

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 7日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500341

研究課題名（和文）神経変成疾患の発症に関するストレスシグナルの解析

研究課題名（英文）Research for stress signalling underlying neuro-degenerating disease

研究代表者

小林 正明（KOBAYASHI MASAOKI）

東邦大学・医学部・講師

研究者番号：70246693

研究成果の概要（和文）：海馬および大脳皮質のニューロンに特徴的に発現するカルシウム結合タンパク質；ヒポカルシンは、カルシウム誘導性神経細胞死の抑制、小胞体ストレスの抑制、stress activated protein kinase (SAPK)の抑制、神経細胞内局所エネルギー供給機構を担っており、神経変性疾患の発症と進行への関与が考えられる。本研究では、ストレス応答によって活性化し、神経細胞死を誘導する mixed lineage kinase (MLK)3 に及ぼすヒポカルシンの作用について検討した。両者の相互作用について免疫沈降実験によって確認した。野生型マウスの海馬から抗ヒポカルシン抗体を用いてヒポカルシンを免疫沈降した場合、MLK3 はカルシウム依存性に共沈し、抗 MLK3 抗体を用いて MLK3 を免疫沈降した。ヒポカルシンはカルシウム依存性に共沈したことから、MLK3 活性について、ヒポカルシン欠損マウスの海馬から抗 MLK3 抗体を用いて MLK3wo 免疫沈降し、MKK4 を基質とした immunocomplex kinase assay を行った。カルシウム±、および組換え体ヒポカルシン±の条件で MLK3 活性を測定したところ、ヒポカルシンはカルシウム依存性に MLK3 活性を抑制する結果が得られた。また、ヒポカルシン欠損マウスの海馬では resting state における MLK3 の活性亢進が認められた。ヒポカルシン欠損マウスにカイニン酸を腹腔内投与した場合、誘導される MLK3 の活性化に亢進が認められ、TUNEL 染色陽性の神経細胞死の亢進を認めた。以上の結果から、ヒポカルシンは神経細胞内で MLK3 を介するストレス応答性の細胞死実行経路を抑制し、神経細胞の生存・維持に関与すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Acceleration of apoptosis and activation of caspases are observed in hippocalcin deficient hippocampal neurons. Here we examined the relation between hippocalcin and Hippocalcin and mixed lineage kinase (MLK)3, which is known to lead neuronal apoptosis. MLK3 were co-immunoprecipitated in a calcium-dependent manner. Immunocomplex kinase assay revealed that MLK3 kinase activity in hippocalcin deficient hippocampus was higher than that in wild type mice. In vitro kinase assay showed that recombinant hippocalcin inhibited MLK3 kinase activity in a calcium-dependent manner. Kainic acid-induced neuronal apoptosis was accelerated in hippocalcin deficient mice accompanied with enhancement in MLK3 activity. These results indicate that hippocalcin inhibits MLK3 kinase activity via direct interaction, and down-regulates apoptosis signaling in hippocampal neurons.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：ヒポカルシン・ストレス応答・神経細胞死・MLK3・カルシウムシグナリング

1. 研究開始当初の背景

分化を終えた神経細胞は幹細胞などの一部のものを除いて分裂・増殖を繰り返すことはなく数十年に渡って生存を続ける。成熟脳における神経細胞死は、不可逆的な機能障害をもたらすことになる。このため、神経細胞は様々な誘因による細胞死に対して抑制機構を持つと考えられる。ニューロンが選択的に変性・脱落する神経変性疾患において細胞死が誘導される過程は未解決の部分が多いが、いずれにも共通する病理所見として不溶性のタンパク質の蓄積が生じ、神経細胞の機能障害や細胞死をきたすと考えられている。細胞内で合成されたタンパク質のうち、高次構造に異常をもつものはユビキチン-プロテアソーム系で分解を受ける。異常タンパク質の生成と分解のバランスが崩れた場合、小胞体ストレスを誘導し、カルシウム恒常性が破綻すると細胞死をきたす一因となる。神経変性疾患の代表例であるアルツハイマー病では、老人斑アミロイドおよび神経原繊維変化という異常線維の蓄積と、海馬、大脳皮質神経細胞の脱落を特徴とする。神経原繊維変化の形成機構の詳細は判明していないが、微小管付随タンパク質；タウが過剰にリン酸化され、不溶化するとともに微小管の形成不全に基づく軸索輸送の低下と、異常リン酸化による ATP 消費により局所エネルギーの供給低下をきたすと考えられる。また、神経原繊維変化中のタウは SAPK カスケードの下流の *c-JUN* N-terminal kinase (JNK) 結合蛋白と相互作用することから、タウの過剰リン酸化機構における SAPK カスケードの影響が示唆されている (連携研究者； Prof. Jürgen Götz, JBC 2009; 284:20909-16)。

申請者らは、海馬および大脳皮質のニューロンに特徴的に発現するヒポカルシンを同定した (Kobayashi et al., *BBRC*, 189: 511-517 (1992); Kobayashi and Takamatsu, *Nature Signaling Gateway*, in press)。これまでの研究結果から、ヒポカルシンは、1) キナーゼカスケードの効率を制御し、

記憶・学習の形成・維持に関与する (*Neuroscience*, 132: 471-484 2005, *J. Neurosci. Res*, 85: 837-844, 2007)、2) グルタミン酸刺激や加齢に伴う小胞体ストレスを軽減し、カルシウム動態を保ち、海馬神経細胞死を抑制する (*Mol Cell Neurosci*, 28: 85-95 2005, *Neuroscience* 145: 495-504, 2007) ことを明らかとした。また、3) SAPK カスケードの MAPKKK として機能する mixed lineage kinase (MLK)3 と結合し、細胞死を抑制する (*J. Med. Soc. Toho Univ.* 55:93-101, 2008 (データの一部))、4) 脳型 creatine kinase B (CKB) をカルシウム依存性に細胞膜へ輸送し、局所での ATP 産生効率を上昇させる基礎データを得ている。これらのことから、ヒポカルシンは様々な誘因による細胞死に対して抑制的に機能すると考えられる。

2. 研究の目的

ヒポカルシンが関与する細胞の生存維持および細胞死の誘導を制御する機構の中で、本研究では、①アルツハイマー神経原線維変化の生成機構における SAPK カスケードならびに小胞体ストレスの関与、②局所エネルギーの供給機構に焦点を絞り、個体レベル (ヒポカルシン欠損マウスとアルツハイマー病モデルマウス)、細胞レベル、生化学レベルでヒポカルシンの作用確認を行う。アルツハイマー病モデルマウスは、タウの過剰リン酸化を誘導し、神経原線維変化を蓄積するタウ p301L トランスジェニックマウス (Prof. Jürgen Götz) を用い、国内外の研究施設と連携して研究を進行する。

3. 研究の方法

①神経原線維変化の生成機構における SAPK カスケードならびに小胞体ストレスの解析 (1-1-1) MLK3 キナーゼ活性におよぼすヒポカルシンの作用解析

ヒポカルシン欠損マウス脳より MLK3 を免疫沈降し、MLK3 キナーゼ活性におよぼす組換え体ヒポカルシン (N-ミリスチン酸化型) の作用を検出し、カルシウム濃度依存性につい

て検討した。

(1-1-2) MLK3 活性化過程におよぼすヒポカルシンの作用解析

MLK3 の活性化段階におけるヒポカルシンの作用を検討する。Rac1/Cdc42 の dominant active form を調整し、MLK3 の活性化を誘導し、組換え体ヒポカルシンの作用を確認した。(1-1-3) MLK3 のリン酸化状態におよぼすヒポカルシンの作用検討

MLK3 の活性化には、Rac1/Cdc42 との結合による自己リン酸化と、Akt キナーゼによるリン酸化が関与している。各段階での MLK3 のリン酸化状態におよぼすヒポカルシンの作用を、配列特異的抗リン酸化抗体を用いて確認した。

(1-2) 個体を用いたヒポカルシンの作用検討

野生型およびヒポカルシン欠損マウスに、カイニン酸の腹腔内投与による痙攣を誘発し、MLK3 活性、カスパーゼ活性の経時変化を検出し、apoptotic cell を検討した。

4. 研究成果

本研究では、ストレス応答によって活性化し、神経細胞死を誘導するmixed lineage kinase (MLK) 3に及ぼすヒポカルシンの作用について検討した。両者の相互作用について免疫沈降実験によって確認した。野生型マウスの海馬から抗ヒポカルシン抗体を用いてヒポカルシンを免疫沈降した場合、MLK3はカルシウム依存性に共沈し、抗MLK3抗体を用いてMLK3を免疫沈降した。ヒポカルシンはカルシウム依存性に共沈したことから、MLK3活性について、ヒポカルシン欠損マウスの海馬から抗MLK3抗体を用いてMLK3を免疫沈降し、MCK4を基質としたimmunocomplex kinase assayを行った。カルシウム±、および組換え体ヒポカルシン±の条件でMLK3活性を測定したところ、ヒポカルシンはカルシウム依存性にMLK3活性を抑制する結果が得られた。また、ヒポカルシン欠損マウスの海馬ではresting stateにおけるMLK3の活性亢進が認められた。ヒポカルシン欠損マウスにカイニン酸を腹腔内投与した場合、誘導されるMLK3の活性化に亢進が認められ、TUNEL染色陽性の神経細胞死の亢進を認めた。また、ヒポカルシンがAβ毒性による神経細胞死を軽減し、アルツハイマー病患者脳およびアルツハイマーモデルマウス脳で神経変性に抑制的に機能することを明らかとした(下図)。以上の結果から、ヒポカルシンは神経細胞内でMLK3を介するストレス応答性の

細胞死実行経路を抑制し、神経細胞の生存・維持に関与すると考えられる。

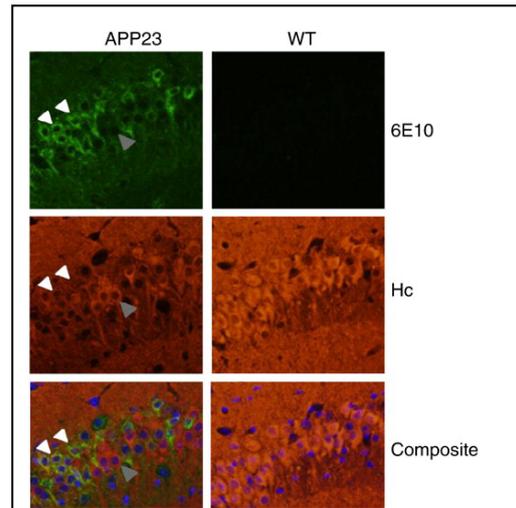


図 Confocal fluorescence analysis of 18 months-old Aβ-plaque-forming APP23 and wild-type littermate controls (WT). Sections were stained with Aβ/APP (6E10; green), hippocalcin (Hc; red). Neurons that have high 6E10 reactivity show very low hippocalcin staining (white arrowheads), while neurons that have high hippocalcin levels reveal no 6E10 Scale bar, 50 μm. (*Biochim Biophys Acta*, 1822: 1247-1257, 2012)

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4件)

- ① Kobayashi M; Hamanoue M, Masaki T, Takamatsu K: Hippocalcin mediates calcium-dependent translocation of brain-type creatine kinase (BB-CK) in hippocampal neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 429:142-147, 2012. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.10.125.
- ② Kobayashi M, Takamatsu K: Hippocalcin. *Encyclopedia of Signaling Molecules*. (ed: Choi S) Springer Reference, USA. 2012. DOI:10.1007/978-1-4419-0461-4_251.
- ③ Lim YA, Giese M, Shepherd C, Halliday G, Kobayashi M, Takamatsu K, Staufenbiel M, Eckert A, Gotz J: Role of hippocalcin in mediating Aβ toxicity. *Biochim Biophys Acta - Molecular Basis of Disease* 1822: 1247-1257, 2012. DOI: 10.1016/j.bbdis.2012.04.007.
- ④ Kim KS, Kobayashi M, Takamatsu K,

Tzingounis AV: Hippocalcin and KCNQ channels contribute to the kinetics of the slow afterhyperpolarization. *Biophysical Journal* 103(12) : 2446 - 2454, 2012. DOI: 10.1016/j.bpj.2012.11.002.

〔学会発表〕(計 8 件)

- ① Kobayashi M, Takamatsu K : Hippocalcin protects hippocampal neurons, against MLK3-mediated excitotoxic damage. 第 90 回日本生理学会大会, 東京, 2013.3.28
- ② 小林正明, 浜之上 誠, 高松 研: Binding profile and intracellular colocalization between hippocalcin and creatine kinase B subunit. 第 55 回日本神経化学会大会, 神戸, 2012.10.1
- ③ 小林正明: 脳虚血による神経細胞死の誘導機構および抑止機構の解析. 第 65 回東邦医学会総会 平成 22 年度医学研究科推進研究報告, 東京, 2011.11.11
- ④ 小林正明, 浜之上 誠, 高松 研: ヒポカルシンを介する脳型クレアチンキナーゼ (BB-CK) のカルシウム依存性膜移行. 第 34 回日本神経科学大会, 横浜, 2011.9.16
- ⑤ 小林正明, 浜之上 誠, 高松 研: ヒポカルシンと脳型クレアチンキナーゼ (CKB) の結合特性. 第 88 回日本生理学会大会・第 116 回日本解剖学会合同大会, 横浜, 2011.3 (震災によるWEB開催)
- ⑥ 小林正明, 細野なつえ: ストレス応答性神経細胞死の誘導機構および抑制機構の解析. 第 137 回東邦医学会例会, 東京, 2011.2.4
- ⑦ 小林正明, 浜之上 誠, 高松 研: 脳型クレアチンキナーゼのカルシウム/ヒポカルシン依存性トランスロケーション. *Nuero2010* (第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経化学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会合同大会), 神戸, 2010.9.2
- ⑧ 小林正明, 浜之上 誠, 高松 研: ヒポカルシンを介した脳型クレアチンキナーゼのカルシウム依存性トランスロケーション. 第 87 回日本生理学会大会, 岩手, 2010.5.21

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 正明 (KOBAYASHI MASAOKI)

東邦大学・医学部・講師

研究者番号 : 70246693

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし