

神経蛋白制御研究チーム

Laboratory for Proteolytic Neuroscience

チームリーダー 西道隆臣

SAIDO, Takaomi C.

生体内において、個々のタンパク質は固有の寿命を有する。短いものは数分以内にターンオーバーする一方で、長いものは数百時間も存在し続ける。この選択的なタンパク質寿命決定機構を解明することは現代生命科学の長年の課題であり、多くの研究者が取り組んできている。しかしながら、これまでに分かってきたことは、血漿といった限られた部位でのタンパク質代謝や一般的な意味での細胞内タンパク質分解に関する部分的な知見に限られるのが現状である。ましてや、脳内において、どのような機構でタンパク質の寿命が決定されるかは、全く不明といってよい。

当研究チームは、この新しい課題を開拓すべく、新しい動物実験モデル系を作成する一方で、生化学・分子生物学・細胞/発生工学の手法を駆使した解析を行う計画である。脳内におけるタンパク質代謝が、他の臓器とは異なっていることは、実は、様々な神経疾患の研究から明らかになりつつある。たとえば、アルツハイマー病・プリオン病・ポリグルタミン病の発症にそれぞれ深くかかわる β アミロイドペプチド・プリオンタンパク質・ポリグルタミンペプチドは、広く全身に発現しているが、実際に蓄積して病的に作用するのは、脳神経系に限られる。これらのことは、脳内に独特のタンパク代謝系が存在することを示唆するのみならず、脳のタンパク代謝系を知ることによってこれらの病気（あるいはより広く脳の老化）を克服することができる可能性のあることを意味している。当研究では、脳内におけるタンパク質の寿命を決定する機構の解明を通じて、神経変性疾患および脳老化の診断・予防・治療のための基礎的知見を得ることを目的とする。特に、孤発性アルツハイマー病を脳老化の一般的終末像として位置づけ、 β アミロイド代謝系の解明を中心的課題とする。また、新たな課題として、神経変性に至るカスケードの比較的下流に位置するカルパインやカスパーゼの作用についても検討する。

1. 脳内における β アミロイドペプチドの分解系の解析、 β アミロイド分解酵素の生化学的・分子生物学的解析、病理的ベータアミロイド分解システムの検索（岩田、城谷、高木、益本、李、藍澤、岩浪、津吹、濱、針ヶ谷、渡辺、関口、細木、深見）

β アミロイド分解系について、昨年度までの成果で、以下の点を明らかにした。(1) β アミロイドペプチドは脳実質内のプロテアーゼによって分解される。(2)分解における主要な中間体は $A\beta_{10-37}$ であり、この中間体の生成が律速過程を担う。(3)この中間体を生成するプロテアーゼは、ネプリライシン様の中性メタロエンドペプチダーゼである。(4)動物脳において分解システムを抑制することによって β アミロイドの蓄積が促進される。本年度は、中性メタロエンドペプチダーゼについて、分子生物学的・生化学的・発生工

学的検討を行い、以下の点を明らかにした。(1)脳内には、中性エンドペプチダーゼとして、ネプリライシン・ネプリライシン様ペプチダーゼ(NEPLP: neprilysin-like peptidase) α, β, γ ・PEX・DINEが存在する。(2)この中で、ネプリライシンが、最も $A\beta$ 分解活性が強く、脳内における存在量も多い。(3)ネプリライシン遺伝子ノックアウトマウスの脳において、標識 $A\beta$ ペプチドの分解が顕著に抑制され、さらに、内在性 $A\beta$ の量が増加する。(4)ネプリライシン遺伝子ノックアウトの効果は、遺伝子量依存的である。これらの結果は、ネプリライシンが脳内における主要な $A\beta$ 分解酵素であることを明らかにしたのみならず、老化に伴ったネプリライシンの発現や活性の低下が、 $A\beta$ の蓄積、ひいては、アルツハイマー病発症の原因となりうること、および、ネプリライシンの発現や活性を正方向に制御することによって脳内における $A\beta$ 蓄積を抑制できることを示している。

また、線維化 β アミロイドに対する“病的”分解システムについては、マトリックスなどの不溶性タンパク質に作用するマトリックス分解酵素が関与するとの作業仮説をたて、脳に存在するマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)分子種を分子生物学的に検索したところ、既知のもの以外に脳特異的新規分子種(MT5-MMP)を見いだした。MT5-MMPは脳全体の神経細胞に発現し、特に小脳発生において発現量が増すことから、生理的には神経発達に関連すると予想されるが、アルツハイマー病の脳では、老人斑や神経原線維変化に存在することを明らかにした。何らかの病的な作用があることが期待される。

2. 動物モデルの作成（李、岩田、城谷、益本、津吹、渡辺、富岡、小山、藤井）

動物モデルについては、通常の $A\beta(A\beta_{1-40/42})$ と修飾型 $A\beta(A\beta_{3(pE)}_{40/42})$ を産生するTgマウスを比較するために、生化学的・病理学的解析を行った。その結果、以下の点が明らかになった。(1)両者におけるAPPの発現量やプロセッシング量は同程度である。(2) $A\beta_{1-40/42}$ を産生するマウスは、特に顕著な病的変化は認められない。(3) $A\beta_{3(pE)}_{40/42}$ を産生するマウスでは、約12ヶ月で海馬および大脳皮質において明確なカルパイン活性化が生じる。これは、特に、海馬CA3で顕著で、MAP-2の脱落を伴う。以上の結果は、修飾型 $A\beta$ が特異的な病理作用を有し、これがカルシウムホメオスタシスの異常を介することを示唆している。今後、より老化させた動物について解析を進める予定である。

以上の他、生化学的マーカーについては、自己抗体およびグルタミルアミノペプチダーゼ活性について検討を継続している。また、カスパーゼ阻害タンパク質(p35)Tgマ

ウスを用いた解析により, *in vivo* におけるカイニン酸投与による神経細胞死には, カスパーゼよりむしろカルパインが関与していることが示された。現在作製中のカルパスタチン Tg マウスとあわせて, 様々の様式の神経細胞死の機構の解析に応用できることが期待される。

誌 上 発 表 Publications

(原著論文) * 印は査読制度がある論文誌

- Schmidt M. L., Saido T. C., Lee V. M.-Y., and Trojanowski J. Q.: "Spatial relationship of AMY protein deposits and different species of A β peptides in amyloid plaques of the Alzheimer disease brain", *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **58**, 1227–1233 (1999). *
- Takeuchi A., Irizarry M. C., Duff K., Saido T. C., Ashe K. H., Hasegawa M., Mann D. M. A., Hyman B. T., and Iwatsubo T.: "Age-related amyloid β deposition in transgenic mice overexpressing both Alzheimer mutant presenilin 1 and amyloid β precursor protein Swedish mutant is not associated with global neuronal loss", *Am. J. Pathol.* **157**, 331–339 (2000). *
- Harigaya Y., Saido T. C., Eckman C. B., Parada C. M., Shoji M., and Younkin S. G.: "Amyloid β protein starting pyroglutamate at position 3 is a major component of the amyloid deposits in the Alzheimer's disease brain", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **276**, 422–427 (2000). *
- Lee H.-J., Tomioka M., Masumoto H., and Saido T. C.: "Molecular cloning and expression of aminopeptidase A isoforms from rat hippocampus", *Biochim. Biophys. Acta* **1493**, 273–278 (2000). *
- Kitagaki H., Tomioka S., Yoshizawa T., Sorimachi H., Saido T. C., Ishiura S., and Suzuki K.: "Autolysis of calpain large subunit inducing irreversible dissociation of stoichiometric heterodimer of calpain", *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 689–695 (2000). *
- Hiwasa T., Arase Y., Kikuno K., Hasegawa R., Sugaya S., Kita K., Saido T. C., Yamamori H., Maki M., and Suzuki S.: "Increase in ultraviolet sensitivity by overexpression of calpastatin in ultraviolet-resistant UVr-1 cells derived from ultraviolet-sensitive human R5a cells", *Cell Death Differ.* **7**, 531–537 (2000). *
- Kouchi Z., Hisasi K., Kinouchi T., Maeda T., Sorimachi H., Saido T. C., Maruyama K., Okuyama A., Suzuki K., and Ishiura S.: "Metabolism of amyloid precursor protein in COS cells transfected with a β -secretase candidate", *Cytotechnology* **33**, 213–219 (2000). *
- Sekine-Aizawa Yoko, Hama E., Watanabe K., Tsubuki S., Kanai-Azuna M., Kanai Y., Arai H., Aizawa H., Iwata N., and Saido T. C.: "Matrix metalloproteinase (MMP) system in brain: Identification and characterization of brain-specific MMP highly expressed in cerebellum", *Eur. J. Neurosci.* **13**, 935–948 (2001). *
- Taniguchi S., Fujita Y., Takahashi S., Hayashi S., Kakita A., Murayama S., Saido T. C., Hisinaga S., Iwatsubo T., and Hasegawa M.: "Calpain-mediated degradation of p35 to p25 in postmortem human and rat brains", *FEBS Lett.* **489**, 46–50 (2001). *
- Takaki Y., Iwata N., Tsubuki S., Taniguchi S., Toyoshima S., Lu B., Gerard N. P., Gerard C., Lee H.-J., Shirotani K., and Saido T. C.: "Biochemical identification of the neutral endopeptidase family member responsible for the catabolism of amyloid beta peptide in the brain", *J. Biochem.* **128**, 897–902 (2000). *
- Shirotani K., Takehashi K., Araki W., Maruyama K., and Tabira T.: "Mutational analysis of intrinsic regions of presenilin 2 that determine its endoproteolytic cleavage and pathological function", *J. Biol. Chem.* **275**, 3681–3686 (2000). *
- Lankiewicz S., Luetjens C. M., Bui N. T., Krohn A. J., Poppe M., Cole G. M., Saido T. C., and Prehn J. H. M.: "Activation of calpain 1 converts excitotoxic neuron death into a caspase-independent cell death", *J. Biol. Chem.* **275**, 17064–17071 (2000). *
- Bialkowska K., Kulkarni S., Du X., Goll D. E., Saido T. C., and Fox J. E. B.: "Evidence that β 3 integrin-induce Rac activation involves the calpain-dependent formation of integrin clusters that are distinct from the focal complexes and focal adhesions that form as Rac and RhoA become active", *J. Cell Biol.* **151**, 685–695 (2000). *
- Kawarabayashi T., Younkin L. H., Saido T. C., Shoji M., Ashe K. H., and Younkin S. G.: "Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid β protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease", *J. Neurosci.* **15**, 372–381 (2001). *
- Shoji M., Kawarabayashi T., Sato M., Sasaki A., Saido T. C., Matsubara E., Tomidokoro Y., Kanai M., Shizuka M., Ishiguro K., Ikeda M., Harigaya Y., Okamoto K., Hirai S., Shoji M., Kawarabayashi T., Sato M., Sasaki A., Matsubara E., Tomidokoro Y., Kanai M., Shizuka M., Ishiguro K., Ikeda M., Harigaya Y., Okamoto K., and Hirai S.: "Age-related amyloid β protein accumulation induces cellular death and macrophage activation in transgenic mice", *J. Pathol.* **191**, 93–101 (2000). *
- Russo C., Schettini G., Saido T. C., Hulette C., Lippa C., Lannfelt L., Ghetti B., Gambetti P., Tabaton M., and Teller J. K.: "Presenilin-1 mutations in Alzheimer's disease", *Nature* **405**, 531–532 (2000). *
- Saido T. C.: "Degradation of Amyloid-beta peptide: A key to Alzheimer pathogenesis, prevention and therapy", *NeuroScience News* **3**, No. 5, pp. 52–62 (2000).
- Yamaguchi A., Yamamoto N., Akamatsu N., Saido T. C., Kaneda M., Umeda M., and Tanoue K.: "PS-liposome and ox-LDL bind to different sites of the immunodominant domain (#155-183) of CD36: A study with GS95, a new anti-CD36 monoclonal antibody", *Thromb. Res.* **97**, 317–326 (2000). *

(その他)

Iwata N., Tsubuki S., Hama E., Takaki Y., Shirotani K., and Saido T. C.: "Clearance of amyloid β -peptide from brain: Transport or metabolism?", *Nat. Med.* **6**, 718–

719 (2000).

伊藤正男, 神庭重信, 西道隆臣, 下仲順子, 御子柴克彦, 石川春律: “連続座談会「脳を育む」III: 成人・老年期”, 生体の科学 52, 44-60 (2001).

口頭発表 Oral Presentations

(国際会議等)

Kitazume-Kawaguchi S., Tachida Y., Oka R., Dohmae N., Takio K., Saido T. C., and Hashimoto Y.: “ST6GalII cleavage occurs at different sites in various cell types”, Gordon Research Conf. on Glycobiology, Ventura, USA, Mar. (2001).

Research Subjects and Members of Laboratory for Proteolytic Neuroscience

1. Analysis of in vivo Catabolism of A β Peptide in Brain
2. Biochemical and Molecular Biological Identification of A β -Degrading Peptidase(s)
3. Analysis of the A β Catabolic Mechanism Under Pathological Conditions
4. Production of Animal Models Producing the Pathological Form of A β
5. Search for Biochemical and Immunochemical Markers of Brain Aging
6. Roles of Cytoplasmic Proteases in Aging-Associated Neuropathology
7. Others (Prion Disease and Glioma)

Laboratory Head

Dr. Takaomi C. SAIDO

Research Scientists

Dr. Nobuhisa IWATA

Dr. Yoko SEKINE-AIZAWA

Dr. Hahn-Jun LEE

Dr. Yoshie TAKAKI

Dr. Hajime MASUMOTO

Technical Staffs

Dr. Satoshi TSUBUKI

Ms. Wakako YAMAO-HARIGAYA

Ms. Emi HAMA

Ms. Misaki SEKIGUCHI

Ms. Emi HOSOKI

Ms. Yukiko DOHZONO

Ms. Kaori WATANABE

Special Postdoctoral Researchers

Dr. Keiro SHIROTANI

Dr. Naoko IWANAMI

Junior Research Associates

Mr. Masanori TOMIOKA (Univ. Tokyo Sch. Medicine)

Mr. Akihiko KOYAMA (Dept. Pharm. Sci., Univ. Tokyo)

Visiting Members

Dr. Megumi TAKAHASHI (Dept. Neurosurgery, Tokyo Med. Coll.)

Dr. Shinjiro FUKAMI (Dept. Neurosurgery, Tokyo Med. Coll.)

Trainees

Mr. Kenkichi FUJII (Dept. Sci., Hokkaido Univ.)

Ms. China NAKABAYASHI (Dept. Pharm. Sci., Kanazawa Univ.)