

# アルツハイマー病における選択的神経細胞死機構

著者	善岡 克次
著者別表示	Yoshioka Katsuji
雑誌名	平成9(1997)年度 科学研究費補助金 基盤研究(C) 研究成果報告書
巻	1996-1997
ページ	10p.
発行年	1998-03
URL	<a href="http://doi.org/10.24517/00050559">http://doi.org/10.24517/00050559</a>



KAKEN

1997

39

# アルツハイマー病における選択的神経細胞死機構

(研究課題番号 08680837)

平成8年度～平成9年度科学研究費補助金（基盤研究C2）  
研究成果報告書

平成10年3月

研究代表者 善岡克次

(金沢大学がん研究所助教授)

はしがき

研究組織

研究代表者：善岡 克次（金沢大学がん研究所 助教授）

研究経費

平成8年度 1、100千円

平成9年度 1、300千円

計 2、400千円

研究発表

（1）学会誌等

Cavigelli M, Li WW, Lin A, Su B, Yoshioka K, Karin M: The tumor promoter arsenite stimulates AP-1 activity by inhibiting a JNK phosphatase. EMBO J 1996; 15: 6269-6279.

Mizukami Y, Yoshioka K, Morimoto S, Yoshida K: A novel mechanism of JNK1 activation. J Biol Chem 1997; 272: 16657-16662.

Onishi I, Tani, T, Hashimoto, T, Shimizu K, Yagi M, Yamamoto K, Yoshioka K: Activation of c-Jun N-terminal kinase during ischemia and reperfusion in mouse liver. FEBS Lett 1997; 420: 201-204.

Yoshioka K: Molecular mechanism of neuronal cell death in Alzheimer's disease. Jpn J Geriat (in press)

（2）口頭発表

善岡克次：アルツハイマー病における神経細胞死機構の解析。第39回日本老年医学会、1997年6月、東京。



8000-60062-5

金沢大学附属図書館

## 研究成果の概要

### 序

アルツハイマー病 (AD) における痴呆の直接的な原因は、選択的な神経細胞の脱落である。しかし、その分子機構に関する知見はほとんど得られていない。Levitanら<sup>1)</sup>は、家族性ADの原因遺伝子プレセニン1 (PS1) が、発生過程において細胞の運命を制御するNotch情報伝達系に関与していることを報告した。この結果は、細胞内情報伝達系の異常がADの一つの原因であることを示唆している。一方Mohitら<sup>2)</sup>は、AD患者脳で観察される選択的な神経細胞脱落のマーカーとなるモノクローナル抗体を作製し、その分子クローニングを行った。彼らが報告した時点ではMAPキナーゼ様の新規分子 (p49<sup>3F12</sup>) であったが、塩基配列の比較から、JNK3 (別名SAPK- $\beta$ )<sup>3),4)</sup>であることが判明した。すなわちヒトJNK3は、正常者脳の特定領域—ADにおいて選択的神経細胞死が認められる海馬CA1や大脳皮質3, 5層などの錐体細胞—でのみ発現している。MAPキナーゼは、酵母からヒトに至るまで広く存在する細胞内情報伝達分子であり、脊椎動物では6種類 (ERK1, ERK2, p38, JNK1, JNK2, JNK3) が知られている。また最近、JNK3ノックアウトマウスを用い、カイニン酸により誘導される神経細胞死がJNK3情報伝達系によって仲介されていることが明らかになった<sup>5)</sup>。以上のことは、JNK3がADにおける選択的な神経細胞脱落の単なるマーカーではなく、その神経細胞死を仲介することを示唆している。本研究は、JNK3情報伝達系の分子機構解明を目的としている。

### 方法

酵母two-hybrid法は、Clontech社 (California, U.S.A.) のプロトコールに従った。マウス脳cDNAライブラリーは、Clontech社より購入した。マウスの各組織からのRNAの調製およびノザンプロット解析は、すでに報告した方法により行った<sup>6)</sup>。抗HA抗体を用いた免疫沈殿キナーゼアッセイ法、および培養細胞へのDNA導入方法もすでに報告した通りである<sup>6),7)</sup>。

## 成績

JNK3結合蛋白のcDNAを単離するため、酵母two-hybrid法を用いてマウス脳cDNAライブラリーのスクリーニングを行った。約 $1.5 \times 10^6$ クローン中、20個の陽性クローンを得た。DNA塩基配列を解析した結果、それらのcDNAクローンは2種類に分類され、ともに新規蛋白（BP#1,2と命名）をコードしていることが判明した（accession number AB005662）。BP#1 mRNAの発現はマウスの各組織において普遍的であるのに対し、BP#2 mRNAはJNK3 mRNAと同様、脳で非常に高い発現が認められた（図1）。そこで今回はBP#2に注目し、さらに解析を進めた。

JNK3を含む6種類のMAPキナーゼファミリーメンバー（ERK1, ERK2, p38, JNK1, JNK2, JNK3）について、BP#2との結合性を酵母two-hybrid法を用いて解析した。その結果、BP#2はJNK3と特異的に結合することが判明した（表1）。またBP#2は、SEK1（JNK活性化キナーゼ<sup>8)</sup>との結合能も有する（善岡；未発表データ）。

JNK3情報伝達系におけるBP#2の役割を明らかにするため、BP#2およびHAエピトープ標識したJNK3をL929細胞内で強制発現させた。JNK3の活性化には活性型MEKK1<sup>9)</sup>を用い、JNK3キナーゼ活性は免疫沈殿キナーゼアッセイ法により測定した。図2に示す通り、BP#2発現プラスミドの量に応じてJNK3の活性化が抑制された。

## 考察

現在、ADを分子レベルで理解するため、家族性ADの原因遺伝子（APP,PS1,PS2）およびAD脳の病理学的特徴である老人斑・神経原繊維変化に関連した研究が精力的に行われている。しかし、ADにおける痴呆の直接的原因となる選択的な神経細胞死の分子機構を明らかにするには至っていない。このような現状を踏まえ、我々はこれまでのAD研究とは全く別の視点から研究を進めている。すなわち、ADにおける選択的な神経細胞死を仲介していると考えられるJNK3情報伝達系に注目し、最終的にはADにおけるJNK3情報伝達系の役割を明らかにすることをめざしている。本研究ではその第一歩として、JNK3と相互作用する蛋白の同定およびその解析を試みた。

脊椎動物MAPキナーゼのうちJNK3と特異的に結合する蛋白BP#2は、これまでに報告されていない新規蛋白である。BP#2の*in vivo*における役割は今のところ不明であるが、

JNK3のみならず、SEK1（JNK活性化キナーゼ）との結合能も有することから、JNK3情報伝達系におけるスキャフォールド蛋白として機能していると考えられる。酵母のスキャフォールド蛋白STE5<sup>10)</sup>は、接合因子情報伝達系に関わる分子と複合体を形成することにより、正確かつ迅速な情報の伝達を可能にしている。脊椎動物においてもスキャフォールド蛋白の存在は考えられているが、分子クローニングは行われていない。BP#2は脊椎動物において初めて分子クローニングされたスキャフォールド様蛋白であり、細胞内に多数存在する情報伝達経路の特異性を理解する上できわめて興味深い。

繊維芽細胞株L929においてBP#2を強制的に過剰発現させることにより、JNK3の活性化が抑制された（図2）。通常L929では、BP#2・JNK3はともに発現していないが、JNK3の活性化は可能である。すなわち、SEK1などJNK3の活性化に必要な分子群が化学量論的に適切なバランスを保って存在している。それらの分子とBP#2が結合することによりバランスがくずれ、その結果としてJNK3の活性化が抑制されたと考えられる。神経細胞においても同様の現象が認められるならば、BP#2の過剰発現によりADにおける神経細胞死を阻害することが可能となるであろう。今後、BP#2を過剰発現するトランスジェニックマウスやBP#2ノックアウトマウスを用い、JNK3情報伝達系におけるBP#2の役割、さらには神経細胞死におけるBP#2の役割等が明らかになるとと思われる。

## 文献

- 1) Levitan D, Greenwald I: Facilitation of *lin-12*-mediated signalling by *sel-12*, a *Caenorhabditis elegans* S182 Alzheimer's disease gene. Nature 1995; 377: 351-354.
- 2) Mohit AA, Martin JH, Miller CA: p49<sup>3F12</sup> kinase: A novel MAP kinase expressed in a subset of neurons in the human nervous system. Neuron 1995; 14: 67-78.
- 3) Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, et al: The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. Nature 1994; 369: 156-160.
- 4) Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sluss HK, Derijard B, et al: Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. EMBO J. 1996; 15: 2760-2770.
- 5) Yang DD, Kuan C-Y, Whitmarsh AJ, Rincon M, Zheng TS, Davis RJ, et al: Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. Nature 1997; 389: 865-870.
- 6) Yoshioka K, Deng T, Cavigelli M, Karin M: Antitumor promotion by phenolic antioxidants: Inhibition of AP-1 activity through induction of Fra expression. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 4972-4976.
- 7) Mizukami Y, Yoshioka K, Morimoto S, Yoshida K: A novel mechanism of JNK1 activation. J Biol Chem 1997; 272: 16657-16662.
- 8) Sanchez I, Hughes RT, Mayer BJ, Yee K, Woodgett JR, Avruch J, et al: Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun. Nature 1994; 372: 794-798.
- 9) Yan M, Dai T, Deak JC, Kyriakis JM, Zon LI, Woodgett JR, et al: Activation of stress-activated protein kinase by MEKK1 phosphorylation of its activator SEK1. Nature 1994; 372: 798-800.
- 10) Choi K-Y, Satterberg B, Lyons M, Elion EA: Ste5 tethers multiple protein kinases in the MAP kinase cascade required for mating in *S. cerevisiae*.

Cell 1994; 78: 499-512.

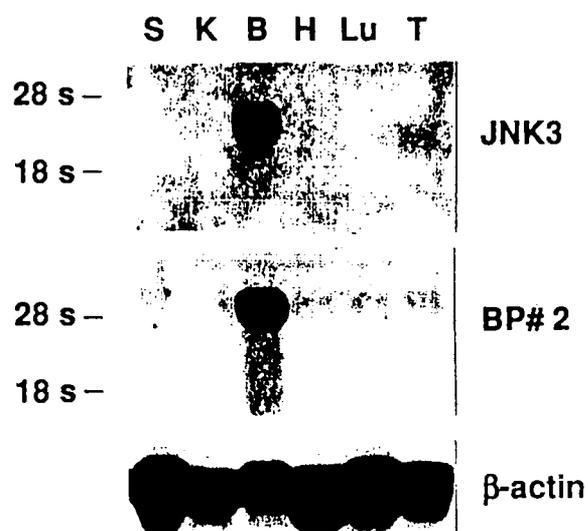


図1 マウスの各組織におけるJNK3, BP#2 mRNAの発現。

β-actinはコントロール。S: 小腸; K: 腎臓; B: 脳;

H: 心臓; Lu: 肺; T: 精巣。

BP# 2	0	0	3	9	(ug)
△MEKK	-	+	+	+	(0.3 ug)
HA-JNK3	+	+	+	+	(1ug)

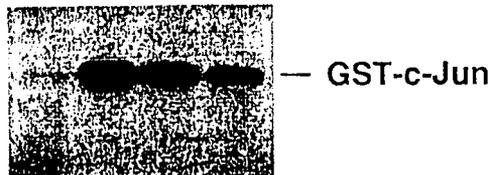


図2 BP#2 過剰発現によるJNK3 活性化の影響。

GST-c-Junを基質とした *invitro* キナーゼ反応によりJNK活性を測定した。

表1 BP#2の結合特異性

	BP#2
ERK1	-
ERK2	-
p38	-
JNK1	-
JNK2	-
JNK3	+