

## 脳神経系の細胞膜受容体応答とストレス応答に関する細胞分子薬理学的研究

野村 靖幸

北海道大学大学院薬学研究科, 〒060-0812 札幌市北区北 12 条西 6 丁目

## Cellular and Molecular Pharmacological Studies on Membrane Receptor-Signaling and Stress-Responses in the Brain

Yasuyuki NOMURA

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Kita-ku, Sapporo 060-0812, Japan

(Received August 23, 2001)

Studies on the cellular and molecular mechanism of neurotransmitter receptor-signaling and of neuronal and glial cell responses to stresses seem to be important to elucidate the action mechanism of centrally-acting drugs and to develop novel therapeutics against several diseases in the brain. The present review shows our findings with regard to the membrane receptor-signaling mechanism including serotonin, noradrenaline, glutamate receptors, ion channels, G-proteins, protein kinases and drug actions in *Xenopus* oocytes injected with rat brain mRNA, NG108-15 cells and brain membranes. Regarding the results of studies on the inter- and intra-cellular mechanism of neurons and glial cells against cerebral ischemia/hypoxia, we review the involvement of a transcription factor NF- $\kappa$ B in LPS-elicited inducible NO synthase (iNOS) expression in rat astroglial cells. Then we describe possible involvement of: 1) ADP-ribosylation/nitrosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and 2) decrease in mitochondrial membrane potential, release of caspase-3 from mitochondria and degradation of the inhibitor of caspase-activated DNase by activated caspase in NO-induced neuronal apoptosis. We observed that hypoxia results in expression of a molecular chaperon such as protein disulfide isomerase (PDI) and HSP70 in astroglial cells. Our recent findings indicate that overexpression of PDI in the rat hippocampus (*in vivo*) and in neuroblastoma SK-N-MC cells (*in vitro*) significantly suppress the hypoxia-induced neuronal death. From physiological/pathophysiological and pharmacological aspects, we review the importance of studies on the cellular and molecular mechanism of membrane receptor-signaling and of stress-responses in the brain to identify functional roles of neuro-glial- as well as neuro-neuronal interaction in the brain.

**Key words**— neurotransmitter; membrane receptor-signaling; apoptosis; brain ischemia; neuron-glia; drug action

## 1. はじめに

個体の生命活動を中枢的に統御する脳には百数十億個とも言われる神経細胞が存在し、一次並びに二次メッセンジャーを介して細胞間及び細胞内の情報伝達を行って、脳高次機能発現に関わっている。また神経細胞における細胞膜受容体応答は、各種脳疾患の発症や治療薬の作用に関与している。今回、筆者らは脳神経細胞における神経伝達物質受容体応答系制御の分子機構に関し細胞分子薬理学的研究を行い新知見を得た。一方、脳組織に神経細胞の数倍の存在が推定されるグリア細胞が、神経細胞と共存・相互作用し脳の機能や病態に関与している。脳虚血/低酸素時におけるグリア細胞の機能蛋白質誘導応答機構と、誘導分子の神経細胞死制御機構について

も検討し興味深い結果を得た。以下に得られた知見を2つに分けて記述する。

## 2. 脳及びモデル細胞における神経伝達物質受容体応答機構と薬物作用

脳神経系細胞における神経伝達物質受容体系応答機構と薬物の作用機構を解明するために、脳 mRNA 移入アフリカツメガエル卵母細胞再構築系 (Fig. 1)<sup>1)</sup>や培養 NG108-15 細胞などのモデル細胞を使用、検討して以下の新知見を得た。

**2-1. セロトニン受容体系<sup>2-14)</sup>** 脳 mRNA 移入によって卵母細胞に機能的に再構成されたセロトニン (5-HT) 受容体系に対する 5-HT<sub>1c</sub> 受容体・Gi/Go・ホスホリパーゼ C 系の活性化はイノシトール 1,4,5-三リン酸 (IP<sub>3</sub>) を産生し細胞内 Ca<sup>2+</sup>

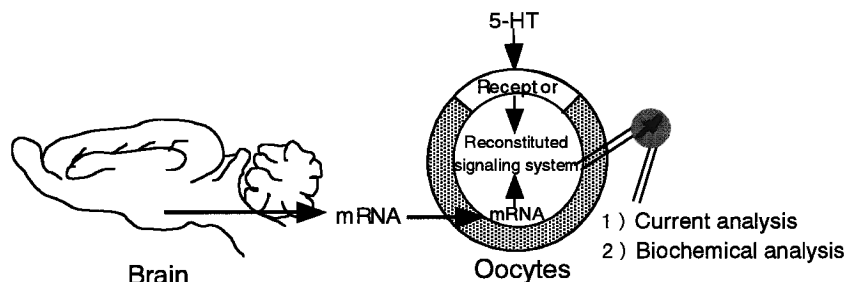


Fig. 1. Current and Biochemical Analysis of 5-HT-Induced Responses in Oocytes Reconstituted by Injection of mRNA from Rat Brain

を動員すること、この  $Ca^{2+}$  によって活性化されたカルモジュリン (CaM) 及び CaM キナーゼ II が 5-HT の  $Cl^-$  チャンネル開口に関わること、一方、 $Ca^{2+}$  は産生された diacylglycerol (DG) とともにプロテインキナーゼ C (PKC) を活性化、活性化された PKC が  $5-HT_{1c}$  受容体・Gi/Go 系の蛋白質をリン酸化し、5-HT 応答電流をフィードバック抑制することを示した (Fig. 2)。さらに 5-HT 応答電流が非定型抗うつ薬のミアンセリンや三環系抗うつ薬のデシプラミンにより抑制されることより、卵母細胞再構成系は抗うつ薬の薬効評価の 1 つとして有用である可能性を示した。

マウス神経芽細胞腫とラット膠細胞腫のハイブリッド細胞である NG108-15 細胞を使用し、5-HT の cGMP 増加作用に 2 種の 5-HT 受容体に関わること示した (Fig. 3)。その 1 つは  $5-HT_3$  受容体/カチオンチャンネルで、 $[Ca^{2+}]_i$  上昇、CaM 活性化に続く CaM 依存 NO 合成酵素の活性化並びにグアニル酸シクラーゼの活性化を起こすこと、他の 1 つには新規  $5-HT_3$  受容体サブタイプが関わり、その活性化は貯蔵型ニトロソチオールから NO 産生を導くことを初めて示した。

2-2. グルタミン酸受容体系<sup>15-20)</sup> 興味深い

ことに、ラット脳 mRNA 移入卵母細胞再構成系において、PKC が NMDA 受容体/チャンネル誘起  $Ca^{2+}$  電流を増強するが、キスカル酸受容体/チャンネル機能を逆に抑制すること、一方カイニン酸受容体/チャンネル機能には全く影響を及ぼさないことが分かった (Fig. 4)。また三環系抗うつ薬が NMDA 受容体/チャンネルの関わる電流を抑制することも見出したが、この事実に一致して、マウス脳粗シナプス膜画分への  $[^3H]$  MK-801 結合をこれらの抗うつ薬が抑制することも見出した (Table 1)。三環系抗

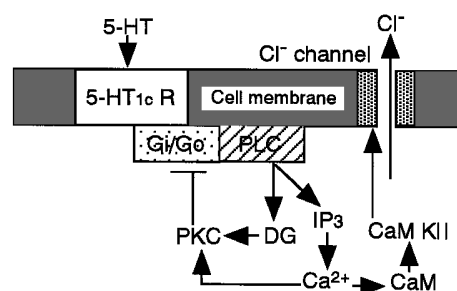


Fig. 2. Intracellular Signaling Mechanism of 5-HT-Induced  $Cl^-$  Current in Oocytes Injected with Rat Brain mRNA

5-HT activates  $5-HT_{1c}$  receptors ( $5-HT_{1c}R$ ), Gi/Go and phospholipase C (PLC). Inositol 1,4,5-trisphosphate ( $IP_3$ ) releases  $Ca^{2+}$  from endoplasmic reticulum, and then  $Ca^{2+}$  · calmodulin (CaM) complexes activate CaM kinase II (CaM KII) which opens  $Cl^-$  channels. On the other hand, diacylglycerol (DG) and  $Ca^{2+}$  activates protein kinase C (PKC) and inhibits Gi/Go. Thus the inhibition of Gi/Go underlies negative feedback inhibition in the 5-HT-induced  $Cl^-$  current.

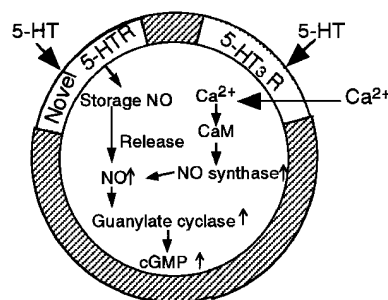


Fig. 3. 5-HT-Induced cGMP Formation in NG108-15 Cells

5-HT causes cGMP formation by two signaling systems: 1) after activation of  $5-HT_3$  receptor/cation channels increases influx of  $Ca^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  · CaM activates NO synthase, followed by activation of guanylate cyclase by NO, 2) activation of novel  $5-HT_3$  receptors subtype causes NO release from storage pool and NO activates guanylate cyclase.

うつ薬のうつ病治療作用発現に、この NMDA 受容体/チャンネル抑制作用がどのように関与するののかについてさらに検討を加えている。

2-3.  $\alpha_2$  アドレナリン受容体系とアセチルコリン受容体系<sup>21-29)</sup> 脳シナプス膜  $\alpha_2$  アドレナリン受容体・Gi 共役系は、神経刺激に伴うノルアドレ

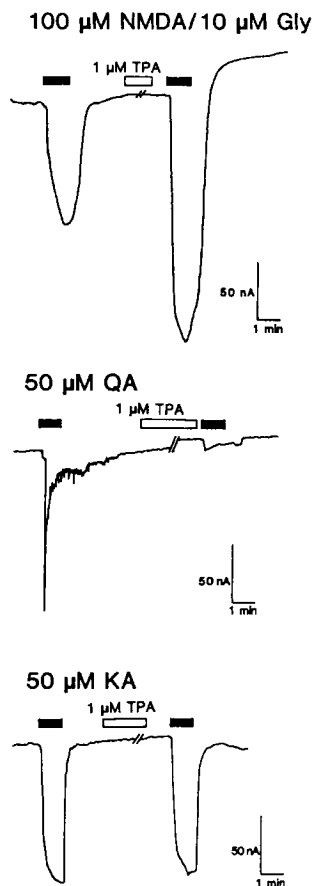


Fig. 4. Effects of TPA on Currents Activated by Each Subclass of Glutamate Receptors

Membrane potentials were clamped at  $-60$  mV, and  $Mg^{2+}$ -free MBS was perfused. Each agonist was applied twice to the same oocyte before and after 10 min of treatment with  $1 \mu M$  TPA. The typical current responses induced by each agonist and the influences of TPA treatment are shown. Gly, glycine, TPA, 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate, QA: quisqualic acid, KA: kainic acid.

ナリン放出抑制に関わることを、またその共役に  $G_i$  の SH 基が関わることを、新規の可逆的 SH 基阻害剤の 3-nitro-2-pyridinesulfonyl 化合物を用い示した。

Figure 5 に示すようにヒト T リンパ球のムスカリン性アセチルコリン (mACh) 受容体刺激は、百日咳毒素非感受性 G 蛋白質を介しホスホリパーゼ C 活性化と  $[Ca^{2+}]_i$  上昇を惹起し、また T 細胞抗原受容体/CD3 複合体刺激による IL-2 mRNA と蛋白質の産生並びに IL-2 受容体 mRNA 発現を促進させること、さらに mACh 受容体の IL-2 産生促進には、細胞外シグナル制御性プロテインキナーゼ (ERK, MAP キナーゼ) や c-Jun N 末端キナーゼが関わるという新知見を得、神経系の免疫系に対する生理機能の存在、とくに ACh の T 細胞促進機能

Table 1. Effects of Antidepressants on  $[^3H]$ MK-801 Binding to Mouse Brain Membranes

Drugs	IC <sub>50</sub> ( $\mu M$ )
Antidepressants	
i) Tricyclic antidepressants	
Desipramine	19 ± 3
Imipramine	75 ± 3
Amitriptyline	74 ± 10
ii) Others	
Nomifensine	69 ± 12
Maprotiline	90 ± 7
Amoxapine	176 ± 23
Mianserin	321 ± 214
Viloxazine	488 ± 214
Zimelidine	531 ± 36
iii) PCP-like drugs	
MK-801	0.016 ± 0.002
PCP	0.245 ± 0.025
Ketamine	0.961 ± 0.121

The homogenates of the removed cerebral cortex and hippocampus from mice were centrifuged at 50,000 xg for 20 min. The pellets suspended in 0.05 M Tris-acetate buffer (pH 7.4) were incubated with test drugs and 5 nM  $[^3H]$ MK-801. Non-specific binding of  $[^3H]$ MK-801 was estimated in the presence of 10  $\mu M$  unlabelled MK-801.

Values are means ± SE of three experiments, each of which was carried out in duplicate.

の存在の可能性を示唆した。

2-4. G 蛋白質, がん遺伝子産物と cyclic AMP の情報伝達<sup>30-39)</sup> がん遺伝子 v-Ki-ras を導入した形質転換 NIH3T3 細胞における p21<sup>ras</sup> の AC 活性増強作用は、Gs・AC 共役活性の促進及び Gi 発現の減少によること、一方、pp60<sup>v-src</sup> 発現は Gs のチロシンリン酸化により Gs・AC 共役活性を低下させることを示した。Gi/Go と cAMP の Ca<sup>2+</sup> チャンネル開口作用を示すと同時に、カルシトニンの IL-6 産生作用への cAMP 依存プロテインキナーゼ (PKA) の関与を明らかにした。NG108-15 細胞における PKA と PKC の同時活性化により発現する神経突起進展作用に GAP-43 が関わることを示すと同時に、筆者らがクローニングに成功した新規蛋白質 TA20 も関わることを見出した。

### 3. グリア細胞と神経細胞のストレス/低酸素応答機構と薬物作用

筆者らは、萌芽的研究課題の神経・免疫相関に着目し、その具体的検討対象として神経細胞・グリア細胞相関 (Fig. 6) を選び、脳虚血や低酸素による脳グリア細胞の誘導型 NO 合成酵素 (inducible NO

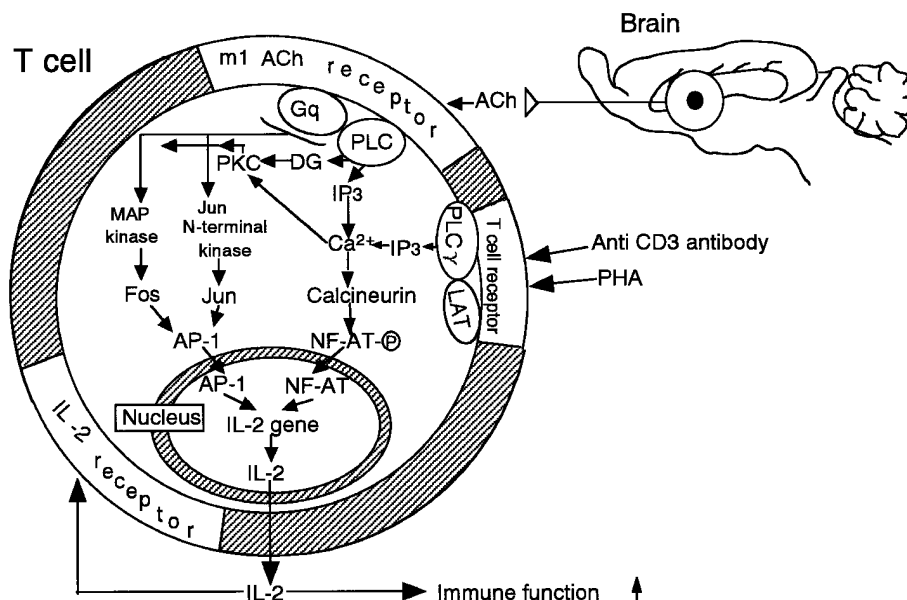


Fig. 5. Stimulatory Effects of Acetylcholine on IL-2 Formation in Human T Cells

Activation of  $m_1$  acetylcholine (ACh) receptors by ACh increases phytohemagglutinin (PHA)-induced IL-2 formation by activating MAP kinase and c-Jun N-terminal kinase. NF-AT: nuclear factor of activated T cell, LAT: linker for activation of T cell.

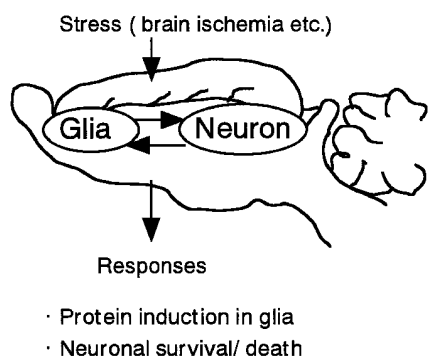


Fig. 6. Neuron-Glia Interaction

Neurons and glial cells closely interact via neurotransmitters and cytokines etc. in the brain. Various stresses such as cerebral ischemia affect the interaction. As an example of the stress responses in the brain, (patho) physiological active proteins expressed in glial cell affect neuronal survival/death.

合成酵素, iNOS), ケモカインと分子シャペロン発現機構, 及び NO や分子シャペロンの神経細胞アポトーシス惹起/防御機構, 並びに薬物の防御作用機構を検討し以下に示す知見を得た (Fig. 7).

3-1. グリア細胞の NO 合成酵素誘導機構<sup>40-49)</sup>

Figure 7 は, 各種ストレス (内毒素 (LPS), IFN $\gamma$  処理や低酸素負荷) に対するグリア細胞の iNOS, ケモカイン, 分子シャペロン誘導応答機構を示す. まずラット脳初代培養グリア細胞を細菌内毒素 (LPS) 処理すると生ずる iNOS 発現には, 転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化が関わる事が明らかとなっ

た. すなわち LPS は  $I\kappa B\alpha$  のリン酸化, ユキビチン化と分解を生じさせ, 不活性型の 3 量体 NF- $\kappa$ B (p50 · p65 ·  $I\kappa B\alpha$ ) から  $I\kappa B\alpha$  を脱離させ活性型 p50 · p65 に転換し核内移行させる機構の関与することを, 改変型 (優性抑制型変異)  $I\kappa B\alpha$  (Ser-32/36→Ala-32/36) を構築・発現させたラット膠細胞腫 (C6 細胞) 標本を作成し実証した (Fig. 8). さらに LPS 受容体と  $I\kappa B\alpha$  キナーゼとの間に未知のハービマイシン A 感受性プロテインキナーゼが存在する, IFN $\gamma$  は Jak 2 による転写因子 Stat 1 のリン酸化を介し iNOS 誘導を導く, また LPS 惹起 iNOS 誘導はエンドセリンにより制御されることなどが分かった.

3-2. グリア細胞のケモカインと分子シャペロン誘導機構<sup>50-53)</sup>

IL-1 $\beta$  のケモカイン誘導に関わる NF- $\kappa$ B 系活性化の律速は,  $I\kappa B\alpha$  のリン酸化やポリユキビチン化よりも 26S プロテアソームによる分解に依存することをラット膠細胞腫 (C6 グリオーマ) を使用し, 示した. 脳虚血/低酸素処理はグリア細胞に対し iNOS 以外に IL-1 $\beta$ , IL-6, INF $\gamma$  なども誘導させ, 神経細胞死を惹起/防御すると推定した. また低酸素処理したグリア細胞は分子シャペロンである蛋白質ジスルフィドイソメラーゼ (protein disulfide isomerase, PDI) (Fig. 7) や HSP70 を誘導すること, 脳虚血に伴い *in vivo* (大

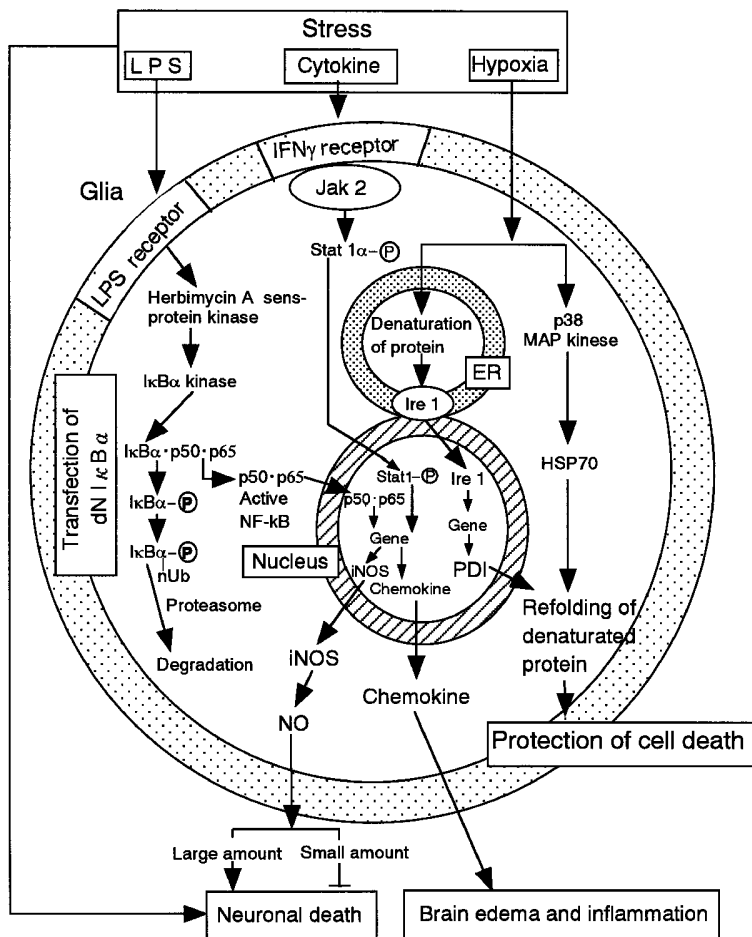


Fig. 7. Schematic Diagram of Glial Responses to Cerebral Stresses

Cerebral stresses (ischemia and cytokines etc.) cause iNOS, chemokines and molecular chaperons which affect neuronal survival/death, brain edema and inflammation. LPS induces iNOS via activation of herbimycin A-sensitive protein kinase (s), I $\kappa$ B $\alpha$  kinase, degradation of I $\kappa$ B $\alpha$  and intra-nuclear translocation of p50/p65. The idea that LPS induces iNOS by activating NF- $\kappa$ B is supported by a result that LPS did not induce iNOS in C6 glioma cells transfected with dominant negative (dN) I $\kappa$ B $\alpha$  (Ser-32/36 $\rightarrow$ Ala-32/36). IFN $\gamma$  activates Jak2 kinase and phosphorylates Stat1 $\alpha$ , whose dimers then translocate into the nucleus. In contrast, hypoxia expresses molecular chaperons which protect glial cell death by perhaps refolding of denatured proteins. HSP70 is formed via p38 MAP kinase and protein disulfide isomerase (PDI) is induced via a transcription factor Ire 1.

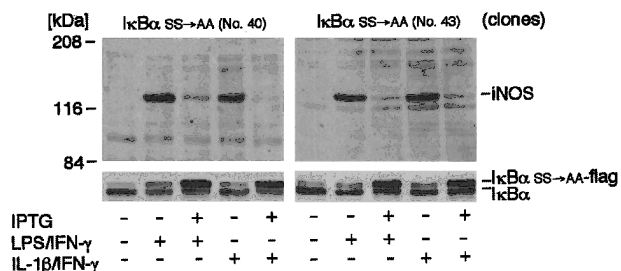


Fig. 8. The Effects of I $\kappa$ B $\alpha$  Mutants Expressed by IPTG (isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside) on iNOS Induction Stimulated by LPS/IFN- $\gamma$  or IL-1 $\beta$ /IFN- $\gamma$  in C6 Cells

Immunoblot analysis of the effect of I $\kappa$ B $\alpha$ SS-AA on iNOS induction is shown in two cases of clones No. 40 and 43. I $\kappa$ B $\alpha$ SS-AA-C6 cells were pretreated with 5 mM IPTG for 24 h at 37 $^{\circ}$ C followed by stimulation with 10  $\mu$ g/ml LPS plus 250 U/ml rat IFN- $\gamma$  (Gibco) or 5 ng/ml mouse IL-1 $\beta$  plus 250 U/ml rat IFN- $\gamma$  for 24 h at 37 $^{\circ}$ C. Crude cytosolic fractions were prepared and subjected to immunoblotting using anti-mac1NOS mAb and anti-I $\kappa$ B $\alpha$  pAb.

脳皮質)において mRNA 並びに PDI が mRNA レベル (Fig. 9) で、及び *in vitro* (アストログリア細胞)において蛋白質レベル (Fig. 10)で誘導されることを見出した。この誘導された PDI の免疫組織化学的分布は、アストログリアの指標蛋白質 GFAP (glial fibrillary acidic protein) の免疫組織化学的分布と一致することから、PDI は主としてアストログリアで誘導されることが示唆された。この結果に基づき、神経細胞と比較してグリア細胞がストレス耐性を有する機構の一つとして、誘導された分子シャペロンが関わるという新しい概念を提出した。事実、PDI をラット海馬の神経細胞にエレクトロポレーション法で強制発現させると、脳虚血に伴う神経細胞死を抑制すること、また *in vitro* でも

神経細胞腫 SK-N-MC 細胞に PDI を過剰発現させる (Fig. 11 の D) と、低酸素に伴う神経細胞死を防御することが示された。PDI の一次構造には触媒活性に関与する 2 つの cysteine 領域 (Cys-36/40 及び Cys-383/387) が含まれているが、このどちらか一方/両領域が神経細胞死抑制活性に関わるかは不明である。これを解明するため 3 種の変異型、すなわち N 末端変異型 (N, Cys36/40Ser) と C 末端変異型 (C, Cys383/387Ser), 及び両末端変異型 (NC, Cys36/40Ser 及び Cys383/387Ser) の細胞を作成した。そして低酸素負荷に伴う神経細胞死惹起の有無を解析したところ Fig. 11 に示すように、いずれの細胞標本 (N, C 及び NC) も神経細胞死を抑制できなかった。したがって N 末端, C 末端の両方とも細胞死抑制作用に関わると推定した。以上 PDI の神経細胞死抑制活性を実証したが、本結果は脳梗塞による神経細胞死に対する遺伝子予防/治療法としての可能性を示唆すると考え、さらに検討

を進めている。

3-3. NO と低酸素の神経細胞死惹起機構<sup>54-61)</sup>  
 虚血/低酸素に伴い誘導されたグリア細胞の iNOS が過剰量の NO を生成し神経細胞死を引き起こすことを提唱するとともに、その機構として、グリセロアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) の Cys-149

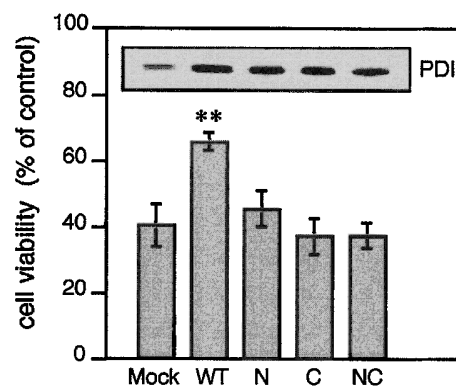


Fig. 11. Overexpression of PDI Protects against the Loss of Viability Induced by Hypoxia in SK-N-MC Cells

Cells were transfected with 1.25  $\mu$ g of the vector (PcDNA3), PDI WT, PDI N, PDI C, or PDI NC plus 0.3  $\mu$ g of pACT- $\beta$ -gal using SuperFect reagent (QIAGEN). Twenty-four hours after transfection, each transfectant was transferred to a low oxygen chamber and incubated for another 20 h. After fixation, the cells were incubated with X-gal buffer, and the stained cells were then counted. Viability is represented as the ratio of stained cells under normoxia and hypoxic challenge. Values represent the means  $\pm$  S.E. of triplicate cultures run in parallel and are expressed as the percentages of those under normoxic conditions in control cultures. Star represents significantly different values from those of mock-transfected cells subjected to hypoxia ( $p < 0.01$ , Student's *t* test). Inset, Western blot analysis of the expression of PDI transfected with each vector in SK-N-MC cells.

PDI WT represents the wild-type PDI with both catalytic sites intact. The PDI N variant had both cysteines in the N-terminal thioredoxin-like active site mutated to serines, and the PDI C variant had both cysteines in the C-terminal thioredoxin-like active site mutated to serines. The PDI NC variant was a double mutant with cysteines in both N and C termini replaced with serines. Values represent the means  $\pm$  S.E. of triplicate cultures run in parallel. Star represents significantly different values from those of mock-transfected cells ( $p < 0.01$ , Student's *t* test).

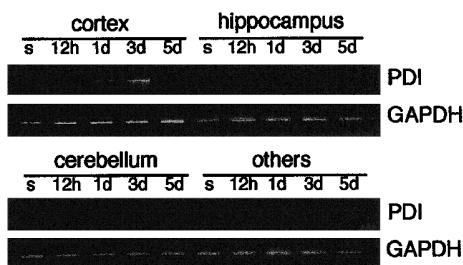


Fig. 9. Up-Regulation and Localization of PDI in Response to Ischemia *in vivo*

RT-PCR analysis to determine PDI expression in the ischemic brain is shown. RT-PCR was performed on mRNA from brain sections of sham-operated rat (s) and 12h, 1 day (1d), 3 days (3d), and 5 days (5d) following 15 min of forebrain ischemia. Twenty cycles of PCR produced a linear relationship between the amounts of input RNA and resulting PCR product.

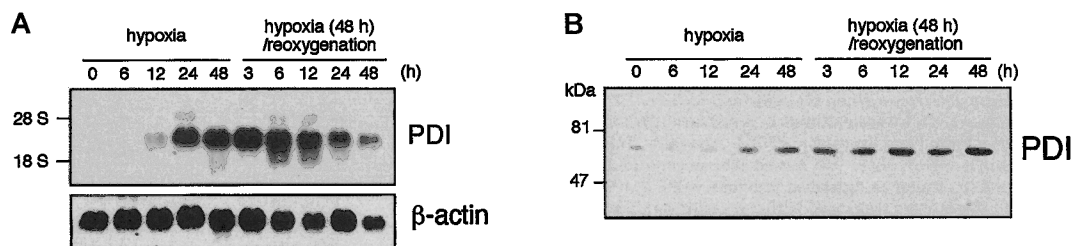


Fig. 10. Up-Regulation of PDI in Response to Hypoxia

A and B, changes in PDI mRNA and protein levels during hypoxia/reoxygenation in astrocytes. Total RNA and the cytosolic fraction were prepared from cells exposed to hypoxia/reoxygenation for the indicated periods. The mRNA (A) and protein (B) levels were analyzed by Northern blotting using full-length PDI cDNA and Western blotting using anti-PDI mAb, respectively. Under these conditions (10  $\mu$ g of total RNA/lane), PDI mRNA was undetectable in the quiescent state but was detected 12 h after hypoxia. The levels peaked 24 h after hypoxia and were sustained until 12 h after reoxygenation, decreasing gradually thereafter. On the other hand, PDI protein was detected at low levels in the quiescent state, and the levels increased 24 h after hypoxia. The levels peaked 6 h after reoxygenation and remained constant for 48 h.

に対する ADP リボシル化/ニトロソ化による活性抑制が関わることを証明した (Fig. 12). さらに NO はミトコンドリアに作用し, 膜電位低下, チトクローム c 放出, caspase-3 活性化, caspase-activated DNase (CAD) 阻害蛋白質の分解, CAD の核内移行, DNA 断片化によりアポトーシスを惹起することを明らかにした (Fig. 12). 高濃度の NO の細胞死惹起作用に対し, 低濃度の NO は逆に細胞死を抑制すること, この抑制作用は caspase-3 に含まれる cysteine をニトロシル化しその触媒活性を抑制することによることを示唆した. なお脳虚血時にグリア細胞で誘導される神経栄養因子 GDNF が, 脳虚血に伴う海馬神経細胞死を抑制することも見出した.

**3-4. 神経毒と薬物の神経細胞アポトーシス惹起/防御の機構<sup>62-69)</sup>** パーキンソン病原因候補物質 MPP<sup>+</sup> (1-methyl-4-phenylpyridinium ion) のドパミン神経細胞死惹起作用, 及びアポトーシス抑制分子 Bcl-2 発現作用とともに, MPP<sup>+</sup> の細胞死惹起作用のいずれかに対しても EGF と FK506 が防御作用を有することが分かった. セラミドの神経細胞死惹起作用に caspase-2 及び-3 の関わることを明らかにし, また酵母 two-hybrid 系を用いて caspase-2 活性を抑制する 25 kDa の Ca<sup>2+</sup> 結合蛋白質の単離に成功, 本蛋白質を ISBP (Ich-2s binding protein) と名付けた. ISBP はヒト株化 T 細胞 (Jurkat 細胞) において抗 Fas 抗体処理に伴う pro-caspase 2L のプロセッシングを抑制する (Fig. 13) ことから, ISBP は細胞内で caspase 2 の活性化を抑制し, アポトーシス制御に関わると推定し, さらに検討を加えている.

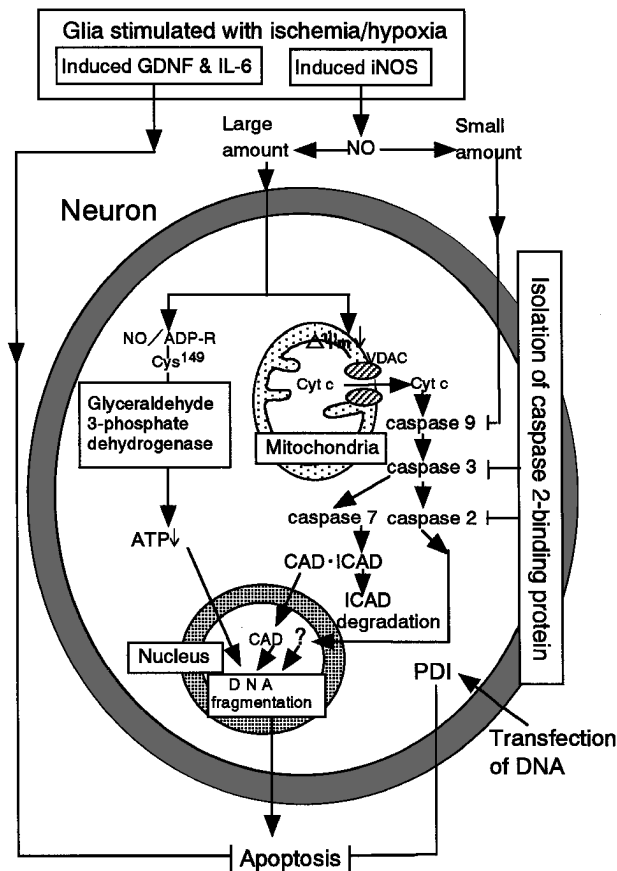


Fig. 12. The Intracellular Mechanism of GDNF/IL-6 and NO on Neuronal Apoptosis

Induction of apoptosis: 1) the large amount of NO causes nitrosylation/ADP-ribosylation (ADP-R) of Cys-149 in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, inactivates of the enzyme activity and results in depletion of ATP. NO also decreases mitochondrial membrane potential, followed by cytochrome c (Cyt c) release and activation of caspase 9, 3, 7 and 2. Then caspase-activated DNase (CAD) dissociated from degraded ICAD (inhibitor of CAD) translocates into nucleus and causes DNA fragmentation.

Protection of apoptosis: 1) the small amount of NO perhaps inhibits caspase 9 and 2 by nitrosylation of Cys in caspase, 2) overexpression of caspase 2-binding protein isolated in a present study delays cleavage of pro-caspase 2 by anti-Fas antibody-treatment in Jurkat cells, and 3) overexpression of PDI in hippocampal CA1 area and SK-N-MC cells (human neuroblastoma) protects ischemia/hypoxia-induced neuronal apoptosis in both *in vivo* and *in vitro*.  $\Delta\psi_m$ : membrane potential, VDAC: voltage dependent-anion channel, CAD: caspase-activated DNase. PDI: protein disulfide isomerase.

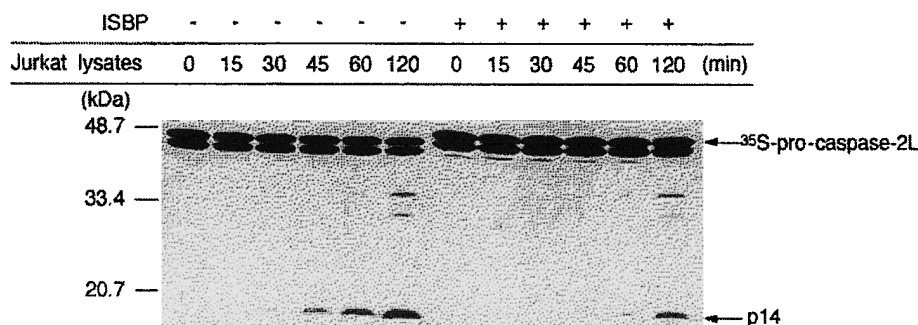


Fig. 13. The Suppressive Effect of ISBP on *in vitro* Cleavage of Pro-caspase-2  
Jurkat cells were treated with 250 ng/ml anti-Fas monoclonal antibody CH-11 for 4 h and cytosolic lysates were prepared. *In vitro* translated <sup>35</sup>S-labeled pro-caspase-2 was incubated with cytosolic lysates for the indicated times at 30°C in the presence or absence of recombinant ISBP protein.

#### 4. おわりに

最近著しく進展する生命諸科学の中で、脳科学は最後に残された魅力ある研究分野と考えられ、最新の生命科学の方法論が導入され活発に研究されようとしている。脳科学におけるさまざまな研究課題のうち、脳の高次機能とその病態、さらに治療薬の作用機構の解明研究のための基礎として、神経細胞の細胞間及び細胞内のシグナル伝達機能と機構の研究とともに、神経細胞とグリア細胞の細胞間/細胞内シグナル伝達の機能と機構の研究も重要と考えらる。今回、筆者らはラット脳、培養神経細胞/グリア細胞、並びに脳 mRNA 移入卵母細胞などを使用して、神経伝達物質受容体応答機構に加え、グリア細胞のストレス応答の 1 つとしての活性分子誘導機構、及び誘導された活性分子の神経細胞生死への関与とその機構に関し、興味深い新知見を得ることができた。今回得られた筆者らの新知見が、今後の細胞分子レベルの脳科学の発展に少しでも寄与できるよう、また新規脳神経疾患治療薬の創製に示唆を与えることができるよう願いつつ、今後一層努力したいと考えている。

**謝辞** 本研究は金子周司助手（現京都大学大学院薬学研究科助教授）、北村佳久助手（現京都薬科大学助教授）、東田道久助手（現富山医科薬科大学和漢研究所助手）、村山俊彦助教授（現千葉大学大学院薬学研究科教授）、上原孝助教授、及び大熊康修助教授はじめ、研究室に所属した数多くの諸氏の努力、研鑽によることを付記し、ここに改めて感謝いたします。また本研究の遂行過程において、ご激励、ご支援いただきました高木博司先生（京都大学名誉教授）、故瀬川富郎先生（広島大学名誉教授）及び福田英臣先生（東京大学名誉教授）に厚くお礼申し上げます。

#### REFERENCES

- Nomura Y., *Yakugaku Zasshi*, **110**, 304–314 (1990).
- Nomura Y., Kaneko S., Kato K., Yamagishi S., Sugiyama H., *Mol. Brain Res.*, **2**, 113–123 (1987).
- Kaneko S., Kato K., Yamagishi S., Sugiyama H., Nomura Y., *Mol. Brain Res.*, **3**, 11–19 (1987).
- Kato K., Kaneko S., Nomura Y., *J. Neurochem.*, **50**, 766–773 (1988).
- Tohda M., Takasu T., Nomura Y., *Europ. J. Pharmacol.*, **166**, 57–63 (1989).
- Kaneko S., Doi E., Watanabe H., Nomura Y., *Cell Calcium*, **11**, 309–317 (1990).
- Tohda M., Nomura Y., *J. Neurochem.*, **55**, 1800–1805 (1990).
- Tohda M., Nakamura J., Hidaka H., Nomura Y., *Neurosci. Lett.*, **129**, 47–50 (1991).
- Tohda M., Sakuma I., Nomura Y., *J. Neurochem.*, **52**, 714–717 (1991).
- Tohda M., Nomura Y., *Europ. J. Pharmacol.*, **200**, 305–310 (1991).
- Tohda M., Takasu T., Nakamura J., Morii N., Narumiya S., Nomura Y., *Europ. J. Pharmacol.*, **266**, 19–24 (1994).
- Tohda M., Tohda C., Oda H., Nomura Y., *Neurosci. Lett.*, **190**, 33–36 (1995).
- Arima T., Ohshima Y., Mizuno T., Segawa T., Nomura Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **227**, 473–476 (1996).
- Arima T., Mizuno T., Ohshima Y., Kitamura Y., Segawa T., Nomura Y., *Neurosci. Res.*, **27**, 229–233 (1997).
- Kurozumi K., Murayama T., Nomura Y., *FEBS Lett.*, **270**, 255–228 (1990).
- Itano Y., Murayama T., Kitamura Y., Nomura Y., *J. Neurochem.*, **59**, 822–828 (1992).
- Urushihara H., Tohda M., Nomura Y., *J. Biol. Chem.*, **267**, 11697–11700 (1992).
- Tohda M., Urushihara H., Nomura Y., *Neurochem. Int.*, **26**, 53–58 (1995).
- Kitamura Y., Arima T., Sato T., Nakamura J., Nomura Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 234–238 (1995).
- Kitamura Y., Arima T., Imaizumi R., Sato T., Nomura Y., *Europ. J. Pharmacol.*, **289**, 299–304 (1995).
- Kitamura Y., Tanaka H., Nomura Y., *Europ. J. Pharmacol.*, **123**, 263–270 (1986).
- Nomura Y., Kawata K., Kitamura Y., Watanabe H., *Europ. J. Pharmacol.*, **134**, 123–130 (1987).
- Kitamura Y., Nomura Y., *J. Neurochem.*, **49**, 1894–1901 (1987).
- Kitamura Y., Mochii M., Kodama M., Agata K., Watanabe K., Eguchi G., Nomura Y., *J.*



- Neurochem.*, **53**, 249–257 (1989).
- 25) Kitamura Y., Imai S., Matsueda R., Nomura Y., *Mol. Pharmacol.*, **38**, 184–191 (1990).
- 26) Kaneda T., Kitamura Y., Nomura Y., *Mol. Pharmacol.*, **43**, 2633–2641 (1993).
- 27) Tohda M., Tohda C., Sakuma S., Higashida H., Nomura Y., *Europ. J. Pharmacol.*, **268**, 169–176 (1994).
- 28) Fujino H., Kitamura Y., Yada T., Nomura Y., *Mol. Pharmacol.*, **51**, 1007–1014 (1997).
- 29) Fujino H., Uehara T., Murayama T., Okuma Y., Ariga H., Nomura Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 1198–1205 (2000).
- 30) Nomura Y., Tohda M., *FEBS Lett.*, **216**, 40–44 (1987).
- 31) Konishi-Imamura L., Noda M., Nomura Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **146**, 47–52 (1987).
- 32) Kaneko S., Nomura Y., *Neurosci. Lett.*, **83**, 123–127 (1987).
- 33) Konishi-Imamura L., Tohda M., Noda M., Nakano H., Nomura Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **153**, 1214–1222 (1988).
- 34) Kumagai C., Tohda M., Isobe M., Nomura Y., *J. Neurochem.*, **59**, 41–47 (1992).
- 35) Akiho H., Tokumitsu Y., Noda M., Nomura Y., *Arch. Biochem. Biophys.*, **304**, 235–241 (1993).
- 36) Kumagai C., Tohda M., Nomura Y., *J. Neurochem.*, **61**, 526–532 (1993).
- 37) Tohda M., Murayama T., Hasegawa H., Nogiri S., Nomura Y., *Neurosci. Lett.*, **175**, 89–91 (1994).
- 38) Tohda C., Tohda M., Nagai S., Nomura Y., *Neurosci. Res.*, **23**, 21–27 (1995).
- 39) Kiriya Y., Murayama Y., Tokumitsu Y., Nomura Y., *J. Neuroimmunol.*, **76**, 139–144 (1997).
- 40) Nomura Y., Kitamura Y., *Neurosci. Res.*, **18**, 103–107 (1993).
- 41) Kitamura Y., Imaizumi R., Esumi H., Nomura Y., *J. Neurosci. Res.*, **43**, 235–245 (1995).
- 42) Nishiya T., Uehara T., Nomura Y., *FEBS Lett.*, **371**, 333–336 (1995).
- 43) Arima T., Kitamura Y., Nishiya T., Nomura Y., *Neurosci. Lett.*, **212**, 1–4 (1996).
- 44) Oda H., Murayama T., Nomura Y., *J. Neurochem.*, **69**, 669–674 (1997).
- 45) Nishiya T., Uehara T., Edamatsu H., Kaziro Y., Itoh H., Nomura Y., *FEBS Lett.*, **408**, 33–38 (1997).
- 46) Oda H., Murayama T., Sasaki Y., Okada T., Nomura Y., *Europ. J. Pharmacol.*, **339**, 253–260 (1997).
- 47) Nomura Y., *Toxicol. Lett.*, **102/103**, 65–69 (1998).
- 48) Nomura Y., *Neuropathology*, **19**, 1–9 (1999).
- 49) Nishiya T., Uehara T., Kaneko M., Nomura Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **275**, 268–273 (2000).
- 50) Uehara T., Baba I., Nomura Y., *Brain Res.*, **790**, 284–292 (1998).
- 51) Uehara T., Kaneko M., Tanaka S., Nomura Y., *Brain Res.*, **823**, 226–230 (1999).
- 52) Uehara T., Matsuno J., Kaneko M., Nishiya T., Fujimuro M., Yokosawa H., Nomura Y., *J. Biol. Chem.*, **274**, 15875–15882 (1999).
- 53) Tanaka S., Uehara T., Nomura Y., *J. Biol. Chem.*, **275**, 10388–10393 (2000).
- 54) Itano Y., Ito A., Uehara T., Nomura Y., *J. Neurochem.*, **67**, 131–137 (1996).
- 55) Nomura Y., Uehara T., Nakazawa M., *Human Cell*, **9**, 205–213 (1996).
- 56) Nakazawa M., Uehara T., Nomura Y., *J. Neurochem.*, **68**, 2493–2499 (1997).
- 57) Araya R., Uehara T., Nomura Y., *FEBS Lett.*, **439**, 168–172 (1998).
- 58) Uehara T., Kikuchi Y., Nomura Y., *J. Neurochem.*, **72**, 196–205 (1999).
- 59) Miyazaki H., Okuma Y., Fujii Y., Nagashima K., Nomura Y., *Neuroscience*, **89**, 643–647 (1999).
- 60) Ishikawa A., Murayama T., Kubota Y., Nomura Y., *Neurosci. Lett.*, **277**, 99–102 (1999).
- 61) Miyazaki H., Ono T., Okuma Y., Nagashima K., Nomura Y., *Europ. J. Neurosci.*, **12**, 2032–2038 (2000).
- 62) Kitamura Y., Itano Y., Kubo T., Nomura Y., *J. Neuroimmunol.*, **50**, 221–224 (1994).
- 63) Itano Y., Kitamura Y., Nomura Y., *Neurochem. Int.*, **25**, 419–424 (1994).
- 64) Itano Y., Nomura Y., *Brain Res.*, **704**, 240–245 (1995).
- 65) Yoshinaga N., Murayama T., Nomura Y., *Brain Res.*, **794**, 137–142 (1998).
- 66) Ito A., Uehara T., Tokumitsu A., Okuma Y.,

- 
- Nomura Y., *Biochem. Biophys. Acta*, **1452**, 263–274 (1999).
- 67) Ito A., Uehara T., Nomura Y., *FEBS Lett.*, **470**, 360–364 (2000).
- 68) Yoshinaga N., Yasuda Y., Murayama T., Nomura Y., *Brain Res.*, **855**, 244–251 (2000).
- 69) Yoshinaga N., Murayama M., Nomura Y., *Biochem. Pharmacol.*, **60**, 111–120 (2000).