

平成 22 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究（B）
研究期間：2007～2009
課題番号：19300130
研究課題名（和文） 老化脳機能制御への基盤分子に関する研究：神経骨格制御から神経寿命制御へ
研究課題名（英文） Research on the fundamental molecules in relation to controlling brain aging: From neuronal cytoskeleton regulation to neuronal longevity control
研究代表者
森 望 (MORI NOZOMU)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：00130394

研究成果の概要（和文）：

これまで研究の主体としてきた N-Shc と相互作用し、NMDA 受容体や Trk 受容体からのシグナル伝達に関係すると目される Grit/RICS の遺伝子欠損マウスを東大分生研から移入し交配を続け、N-Shc とのダブル KO マウスの作成をした。顕著な異常症状はなく、神経細胞の培養などで比較を進めている。一方、N-Shc-Grit/RICS からアクチン骨格制御への要となる Homer/Cupidin について、他の関連分子との機能連関による神経樹状突起スパインの形態制御についてとりまとめ論文公表した (Shiraishi-Yamaguchi et al., 2009)。N-Shc が媒介する神経栄養因子 BDNF の転写誘導に関して、NRSF/REST による制御機構をとりまとめ論文公表した (Hara et al., 2009)。当初、本研究の主目的ではなかったが、研究を進める過程で、これまで見てきた海馬での神経可塑性に加え、小脳での平行線維-プルキンエ細胞シナプスでの長期増強 (LTP) の観察か連携研究者との共同で可能となった。このシステムで老若のマウスの小脳の機能可塑性を比較検討したところ、老齢動物で劇的な低下がみられた。興味深いことに、若齢動物でも小脳スライスを事前に酸化処理しておくこと、可塑性は低下した。老化過程での酸化ストレスの蓄積による小脳機能の低下が結論づけられた。さらに、この可塑性は一酸化窒素 (NO) による活性化が必須であることがわかっていたので、NO シグナルと酸化ストレスの関係を調べた。すると、酸化シグナルはまさに NO による小脳蛋白質の Cys 残基の S-ニトロシル化をブロックすることがわかった。すなわち、若い動物では NO による Cys の S-ニトロシル化を介して神経可塑性を発揮できるが、老齢動物では酸化ストレスの蓄積のため、この S-ニトロシル化がうまく進まないことが、老齢動物における神経可塑性の低下を来す、と結論づけられた (Kakizawa et al., 2010, 印刷中)。最近注目をあびるようになった寿命関連遺伝子である SIRT について、SIRT2 と同じくチューブリンの脱アセチル化酵素である HDAC6 の機能性に着目し、特に老化細胞で生じやすい蛋白質凝集プロセスへの関与を検討した。その結果、HDAC6 は Poly Q を使ったモデル系で蛋白質凝集を促進する結果を得た (Shibazaki et al., 投稿準備中)。最後に、長崎を中心に日韓の老化研究ネットワークの連携を促進すべく合同シンポジウムを開催し、その報告をとりまとめ老化の専門誌にて公表した (Shimokawa et al., 2009)。

研究成果の概要（英文）：

While I previously established N-Shc gene deficient mouse, the so-called KO mouse, we now made N-Shc and Grit/RICS double KO mouse. In order to understand molecular mechanisms of actin dynamics regulation via N-Shc, we examined the role of Homer/Cupidin, an anchoring molecule to actins at neuronal synapses. We also analyzed the transcriptional regulatory mechanisms of BDNF promoter by NRSF/REST. In aged brains, it has been well known that various functions, particularly in hippocampus and cerebrum, do decrease, but little is known about the cerebellar function. We, therefore, asked whether synaptic LTP in cerebellum changes or not in aging, and found that it indeed declined with age. We further found that the reduction of LTP is strongly affected by oxidative stress. Since the LTP at parallel fiber-Purkinje cell synapse depend on NO (nitric oxide), we assumed and finally

demonstrated that this NO-dependent LTP is impaired by oxidative stress during aging. We also analyzed the effects of HDAC6 and SIRT2 in the protein aggregate turnover in neurons, and found that HDAC6 stimulated poly glutamin-mediated protein aggregation in neuronal cells, which may be relevant to the studies of age-related neurodegenerative diseases. Finally, we established Asian research consortium on aging.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2008年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2009年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：神経可塑性、シグナル伝達、神経変性、アクチン、微小管

1. 研究開始当初の背景

本研究開始以前に、われわれは、成体脳、老化脳における種々の神経特異的分子の果たす役割についての解析を進め、神経応答に関する機能的な劣化が神経変性等の病状に至る前の生理的な老化に関わることを主張してきた。具体的には、神経の突起伸展に関する微小管崩壊因子 SCG10 を単離し、その後、SCLIP (SCG10-like protein) や RB3 などのホモログも同様に強力な微小管崩壊活性をもつこと、しかし、分子内の複数のセリン残基のリン酸化によってその崩壊活性は完全に消失することから、これらの分子が神経細胞の微小管のダイナミズムの制御因子となること、それが神経の活性化後の種々のキナーゼの活性化状態で変動するが中でも脳海馬の NMDA 受容体活性化に呼応して SCG10 の Ser73 の特異的なリン酸化が亢進することを示していた。また、発達期の視覚野可塑性の臨界期には SCG10 の発現が高いが、成体脳においては SCLIP や RB3 の発現が強く、また成体脳での誘導現象に関しては RB3 が最もよく応答することを示した。

一方、神経栄養因子 BDNF の受容体 TrkB のシグナリングに関与する中枢特異的なシグナル伝達分子として単離した N-Shc (ShcC) は、NMDA 受容体の Src や Fyn によるチロシンリン酸化修飾に関連して、受容

体のモジュレータとなることを明らかにした。この発見は、N-Shc/ShcC 遺伝子欠損マウスの記憶学習能が上がり、同時に海馬での長期増強 LTP が亢進している事実に由来する。N-Shc はその PTB ドメインで NR2B サブユニットに直接結合するが、ShcA に関して従来知られていた Grb2 結合サイトではない新しいシグナルアウトプットがあるが、それがどうして記憶学習能の向上へ向かわせるのかは明らかでない。近年、グルタミン酸受容体の興奮後、スパインの形態が活性に応じて変動すること、その背後にはポストシナプス側でのアクチン骨格の再編成が起こることがよく議論される。それに関連して、われわれは、N-Shc の PTB ドメインへの結合分子として脳での発現が強い新規 Rho-GAP を見だし、Grit と命名した。最近それが、神経ネットワーク形成に関わるカドヘリンシグナリングや NMDA 受容体シグナリングにも関与するとされた RICS と同一分子であることがわかり、Grit/RICS の多彩な機能が注目されるようになった。

N-Shc や RB3 などの神経特異的な分子は、神経選択的サイレンサー制御因子 NRSF/REST によって転写制御を受ける。神経活性化に伴うこれらの分子の誘導にも、NRSF が関与すると想定されるが、NRSF による神経クロマチンの制御は神経再生や神経幹細胞からの初期分化にも重要な働きをす

る。また、一部の神経変性疾患（ハンチントン舞踏病とダウン症）での発現異常も観察されている。われわれは、NRSF による神経遺伝子の転写抑制機構を解明し、転写補因子との複合体での立体構造やクロマチンリモデリング因子 Brm との結合性などを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

発達期における脳の可塑性が非常に高いことはよく知られているが、成体脳においてもいわゆる記憶学習の成立や脳損傷後の機能回復あるいは神経ネットワーク再編にみられるように、ある程度の構造的ならびに機能的な可塑性応答能力を保持している。しかし、その可塑性応答能力は老化とともに確実に減退する。高齢期の脳においては、いわゆるアルツハイマー病等の神経変性疾患に至らずとも脳は生理的に老化し、可塑性の減退がみられる。成体脳において脳が如何に健全に機能しうるか、また老化脳において脳がいかに機能低下を来すか、それを理解するためには、神経の可塑性応答の分子機構を明らかにする必要がある。本研究では、神経の分化制御や栄養因子応答に関わる神経特異的な分子群の研究結果を背景に、神経の可塑性応答に関わる分子機構、特に、アクチン骨格系と微小管骨格系との制御因子の機能とその周辺分子ならびにそれらの誘導に関わる神経特異的シグナル伝達分子と転写制御因子との機能連関を中心に理解を進め、成体脳および老化脳における可塑性制御の分子機構とその機能低下の原因を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) N-Shc-Grit 系分子による脳海馬神経の機能的可塑性におけるアクチン骨格動態制御： N-Shc および Grit/RICS 関連クローンおよび生化学的解析については文献 1、脳海馬からの神経の初代培養とアクチン骨格動態の観察方法については文献 5 に記したとおり。

(2) SCG10 関連分子のリン酸化制御による神経の構造可塑性および機能可塑性への微小管動態制御： SCG10 関連クローンについては過去の文献を参照 (Mori and Morii, 2002; Morii et al., 2006)。GSK3b およびその阻害剤 BIO については市販の物を入手した。生化学的解析方法については、上記文献の他、文献 2, 3 を参照。

(3) 神経骨格動態制御因子からみる神経老化と寿命の制御：

SIRT2, HDAC6 関連クローンはそれぞれ鳥取大押村研究室、理化学研究所吉田研究室より分与された。老化にともなう小脳機能、特に平行線維-プルキンエ細胞間のシナプスの電気生理的手法については文献 8 に記したとおり。

4. 研究成果

(1) N-Shc-Grit 系分子による脳海馬神経の機能的可塑性におけるアクチン骨格動態制御：

これまで研究の主体としてきた N-Shc と相互作用し、NMDA 受容体や Trk 受容体からのシグナル伝達に関係すると目される Grit/RICS の遺伝子欠損マウスを東大分生研から移入し交配を続け、N-Shc とのダブル KO マウスの作成をした。顕著な異常症状はなく、神経細胞の培養などで比較を進めている。一方、N-Shc-Grit/RICS からアクチン骨格制御への要となる Homer/Cupidin について、他の関連分子との機能連関による神経樹状突起スパインの形態制御についてとりまとめ論文公表した (Shiraishi-Yamaguchi et al., 2009)。

N-Shc が媒介する神経栄養因子 BDNF の転写誘導に関して、NRSF/REST による制御機構をとりまとめ論文公表した (Hara et al., 2009)。

(2) SCG10 関連分子のリン酸化制御による神経の構造可塑性および機能可塑性への微小管動態制御：

SCG10 は、4 箇所 of リン酸化部位を持ち、PKA, MAPK, cdk5 などリン酸化酵素でリン酸化を受け、不活化される。同様に、安定化因子も種々のリン酸化酵素で活性調節されることが報告されており、微小管制御において、リン酸化は重要な分子機構である。GSK3b は CRMP2, EB/APC, CLIP/CLASP, MAP1b, tau, MAP2 など多くの安定化因子をリン酸化し、重要な分子調節機構として働いており、微小管制御において中心的な役割を果たす。これに対して、SCG10 を始めとする不安定化因子の制御に関しては現在まで報告がない。SCG10 のアミノ酸配列を検索すると N 末端側の神経成長円錐への輸送に関連する領域の脂肪酸結合配列付近に GSK3 によるリン酸化コンセンサス配列を見出すことができ、SCG10 が GSK3 によりリン酸化制御を受ける可能性が出てきた。そこで、海馬初代培養神経細胞を用いて、GSK3b による SCG10 制御を検証した。BIO は、GSK3 特異的な阻害剤として開発され、海馬初代培養神経細胞においては作用濃度により効果が異なり、低濃度 (10 nM) ではプランチング増加や CRMP2 リン酸化阻害、高濃度 (300 nM) では神経突起伸展阻害や MAP1b リン酸化阻害がおこる。GSK3b の阻害は、微小管を安定化方向へと導き、その結果、神経突起伸展の阻害が起こってくると考えられている。このとき、SCG10 の細胞内局在は、見かけ上、BIO による影響は見られなかった。しかしながら、免疫染色時の蛍光強度を細胞体、神経突起内で比較した場合、細胞体での濃度依存的な蛍光強度の増加が見られ、300 nM BIO では約 3 倍の増加が観察され、SCG10

が細胞体に蓄積していると考えられた。同様な結果が、GSK3b-KD 変異体の強制発現においても見られ、SCG10 が GSK3b により制御されている可能性を示唆した。しかし、神経成長円錐において SCG10 のシグナル消失が見られないことから、この効果は SCG10 輸送の直接的な阻害によるものとは考えにくい。代わる可能性としては、SCG10 の安定化に起因するターンオーバーの低下が考えられた。SCG10 は、微小管不安定化因子でありながら、神経回路形成時に高い発現を示す。SCG10 の作用場所は明らかになっていないが、細胞体と神経成長円錐に豊富に存在することから、細胞体から、常時、神経成長円錐内の SCG10 レベルを検知しながら輸送されていると考えられる。神経成長円錐内の SCG10 が安定化され、タンパク質のターンオーバーが抑制されると、輸送が抑制され、結果として、細胞体内に SCG10 が蓄積すると考えられる。GSK3b と SCG10 安定化との関連は、COS 細胞に共発現させた場合に、SCG10 発現レベルの増加として観察された。しかしながら、GSK3b wild type, KD 変異体共に同様な増加が見られ、また、SCG10 の主要な 4 カ所のリン酸化部位変異体でも SCG10 発現レベルの増加がみられる。このことは、GSK3b が SCG10 を直接リン酸化することによる効果ではなく、さらに、他のリン酸化酵素を活性化し SCG10 がリン酸化される間接的な効果でもないことを示している。代わって、GSK3b との共発現下で、SCG10 が未知因子との相互作用し、安定化していることを示している。GSK3b は、その活性化状態に依存して相互作用する分子を変え、リン酸化酵素としての働きだけではなく、一種のシグナルアダプター分子としての役割を持っていることが知られており、SCG10 がそのようなシグナル複合体により制御されているのかもしれない (Morii et al., 投稿準備中)。

(3) 神経骨格動態制御因子からみる神経老化と寿命の制御：

最近注目をあびるようになった寿命関連遺伝子である SIRT について、SIRT2 と同じくチューブリンの脱アセチル化酵素である HDAC6 の機能性に着目し、特に老化細胞で生じやすい蛋白質凝集プロセスへの関与を検討した。その結果、HDAC6 は Poly Q を使ったモデル系で蛋白質凝集を促進する結果を得た (Shibazaki et al., 投稿準備中)。

当初、本研究の主目的ではなかったが、研究を進める過程で、これまで見てきた海馬での神経可塑性に加え、小脳での平行線維-プルキンエ細胞シナプスでの長期増強 (LTP) の観察が連携研究者との共同で可能となっ

た。このシステムで老若のマウスの小脳の機能可塑性を比較検討したところ、老齢動物で劇的な低下がみられた。興味深いことに、若齢動物でも小脳スライスを事前に酸化処理しておく、可塑性は低下した。老化過程での酸化ストレスの蓄積による小脳機能の低下が結論づけられた。さらに、この可塑性は一酸化窒素 (NO) による活性化が必須であることがわかっていたので、NO シグナルと酸化ストレスの関係を調べた。すると、酸化シグナルはまさに NO による小脳蛋白質の Cys 残基の S-ニトロシル化をブロックすることがわかった。すなわち、若い動物では NO による Cys の S-ニトロシル化を介して神経可塑性を発揮できるが、老齢動物では酸化ストレスの蓄積のため、この S-ニトロシル化がうまく進まないことが、老化動物における神経可塑性の低下を来す、と結論づけられた。論文をとりまとめ投稿し、ごく最近受理された (Kakizawa et al, 2010, 印刷中)。

最後に、長崎を中心に日韓の老化研究ネットワークの連携を促進すべく合同シンポジウムを開催し、その報告をとりまとめ老化の専門誌にて公表した (Shimokawa et al., 2009)。

追記：これらの成果をもとに、老化研究に関しては、長崎大学を中心に国内の関連研究施設と韓国の 4 大学の老化関連研究機関との連携プロジェクトを開始することが可能となった (H22-26 アジア研究教育拠点形成事業「アジアの健康長寿をめざす老化研究と地域老年医療教育拠点の構築」/日本学術振興会)。また、この 3 年間の基盤研究の成果をもとに、H22-24 基盤研究 B「神経骨格ダイナミズムの陰陽制御と神経寿命」が採択されたので、さらに発展的な研究展開ができるよう努めたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

- ① Chen L, Miyamoto Y, Furuya K, Mori N, Sokabe M. PREGS induces long-term potentiation in the hippocampal dentate gyrus of adult rats via tyrosine phosphorylation of NR2B coupled to ERK/CREB signaling. *J. Neurophysiol.* 98, 1538-1548 (2007)
- ② Wang T, Wang Y, Kontani Y, Kobayashi Y, Sato Y, Mori N, Yamashita H. Evodiamine improves diet-induced obesity in a UCP1-independent manner: Involvement of anti-adipogenic mechanism and ERK/MAPK signaling. *Endocrinology*, 49, 358-366 (2008)
- ③ Yamashita H, Wang Y, Kimura K, Inokuma K,

- Saito M, Kontani Y, Kobayashi Y, Mori N, Impaired basal thermal homeostasis in rats lacking capsaicin-sensitive peripheral small sensory neurons. *J. Biochem.*, 143, 385-393 (2008)
- ④ Zhang P, Ikejima T, Mori N, Regulatory effects of Shc-related phosphotyrosine adaptor proteins on aging, *Acta Pharmaceutica Sinica* 43 (8), 793-800 (2008) (*in Chinese*)
- ⑤ Shiraishi-Yamaguchi Y, Sato Y, Sakai R, Mizutani A, Knöpfel T, Mori N, Mikoshiba K, Furuichi T., Interaction of Cupidin/Homer2 with two actin cytoskeletal regulators, Cdc42 small GTPase and Drebrin, in dendritic spines. *BMC Neurosci.* 2009 Mar 24;10:25. (14 pages)
- ⑥ Shimokawa I, Park SC, Mori N, Hwang ES, Japan-Korea Joint Seminar: Asian Aging Core for Longevity 2008 in Nagasaki---Toward the establishment of an asian aging research and education center. *Mech. Ageing Dev.*, 130, 198-201 (2009)
- ⑦ Hara D, Fukuchi M, Miyashita T, Tabuchi A, Takasaki I, Naruse Y, Mori N, Kondo T, and Tsuda M, Remote control of activity-dependent BDNF gene promoter-I transcription mediated by REST/NRSF. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 384 , 506-511 (2009)
- ⑧ Kakizawa S, Shibazaki M, Mori N, Protein oxidation inhibits NO-mediated signaling pathway for synaptic plasticity, *Neurobiol. Aging* (2010) *in press*
- ⑨ 森 望、大神和子：老化・神経変性における神経系の再生・分化のメカニズム *Cognition and Dementia* 特集「神経変性疾患の神経再生・神経移植」(メディカルレビュー社) 6(1) 9-17 (2007)
- ⑩ 森 望、神経の可塑性が脳を守る：脳の抗加齢は可能だ アンチ・エイジング医学-日本抗加齢医学会雑誌 2(2), 194-198 (2007)
- ⑪ 森 望、寿命の進化史と遺伝子 エコソフィア 特集「Agingの博物自然史」 19, 17-24 (2007)
- ⑫ 森 望、分子遺伝学の巨匠 Seymour Benzer—Methuselahの夢と足跡 実験医学 26 (5月号) 1271-1276 (2008)
- ⑬ 森 望、晩年のBenzer研究室の動向からみるショウジョウバエの分子老年遺伝学 基礎老化研究 32 (3) 1-5 (2008)
- ⑭ 森 望、未病からの老化制御：生理的老化と病的老化の狭間みる食養と抗加齢サプリ、未病と抗老化 18, 19-23 (2009)
- [学会発表] (海外8件 国内6件：計14件)
- ① Shiraishi-Yamaguchi Y In vitro neuronal aging: long-term cultured hippocampal neurons of an in vitro aging model、北米神経科学会、サンディエゴ国際会議場 (アメリカ・サンディエゴ)、2007年11月3-7日
- ② 森 望、Shc-related neuronal phosphotyrosine adaptors in brain aging and longevity control、第8回アジア・オセアニア国際老年学会議、北京国際会議センター (中国・北京) 2007年10月22-25日
- ③ 森 望、Roles of the neuronal phospho-tyrosine signal adaptor, N-Shc/ShcC, in the activity-dependent actin remodeling in the hippocampal post-synaptic spines、北米神経科学学会、サンディエゴ国際会議場 (アメリカ・サンディエゴ)、2007年11月3-7日
- ④ 森 望、Neuronal Shc: a molecular correlate of age-related cognitive decline and spine morphogenesis、日韓基礎老化学会合同シンポジウム、Yeungnam大学医学部 (韓国・テグ市)、2008年5月15日
- ⑤ 森 望、Roles and signaling mechanisms of the neural-specific Shc phospho-tyrosine adaptor in dendritic spine morphogenesis of hippocampal neurons、アジアパシフィック神経化学学会議、上海グットホープホテル (中国・上海) 2008年6月25日
- ⑥ 森 望、Neuronal Shc : a molecular correlate of age-related cognitive decline and spine morphogenesis、Symposium on Biological Complexity : Processes of Aging、ソーク研究所 (アメリカ・サンディエゴ)、2009年1月8-10日
- ⑦ 森 望、Neuronal Shc : a molecular correlate of age-related cognitive decline and spine morphogenesis、第2回ハーリム-長崎合同シンポジウム、ハーリム大学 (韓国・ソウル)、2009年2月9日
- ⑧ 森 望、Tubulin deacetylases in neuronal aging in vitro and in vivo、IAGG World Congress第19回国際老年学会、パリ国際会議場 (フランス・パリ)、2009年7月5日-9日
- ⑨ 森 望、脳の老化と神経変性におけるチューブリン脱アセチル化酵素 (TDACs)、第30回日本基礎老化学会、北海道厚生年金会館、2007年6月21日

- ⑩ 森 望、Shc系アダプター分子による神経活動依存的なアクチン骨格制御、日本神経科学大会・日本神経化学学会、パシフィコ横浜、2007年9月10-12日
- ⑪ 森 望、山口 陽子、リン酸化チロシンアダプター分子Shcを介したスパイン形成制御に関わるシグナル伝達経路、日本神経科学大会・日本神経化学学会、パシフィコ横浜、2007年9月10-12日
- ⑫ 森 望、寿命制御と神経生存におけるHDACsとTDACs、BMB2007 日本分子生物学会年会日本生化学大会、パシフィコ横浜、2007年12月11日
- ⑬ 森 望、寿命制御と神経生存におけるHDACsとTDACs、日本基礎老化学会第31回大会、長野県松本文化会館、2008年6月12日
- ⑭ 森 望、Roles of TDACs(Tubulin deacetylases)in neuronal aging and longevity control、AACL日韓共同セミナー：アジア老化研究教育拠点形成にむけて、ハウステンボス、2008年9月4日

[図書] (計 1件)

森 望、大内尉義 (編集)、東京大学出版会、神経系の加齢変化 (第2章第1節) in『新老年学第3版』、2009、113-154

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/anatomy1/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 望 (MORI NOZOMU)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：00130394

(2) 研究分担者

柴崎 晶彦 (SIBAZAKI MASAHIKO)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：20445109

(3) 連携研究者

柿澤 昌 (KAKIZAWA SHO)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・講師

研究者番号：40291059

白石-山口陽子 (SHIRAIISHI-YAMAGUCHI YOKO)

長崎大学・先導生命研究センター・研究支援

推進員

研究者番号：50311345