

運動遺伝子研究チーム

Laboratory for Genes of Motor Systems

チームリーダー 木内 一 壽
KIUCHI, Kazutoshi

一般に、ドーパミン神経は運動のプログラムを任意に変換する能力を有すると考えられている。ドーパミンは大脳基底核のサーキットを円滑に作動させる順行性シグナルとして働いており、線条体に存在する神経栄養因子は逆行性シグナルとしてドーパミン神経の活動を支えている。ドーパミンの作用機序を遺伝子レベルで理解するためにはドーパミン神経の活動低下により線条体での発現が影響を受ける遺伝子を探索し、その遺伝子の機能を明らかにする必要がある。このテーマではドーパミン神経のチロシン水酸化酵素をノックアウトすることにより、線条体における遺伝子発現の解析を進めていきたい。一方、線条体においては、ドーパミン神経の活動、存続維持に影響を及ぼしていると考えられているグリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) が発現している。このテーマでは GDNF の遺伝子発現の調節機構を解析するとともに、線条体における GDNF のドーパミン神経の活動に及ぼす影響を明らかにしたい。また、ドーパミン神経毒によるアポトーシスと GDNF 受容体 GFR α -1/Ret との係わりを明らかにするとともに、cAMP 系のシグナル伝達の Ret を介するシグナル伝達経路に及ぼす影響について解析を進めていきたい。

1. ドーパミン神経の活動と線条体での遺伝子発現に関する研究

(1) ドーパミン欠損マウスの機能障害に関する解析 (小林, 松下)

本研究では、ドーパミンの線条体における役割を調べるため、Transgenic rescue 法によりドーパミン神経でのみカテコールアミン生合成の律速酵素であるチロシン水酸化酵素 (TH) を欠損するマウスを作製し、ドーパミンは生後発育期の運動機能に加えて、情動行動のコントロールにも不可欠の役割を持つことを明らかにしてきた。本年度はヒト TH 遺伝子のプロモーターに緑色蛍光タンパク質 (GFP) cDNA をレポーターとして繋ぎ、励起光を当てることによりドーパミン神経をはじめとしてカテコールアミン産生細胞を他の細胞より識別することのできるトランスジェニックマウスを作製した。今後は、ドーパミン神経細胞をクローン化するとともに、上記ミュータントマウスと掛け合わせることで、TH を欠失したドーパミン神経培養細胞をクローン化したい。

(2) 導電性高分子性神経刺激電極の開発とその応用に関する研究 (八木, 伊藤 (雄)*)

導電性高分子の 1 つであるポリピロールを用いて、神経細胞に対し長期にわたり刺激を与え、その電気生理学的な活動を測定するための電極の作製を試みた。酸化重合剤の光反応性を利用して、電極としては線幅 150 μ m、厚み 2.5 μ m のもので伝導度 3 S/cm のポリピロールパターンを作製す

ることができた。最小線幅 3 μ m までのパターンが作製可能である。また、ポリピロールにグルクロン酸を付加させた電極の作製も試みた。ポリピロールは高い生体親和性を示し、培養細胞は突起を伸展し、4 週間の長期にわたって生存することが確かめられた。

2. ドーパミン神経シナプス膜のドーパミントランスポーター (DAT) に関する研究 (足立, 木内 (清), 木内)

ドーパミントランスポーター (DAT) はドーパミン神経に特異的に発現している遺伝子である。マウス DAT 遺伝子をクローニングし、転写開始地点より 5' 側上流領域を含むもの、非翻訳領域であるエクソン 1 まで含むもの、および、イントロン 1 まで含むもの等をプロモーターとし GFP をレポーターとする各種のコンストラクトを作製した。現在、脳組織培養切片を用いて、ジーンデリバリーシステムにより遺伝子を導入し、DAT プロモーターの特異性の解析を進めている。

3. ドーパミン神経の神経栄養因子に関する研究

(1) ドーパミン神経に対する神経毒とグリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) との係わりに関する研究 (平田, 村口, 萩原)

本研究では、PC12 細胞は TH, DAT, GFR α -1, Ret 受容体型チロシンキナーゼ等を発現しているので、この細胞をドーパミン神経のモデル細胞として使い、パーキンソン病を引き起こす環境因子の作用機序と GDNF 受容体からのシグナル伝達経路の係わりについて解析を進めている。本年度は、PC12 細胞においてマンガンによりアポトーシスが誘導される際、細胞死のプロテアーゼシグナル経路をなす caspase により Ret が分解を受け細胞膜上から消失することを明らかにした。In vivo の系においても、神経毒 MPTP 投与により線条体における GFR α -1 のタンパク質量はほとんど変化しないのに対して、Ret および DAT は著しく減少することが分かった。一方、TH は中間的な変化を示した。いずれにしても線条体では、Ret の消失により GDNF 刺激による生存維持のためのシグナル伝達が断たれ、ドーパミン神経の変性脱落を引き起こす一因となるものと考えられる。

(2) グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 遺伝子のプロモーター解析 (田中, 伊藤 (佐), 木内)

本研究は、GDNF 遺伝子の発現調節機構について解析し、GDNF の発現に関与する転写調節因子を解明することを目的としている。本年度はマウス GDNF 遺伝子が 4 個のエキソンから成ることを明らかにし、3 種類のオールタナティブプロモーター (プロモーター I, II, III) 領域の構造とその特徴を解析した。各々のプロモーターのコア領域の性質

は大きく異なっているが、IL-1 β や TNF- α 等のサイトカイン刺激により、いずれのプロモーター活性も上昇することが分かった。エンハンサーの候補として NF- κ B 結合配列について解析した結果、イントロン 1 に存在する NF- κ B 結合配列が実際に機能している可能性を示すデータが得られた。この事実は、各種神経損傷モデルにおいて GDNF の役割を示唆しており、興味深い。

(3) GDNF により発現誘導される遺伝子の解析 (肖, 磯部, 木内)

GDNF 刺激により神経突起の伸展などの形態的变化を引き起こすことが知られているヒト神経芽細胞株 TGW 細胞を用い、GDNF の TH 遺伝子発現に及ぼす影響について検討を加えた。その結果、GDNF 刺激後、TH mRNA 量は 25 時間まで増加し、発現量は約 13 倍となった。また、TH タンパク量は 5 時間ほど遅れて同じレベルまで増加した。TH 遺伝子を過剰発現させたトランスジェニックマウスでは TH の mRNA 発現量増大 (約 50 倍) に比べタンパク質量は 2~3 倍しか増えないことから、GDNF 刺激は TGW 細胞において、TH の転写および翻訳の両方に影響を及ぼすことが示唆された。この現象は、他のヒト神経芽細胞株でも確認することができた。各種プロテインキナーゼ阻害剤を用いた解析より、GDNF による TH 遺伝子の発現誘導には Ret を介して MAP キナーゼ経路が関与していることが明らかとなった。

(4) Ret 受容体からの細胞内シグナル伝達機構に関する研究 (福田^{*1}, 高橋, 木内)

Ret 受容体のドーパミン神経における役割を解析するために、GDNF 受容体 Ret の 1062 番目の Tyr を Phe に置換したノックインマウスの作製を進めている。現在、キメラマウス作製の段階まできている。一方、Ret の膜貫通領域の下流近傍に A キナーゼ (PKA) によるリン酸化共通配列が存在しているので、cAMP 系の Ret を介するシグナル伝達経路に及ぼす影響を明らかにすることを目的として研究をスタートした。Forskolin 刺激により PKA は Ret の 696 番目の Ser をリン酸化し、Ret のチロシンリン酸化を抑制すること、Ret への糖鎖付加を阻害すること等を明らかにした。また、Ret の 696 番目の Ser を Ala に置換した Ret を発現している細胞では、GDNF 刺激によって形態が lamellipodia 形成から stress fiber 形成へ変化するという興味深い知見を得た。

(5) GDNF と神経細胞の増殖に関する研究 (平田)

GDNF の未分化な神経細胞の増殖に及ぼす影響を調べるため、ヒト神経芽細胞、SH-SY5Y 細胞を用いて検討を加えた。その結果、Ret 受容体から PI3 キナーゼを介して、Akt キナーゼ、p70 S6 キナーゼを経るシグナル伝達経路が増殖に関与していることが分かった。

4. 神経とグリアの相互作用に関する研究

(1) 脳血液関門の通過に関与する未知のタンパク質の探索 (筒井, 村口, 澤田)

ミクログリアが脳血液関門を通過することに着目して、この現象に関与するミクログリア細胞膜表面のタンパク質の同定を進めている。ファージディスプレイ法を応用してペプチドライブラリーから *in vivo* において脳親和性クローンを濃縮し、目的遺伝子を探索するとともに、ミクログリ

アとマクロファージの細胞膜画分に存在するタンパク質を二次元電気泳動法により比較し、ミクログリアにのみ存在するタンパク質のスクリーニングも合わせて行っている。

(2) ラット線条体損傷モデルに関する研究 (武内, 磯部)

ラット線条体の損傷モデルにおいて、壊死を起こした部位周辺において何らかのダメージを受けた神経細胞は、ミクログリアの放出する NO によりアポトーシスを引き起こし、排除されることを明らかにしてきた。この一連の現象において、排除されない神経細胞では Cu/Zn 型スーパーオキシジスムターゼ (Cu/Zn-SOD) および Mn 型スーパーオキシジスムターゼ (Mn-SOD) 遺伝子の発現が増大すること、また、グリア細胞では Mn-SOD のみが増大することが分かり、酸化ストレスに対する SOD 遺伝子についての新しい知見を得ることができた。

(3) ラット脊髄損傷モデルにおける GDNF 遺伝子の発現誘導機構に関する研究 (佐竹^{*2}, 于^{*2}, 足立, 木内)

ラット脊髄損傷モデルを作製し、iNOS および GDNF 遺伝子の発現が損傷後、30 分から 3 時間にかけて急速に誘導されピークに達することを明らかにした。iNOS に関しては遺伝子発現のピークが 24 時間目にもあり二相性を示し、マクロファージで誘導がみられるのに対し、GDNF に関しては発現は単相性でマクロファージおよびミクログリアで誘導がみられた。また、iNOS の発現は損傷部位で引き起こされるアポトーシスと関連していることを示すデータが得られた。現在、GDNF 遺伝子の発現誘導に係わる未知の因子を探索中である。

^{*1} ジュニア・リサーチ・アソシエイト, ^{*2} 研修生

誌 上 発 表 Publications

(原著論文) *印は査読制度がある論文誌

Hasegawa T., Xiao H., Hamajima F., and Isobe K.: "Interaction between DNA-damage protein GADD34 and a new member of the Hsp40 family of heat shock proteins that is induced by a DNA-damaging reagent", *Biochem. J.* **352**, 795-800 (2000). *

Tanaka M., Ito S., and Kiuchi K.: "Novel alternative promoters of mouse glial cell line-derived neurotrophic factor gene", *Biochim. Biophys. Acta* **1494**, 63-74 (2000). *

Takeuchi A., Miyaishi O., Kiuchi K., and Isobe K.: "Cu/Zn- and Mn-superoxide dismutases are specifically up-regulated in neurons after focal brain injury", *J. Neurobiol.* **45**, 39-46 (2000). *

Tanaka M., Ito S., Matsushita N., Mori N., and Kiuchi K.: "Promoter analysis and characteristics of the 5'-untranslated region of the mouse glial cell line-derived neurotrophic factor gene", *Mol. Brain Res.* **85**, 91-102 (2000). *

Satake K., Matsuyama Y., Kamiya M., Kawakami H., Iwata H., Adachi K., and Kiuchi K.: "Nitric oxide via macrophage iNOS induces apoptosis following traumatic spinal cord injury", *Mol. Brain Res.* **85**, 114-122 (2000). *

Satake K., Matsuyama Y., Kamiya M., Kawakami H.,

Iwata H., Adachi K., and Kiuchi K.: "Up-regulation of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) following traumatic spinal cord injury", *NeuroReport* **11**, 3877-3881 (2000). *

Pekarsky Y., Hallas C., Palamarchuk A., Koval A., Bullrich F., Hirata Y., Buchi R., Letofsky J., and Croce C. M.: "Akt phosphorylates and regulates the orphan nuclear receptor Nur77", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 3690-3694 (2001). *

口 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

Xiao H., Hirata Y., Isobe K., and Kiuchi K.: "GDNF-induced expression of tyrosine hydroxylase", 18th Int. Congr. of Biochemistry and Molecular Biology, (IUBMB, The Biochemical Society, and FEBS), Birmingham, UK, July (2000).

Hirata Y., Xiao H., and Kiuchi K.: "Mitogenic action of GDNF dependent on AKT-P70 S6 kinase pathway", 30th Ann. Meet. Soc. for Neuroscience, New Orleans, USA, Nov. (2000).

Ito Y., Yagi T., Ohnishi Y., Kiuchi K., and Uchikawa Y.: "A study on conductive polymer for electrical stimulation device of cultured neuron", 30th Ann. Meet. Soc. for Neuroscience, New Orleans, USA, Nov. (2000).

Tanaka M., Ito S., and Kiuchi K.: "Gene regulations of mouse GDNF", *Experimental Biology 2001*, Orlando, USA, Mar.-Apr. (2001).

Kiuchi K. and Xiao H.: "GDNF-induced expression of tyrosine hydroxylase", 9th Int. Catecholamine Symp., Kyoto, Mar.-Apr. (2001).

Hirata Y. and Kiuchi K.: "Down-regulation of Ret following exposure to MPTP and manganese", 5th Int. Conf. on Progress in Alzheimer's and Parkinson's Disease, Kyoto, Mar.-Apr. (2001).

(国内会議)

福田敏史, 高橋雅英, 木内一壽: "GDNF/RET シグナル伝達系における PKA の役割", 第 23 回日本神経科学大会・第 10 回日本神経回路学会合同大会, 横浜, 9 月 (2000).

木内一壽, 佐竹宏太郎, 松山幸弘, 神谷光広, 川上寛, 岩田久: "急性脊椎損傷における GDNF の誘導", 第 23 回日本神経科学大会・第 10 回日本神経回路学会合同大会, 横浜, 9 月 (2000).

田中幹衛, 伊藤佐知子, 木内一壽: "神経栄養因子 GDNF の放出機構と細胞内局在の解析", 第 23 回日本神経科学大会・第 10 回日本神経回路学会合同大会, 横浜, 9 月 (2000).

福田敏史, 高橋雅英, 木内一壽: "GDNF/Ret シグナル伝達系における PKA の役割", 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2000).

肖恒怡, 磯部健一, 木内一壽: "GDNF を介する tyrosine hydroxylase 発現調節の経路", 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2000).

伊藤雄一郎, 八木透, 大西保志, 木内一壽, 内川嘉樹: "導

電性高分子を用いた神経刺激電極の作製", 電子情報通信学会有機エレクトロニクス研究会, 東京, 12 月 (2000).

Research Subjects and Members of Laboratory for Genes of Motor Systems

1. Neural Activity of Dopaminergic Neurons and Transcriptional Regulation in Postsynaptic Cells
2. Genes Specifically Expressed in Dopaminergic Neurons
3. Neurotrophic Factors for Dopaminergic Neurons
4. Function of Glial Cells in the Brain

Head

Dr. Kazutoshi KIUCHI

Research Scientists

Dr. Mikiie TANAKA

Dr. Hengyi XIAO

Technical Staffs

Ms. Kayo ADACHI

Ms. Sachiko MURAGUCHI

Ms. Sachiko ITO

Mr. Ko TSUTSUI

Visiting Members and Postdoctoral Fellows

Dr. Yoko HIRATA (Fac. Eng., Gifu Univ.)

Dr. Natsuki MATSUSHITA (Inst. Biomed. Sci., Fukushima Med. Univ.)

Dr. Masatoshi HAGIWARA (Med. Res. Inst., Tokyo Med. Dental Univ.)

Dr. Kiyomi KIUCHI (Konan Jr. Coll.)

Dr. Makoto SAWADA (Inst. Compr. Med. Sci., Fujita Health Univ.)

Dr. Kazuto KOBAYASHI (Inst. Biomed. Sci., Fukushima Med. Univ.)

Dr. Ken-ichi ISOBE (Dept. Basic Gerontol., Natl. Inst. Longevity Sci.)

Dr. Akihide TAKEUCHI (Dept. Basic Gerontol., Natl. Inst. Longevity Sci.)

Dr. Tohru YAGI (Fac. Eng., Nagoya Univ.)

Mr. Toshifumi FUKUDA (Sch. Med., Nagoya Univ.)

Mr. Yuichiro ITO (Fac. Eng., Nagoya Univ.)

Trainees

Mr. Kotaro SATAKE (Sch. Med., Nagoya Univ.)

Mr. Yi-Min YU (Sch. Med., Nagoya Univ.)

Collaborators (Outside of RIKEN)

Dr. Masahide TAKAHASHI (Sch. Med., Nagoya Univ.)