

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

霊長類における神経細胞死機構の解明

分担研究者 山嶋哲盛

研究要旨

一過性脳虚血の後5日目に海馬CA1領域の錐体細胞が神経細胞死をきたすことはげっ歯類から霊長類に至るまで良く知られているが、その機序は現在なお不明である。本研究では、ニホンザルを用いて20分間の全脳完全虚血の後5日目にCA1錐体細胞に生じる神経細胞死が、アポトーシス、ネクローシスのいずれによって生じるかを明らかにした。

結果：虚血後のCA1錐体細胞においては虚血直後から5日目まで $\mu$ -カルパインの活性化が持続しており、虚血後3日目に最大の活性化が見られた。活性化型 $\mu$ -カルパインは虚血後2日目まではリソソームに局在しており、3日目以降は胞体全体にび漫性に見られた。リソソーム膜蛋白であるLAMP-1の免疫染色性も虚血後2、3日目がりソソームに最も強く、それ以降は胞体全体に散逸しており、虚血後に活性化型 $\mu$ -カルパインによってリソソーム膜が損傷されたことを示唆した。虚血後にはカテプシンのリソソーム外への放出が確認された。カスパーゼ3の活性化は虚血後3時間後にピークであったが、前駆体であるプロカスパーゼ3の蛋白の発現は増加するにもかかわらず、その後は活性化型カスパーゼ3のバンドは見られなくなった。しかし、CA1錐体細胞においては虚血後3日目をピークとしてCADの胞体から核内への局在変化が見られた。虚血後のCA1錐体細胞は光顕的に好酸性の凝固壊死を呈し、電顕的には膜の断裂像が見られた。また、アポトーシス小体は見られず、核クロマチンの点状の凝集像が見られた。さらに、DNAの電気泳動像はラダーではなくスメアパターンを呈した。

結論：霊長類の虚血性神経細胞死においては、カルパイン-カテプシン・カスケードがカスパーゼ3-CAD・カスケードよりも重要な働きをなすことが明らかになった。

A. 研究目的

一過性脳虚血を負荷すると、海馬のCA1ニューロンが数日かかって死んでゆくことは、砂ネズミからヒトに至るまでよく知られている。しかし、この神経細胞死の分子メカニズムに関しては依然として不明な点が多い。すなわち、同一の虚血刺激を受けているにもかかわらずなぜ特定部位のニューロンのみが脆弱性を示すのかという疑問に対する完璧な解答は誰もできないのが現状である。一過性脳虚血の後5日目頃に海馬CA1領域の錐体細胞が神経細胞死をきたすことは、げっ歯類から霊長類に至るまで良く知られているが、そのメカニズムは現在なお明らかにされていない。げっ歯類を対象とした従来の研究

成果では、このような虚血性神経細胞死はアポトーシスによって生じるとされてきた。しかし、霊長類における虚血性神経細胞死の分子メカニズムに関しては研究がきわめて少ないため、現在なお不明な点が多い。本研究においては、ニホンザルを用いて20分間の全脳完全脳虚血の後5日目にCA1錐体細胞に生じる神経細胞死が、アポトーシスないしネクローシスのいずれによって生じるかを明らかにする事を目的とした。

B. 研究方法

体重5kg?9kgのニホンザル(*Macaca fuscata*)15頭を用いた。具体的には、開胸後縦隔内に進入し直視下に大動脈弓より分岐直後の左鎖骨

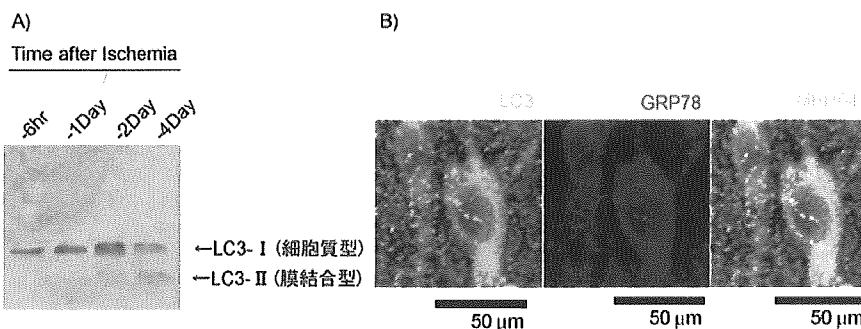
下動脈と無名動脈を剥離後、血管クリップにより20分間血流を完全に遮断した。血実験後のサルは3群に分け、5頭は治療なしのコントロールとし、5頭はCA-074、5頭はE64c、それぞれ4mg/kgのカテプシン阻害剤の静脈内注射を虚血解除後に行った。また、術中は直腸温をモニターし、体温を一定に保った。

$\mu$ -カルパインをはじめリソソーム膜蛋白のLAMP-1 (lysosome-associated membrane protein-1)、カテプシン、カスパーゼ3、およびカスパーゼ3によって誘導されるDNaseであるCAD (caspase-activated DNase) の発現変化と活性化および局在変化を検索した。同時に、虚血後のCA1錐体細胞の形態学的変化とDNAゲル電気泳動像とを検索した。

倫理面への配慮：ヒトに対して行う方法に準じて、ハロセンにより緩徐に麻酔導入し、全身麻酔(1%ハロセン、60%笑気、40%酸素)下で無痛的に手術を行った。

### C. 研究結果

その結果、ウェスタンブロットでは、虚血後のCA1錐体細胞においては虚血直後から5日目まで $\mu$ -カルパインの活性化が持続しており、虚血後2、3日目に最大の活性化が見られた。活性化型 $\mu$ -カルパインは免疫組織化学的検索では、虚血後2日目まではリソソームに一致して局在しており、虚血後3日目以降は胞体全体にびまん性に見られた。LAMP-1の免疫染色性も虚血後2、3日目においてリソソームで最も強く、それ以降は胞体全体に散逸しており、虚血後に活性化型 $\mu$ -カルパインによってリソソーム膜が損傷されたことを示唆した。以前に報告したごとく、虚血後にはカテプシ



図：霊長類海馬におけるオートファジー経路の活性化

ニホンザル脳虚血後の海馬において虚血後2-4日にかけて、膜結合型LC-3がWestern blotにて検出された(A)。また、4日後の免疫染色では、LC3の染色パターンはGRP78のそれと一致し、膜結合型LC3抗原の分布が小胞体(ER)に類似することが示された。これは、従来の報告にあるライソソーム経路(図C最下段)の活性化以前にオートファジー経路の活性化が、小胞体の近傍でおこっていることを示唆する。

ンBとカテプシンLのリソソーム外への放出が免疫組織化学により確認された。ウェスタンブロットでは、カスパーゼ3の活性化は虚血後3時間後にピークであったが、前駆体であるプロカスパーゼ3の蛋白の発現は増加しているにもかかわらず、その後は活性化型カスパーゼ3のバンドはほとんど見られなくなった。リンパ節や小腸などと比較すると、正常脳のCADの発現量は著しく少なかった。

しかし、CA1錐体細胞においては虚血後2、3日目をピークとして胞体から核内への局在変化が見られた。虚血後のCA1錐体細胞は光顕的に好酸性の凝固壊死を呈し、電顕的には膜の断裂像が見られた。また、典型的なアポトーシス小体は見られず、核クロマチンの点状の凝集像が見られるだけであった。DNAの電気泳動像は、アポトーシスに特徴的なラダーパターンではなく、ネクローシスに特徴的なスメアパターンを呈した。

### D. 考察

最近、線虫の神経変性モデルにおいてもCa<sup>2+</sup>依存性のプロテアーゼであるカルパインとリソソーム酵素であるカテプシンが神経細胞の変性に重要な役割を果たすことが分子遺伝学的に確認された。本研究からは、霊長類においてはカルパイン-カテプシン-カスケードがカスパーゼ3-CAD・カスケードよりも重要な働きをなすこと、したがって、虚血性神経細胞死はアポトーシスではなくネクローシスによって生じることが明らかになった。活性化型 $\mu$ -カルパインによってリソソーム膜の損傷が持続的に起きるために、リソソームからのカテプシンの放出が虚血後5日間にわたり続くことが、一過性脳虚血後に生じるCA1錐体細胞のネクローシスを惹起するものと思われる。今後、アポトーシスとネクローシスのクロストークのみならず、活性化型 $\mu$ -カルパインやカテプシンのin vivoでの基質蛋白を同定する必要が

ある。以上、線虫から霊長類に至るまで、「カルパイン-カテプシン仮説」は種を越えて虚血性神経細胞死のメカニズムを説明し得るものと思われる。

#### E. 結論

霊長類の虚血性神経細胞死においては、カルパイン-カテプシン・カスケードがカスパーゼ3-CAD・カスケードよりも重要な働きをなすことが明らかになった。

#### F. 参考文献

- 1) Anton B. Tonchev, et al.,  
Differential proliferative response in the postischemic hippocampus, temporal cortex and olfactory bulb of young adult macaque monkeys. *Glia* 42(3):209-224, 2003.
- 2) Anton B. Tonchev, et al.,  
Proliferation of neural and neuronal progenitors after global brain ischemia in young adult macaque monkeys. *Mol Cell Neurosci* 23(2):292-301, 2003
- 3) Boryana K. Papivanova, et al.,  
Accumulation of microglial cells expressing ELR motif-positive CXC chemokines and their receptors CXCR2 in monkey hippocampus after ischemia-reperfusion *Brain Res* 970(1-2):195-204, 2003
- 4) Tetsumori Yamashima, et al., Sustained calpain activation and lysosomal rupture prevailing apoptosis cascade, execute necrosis of the postischemic CA1 neurons in primates. *Hippocampus* 13(7): 791-800-11, 2003.

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 CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM D-glucose, 26 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 μM bicuculline, 95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>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

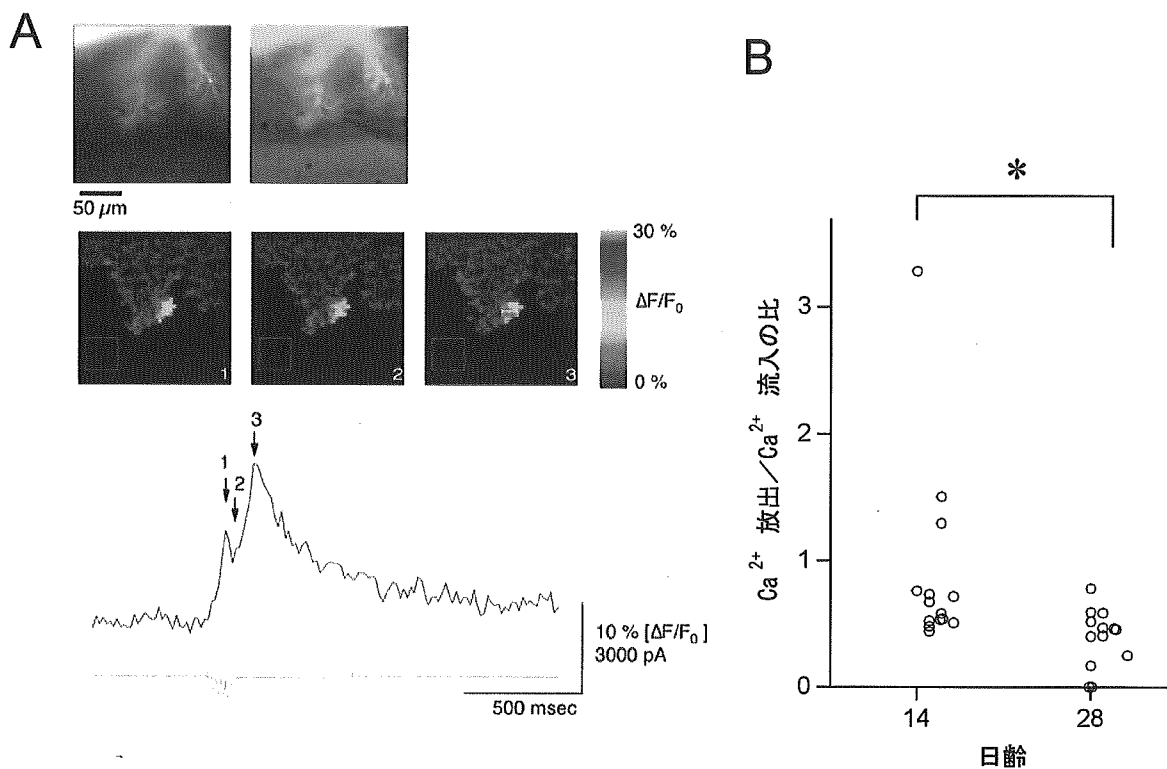


図1 平行線維刺激によるプルキンエ細胞樹状突起でのカルシウム上昇。(A) 2週齢においては二相性カルシウム上昇の遅いピーク(矢印3)は大きく、早いピーク(矢印1)よりも大きい例が多かった。上段の図は樹状突起部の蛍光画像(左)、及び同視野の微分干渉像との重ね合わせ(右)。右図ではスライス表面に置かれた刺激電極が見えている。中段の図はプロット中の各時点の蛍光強度変化を疑似カラーで示す。疑似カラー画像中のROI内の蛍光強度の時間変化(カルシウム濃度変化)を下段のグラフに示す。最下部の波形は膜電流記録。(B) 2週齢のプルキンエ細胞では4週齢に比べて有意に大きなカルシウム放出が観測された。

(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

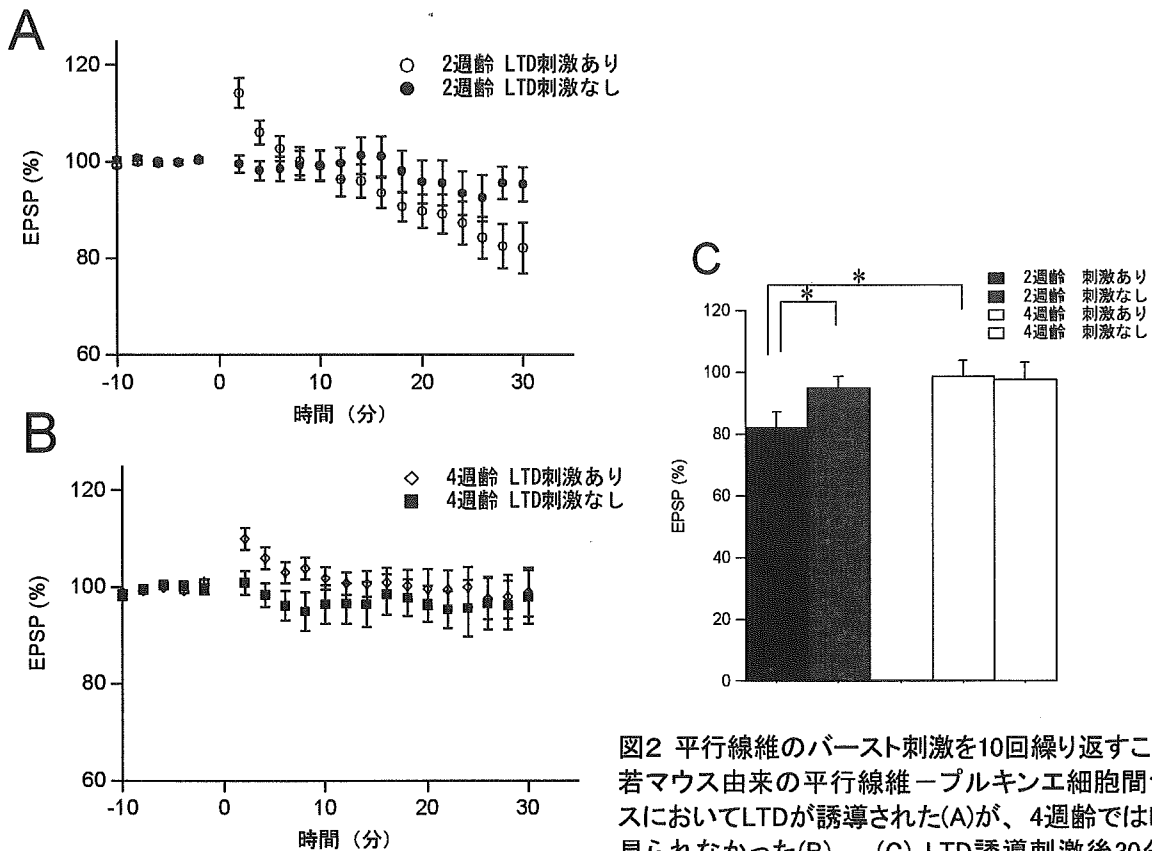


図2 平行線維のバースト刺激を10回繰り返すことで幼若マウス由来の平行線維-プルキンエ細胞間シナプスにおいてLTDが誘導された(A)が、4週齢ではLTDは見られなかった(B)。 (C) LTD誘導刺激後30分でのEPSPの平均。

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型カルシウムチャン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

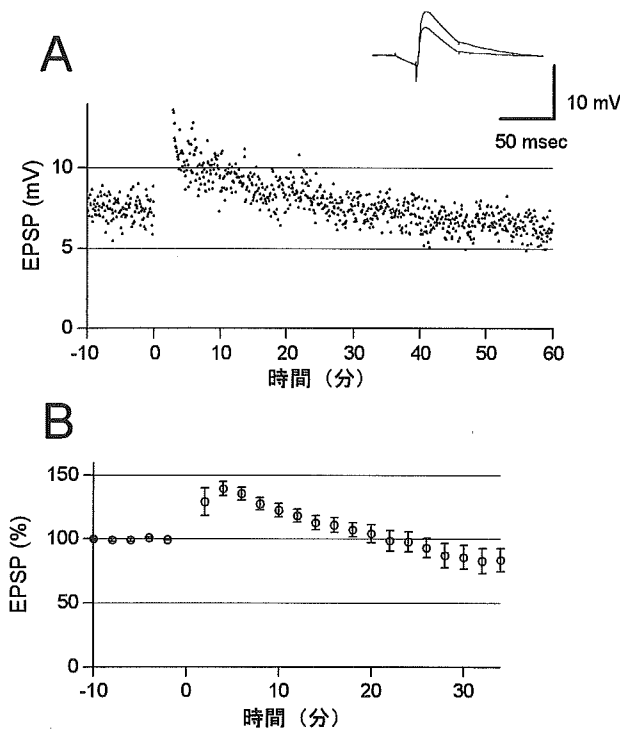


図3 平行線維のバースト刺激(50Hz, 5回)を1秒毎に90回反復して誘導された10-20分持続するSTP。(A)代表例。右上には誘導刺激前と誘導刺激5分後のEPSPを重ねて示す。(B)12例の平均。

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. 参考文献

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 Mikoshiba, Yasuo Ikeda, Masataka Kuwana. Neurogenic potential of progenitors derived from human circulating CD14<sup>+</sup> monocytes.

**Immunology and Cell Biology**, 84: 209-17 (2006).

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



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

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。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ることは、カテプシンD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た検討、電子顕微鏡による観察でも明らかとなった。今回オートファジーを伴う遅延型神経細胞死が細胞死の実行因子であるカスパーゼ3依存性か否か検討するためカスパーゼ3欠損マウスを用いて低酸素-脳虚血負荷後の海馬を観察したところ、対照群と少なくとも同程度のTUNEL陽性の神経細胞が出現することが分かった。

A. 研究目的

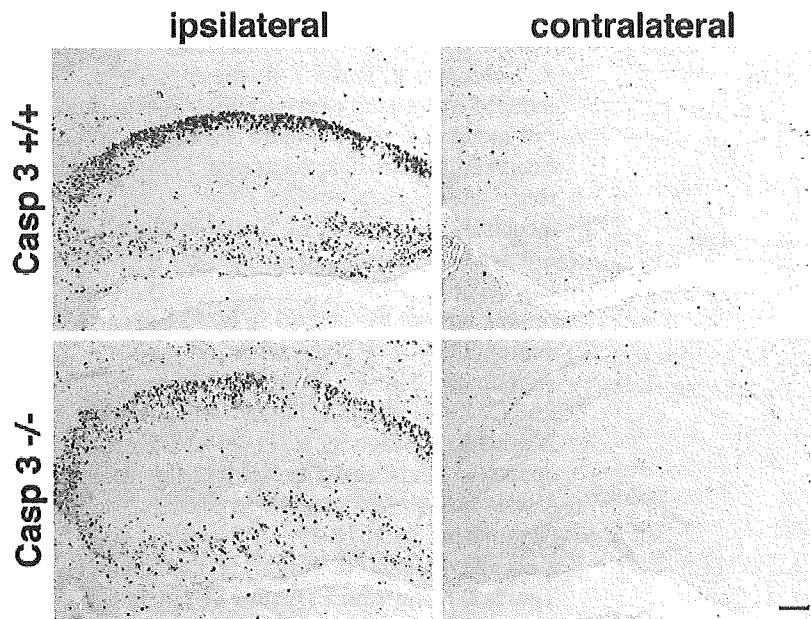
オートファジーは、細胞が自らの構成成分を小胞体様の隔離膜で囲い込み、一般細胞質から隔離し、リソソームと融合することによって分解する現象であり、正常の細胞では代謝の恒常性維持に必須の現象である。通常、オートファジーの亢進に基づくリソソームの活性化は、細胞の生存を維持するために必要なアミノ酸や生理活性のあるモノマーの供給源として機能することが推測されている。しかし、胎生期の一部の神経細胞の死やある種の神経疾患による細胞死は、明らかにアポトーシスやネクロトーシスの像と異なり、細胞質にオートファゴソームが充満した形態で死に至る。この死は、オートファジー性細胞死 (II型神経細胞死 ; Clarke, P. (1991)) と呼ばれる。近年、多くの神経変性疾患でポリグルタミン鎖に代表されるように細胞内封入体の形成と細胞死との関係が報告されている。細胞内の不要なポリペプチド鎖は、可溶性であればユビキチン-プロテアソーム系で分解され、不溶性であればオートファジー (自食作用) によりリソソーム系で分解されることが

予想される。実際、多くの神経細胞死でオートファジーが誘導される。しかし、その構造を正確に把握し、分子レベルでオートファゴソームであることを指摘した研究はほとんどない。

私達は、小胞体ストレスとの関連性が高い、短時間脳虚血に伴う遅延型神経細胞死では、リソソーム/オートファジーが関与する積極的細胞死であることを指摘した

(Nitatori et al., 1995)。また、オートファジー/リソソームに注目して、細胞死の分子機構をラット褐色細胞腫由来のPC12細胞で検討した結果、血清除去に基づくPC12細胞の細胞死には、カスパーゼ依存性の経路と独立して、オートファジーと、その下流でリソソームカテプシンDとBで制御される細胞死の経路が存在することを明らかにした

(Shibata et al., 1998; Isahara et al., 1999)。私達はさらに、生後1週齢のマウスの低酸素-虚血負荷を受けた神経細胞で電子顕微鏡的にオートファゴソームがたくさん認められること、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への変換が起り、顆粒状の局在を



カスパーゼ3欠損(Casp 3 -/-)および対照群(Casp 3 +/+)マウスの45分の低酸素-脳虚血負荷36時間後の海馬領域のTUNEL染色像。両群とも海馬全体にTUNEL陽性細胞が出現している。  
スケールバー: 100  $\mu$ m

生後1週齢のC57BL/6J系統の野生型マウスおよびC57BL/6J系統にバッククロス済みのカスパーゼ3欠損マウス用い、低酸素-脳虚血

呈することを明らかにしてきた。

しかし現在のところ、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が誘発されて細胞死に繋がるのか、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。一方従来の報告によると、げっ歯類の低酸素-虚血負荷モデルではカスパーゼ3をはじめとするアポトーシスの実効因子がその神経細胞死に関わることが報告されてきた。しかし、オートファジー性細胞死はその形態像がいわゆる典型的なアポトーシス像と異なることからカスパーゼ非依存性である可能性がある。そこで低酸素-虚血負荷モデルにおいてカスパーゼ依存性の細胞死とオートファジー依存性の細胞死の寄与の度合いを比較検討することはそのメカニズムにせまる上で重要である。

アポトーシスの代表的な実効因子であるカスパーゼ3の欠損マウスは当初の解析では胎生致死となるとされたが(Kuida et al., 1996)、C57BL/6系統にバッククロスすることにより出生し、繁殖力を持つことが分かっている(Leonard et al., 2002)。そこで本研究ではこの系統のマウスを低酸素-虚血負荷をかけ、神経細胞死の程度を対照群と比較検討することを試みた。

## B. 研究方法

(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度に保温した容器(酸素濃度8%、窒素濃度92%に調節)に同マウスを45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、0.1M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ないしOCTコンパウンドに包埋し、光学顕微鏡用の連続切片を作製した。光学顕微鏡用切片を用いて、ヘマトキシリンエオシン染色、TUNEL染色、TUNEL染色と活性型カスパーゼ3ないし7に対する抗体による2重染色を行なった。

## C. 研究結果

カスパーゼ3欠損マウスおよび対照群の野生型マウスを用いて、低酸素-虚血負荷後36時間の時点で、同領域の錐体細胞でTUNEL陽性となる細胞数を比較検討した。図に示す如く、海馬CA1錐体細胞でTUNEL陽性の細胞数は対照群と全く変化がなかった。カスパーゼ7はカスパーゼ3と酵素活性が類似しているアポトーシスの実効因子であるが、活性型カスパーゼ7に対する特異抗体を用いて免疫染色を行なった結果、野生型、カスパーゼ欠損マウスともにカスパーゼ7陽性細胞を認めなかった。

## D. 考察

低酸素-虚血負荷による海馬錐体細胞の神経細胞死におけるカスパーゼ3の役割についてその欠損マウスを用いた実験により検討を行った。その結果、カスパーゼ3が無くても野生型と同様虚血による神経細胞死が誘導されることが判明した。またカスパーゼ3類似の分子であるカスパーゼ7が代償的に活性化されている可能性も否定された。最近、カスパーゼ3と7のダブルノックアウトマウスの細胞を用いた実験結果が発表されたが、それによると、この2酵素を欠失した線維芽細胞は、ミトコンドリアを介したアポトーシスと細胞死受容体を介したアポトーシスの両方に強い耐性を示すことが分かった。さらに従来カスパーゼ非依存性細胞死に関わるとされてきたApoptosis Inducing Factor (AIF)の核への移行も完全に抑えた(Lakhani et al., 2006)。この知見と今回得られた実験結果を考え合わせると、低酸素-虚血負荷による海馬錐体細胞の神経細胞死においては、カスパーゼ3による典型的なアポトーシスの寄与はほとんどないことが分かる。また近年、低酸素-虚血負荷においても、AIFがカスパーゼ非依存性の細胞死の因子とする報告が散見されるが、このAIFを私達がカスパーゼ3欠損マウスで見いだしたカスパーゼ非依存性の細胞死の実効因子と考えることは、上記ダブルノックアウトマウス報告からすると困難である。最近、神経系特異的にオートファジーを起こさないノックアウトマウス(Atg7ノックアウトマウス)が作成された(Komatsu et al., in press)。現在私達はこのマウスを用いてカスパーゼ3欠損マウスと同様低酸素-虚血負荷を行ない、オートファジー性細胞死の寄与を検討しているところである。

## E. 結論

低酸素-虚血負荷実験による海馬錐体細胞の神経細胞死はカスパーゼに全く依存していないことがアポトーシスの代表的な実効因子であるカスパーゼ3欠損マウスを用いた実験から明らかとなった。

## F. 参考文献

Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K (in press) Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration. *Nature*  
Ishii M, Iwai K, Koike M, Ohshima S, Kudo-

Tanaka E, Ishii T, Mima T, Katada Y, Miyatake K, Uchiyama Y, Saeaki Y (in press) RANKL-induced expression of tetraspanin CD9 in lipid raft membrane microdomain is essential for cell fusion during osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res.*

Yoshimura K, Shibata M, Koike M, Gotoh K, Fukaya M, Watanabe M, Uchiyama Y (in press) Effects of RNA interference of Atg4B on the limited proteolysis of LC3 in PC12 cells and expression of Atg4B in various rat tissues.

### Autophagy

Zhu C, Xu F, Wang X, Shibata M, Uchiyama Y, Blomgren K, Hagberg H (in press) Different apoptotic mechanisms are activated in male and female brains after neonatal hypoxia-ischaemia. *J Neurochem.* 96:1016-27

Koike M, Shibata M, Waguri S, Yoshimura K, Tanida I, Kominami E, Gotow G, Peters C, Figura Kv, Mizushima N, Saftig P and Uchiyama Y (2005) Participation of autophagy in storage of lysosomes in neurons from mouse models of neuronal ceroid-lipofuscinoses (Batten disease). *Am J Pathol* 167:1713-1728

Yu WH, Cuervo AM, Kumar A, Peterhoff CM, Schmidt SD, Lee JH, Mohan PS, Mercken M, Farnery MR, Tjernberg LO, Jiang Y, Duff K, Uchiyama Y, J Näslund, Mathews PM, Cataldo AM, Nixon RA (2005) Macroautophagy—a novel amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) peptide-generating pathway activated in alzheimer's disease. *J Cell Biol* 171: 87-98

Shimizu, T., Hayashi, Y., Yamada, J., Zhang, J., Yamasaki, J., Ukai, K., Koike, M., Mine, K., Figura, K., Peters, C., Saftig, P., Fukuda, T., Uchiyama, Y., Nakanishi, H. (2005) Proteolytic Degradation of Glutamate Decarboxylase Mediates Disinhibition of Hippocampal CA3 Pyramidal Cells in Cathepsin D-deficient Mice. *J Neurochem* 94:680-690

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
Miyazaki M, Ozawa K, Hori O, Kitao Y, Matsushita K, Ogawa S, and Matsuyama T.	Expression of ORP150 (150 kDa oxygen regulated protein) in the hippocampus suppresses delayed neuronal cell death.	J. Cereb. Blood Flow Metab.	22	979-987	2002
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	1486-1496	2004
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
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
Popivanova BK, Koike K, Tonchev AB, Ishida Y, Kondo T, Ogawa S, Mukaida N, Inoue M, Yamashima T.	Accumulation of microglial cells expressing ELR motif-positive CXC chemokines and their receptors CXCR2 in monkey hippocampus after ischemia-reperfusion.	Brain Res.	970	195-204	2003
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
Nishimoto, S., Kawane, K., Watanabe-Fukunaga, R., Fukuyama, H., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y., Hashida, N., Ohguro, N., Tano, Y., Morimoto, T., Fukuda, Y., Nagata, S.	Nuclear cataract caused by a lack of DNA degradation in the mouse eye lens.	Nature	424	1071-1074	2003
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
Kiyoko Fukami, Manabu Yoshida, Takafumi Inoue, Manabu Kurokawa, Rafael A. Fissore, Nobuaki Yoshida, Katsuhiko Mikoshiba, Tadaomi Takenawa.	Phospholipase C-4 is required for Ca <sup>2+</sup> -mobilization essential for acrosome reaction in sperm.	The Journal of Cell Biology	161	79-88	2004
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

# 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。小胞体にはリボゾ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

サイド  
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

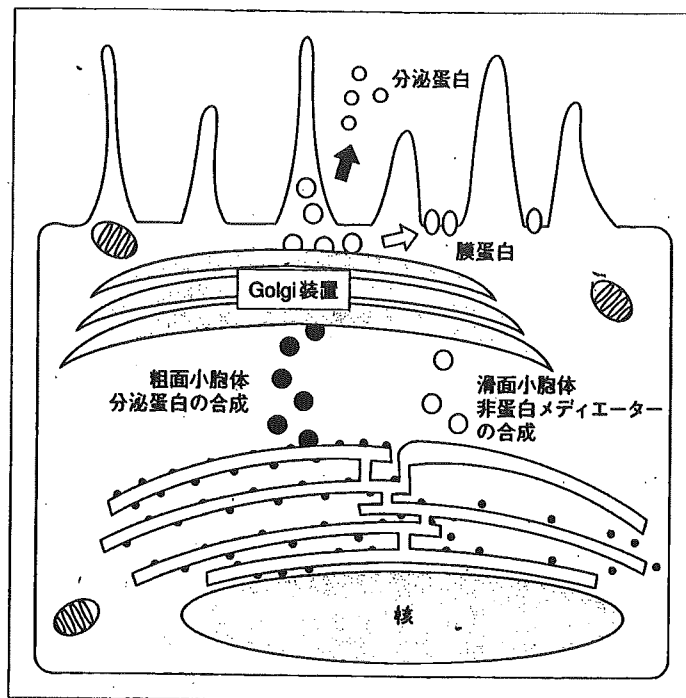


図1 小胞体の機能と構造

導されることが知られている<sup>1)</sup>。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<sup>2)</sup>。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っ

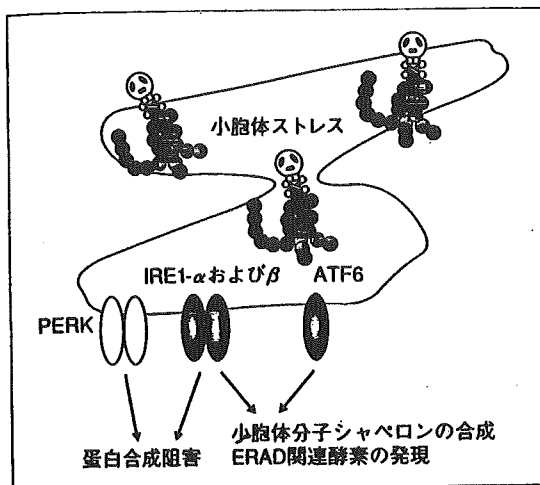


図2 小胞体ストレスとUPR

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<sup>3)</sup>。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 UPR (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<sup>4)</sup>。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 SIP 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<sup>5)</sup> (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<sup>6)</sup>。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<sup>7)</sup>。

### ● 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<sup>8)</sup>。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<sup>9)</sup>。

UPR の項で紹介した IRE1 には IRE1- $\alpha$  と IRE1- $\beta$  の 2 つのアイソフォームが存在するが、IRE1- $\beta$  が 28Sr RNA 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<sup>10)</sup>。また、これ以外に小胞体で発生する活性酸素が NF- $\kappa$ B 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)。

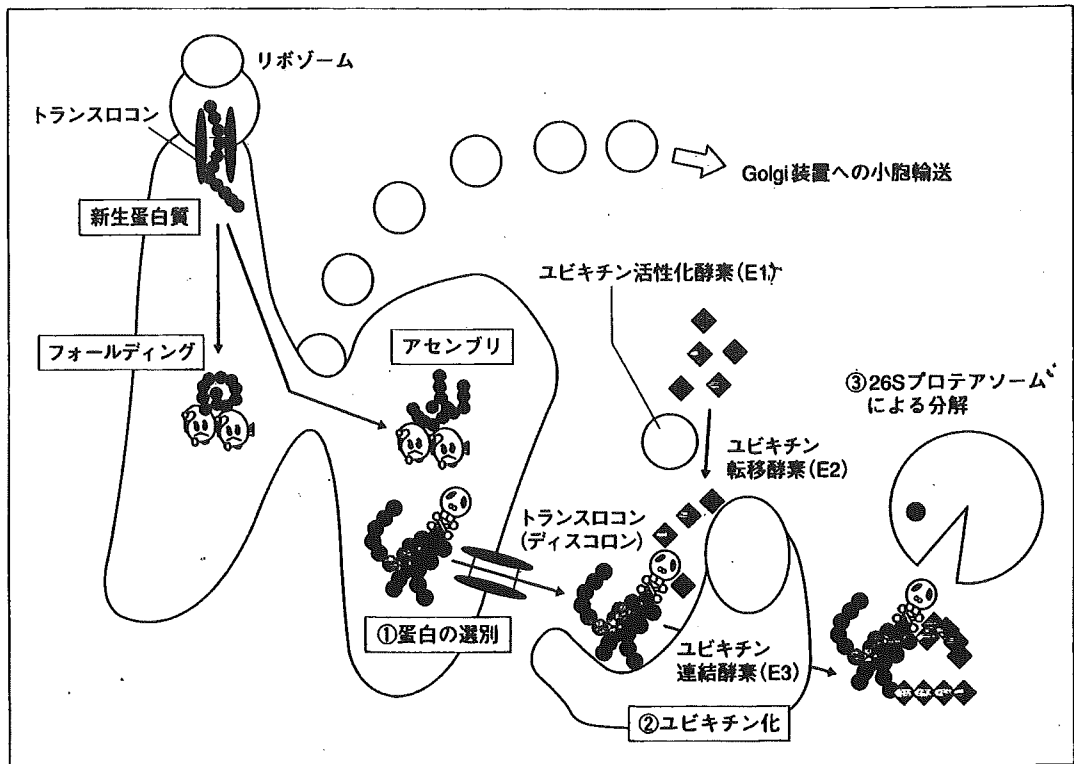


図 3 小胞体ストレスとERAD

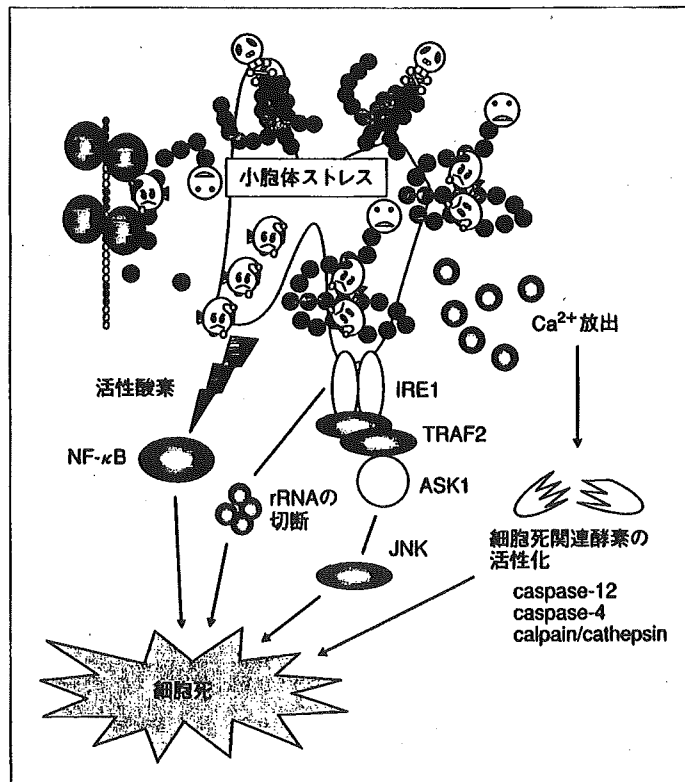


図 4 小胞体ストレスと細胞死



## ● 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<sup>11)</sup>、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<sup>12)</sup>。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,<sup>1\*</sup> Mayuki Miyazaki,<sup>2</sup> Takashi Tamatani,<sup>1</sup> Kentaro Ozawa,<sup>1</sup> Katsura Takano,<sup>3</sup> Masaru Okabe,<sup>4</sup> Masahito Ikawa,<sup>4</sup> Enno Hartmann,<sup>5</sup> Petra Mai,<sup>5</sup> David M. Stern,<sup>6</sup> Yasuko Kitao,<sup>1</sup> and Satoshi Ogawa<sup>1</sup>

Department of Neuroanatomy, Kanazawa University Graduate School of Medical Science, Kanazawa City, Ishikawa, Japan<sup>1</sup>; Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, Japan<sup>2</sup>; Laboratory of Molecular Pharmacology, Kanazawa University Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa City, Ishikawa, Japan<sup>3</sup>; Genomic Information Service Center, Osaka University, Osaka, Japan<sup>4</sup>; CSCM, Institut für Biologie, Universität Lübeck, Lübeck, Germany<sup>5</sup>; and Dean's Office, University of Cincinnati College of Medicine, Cincinnati, Ohio<sup>6</sup>

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<sup>-/-</sup> 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<sup>-/-</sup> 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<sup>-/-</sup> mice, and growth hormone production was slowed in SERP1<sup>-/-</sup> pituitary after insulin stimulation. Experiments using pancreatic microsomes revealed aberrant association of ribosomes and the Sec61 complex and enhanced ER stress in SERP1<sup>-/-</sup> pancreas. In basal conditions, the Sec61 complex in SERP1<sup>-/-</sup> microsomes was more cofractionated with ribosomes, compared with SERP1<sup>+/+</sup> 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.

**Fn\*/AQ:B** 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 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ) (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<sup>-/-</sup> 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  $\alpha$  and  $\beta$  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  $\mu$ g/ml aprotinin, 1  $\mu$ g/ml leupeptin, and 1  $\mu$ 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  $\mu$ g/ml aprotinin, 1  $\mu$ g/ml leupeptin, and 1  $\mu$ g/ml pepstatin. Western blotting was performed with antibodies against SERP1/RAMP4 (3), Sec61 $\alpha$  (3), KDEL (StressGen Biotechnologies Corp., Victoria, British Columbia, Canada), Herp (7), P-eIF2 $\alpha$  (Cell Signaling Technology, Beverly, MA), eIF2 $\alpha$  (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  $\beta$ -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- $\mu$ 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.

AQ: E

**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 F<sub>1</sub> to F<sub>3</sub> 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<sup>+/+</sup>, SERP1<sup>+/-</sup>, and SERP1<sup>-/-</sup> mice, sex-matched siblings derived from mating SERP1<sup>+/-</sup> animals were used.

**Glucose, insulin, and growth hormone measurements.** Blood glucose levels were determined using a portable glucose-measuring device (Dexter-Z, Bayer Medical Co., Tokyo, Japan). Intraperitoneal glucose tolerance tests (ip-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 Shibayagi 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<sup>+/+</sup>, SERP1<sup>+/-</sup>, or SERP1<sup>-/-</sup> 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 [<sup>35</sup>S]Met/Cys (200  $\mu$ 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  $\mu$ g/ml aprotinin, 1  $\mu$ g/ml leupeptin, and 1  $\mu$ 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 ( $1 \times 10^7$  to  $2 \times 10^7$  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<sup>+/+</sup> or SERP1<sup>-/-</sup> 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)<sub>2</sub>, 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 [<sup>35</sup>S]Met/Cys (200  $\mu$ Ci; Amersham Pharmacia Biotech Inc.) for 30 min at 30°C, half of the samples (12.5  $\mu$ l) were precipitated with 20% trichloroacetic acid. The pellets were washed with acetone and dissolved in SDS sample buffer. The newly synthesized proteins ( $\beta$ -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).

AQ: F

**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  $\mu$ g/ $\mu$ 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)<sub>2</sub>, 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.

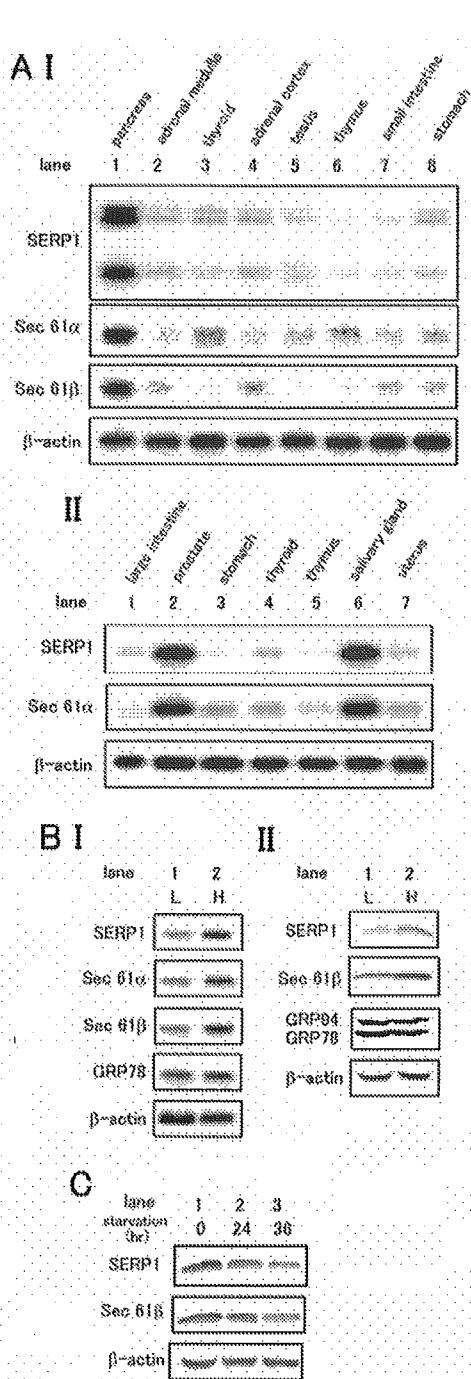
**Laser densitometric analysis and measurement of pancreatic islets and pituitary.** Laser densitometric analysis was performed to semiquantitate results of Western and Northern blotting as described previously (7). The sizes of pancreatic islets, pituitary anterior lobes, and intermediate/posterior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

## RESULTS

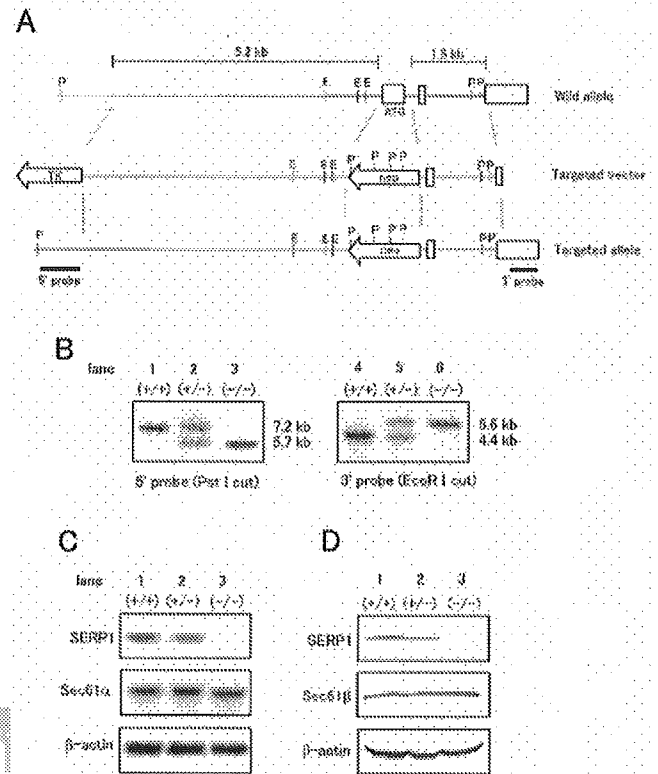
**Expression of SERP1 in secretory tissue.** In order to identify a model system for the analysis of SERP1 function, its expression was determined in different human and mouse organs (Fig. 1AI and AII; also data not shown). SERP1 transcripts, together with those of the Sec61 complex, were expressed at 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).

F1/AQ: G

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 ( $\sim 2.2$ -fold increase at RNA level [Fig. 1BI] and  $\sim 2.4$ -fold at antigen level



**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 <sup>32</sup>P-labeled cDNA probes. **B.** Expression of SERP1 and the complex in MIN6 cells. I. MIN6 cells (10<sup>7</sup> 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 × 10<sup>6</sup> 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<sup>-/-</sup> 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); E, EcoRI; P, PstI. **B.** Southern blotting of mouse tail DNA in a litter born to two heterozygotes (SERP1<sup>+/-</sup>). Purified DNA was digested with PstI (lanes 1 to 3) or EcoRI (lanes 4 to 6) and hybridized with 5' or 3' probes as indicated in panel A. The mutant 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<sup>+/+</sup>, SERP1<sup>+/-</sup>, and SERP1<sup>-/-</sup> mice at 3 weeks after birth. Total liver RNA (20 μg) was hybridized with <sup>32</sup>P-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<sup>-/-</sup> 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<sup>+/+</sup> and SERP1<sup>+/-</sup> mice (0.9 ± 0.1 g for SERP1<sup>-/-</sup> and 1.0 ± 0.1 g for other genotypes). However, by 3 weeks of