ユビキチン活性化酵素(E1)、ユビキチン転移酵素(E2)、ユビキチン連結酵素(E3)からなる一連の酵素群によってユビキチン標識され、ポリユビキチン化された蛋白は速やかに分解される。ユビキチン化に関与する3群の酵素のなかでも、最終段階に位置するユビキチン連結酵素(E3)は基質特異性をもつといわれ、近年遺伝性Parkinson病の病因遺伝子として同定された*parkin*は、このE3酵素である⁷⁾。

● 小胞体ストレスと細胞死

小胞体に許容限界以上の未熟な、あるいは変性した蛋白が蓄積すると、小胞体環境を守るためのUPRやERADをもってしても、それ以上の強い小胞体ストレスに抗しきれなくなる。小胞体内での環境変化が不可逆となると、いくつかの細胞死の経路が活性化されることが知られている。小胞体はカルシウム貯蔵装置としても機能しているが、小胞体環境が悪化すると小胞体からのカルシウムの流出を制御しきれなくなる。カスパーゼ12は小胞体に局在する細胞死関連遺伝子であり、齧歯類における小胞体依存性細胞死遺伝子として知られている⁸⁾。また、ヒトではカスパーゼ4が齧歯類におけるカスパーゼ12と同様の働きをする⁹⁾。

UPRの項で紹介したIRE1にはIRE1-αとIRE1-βの2つのアイソフォームが存在するが、IRE1-βが28SrRNAを特異的に切断することが報告され、小胞体ストレスによって誘導される細胞死におけるIRE1の役割が注目されている。IRE1が、TNFレセプターのアダプター分子として知られていたTRAF2をリクルートすることによって、MAPキナーゼ(MAPK)ファミリーの1つであるJNK(c-jun N-terminal kinase)を活性化することも報告されている¹⁰⁾。また、これ以外に小胞体で発生する活性酸素がNF-κBの経路を用いて細胞死を引き起こすとの報告もある(図4)。

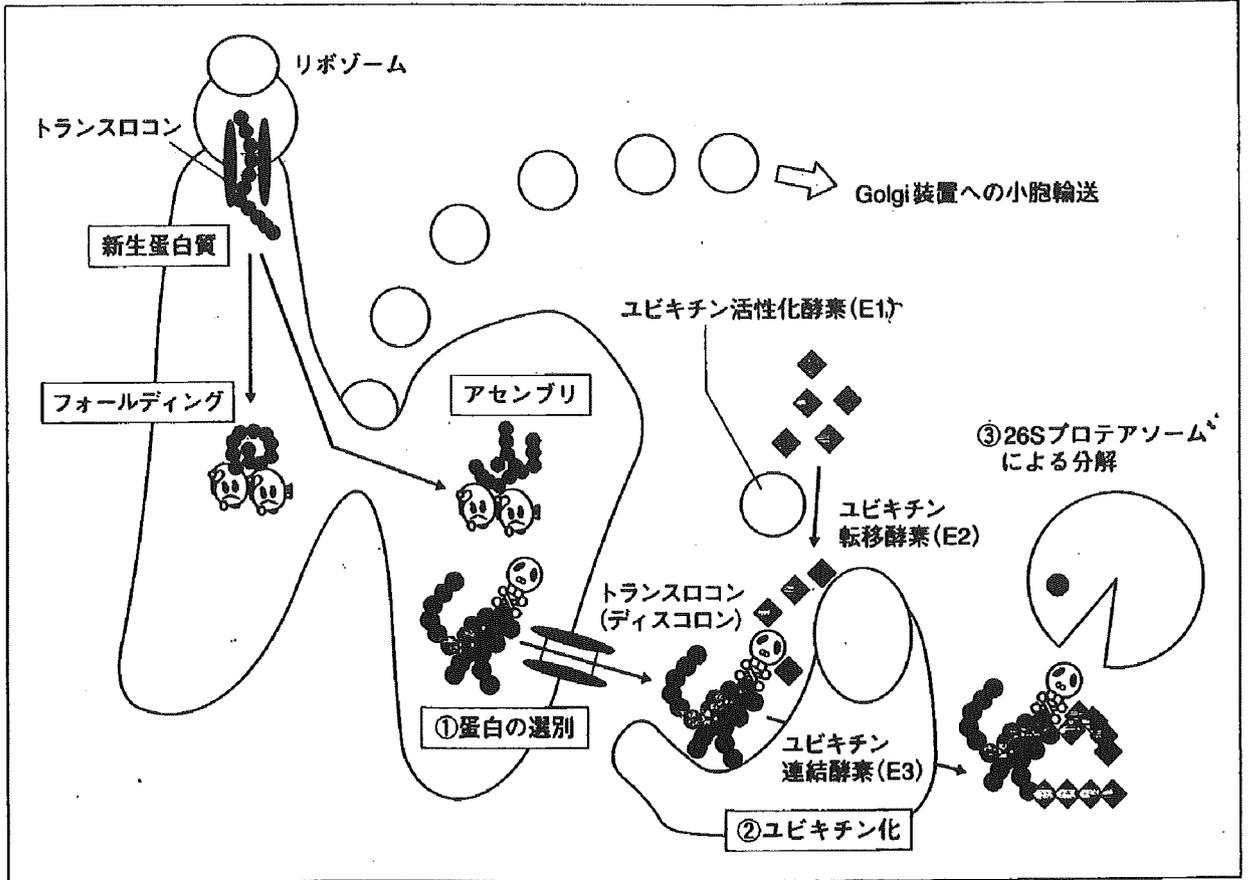


図 3 小胞体ストレスとERAD

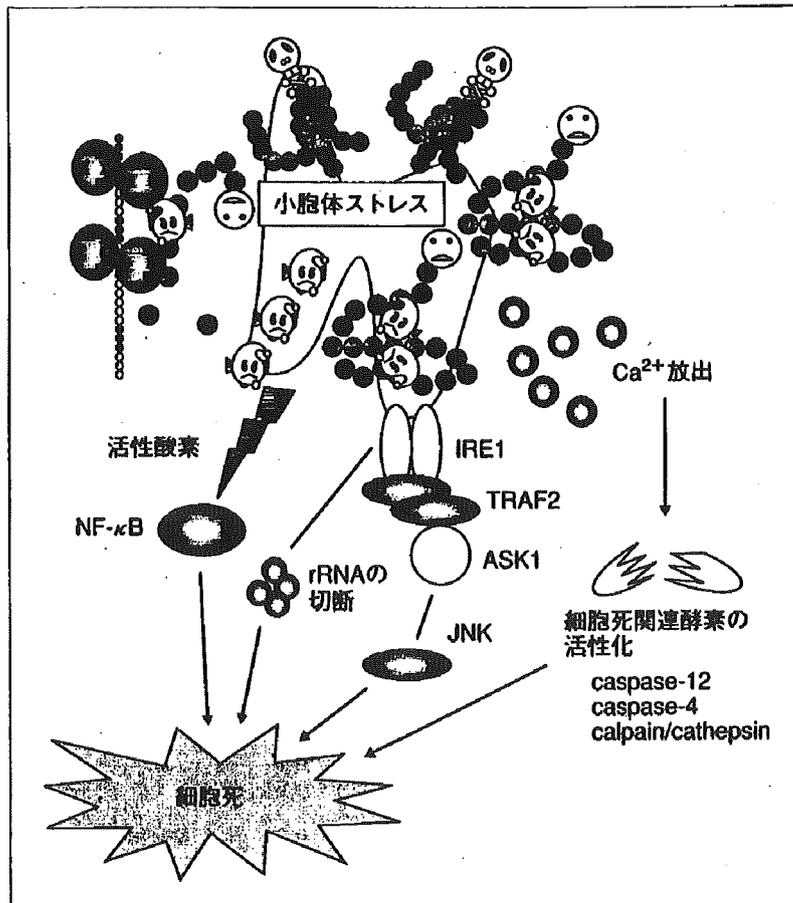


図 4 小胞体ストレスと細胞死

● おわりに

蛋白質のフォールディングが行われないために異常蛋白質が細胞内小器官に蓄積し細胞死を引き起こす疾患概念が確立されつつある。虚血はもつともありふれた小胞体ストレスのひとつであるが¹¹⁾、それ以外にも、甲状腺機能亢進症による甲状腺障害、糖尿病における膵臓β細胞死など、多くの疾患で小胞体ストレスによる細胞死と病態生理の関連が注目されてきている。さらに最近、過血糖による慢性的な小胞体ストレスが、先述したJNKの系を介して、インスリン抵抗性を生じさせる原因であるとの報告もある¹²⁾。これらの報告は、小胞体ストレスが細胞死を引き起こし病態に関与するだけでなく、小胞体ストレスそのものが細胞の機能に影響を与えることを示しており、非常に興味深い。

謝辞：本稿の執筆を終えるにあたり、その機会を与えていただいた京都大学ウイルス研究所・淀井淳司教授に深謝いたします。

文献

- 1) Heacock, C. S. and Sutherland R. M. : *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 12 : 1287-1290, 1986.
- 2) Lee, A. S. : *Trends Biochem. Sci.*, 26, 504-510, 2001.
- 3) Harding, H. P. et al. : *Nature*, 397 : 271-274, 1999.
- 4) Yoshida, H. et al. : *Cell*, 107 : 881-891, 2001.
- 5) Yoshida, H. et al. : *J. Biol. Chem.*, 273 : 33741-33749, 1998.
- 6) Hampton, R. Y. : *Curr. Opin. Cell Biol.*, 14 : 476-482, 2002.
- 7) Kitada, T. et al. : *Nature*, 392 : 605-608, 1998.
- 8) Nakagawa, T. et al. : *Nature*, 403 : 98-103, 2000.
- 9) Hitomi, J. et al. : *J. Cell Biol.*, 165 : 347-356, 2004.
- 10) Nishitoh, H. et al. : *Genes Dev.*, 16 : 1345-1355, 2002.
- 11) Tamatani, M. et al. : *Nat. Med.*, 7 : 317-323, 2001.
- 12) Nakatani, Y. et al. : *J. Biol. Chem.*, 2004. [Epub ahead of print]

* * *

Deletion of SERP1/RAMP4, a Component of the Endoplasmic Reticulum (ER) Translocation Sites, Leads to ER Stress

Osamu Hori,^{1*} Mayuki Miyazaki,² Takashi Tamatani,¹ Kentaro Ozawa,¹ Katsura Takano,³ Masaru Okabe,⁴ Masahito Ikawa,⁴ Enno Hartmann,⁵ Petra Mai,⁵ David M. Stern,⁶ Yasuko Kitao,¹ and Satoshi Ogawa¹

Department of Neuroanatomy, Kanazawa University Graduate School of Medical Science, Kanazawa City, Ishikawa, Japan¹; Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, Japan²; Laboratory of Molecular Pharmacology, Kanazawa University Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa City, Ishikawa, Japan³; Genomic Information Service Center, Osaka University, Osaka, Japan⁴; CSCM, Institut für Biologie, Universität Lübeck, Lübeck, Germany⁵; and Dean's Office, University of Cincinnati College of Medicine, Cincinnati, Ohio⁶

AQ: A

Received 22 October 2005/Returned for modification 8 December 2005/Accepted 17 March 2006

Stress-associated endoplasmic reticulum (ER) protein 1 (SERP1), also known as ribosome-associated membrane protein 4 (RAMP4), is a Sec61-associated polypeptide that is induced by ER stress. SERP1^{-/-} mice, made by targeted gene disruption, demonstrated growth retardation, increased mortality, and impaired glucose tolerance. Consistent with high levels of SERP1 expression in pancreas, pancreatic islets from SERP1^{-/-} mice failed to rapidly synthesize proinsulin in response to a glucose load. In addition, reduced size and enhanced ER stress were observed in the anterior pituitary of SERP1^{-/-} mice, and growth hormone production was slowed in SERP1^{-/-} pituitary after insulin stimulation. Experiments using pancreatic microsomes revealed aberrant association of ribosomes and the Sec61 complex and enhanced ER stress in SERP1^{-/-} pancreas. In basal conditions, the Sec61 complex in SERP1^{-/-} microsomes was more cofractionated with ribosomes, compared with SERP1^{+/+} counterparts, in high-salt conditions. In contrast, after glucose stimulation, the complex showed less cofractionation at an early phase (45 min) but more at a later phase (120 min). Although intracellular insulin/proinsulin levels were not significantly changed in both genotypes, these results suggest that subtle changes in translocation efficiency play an important role in the regulation of ER stress and rapid polypeptide synthesis.

ABSTRACT: Secretory proteins undergo posttranslational processing, including correct folding and oligomerization, in the endoplasmic reticulum (ER). In order to effectively produce and secrete mature proteins, cellular mechanisms for monitoring the ER environment are essential. In mammalian cells, at least three different mechanisms contribute to this surveillance system: regulated induction of transcription, attenuation of translation, and degradation (11). Exposure of cells to conditions promoting accumulation of unfolded proteins in the ER (ER stress) induces molecular chaperones, folding catalysts, and subunits of the translocation machinery (Sec61 complex), a process known as the unfolded protein response. Attenuation of protein synthesis in response to ER stress provides another point of regulation, in this case serving to reduce the load of proteins entering the ER. The latter pathway requires activation of the ER-resident membrane protein PERK and phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 α (eIF2 α) (5).

SERP1 (stress-associated ER protein 1) was identified because of its induction in response to hypoxia or ER stress (20) and found to be identical to RAMP4 (ribosome-associated membrane protein 4). The latter was originally recognized because it was copurified with the Sec61 complex (3) and then found to be a genuine and evolutionarily conserved part of the

ER translocon. SERP1/RAMP4 controls glycosylation of major histocompatibility complex class II-associated invariant chains by a translocational pausing mechanism (16), and its overexpression stabilizes newly synthesized membrane proteins under ER stress by associating with the Sec61 complex (20). YSY6, the yeast homolog of SERP1, suppresses the defect in protein export of particular mutant alleles of *secY* in *Escherichia coli* (14). Although these observations suggest that SERP1 is somehow involved in the biosynthesis/processing of secretory proteins, the precise role of SERP1 has not been clarified yet.

We have developed SERP1 knockout mice using a homologous recombination technique and report here that SERP1^{-/-} mice demonstrated postnatal growth retardation, increased mortality, and impaired glucose tolerance. We present evidence that these phenotypes are likely due to the incapability of rapid production of polypeptide hormones by prolonged translational suppression and possible damage of secretory tissues by enhanced ER stress.

MATERIALS AND METHODS

Cell cultures and animal experiments. MIN6 cells were provided by Jun-ichi Miyazaki, Osaka University (10). Cells were cultured in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) (25 mM glucose) with fetal calf serum (15%) and placed in medium with high (25 mM) or low (5.5 mM) glucose when cultures achieved ~70% confluency. Expression of SERP1 or other molecules was analyzed after 24 h. Animal experimental protocols were approved by the Committee on Animal Experimentation of Kanazawa University (Takara-Machi Campus).

AQ: D

* Corresponding author. Mailing address: Department of Neuroanatomy, Kanazawa University, Graduate School of Medical Science, 13-1 Takara-Machi, Kanazawa City, Ishikawa 920-8640, Japan. Phone: 81-76-265-2162. Fax: 81-76-234-4222. E-mail: osamuh@nanat.m.kanazawa-u.ac.jp.

Northern blotting. Hybridization with cDNA fragments of SERP1, Sec61 α and β subunits, or GRP78 was performed as described previously (20). Expression of SERP1 or the Sec61 complex in different tissues was analyzed using human endocrine system MTN Blot, mouse MTN Blot, and mouse MTN Blot II assays (Clontech, Palo Alto, CA).

Western blotting and immunostaining. For MIN6 cells or isolated pancreatic islets, protein extraction was performed in the presence of 1% Triton X-100, 10 mM Tris (pH 7.6), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin, and 1 μ g/ml pepstatin. Pancreas, liver, pituitary (anterior and posterior lobes), and cerebral cortex (parietal lobe) were removed from C57BL/6 mice (20 to 25 g) after euthanasia and were homogenized in 1% NP-40, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.2% deoxycholate, 10 mM Tris (pH 7.6), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin, and 1 μ g/ml pepstatin. Western blotting was performed with antibodies against SERP1/RAMP4 (3), Sec61 α (3), KDEL (StressGen Biotechnologies Corp., Victoria, British Columbia, Canada), Herp (7), P-eIF2 α (Cell Signaling Technology, Beverly, MA), eIF2 α (Cell Signaling Technology), insulin (Biogenesis, Poole, England, United Kingdom), growth hormone (GH; Biogenesis), corticotropin (ACTH; Chemicon, Temecula, CA), P58 (a gift from M. G. Katze, University of Washington), or β -actin (Sigma, St. Louis, MO). Sites of primary antibody binding were visualized using alkaline phosphatase-conjugated secondary antibodies. For immunostaining, pancreas and other tissues (including pituitary) were removed from C57BL/6 mice (20 to 25 g) after perfusion with paraformaldehyde (4%) and embedded in paraffin, and 5- μ m sections were cut. Sections were incubated with anti-insulin antibody or anti-growth hormone antibody (Biogenesis), followed by incubation with fluorescein isothiocyanate- or Cy3-conjugated secondary antibodies.

Development of SERP1 knockout mice. A targeting vector was constructed in pPNT (a gift from Victor L. J. Tybulewicz, MRC National Institute for Medical Research, London, United Kingdom) by replacing exon 1 of the mouse SERP1 gene derived from the 129SvJ library (Incyte Genomics, St. Louis, MO) with a phosphoglycerate kinase (PGK)-neo cassette (see Fig. 2A). Seven correctly targeted heterozygote embryonic stem cell clones were obtained, and two of those were injected into C57BL/6 blastocysts. Germ line transmission of the SERP1 mutant gene was achieved in both lines. Mice were genotyped by PCR and Southern blotting, and F₁ to F₃ offspring mice were intercrossed (129SvJ \times C57BL/6 background) or backcrossed into the C57BL/6 strain for six generations (C57BL/6 background). In all studies comparing SERP1^{+/+}, SERP1^{+/-}, and SERP1^{-/-} mice, sex-matched siblings derived from mating SERP1^{+/+} animals were used.

Glucose, insulin, and growth hormone measurements. Blood glucose levels were determined using a portable glucose-measuring device (Dexster-Z; Bayer Medical Co., Tokyo, Japan). Intraperitoneal glucose tolerance tests (Ipi-GTT) and insulin tolerance tests (ITT) were performed by administration of glucose, 2 g/kg of body weight, or insulin, 1 U/kg of body weight, followed by sampling of blood from the tail vein. Insulin and growth hormone levels in culture medium, cell extracts, or plasma were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (for insulin, the kit was from Shibuyagi Co., Shibukawa, Japan, and for growth hormone, the kit was from Cayman Chemical, Ann Arbor, MI).

Isolation of pancreatic islets and metabolic labeling. Pancreatic islets were isolated from SERP1^{+/+}, SERP1^{+/-}, or SERP1^{-/-} mice (12 to 16 weeks old) by collagenase digestion, as described previously (4). After incubation in glucose-free RPMI 1640 (Sigma) for 1 h, islets (20 islets/condition) were exposed to high glucose (22 mM), and insulin release was measured as above. Biosynthesis of insulin was evaluated by metabolic labeling as follows. Isolated islets (30 islets/condition) were exposed to high glucose (22 mM) in Met-free DMEM containing dialyzed 10% fetal bovine serum (FBS), and [³⁵S]Met/Cys (200 μ Ci; Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ) was added for the indicated 30-min periods prior to harvesting. Islet cells were then lysed in 1% Triton X-100, 10 mM Tris, pH 7.6, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin, and 1 μ g/ml pepstatin and immunoprecipitated with anti-insulin antibody. Immunoprecipitates were analyzed on 15% Tricine-buffered polyacrylamide gels followed by autoradiography.

Preparation of recombinant adenoviruses and adenovirus-mediated gene expression. A cDNA fragment spanning the entire coding regions of rat SERP1 and the FLAG epitope (20) was inserted into the pAdx1CA cosmid vector. Recombinant adenovirus Adex1CA SERP1 was prepared by homologous recombination using an adenovirus expression vector kit (Takara, Tokyo, Japan). Viral stocks had titers of $\sim 1 \times 10^9$ PFU/ml. A control virus, Adex1CA GFP (green fluorescent protein), was a gift from Hiroshi Kiyama (Osaka City University, Osaka, Japan). Infection of islets was performed as described previously (12). Briefly, isolated islets (40 islets/condition) were incubated with Adex1CA SERP1 or Adex1CA GFP (1×10^7 to 2×10^7 PFU/ml) in DMEM containing 5%

FBS for 2 h at 37°C, after which RPMI 1640 containing 10% FBS was added. After 36 h, expression of GFP and SERP1 or secretion of insulin was analyzed by immunostaining, Western blotting, or ELISA, respectively, as described above.

Isolation of pancreatic microsomes and in vitro translation/translocation assays. Rough microsomes (RM) from SERP1^{+/+} or SERP1^{-/-} mice (15 to 25 g) were prepared as described previously (17). In brief, mouse pancreas was removed either after 15 h of fasting or after 15 h of starvation followed by glucose stimulation, and two or three pancreata were pooled for each experimental condition. Samples were then homogenized with a tissue grinder (30 s) and a Dounce homogenizer (40 strokes) in ice-cold buffer A, containing 250 mM sucrose, 50 mM triethanolamine, 50 mM KOAc, 6 mM Mg(OAc)₂, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, and 0.5 mM PMSF. After sequential centrifugation, the pellets were dissolved in buffer B, containing 250 mM sucrose, 50 mM triethanolamine, and 1 mM dithiothreitol. In vitro translation/translocation analysis was performed using the rabbit reticulocyte lysate system (Promega Corporation, Madison, WI). After the standard reaction using [³⁵S]Met/Cys (200 μ Ci; Amersham Pharmacia Biotech Inc.) for 30 min at 30°C, half of the samples (12.5 μ l) were precipitated with 20% trichloroacetic acid. The pellets were washed with acetone and dissolved in SDS sample buffer. The newly synthesized proteins (β -lactamase and luciferase) were resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (10% gel) followed by autoradiography. In vitro translation/translocation analysis of growth hormone, prolactin, and insulin was also performed in the presence of ribosome-free membranes (K-RM) for both genotypes (2). One equivalent was determined as described previously (17).

Fractionation of RM by iodixanol gradient centrifugation. Fractionation of RM was performed essentially as described previously (2), with some modification. In brief, RM were dissolved at 0.5 eq/ μ l either in low-salt buffer (100 mM KOAc), high-salt buffer (600 mM KOAc), or high-salt buffer (600 mM KOAc) with 1 mM puromycin, containing 0.04% deoxycholate, 50 mM HEPES (pH 7.5), 6 mM Mg(OAc)₂, 0.25 M sucrose, and 0.5 mM PMSF. The samples were incubated at room temperature for 20 min and then layered onto 20 to 30% iodixanol (Opti-prep; Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway) gradients in the same buffers as those for dissolving RM. After centrifugation in a TLA 100.4 rotor at 50,000 rpm for 140 min, fractions were subjected to Western blotting with indicated antibodies.

Laser densitometric analysis and measurement of pancreatic islets and pituitary. Laser densitometric analysis was performed to semiquantitate results of Western and Northern blotting as described previously (7). The sizes of pancreatic islets, pituitary anterior lobes, and intermediate/posterior lobes were measured using Adobe Photoshop 6.0 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA).

RESULTS

Expression of SERP1 in secretory tissue. In order to identify a model system for the analysis of SERP1 function, its expression was determined in different human and mouse organs (Fig. 1AI and AII; also data not shown). SERP1 transcripts, together with those of the Sec61 complex, were expressed at high levels in secretory organs such as pancreas, prostate, and salivary gland (Fig. 1AI and 1AII) and, to a slightly lesser extent, in liver (data not shown). While mouse and rat organs had a prominent transcript of 2.3 kb as described previously for rat tissues (Fig. 1AII) (20), human cells contained an additional SERP1 transcript of approximately 0.9 kb. PCR and Northern blot analysis using different sets of primers/probes suggested that both transcripts were derived from the human SERP1 gene but that they had different poly(A) attachment sites (data not shown).

As expressions of the Sec61 complex and other translocon members were reportedly upregulated in MIN6 cells, a mouse insulinoma cell line, after exposure to high glucose (18), the levels of SERP1 expression in these cells were compared in the presence of low (5.5 mM) and high (25 mM) glucose. Both SERP1 transcripts and antigens increased under high-glucose conditions to a similar extent as the Sec61 complex (~ 2.2 -fold increase at RNA level [Fig. 1BI] and ~ 2.4 -fold at antigen level

AQ: E

AQ: F

FI/AQ: G

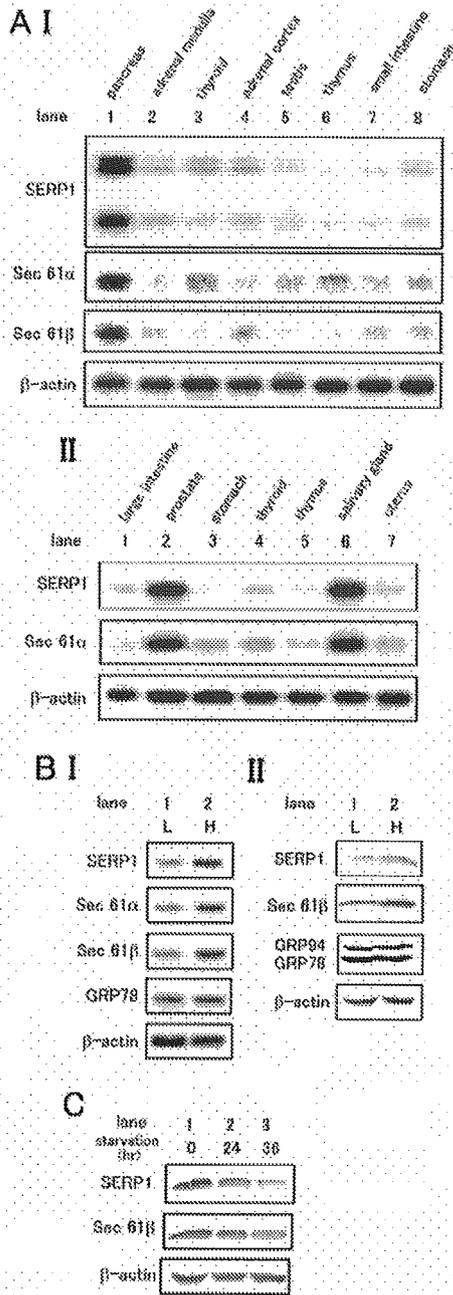


FIG. 1. Expression of SERP1 in secretory tissue. **A.** Expression of SERP1 and Sec61 complex in human and mouse secretory tissue. Human endocrine system MTN Blot (I) or mouse MTN Blot II (II) was hybridized with indicated ³²P-labeled cDNA probes. **B.** Expression of SERP1 and the complex in MIN6 cells. I. MIN6 cells (10⁷ cells/condition) were incubated in medium containing high (H; 25 mM) or low (L; 5.5 mM) glucose for 24 h, and total RNA (10 μg/lane) was used for Northern blotting. II. MIN6 cells (5 × 10⁶ cells/condition) were incubated as described above, and cell extracts were subjected to Western blotting using indicated antibodies. **C.** Expression of SERP1 and the Sec61 complex in pancreas. Protein extracts of pancreas from C57BL/6 mice after starvation for indicated times were subjected to Western blotting as described above.

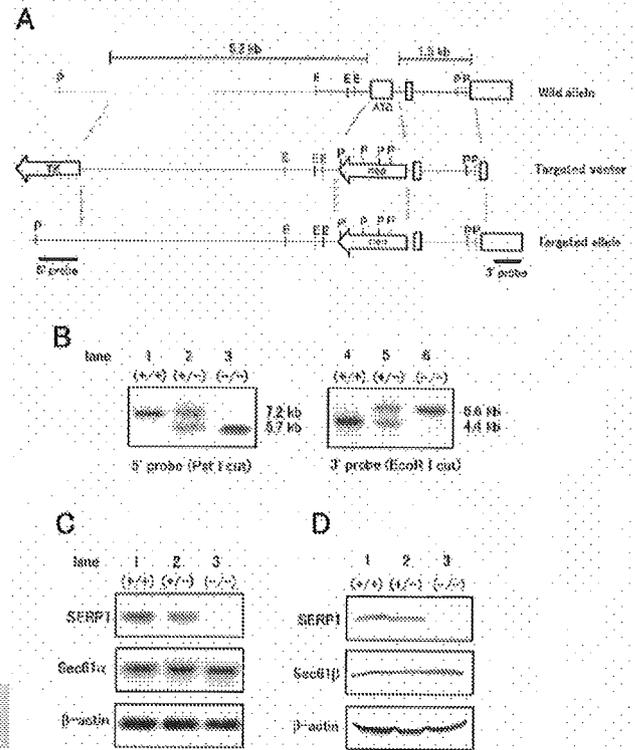


FIG. 2. Generation of SERP1^{-/-} mice. **A.** Creation of the mutant allele by homologous recombination. The neomycin resistance gene was flanked by 5.2 and 1.5 kb of 5' and 3' genomic sequences and replaced exon 1 of the mouse SERP1 gene, including the start codon (ATG). TK, PGK-thymidine kinase (TK) cassette; neo, PGK-neomycin resistance gene (neo) cassette; E, EcoRI; P, PstI. **B.** Southern blotting of mouse tail DNA in a litter born to two heterozygotes (SERP1^{+/-}). Purified DNA was digested with PstI (lanes 1 to 3) or EcoRI (lanes 4 to 6) and hybridized with 5' or 3' probes indicated in panel A. The mutated allele (5.7 and 5.6 kb) could be distinguished from the wild-type allele (7.2 and 4.4 kb) in each case. **C** and **D.** Expression of SERP1 transcripts (**C**) and antigens (**D**) in SERP1^{+/+}, SERP1^{+/-}, and SERP1^{-/-} mice at 3 weeks after birth. Total liver RNA (20 μg) was hybridized with ³²P-labeled cDNA probes as described in the text (**C**). Protein extracts (40 μg) from pancreas were subjected to Western blotting with indicated antibodies.

[Fig.1BII)]. Accordingly, the levels of expression of SERP1 and Sec61 complex antigens in the whole pancreas decreased by starvation in vivo (Fig. 1C).

Generation of SERP1 knockout mice and effects of the SERP1 gene deletion on development. To study the function of SERP1 in vivo, we created mice lacking SERP1. Targeted disruption of the SERP1 gene was performed (Materials and Methods) (Fig. 2A). Homologous recombinants of the SERP1 gene were correctly transmitted (Fig. 2B), and expression of SERP1 was not observed in SERP1 knockout mice both at the level of transcription (Fig. 2C) and at the level of translation (Fig. 2D).

SERP1^{-/-} mice were born almost at the expected Mendelian ratio, and there was no apparent phenotype observed except for a slight reduction in body weight compared with SERP1^{+/+} and SERP1^{+/-} mice (0.9 ± 0.1 g for SERP1^{-/-} and 1.0 ± 0.1 g for other genotypes). However, by 3 weeks of

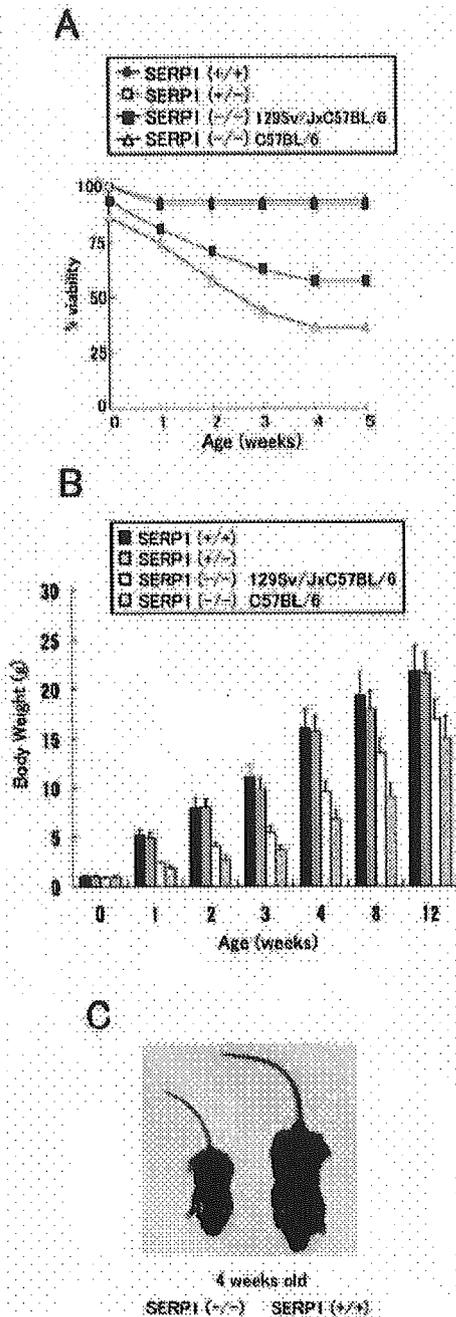


FIG. 3. Postnatal growth retardation in $SERP1^{-/-}$ mice. A. Survival of neonatal $SERP1^{+/+}$, $SERP1^{+/-}$, and $SERP1^{-/-}$ mice. The number of mice at birth was designated as 100 in each group. $SERP1^{-/-}$ mice in a C57BL/6 background have lower viability than $SERP1^{-/-}$ mice in a 129Sv/J \times C57BL/6 background. B. Weight gain in neonatal genetically manipulated $SERP1$ mice of the indicated genotype. C. Representative photograph of $SERP1^{-/-}$ versus $SERP1^{+/+}$ littermate siblings in the 129Sv/J \times C57BL/6 background.

adulthood (Fig. 3A). Body weights of $SERP1^{-/-}$ mice were reduced to $60\% \pm 12\%$ of those of $SERP1^{+/+}$ mice in the 129Sv/J \times C57BL/6 and to $44\% \pm 13\%$ of those of $SERP1^{+/+}$ mice in the C57BL/6 mice at 4 weeks after birth. If the body weight of a $SERP1^{-/-}$ mouse was less than 40% of that of a $SERP1^{+/+}$ mouse of the same age, or if weight gain stopped for several days, these animals would usually die. Autopsies of nonsurviving $SERP1^{-/-}$ mice revealed amounts of milk in the gut comparable to those of other mice. Blood glucose levels and liver glycogen contents of low-weight $SERP1^{-/-}$ animals were not significantly different from those of other genotypes during the period from 1 to 4 weeks of age. These data indicate that the high mortality of $SERP1^{-/-}$ mice was not likely due to reduced nursing or impaired intestinal absorption.

Once $SERP1^{-/-}$ mice survived to the age of 4 weeks, their growth and body weight steadily increased. By 12 weeks of age, body weights of $SERP1^{-/-}$ animals recovered to $\sim 75\%$ of those of $SERP1^{+/+}$ mice in both backgrounds (Fig. 3B).

Effects of the $SERP1$ gene deletion on glucose homeostasis and insulin biosynthesis. High levels of $SERP1$ expression in pancreas and in MIN6 cells (Fig. 1) led us to investigate the role of $SERP1$ in glucose homeostasis and insulin biosynthesis/secretion. i.p.-GTT were performed using mice between 10 and 20 weeks of age to minimize the effect of growth retardation in $SERP1^{-/-}$ mice. Both male and female $SERP1^{-/-}$ mice revealed impaired glucose tolerance (Fig. 4A and 4B). Increased blood glucose levels in $SERP1^{-/-}$ mice were most prominent between 30 min and 60 min after glucose infusion. In the later phase (120 min after glucose injection) of i.p.-GTT, glucose levels in $SERP1^{-/-}$ mice were close to that observed in wild-type controls. In contrast, ITT revealed no significant difference in blood glucose levels between $SERP1^{+/+}$ and $SERP1^{-/-}$ mice after insulin administration (data not shown), suggesting that impaired glucose tolerance in $SERP1^{-/-}$ animals was not due to insulin resistance in peripheral tissue. Histological analysis of pancreatic tissue demonstrated islets of comparable size (Fig. 4B) and immunoreactivity with anti-insulin antibody (data not shown) when $SERP1^{-/-}$ mice were compared with wild-type controls.

To further analyze the effect of $SERP1$ on insulin biosynthesis/secretion, pancreatic islets were isolated from mice and stimulated by exposure to media with high glucose (22 mM; Fig. 4C). There was only a slight difference in insulin secretion at 15 min after stimulation when islets from the different genotypes were compared ($SERP1^{+/+}$, $SERP1^{+/-}$, and $SERP1^{-/-}$). However, by 30 to 60 min, insulin secretion continued to increase in islets from wild-type controls but not in islets from $SERP1^{-/-}$ mice. It was not until the 60- to 120-min time period that insulin secretion in islets from $SERP1^{-/-}$ mice began to increase again. By 120 min, comparable levels of insulin were present in the supernatants of islets from each genotype.

Metabolic labeling of isolated islets followed by immunoprecipitation with anti-insulin antibody was performed to measure proinsulin/insulin biosynthesis/processing directly after glucose stimulation. In islets from $SERP1^{+/+}$ mice, proinsulin biosynthesis started and reached a peak at 30 to 60 min after glucose stimulation (Fig. 4D, lane 2). Thereafter, it gradually decreased (Fig. 4D, lanes 3 and 4). In contrast, islets from $SERP1^{-/-}$ mice showed a delay in proinsulin biosynthesis that

age, $SERP1^{-/-}$ mice displayed increased mortality (Fig. 3A) and growth retardation (Fig. 3B). Approximately 60% and 35% of $SERP1^{-/-}$ mice in a mixed 129Sv/J \times C57BL/6 ($n = 16$) and C57BL/6 ($n = 12$) background, respectively, grew to

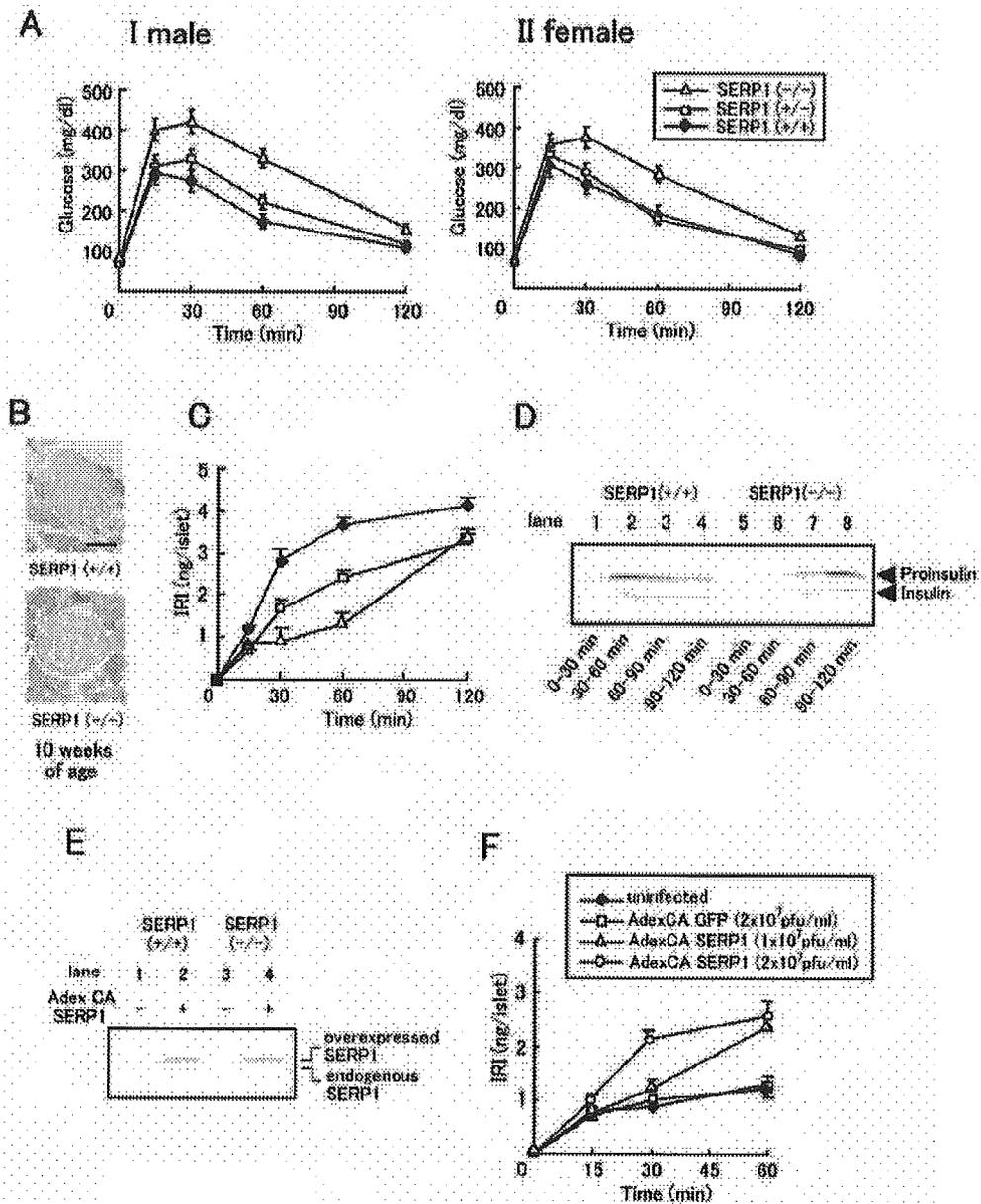


FIG. 4. Impaired glucose tolerance and delayed biosynthesis of insulin in $SERP1^{-/-}$ mice. A. i.p.-GTT were performed on $SERP1^{+/+}$, $SERP1^{+/-}$, and $SERP1^{-/-}$ mice at 10 weeks. Values shown are means \pm standard deviations ($n = 10$ in panel I and $n = 6$ in panel II). B. Hematoxylin-and-eosin-stained $SERP1^{-/-}$ and $SERP1^{+/+}$ pancreas (10 weeks of age). Bar, 50 μ m. C. Insulin release from pancreatic islets isolated from $SERP1$ mice of the indicated genotype. Islets were incubated in medium containing 22 mM glucose for the indicated times. Insulin levels in the medium were measured by ELISA. Values shown are means \pm standard deviations ($n = 4$). D. Insulin biosynthesis in $SERP1^{+/+}$ (lanes 1 to 4) and $SERP1^{-/-}$ (lanes 5 to 8) islets. Islets were stimulated with high glucose (22 mM) and subjected to metabolic labeling with [³⁵S]Met/Cys for 30 min prior to harvesting. Cell extracts were immunoprecipitated with anti-insulin antibody. E. Adenovirus-mediated transfer of $SERP1$ cDNA. $SERP1^{+/+}$ and $SERP1^{-/-}$ islets were infected with AdexCA $SERP1$ (2×10^7 PFU/ml) (lanes 2 and 4) or cultured in the medium alone (lanes 1 and 3), and cell extracts were subjected to Western blotting with anti- $SERP1$ antibody. F. Rescue experiments with $SERP1$ cDNA. $SERP1^{-/-}$ islets were infected with AdexCA $SERP1$ (1×10^7 to 2×10^7 PFU/ml) or AdexCA GFP (2×10^7 PFU/ml) or cultured in medium alone. Insulin release in response to glucose stimulation (22 mM) was monitored by ELISA. Values shown are means \pm standard deviations ($n = 3$).

peaked at 90 to 120 min after glucose stimulation (Fig. 4D, lane 8). The ratio of proinsulin to insulin was not significantly changed in islets from $SERP1^{-/-}$ and wild-type control mice, suggesting that the $SERP1$ gene deletion affects the biosynthesis of proinsulin but not the conversion of proinsulin to insulin.

To confirm that delayed proinsulin biosynthesis in $SERP1^{-/-}$ islets was due to deletion of the $SERP1$ gene, rescue experiments were performed using adenovirus-mediated transfer of the $SERP1$ cDNA as described previously (12). When isolated islets were infected with AdexCA $SERP1$ (2×10^7 PFU/ml),

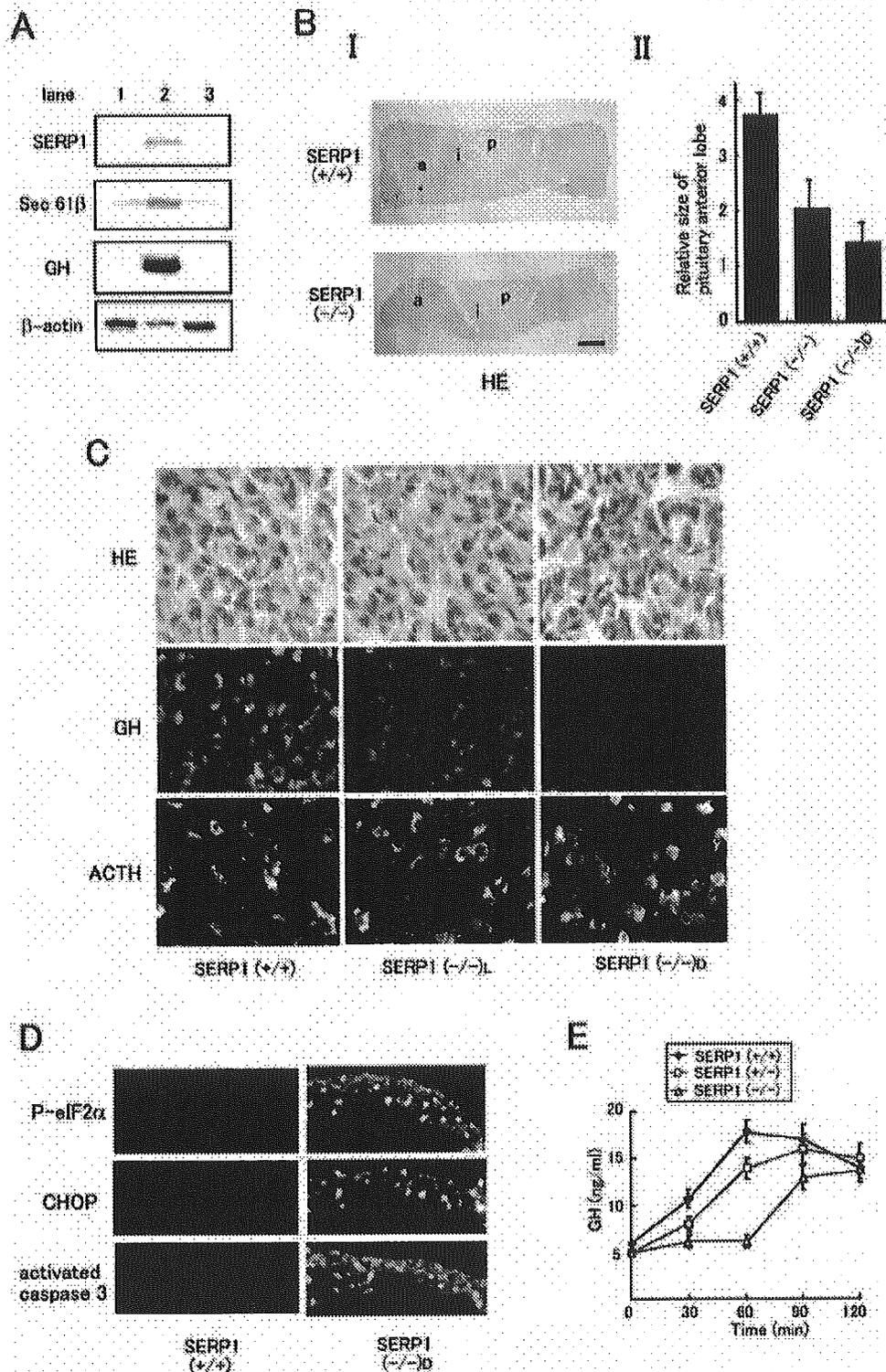


FIG. 5. Reduced size and enhanced ER stress in the SERP1^{-/-} anterior pituitary. A. Expression of SERP1, Sec61β, and GH in the pituitary. Protein extracts (40 μg) from cerebral cortex (lane 1) or pituitary anterior (lane 2) or posterior (lane 3) lobe of C57BL/6 mice (8 weeks) were subjected to Western blotting with indicated antibodies. B. The size of pituitary anterior lobe. I. Pituitary from mice of the indicated genotype (4 to 8 weeks old, coronal section) was stained with hematoxylin and eosin ($n = 4$), and representative micrographs are shown. Bar, 200 μm. II. Relative size of pituitary anterior lobe in SERP1^{+/+}, total SERP1^{-/-} (SERP1^{-/-}), and dying SERP1^{-/-} (SERP1^{-/-}D) mice. Area occupied by the anterior (a) lobe was divided by the combined area of posterior (p) and intermediate (i) (area of the p + i lobes was designated as 1). Values shown are means ± standard deviations ($n = 4$). C. Expressions of GH and ACTH in the anterior pituitary. Pituitary from SERP1^{+/+}, living