

## 神経栄養因子関連化合物の抗認知症薬の開発について

小原 祐太郎

## Development of Anti-dementia Drugs Related to Neurotrophic Factors

Yutaro OBARA

Department of Cellular Signaling and 21st Century COE Program “CRESCENDO”, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Aoba, Aramaki, Aoba-ku, Sendai City 980-8578, Japan

(Received May 30, 2006)

Neurotrophic factor-like substances and inducers of neurotrophic factor biosynthesis have enormous therapeutic potential for serious neuronal diseases such as Alzheimer's disease. Here, we discuss about the pharmacological effects of scabronines and  $\beta$ -eudesmol as promising candidates of leading compounds against the dementia. In addition, we discuss about the signaling pathway of nerve growth factor and cyclic AMP in order to seek the signaling molecules as targets of drug development.

**Key words**—neurotrophic factor; nerve growth factor (NGF); cyclic AMP (cAMP); scabronine;  $\beta$ -eudesmol

## 1. はじめに

高齢化社会を迎え、アルツハイマー病などに代表される老人性認知症が近年大きな社会問題となっている。現在のところ、アルツハイマー病の発症はアミロイド仮説が有力である。すなわち、 $\beta$ アミロイドの過剰な産生、凝集、沈着によるタウタンパク質の高度のリン酸化並びに神経原線維変化が引き起こされることにより、病気が発症するものと考えられている。<sup>1,2)</sup> わが国で現在使用されているアルツハイマー病の治療薬は、コリンエステラーゼ阻害作用を有するアリセプト® (エーザイ) のみである。この薬物療法は原因療法ではないため、その効果は限定的であるのが現状である。

神経栄養因子とは神経細胞の生存、分化、再生を促進させる物質の総称であり、現在までに様々な栄養因子が同定されている。<sup>3)</sup> 中でも神経成長因子 (nerve growth factor, NGF)、脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) などに代表されるニューロトロフィンの研究が盛んに行われている。アルツハイマー病では、学習、記憶に重

要な役割を担うと言われているコリン作動性ニューロンが顕著に変性している。<sup>4)</sup> そのコリン作動性ニューロンが NGF 感受性であることから、NGF などの神経栄養因子をアルツハイマー病の治療薬として応用する試みが考えられた。しかしながら、NGF などの栄養因子は高分子タンパク質であり、末梢から投与しても血液—脳関門を通過せずにほとんど脳内に移行しない。そのため、ドラッグデリバリー上の問題点があり、NGF そのものを医薬品として応用することは非常に困難である。したがって、新たな戦略として、1) NGF 様の作用を示す低分子性の化合物の開発、2) NGF などの神経栄養因子の生合成を促進させる低分子性の化合物の開発、3) NGF の情報伝達経路を活性化させる低分子性の化合物の開発などが考えられる。そこで、筆者は 1)、2) に該当する薬物を自然界から幅広く探索した。その結果、担子菌ケロウジ (*Sarcodon scabrosus*) から単離された新規ジテルペノイドであるスカブロン類がグリア細胞において NGF などの神経栄養因子の生合成を促進させること、また、蒼朮から単離された  $\beta$ -ユーデスマールにより神経細胞のモデル細胞である PC12 細胞の分化が引き起こされ、かつ、グリア細胞において神経栄養因子の発現が誘導されることを見出した。そこで、これらのユニークな薬理活性を持つ上記の天然由来の

東北大学大学院薬学研究科 (〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉)

e-mail: obaray@mail.pharm.tohoku.ac.jp

本総説は、平成 17 年度日本薬学会東北支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

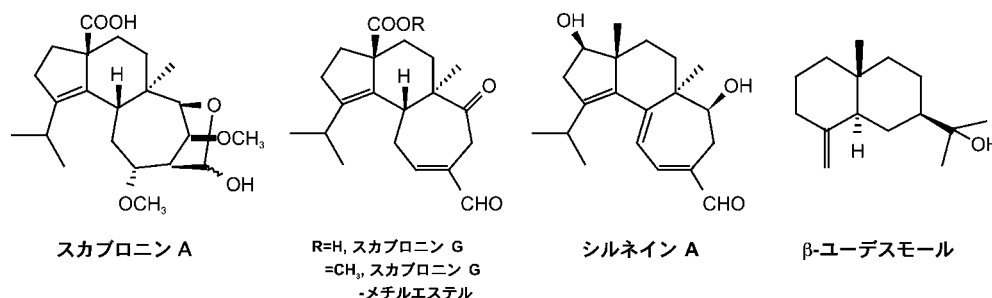


Fig. 1. Chemical Structure of Neurotrophic Factor-like Compounds and Neurotrophic Factor Inducers

化合物を臨床応用することを目的として、その詳細なメカニズムの解析を行った。さらに、3)の NGF の情報伝達経路を特異的に活性化する薬物を開発するため、NGF の作用機構を epidermal growth factor (EGF) 及びサイクリック AMP (cAMP) 刺激の場合と比較しながら詳細に検討した。

## 2. スカプロニン類の作用メカニズムの解析

筆者らはヒナダシタケ目イボタケ科に属する担子菌ケロウジ (*Sarcodon scabrosus*) から単離された新規ジテルペノイドであるスカプロニン A 及び G (Fig. 1) の活性試験を行った。<sup>5-7)</sup> このキノコは仙台市近郊で採取されたものであり、あいにく苦みが強く食用には適さない。また、ケロウジからはスカプロニン類と類似のジテルペノイドであるサルコニン類が既に単離されていたが、<sup>8)</sup> その薬理活性は知られていなかった。そこでまず、筆者らはグリア細胞のモデル細胞である 1321N1 ヒトアストロサイトーマ細胞を利用して、スカプロニン類の神経栄養因子の生合成に対する影響を検討した。1321N1 細胞をスカプロニン存在下で 2 日間培養して、その培養上清を回収した。さらに、未分化神経モデル細胞である PC12 細胞をその 1321N1 細胞の培養上清中で培養し、その形態変化 (神経突起伸展、分化) を観察した。言い換えると、1321N1 細胞からの神経栄養因子の分泌量測定のために、PC12 細胞の分化を指標にしたバイオアッセイを行った。その結果、スカプロニン A 及び G で刺激した 1321N1 細胞の培養上清による PC12 細胞の形態的分化が誘導され、スカプロニン類により何らかの神経栄養因子の分泌が顕著に増強されることが示唆された。一方、PC12 細胞を直接スカプロニン類で刺激しても形態的な変化はみられなかった。そこで、最も代表的な神経栄養因子である NGF の合成、分泌に対する影

響を reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 及び enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法で測定したところ、スカプロニン A 及び G により 1321N1 細胞における NGF の遺伝子発現が誘導され、NGF タンパク質の分泌が濃度依存的に促進されることが明らかになった。また、筆者らは新たにスカプロニン誘導体を作成しその活性を測定した。その結果、スカプロニン G のメチルエステル (ME) 化により (Fig. 1), NGF 及びインターロイキン-6 (IL-6) などの神経栄養因子の生合成、分泌が増強され、その培養上清による PC12 細胞の分化をさらに誘導させた (Fig. 2(A) 及び 2(B))。さらに、スカプロニン G-ME で刺激して得た 1321N1 細胞の培養上清を NGF 中和抗体とインキュベートすることにより、PC12 細胞の分化が部分的ではあるが有意に抑制されたことから、その分化に NGF が関与していることが示唆された。

次に、筆者はこのスカプロニン G-ME を用いて、1321N1 細胞における神経栄養因子の遺伝子発現誘導のメカニズムを詳細に検討した。<sup>3</sup>H イノシトールを用いたトレーサー実験によりイノシトールリン脂質の代謝回転を測定したところ、スカプロニン G-ME はカルバコール誘発性のイノシトールリン脂質代謝回転を濃度依存的に抑制し、この抑制作用はプロテインキナーゼ C (PKC) 阻害薬の GF109203X により消失した。さらに、スカプロニン G-ME による NGF 及び IL-6 の合成、分泌促進作用が



小原祐太郎

東北大学大学院薬学研究科細胞情報薬学分野助手。1974 年東京都生まれ。東北大学薬学部卒業、同大学院薬学研究科博士課程修了 (薬学博士)。日本学術振興会特別研究員 (DC1/PD) を経て、2005 年 4 月より現職。趣味：旅行、スキー、野球、ゴルフ (初心者) など。

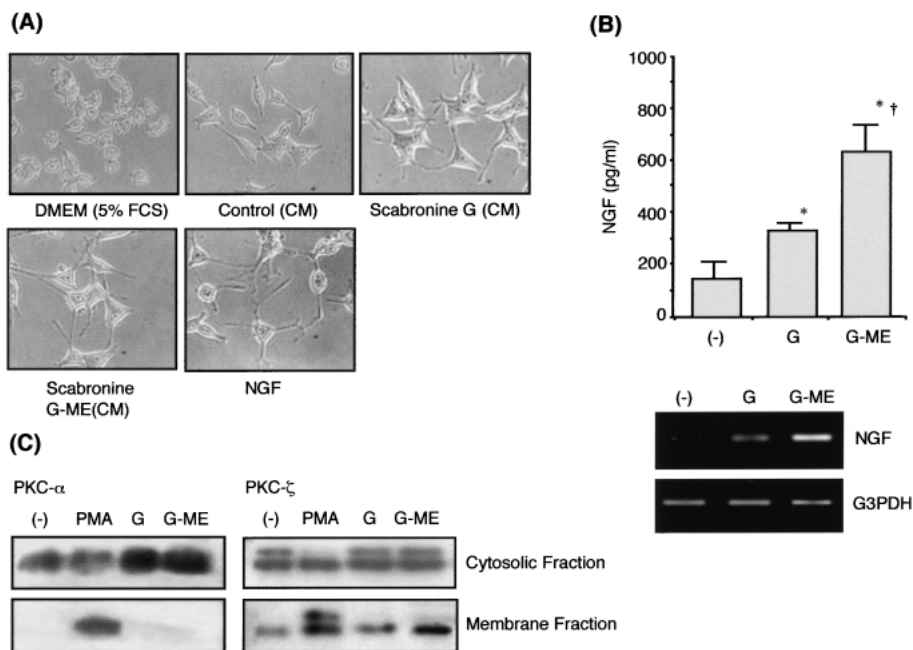


Fig. 2. Effects of Scabronines on Neurotrophic Factor Biosynthesis via PKC

(A) 1321N1 cells were cultured in the presence of scabronine G ( $100 \mu\text{M}$ ) or scabronine G-ME ( $100 \mu\text{M}$ ) for two days, and the conditioned media (CM) were collected. PC12 cells were cultured in the scabronine-conditioned media or DMEM containing NGF ( $50 \text{ ng/ml}$ ) for additional two days, then the morphological changes of the cells were observed. (B) 1321N1 cells were cultured in the presence of scabronine G or scabronine G-ME for 24 h, NGF concentration in the media was determined by ELISA. Scabronine G significantly promoted the NGF secretion compared with corresponding control ( $*p < 0.05$ ,  $n = 3$ ) and scabronine G-ME significantly enhanced the NGF secretion compared with scabronine G ( $*p < 0.05$ ,  $n = 3$ ). 1321N1 cells were incubated with scabronine G or scabronine G-ME for 4 h, then NGF expression was examined by RT-PCR. (C) 1321N1 cells were incubated with PMA ( $100 \text{ nM}$ ), scabronine G or scabronine G-ME for 30 min, then cells were homogenized and fractionated to cytosolic and membrane fractions. The PKC- $\alpha$  and - $\zeta$  in these fractions detected by Western blotting.

GF109203Xにより抑制された。これらのことから、一連の現象にはPKCの関与が示唆された。そこで、PKCの活性化時に引き起こされるPKCの膜移行を遠心による分画とウエスタンブロット法で調べたところ、スカブロン G-MEにより conventional PKC $\alpha$ の局在変化はみられなかったが、atypical タイプの PKC $\zeta$ の膜移行が確認された (Fig. 2(C))。さらに、1321N1 細胞の破碎液をスカブロン G-ME で刺激しても PKC $\zeta$ の膜移行が確認され、かつスカブロン G-ME がヒトリコンビナント PKC $\zeta$ の活性を *in vitro* で上昇させたことから、スカブロン G-ME は PKC $\zeta$ に直接作用して活性化させることが強く示唆された。次に、PKC $\zeta$ 下流のエフェクターで、神経栄養因子の発現を制御する代表的な転写因子 NF- $\kappa\text{B}$  について検討した。免疫染色法及びウエスタンブロット法により、スカブロン G-ME は NF- $\kappa\text{B}$  の活性化時に引き起こされるその核移行及び I- $\kappa\text{B}\alpha$  の分解を促進することが明らかになった。また、レポータージーンアッセイにより NF- $\kappa\text{B}$  の転写促進活性を定量したところ、スカブロン G-ME はその転写活性を

有意に上昇させた。また、スカブロン G-ME による I- $\kappa\text{B}\alpha$  の分解促進作用は、GF109203X により濃度依存的に抑制されたことから、NF- $\kappa\text{B}$  は PKC $\zeta$  依存的に活性化されて、神経栄養因子の発現を促進していると示唆された。現在、さらに詳細なメカニズムについて検討中である。

また、最近イタリアの Marcotullio らのグループにより、ケロウジと類似のキノコ (*Sarcodon cyrneus*) から新たにスカブロン類と同様のシアタン骨格を有するジデルペノイドのシルネイン類が単離された (Fig. 1) (*Planta Med.* 印刷中)。筆者らはこれら一連のシルネイン化合物の薬理活性を検討した結果、スカブロン類と同様に 1321N1 細胞における NGF 遺伝子の発現誘導作用が確認された (未発表データ)。さらに興味深いことに、PC12 細胞をシルネイン類で直接刺激したところ、一部のシルネイン類は強い分化誘導作用を有することが確認された。この作用はスカブロン類では確認されなかったものである。スカブロン類とシルネイン類は同じシアタン骨格を持つ化合物であるが、それらの持つ官能基によって薬理作用が変化するのは興味深

い。現在、筆者らは一連のジテルペノイドの構造活性相関の検討を行っている。

今後、スカブロン類を臨床応用するには解決しなくてはならない問題点がある。スカブロン類の標的分子と思われる aPKC $\zeta$  はユビキタスに発現しているため、全身の細胞、組織ではスカブロン類によりそれら特有の細胞応答が引き起こされることが考えられ、副作用の原因となることが予想される。したがって、少なくとも脳内の移行性が極めて高い薬剤の開発が望まれる。さらに、スカブロン類により IL-6 の生合成が促進されたように、PKC-NF- $\kappa$ B の情報伝達経路は様々な炎症性サイトカイン類の発現を誘導することが予想される。これらの中には神経細胞に対して保護的に機能する因子もある一方、不必要な炎症反応を脳内で誘発、憎悪させる可能性も考えられるので、より詳細な *in vivo* における有効性も検討していくことが課題である。最近になって、アメリカの Danishefsky らのグループによってスカブロン G-ME の全合成がなされ、かつ筆者らが見出したその薬理作用の追試験がなされた。<sup>9)</sup> 今後、多量のスカブロン類の化学合成がなされれば、*in vivo* の実験が可能になると期待される。

### 3. $\beta$ -ユーデスマールの作用メカニズムの解析

$\beta$ -ユーデスマールは蒼朮 (*Atractylodes lanceae rhizomas*) などから単離されたセスキテルペンである (Fig. 1)。蒼朮は桂皮加朮附湯などの漢方方剤を構成する生薬であり、胃腸機能改善作用や利尿作用などの効能がある。また、 $\beta$ -ユーデスマールのユニークな薬理作用も古くから知られている。例えば、 $\beta$ -ユーデスマールが Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase 活性を抑制することや、<sup>10)</sup> 骨格筋においてニコチン性アセチルコリン受容体のブロッカーとして作用することが報告されている。<sup>11)</sup> さらに、 $\beta$ -ユーデスマールがウシ副腎髄質からのアセチルコリン誘発性カテコールアミンの分泌を、細胞内への Ca<sup>2+</sup> 流入の抑制を伴って阻害することが見出された。<sup>12)</sup>  $\beta$ -ユーデスマールの異性体である  $\alpha$ -ユーデスマールは、P/Q タイプの電位依存性 Ca<sup>2+</sup> チャネルを抑制することも知られている。<sup>13)</sup> このような様々な薬理作用を考慮しながら、筆者は PC12 細胞あるいはラットグリオーマ細胞 (C6-BU-1) における  $\beta$ -ユーデスマールの作用を検討した。その結果、 $\beta$ -ユーデスマー

ルが PC12 細胞の形態的な分化を誘導し、また C6-BU-1 細胞からの神経栄養因子の遺伝子発現を促進することを見出したので、その詳細な作用メカニズムを解析した。<sup>14)</sup>

まず始めに、 $\beta$ -ユーデスマールで PC12 細胞を刺激すると、濃度依存的な形態的な分化が引き起こされた (Fig. 3(A))。さらに、この細胞において、 $\beta$ -ユーデスマールはイノシトールリン脂質の代謝回転を促進させ (Fig. 3(C))、このイノシトールリン脂質の加水分解に依存的に又は非依存的に、一過性の細胞内カルシウム濃度上昇を引き起こすことが明らかになった (Fig. 3(B))。また、免疫染色法及びウエスタンブロット法により、PC12 細胞の分化時に主要な役割を担う extracellular signal-regulated kinase (ERK) 及び様々なイオンチャネルや神経伝達物質の合成酵素の発現を制御する cyclic AMP-responsive element binding protein (CREB) の関与を検討したところ、 $\beta$ -ユーデスマールは ERK 及び CREB のリン酸化をともに促進した (Fig. 3(D))。それらのリン酸化はホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼ C 阻害薬の U73122 で抑制されたことから、 $\beta$ -ユーデスマールがホスホリパーゼ C を活性化させて、ERK 及び CREB のリン酸化を亢進していることが示唆された。さらに、PC12 細胞を ERK キナーゼ (MEK) 阻害薬の PD98059 で前処理すると、 $\beta$ -ユーデスマールによる分化が顕著に抑制されたことから、ERK の活性化が PC12 細胞の分化に必要な不可欠なものとして推定された。さらに、<sup>3</sup>H]-ノルエピネフリンを取り込ませた PC12 細胞を  $\beta$ -ユーデスマール刺激すると、その細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度上昇に伴う <sup>3</sup>H]-ノルエピネフリンの分泌が亢進した (未発表データ)。すなわち、 $\beta$ -ユーデスマールは単に PC12 細胞の形態的な分化を引き起こすだけでなく、神経細胞機能の亢進作用を現すことが示唆された。

一方、C6-BU-1 細胞及び 1321N1 細胞において、 $\beta$ -ユーデスマールは細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度上昇を引き起こして、NGF, IL-6 及び glial cell-derived neurotrophic factor などの遺伝子発現を誘導することが明らかになった。しかしながら、PC12 細胞とは異なり、C6-BU-1 細胞では、 $\beta$ -ユーデスマールによるホスホリパーゼ C の活性化は確認されず、また、その Ca<sup>2+</sup> 上昇は細胞外液からの Ca<sup>2+</sup> 流入を

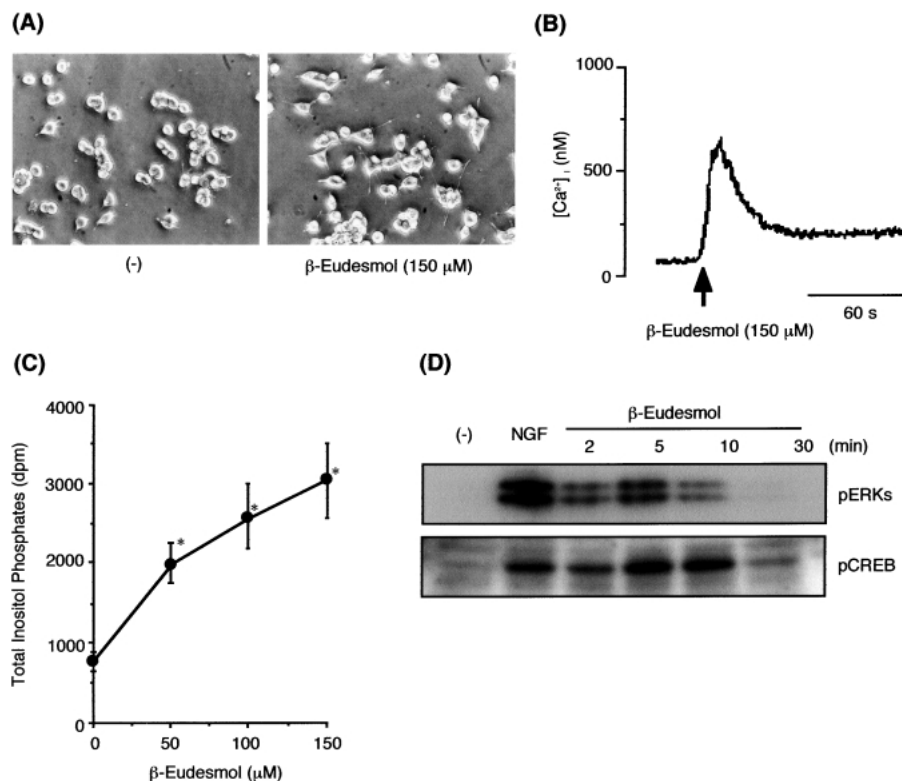


Fig. 3. Effect of  $\beta$ -Eudesmol on Neurite Outgrowth in PC12 Cells and Its Signaling Pathway

(A) PC12 cells were cultured in the presence of  $\beta$ -eudesmol for two days, then morphological changes were observed. (B) After fura 2 was incorporated to the cells, they were stimulated with  $\beta$ -eudesmol, and intracellular  $Ca^{2+}$  concentration  $[Ca^{2+}]_i$  was measured. (C) After the cells were labeled with  $[^3H]$ -inositol, they were stimulated with  $\beta$ -eudesmol for 10 min. The inositol phosphates were purified by anion-exchange column and the radio-activity was measured.  $\beta$ -eudesmol significantly promoted the accumulation of inositol phosphates ( $*p < 0.05$ ,  $n = 3$ ). (D) The cells were stimulated with NGF (50 ng/ml) for 5 min or  $\beta$ -eudesmol for indicated periods, then phospho-ERKs and phospho-CREB were detected by Western blotting.

介さないにも係わらず、小胞体上のイノシトール 3リン酸受容体阻害薬 2-APB による影響を全く受けなかった (論文投稿中)。すなわち、C6-BU-1 細胞では、 $\beta$ -ユーデスマールはホスホリパーゼ C 非依存的に  $Ca^{2+}$  遊離を引き起こすものと推定される。

以上の研究により、 $\beta$ -ユーデスマールはグリア細胞において神経栄養因子の合成を促進させる一方、PC12 細胞にも直接作用して、分化を誘導させることを見出した。スカプロニン類や  $\beta$ -ユーデスマールは、それぞれ異なった作用メカニズムで NGF などの神経栄養因子の遺伝子発現を促進しており、これらの化合物が複雑な神経栄養因子の発現制御機構を解明するための薬理的試薬としていずれも有用であることが示唆された。さらに、スカプロニン類及び  $\beta$ -ユーデスマールは神経栄養因子の生合成を促進する医薬品のリード化合物としても、今後の研究の発展が期待される。

#### 4. NGF 及び cAMP による ERK 活性化メカニズムの解析

前述したように、NGF は様々な神経細胞において、その生存、分化、再生を促進させる。また、細胞内 cAMP 濃度上昇をもたらす生理活性物質や薬理試薬により NGF 様の効果が認められることが多い。NGF などの神経栄養因子や cAMP により活性化される ERK は上記の効果に主要な役割を担うだけでなく、神経細胞の可塑性の変化、記憶学習の亢進などにも重要な細胞内酵素の 1 つである。そこで、筆者は NGF 及び cAMP による ERK の活性化の情報伝達を担うシグナル分子に創薬のターゲットを求めて、詳細に ERK の活性化機構を解析した。

PC12 細胞において、EGF は一過性の ERK の活性化を介して細胞増殖を促進させる一方、NGF や活性型 MEK の過剰発現により持続的な ERK の活性化が引き起こされて細胞の分化が誘発されることから、持続的な ERK の活性化が分化に必要十分であることが知られている。<sup>15,16)</sup> まだ議論の余地が残

されているが、このような ERK の活性化の度合いに依存して、その細胞応答が決定されるのは興味深い現象である。EGF はそのチロシンキナーゼ型受容体の自己リン酸化を促進し、Shc や Grb2 などのアダプタータンパク質並びに Ras グアニンヌクレオチド交換促進因子 (GEF) である Sos を介して、低分子量 G タンパク質である Ras を活性化させる。活性化された Ras は Raf (Raf-1 及び B-Raf)/MEK/ERK と一連の MAPK カスケードを活性化する。しかし、ERK が一度活性化されると、ERK 若しくは ERK 下流エフェクターの RSK による Sos のリン酸化、MAPK ホスファターゼの活性化、RasGTPase 活性化タンパク質による Ras の不活性化などの様々な機構により、比較的早期に Ras-ERK シグナルがオフになる。<sup>17)</sup> 一方、NGF はその TrkA チロシンキナーゼ型受容体を介して、EGF の場合と同様に Ras/MAPK カスケードを一過性に活性化する。しかし、NGF の場合には、TrkA がスキャフォールドタンパク質として機能する FRS2 又は ARMS と会合する。さらに、この複合体にアダプター分子である Crk-L や低分子量 G タンパク質 Rap1GEF の C3G が結合して、Rap1 が活性化する。<sup>17-19)</sup> NGF により活性化された Rap1 は B-Raf と結合し、さらに MEK を介して ERK が活性化する。Rap1 の不活性化のメカニズムは詳細には明らかにされていないが、Ras の場合と異なり、Rap1 の活性化は非常に持続的なものであるため、Rap1 を介した ERK の活性化はやはり持続的なものとなる。また、EGF による Rap1 の活性化は NGF と比較して非常に弱いものであるため、EGF は Rap1 を介した持続的な ERK 活性化シグナルを伝達できない。<sup>18)</sup> cAMP は PKA 依存的あるいは非依存的に Rap1 を活性化することが知られている。その結果、やはり持続的な ERK 活性化を引き起こして、PC12 細胞を分化誘導させることができる。<sup>20)</sup> そこで、筆者は NGF を EGF や cAMP 刺激の場合と比較しながら、ERK の持続的な活性化に関与する Rap1 の活性化機構を解明した。<sup>21)</sup>

PC12 細胞を NGF で刺激すると持続的な ERK の活性化が誘発されたが、Src チロシンキナーゼファミリー (SFK) の阻害薬 PP2 で前処理すると、ERK 活性化の持続相が選択的に抑制された (Fig. 4 (A))。興味深いことに、cAMP 刺激による ERK の

活性化も PP2 により大部分が抑制されたことから (Fig. 4(A))、NGF あるいは cAMP による Rap1 を介した ERK の情報伝達には SFK の活性が必要であることが示唆された。次に、Ras の活性を pull-down アッセイにて測定したところ、NGF 並びに EGF はどちらも強く Ras を活性化したが、その活性化は PP2 によりほとんど影響を受けなかった。また、cAMP は Ras を全く活性化しなかった。一方、EGF は Rap1 の活性化を強く引き起こさなかったが、NGF は持続的な Rap1 の活性化を引き起こした。また、NGF による Rap1 の活性化は PP2 で顕著に抑制された (Fig. 4(B))。近年、プロテインキナーゼ A (PKA) が SFK の中でも Src を選択的にリン酸化し、そのチロシンキナーゼ活性を制御していることが報告されている。<sup>22)</sup> そこで、PKA 阻害薬 H89 で細胞を前処理したところ、NGF による Rap1 の活性化は PP2 の場合と同様に抑制された (Fig. 4(B))。また、cAMP も Rap1 の活性化を引き起こし、その活性化はやはり PP2 及び H89 により完全に消失した (Fig. 4(B))。以上より、NGF 及び cAMP は PKA 並びに Src を介して、Rap1 を活性化することが示唆された。

そこで、NGF 又は cAMP 刺激時に引き起こされると推定される PKA による Src のリン酸化反応について、さらに詳細に検討した。PKA が Src セリン 17 番残基をリン酸化することが古くから知られているが、<sup>23)</sup> その生理的な意義は不明である。実際に PKA が Src をリン酸化しているかどうかを、Src 抗体を用いた免疫沈降法とリン酸化 PKA 基質抗体を用いたウエスタンブロット法を組み合わせる解析した。その結果、NGF でも cAMP の場合でも、刺激後 15 分をピークに時間依存的な Src セリン 17 残基のリン酸化が認められた (Fig. 4(C))。しかし、EGF の場合はこの反応が認められなかった。Src の自己リン酸化部位 (チロシン 416) のリン酸化はそのチロシンキナーゼ活性のよい指標となる。そこで、リン酸化特異的 Src 抗体を用いて Src の活性をモニタリングしたところ、Src セリン 17 のリン酸化のタイムコースとよく対応するように、チロシン 416 のリン酸化が認められた (Fig. 4(C))。また、NGF 及び cAMP 刺激による Src セリン 17 及びチロシン 416 のリン酸化は、PKA 阻害薬 H89 で抑制された。すなわち、PKA による Src セリン 17 残基

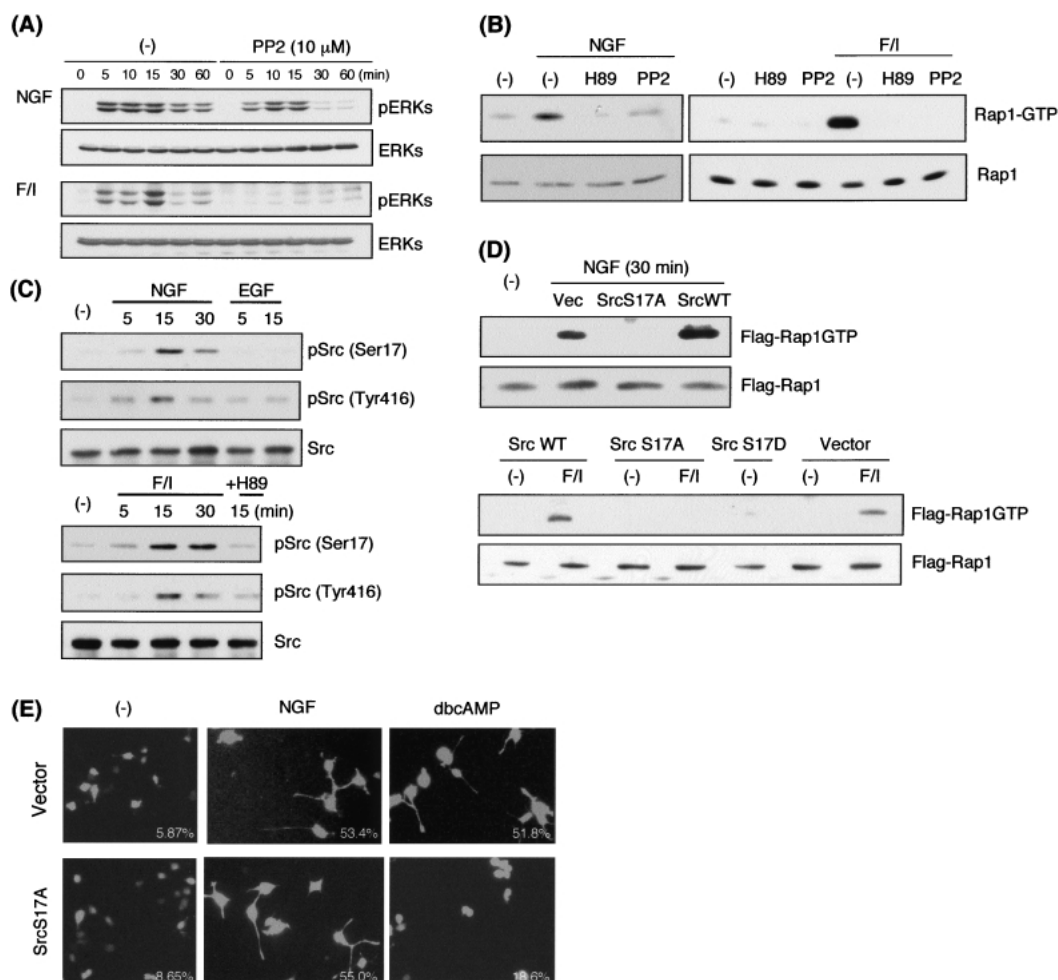


Fig. 4. Activation of Rap1 via Src by NGF and cAMP

(A) PC12 cells were stimulated with NGF (100 ng/ml) or forskolin (10  $\mu$ M)/IBMX (100  $\mu$ M) (F/I) for the indicated periods in the presence or absence of PP2. Then, phospho-ERKs and total ERKs were detected by Western blotting. (B) The cells were incubated with NGF for 30 min or F/I for 20 min in the presence or absence of H89 (10  $\mu$ M) or PP2 (10  $\mu$ M). Rap1 activity was determined by pull-down assay by using GST-RalGDS as a probe. (C) After the cells were stimulated with NGF, EGF (100 ng/ml) or F/I for the indicated periods, Src was immunoprecipitated. Then, Src phosphorylation was detected by Western blotting by using phospho-PKA substrate antibody or phospho-Src (Y416) antibody. (D) The cells were cotransfected with empty vector (Vec), Src WT, SrcS17A or SrcS17D and Flag-Rap1, then the cells were stimulated with NGF for 30 min or F/I for 20 min. The Flag-Rap1 activity was examined by using GST-RalGDS and anti-Flag antibody. (E) The cells were cotransfected with empty vector or SrcS17A and EGFP, and the cells were incubated with NGF or dibutyryl cyclicAMP (0.5 mM) for 24 h. Then morphological changes in EGFP-positive cells were observed. Percentage of neurite-bearing cells was expressed.

のリン酸化が、そのチロシンキナーゼ活性の上昇のトリガーとなっていることが示唆される。さらに、SrcのPKAによるリン酸化部位を欠落させた変異体 (SrcS17A) を用いて、Rap1及びERKの活性を測定した。その結果、SrcS17Aの過剰発現により、NGF及びcAMPによるRap1の活性化はほぼ完全に抑制された (Fig. 4(D))。また、NGF刺激によるERKの活性化は、刺激後30分でSrcS17Aにより抑制されたが、刺激5分後では影響を受けなかった。すなわち、NGF刺激の場合、PKAによるSrcのリン酸化はRasではなく、Rap1を介したERKの活性化に必須であることが示唆された。さらに、cAMPによるERKの活性化もSrcS17Aの過剰発現

により抑制されたことから、cAMP刺激時も、PKA/Src/Rap1を介してERKが活性化されることが明らかになった。今後はPKAによるSrcセリン17残基のリン酸化からどのようにしてSrcのチロシンキナーゼ活性が上昇するのか、このリン酸化部位がある特定の情報伝達分子の結合部位として機能するかなどの可能性を検討していく予定である。また、Rap1は細胞膜、細胞内小胞膜、ゴルジ装置、核膜付近に局在することが報告されているが、PC12細胞においては、細胞膜にはほとんど局在せず、大部分が細胞内小胞膜上に局在することが知られている。<sup>24)</sup>一方、SrcはN末がミリスチン酸化修飾を受け、細胞膜直下に局在している。NGFある

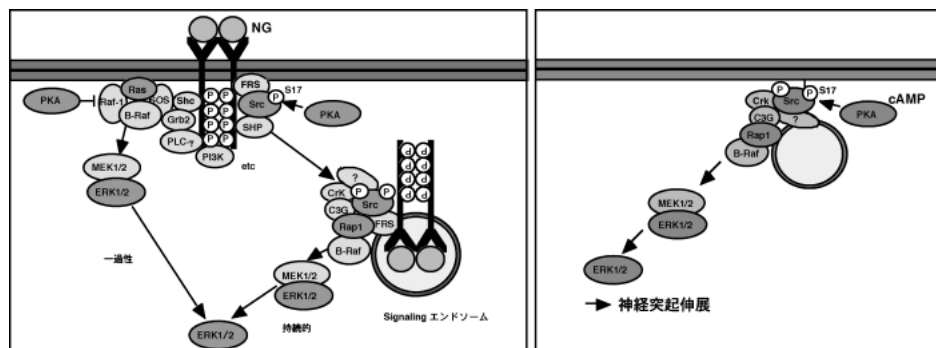


Fig. 5. Diagram of Putative Signaling Pathways of NGF and cAMP to ERK Activation

いは cAMP により PKA を介して活性化された Src と Rap1 が、どのような形で共局在化し相互作用をするかについても、興味を引くところである。

最後に、筆者は NGF 又は cAMP 刺激によって引き起こされる PKA の Src のリン酸化の生理的意義について検討を加えた。PC12 細胞は NGF や cAMP 刺激により劇的な分化が誘導されることから、まず、その分化を生理的な意義の指標とした。MEK 阻害薬 PD98059 存在下で、NGF 又は cAMP 刺激を 24 時間行くと PC12 細胞の分化が顕著に抑制されたことから、ERK が細胞の分化に関与していることが確認された。しかし、SFK 阻害薬 PP2 は cAMP 誘発性の分化を抑制したが、NGF 刺激による分化に対してはほとんど影響しなかった。また、SrcS17A と GFP を共発現させたのち、GFP 陽性細胞についてその形態を観察したところ、cAMP 刺激による PC12 細胞の分化は顕著に抑制されたが、NGF による分化はほとんど抑制されなかった (Fig. 4 (E))。以前に、筆者らのグループは不活性型 Rap1 の過剰発現により、NGF による PC12 細胞の分化は抑制されないことを報告しているが、<sup>20)</sup> 今回の結果を合わせて考慮すると、PKA/Src/Rap1/ERK の情報伝達経路は NGF による分化作用に対してかならずしも必須ではないことが考えられる。しかし、NGF による Rap1 を介した ERK の活性化 (持続的な活性化) が PC12 細胞の分化に対して必要不可欠であるとの相反する報告もあり、<sup>16,19)</sup> 今後より詳細な解析が望まれる。NGF によって活性化される Rap1 のその他の生理的な意義については、Rap1 が Na<sup>+</sup> 電流を誘発すること、また、transin のような神経細胞特異的な遺伝子の発現に関与することが知られている。<sup>25)</sup> 今後、神経細胞の分化時に

における Rap1 の役割について詳細に検討していく予定である。

以上、本研究で明らかにされた NGF 及び cAMP による ERK 活性化の情報伝達経路を Fig. 5 に示した。筆者らは NGF の情報伝達経路を cAMP 及び EGF の場合と比較しながら検討してきたが、その結果、Rap1 を介した ERK の活性化に cAMP の場合と共通のメカニズムが存在することが見出された。今後、臨床的に応用できる薬物を開発する際に、何らかの形で cAMP/PKA 経路を活性化できるような低分子性の化合物、例えば、フォルスコリンに代表されるアデニル酸シクラーゼ活性化薬又はホスホジエステラーゼ阻害薬などがその有力な候補となり得ることが考えられる。

## 5. おわりに

冒頭にも触れたが、アルツハイマー病などの老人性認知症に対する様々な新しい治療法が全世界的に活発に提案され、臨床試験が行われている。恐らく、様々な異なる薬理作用を持つ薬物を複数組み合わせた薬物療法が今後主流となっていくと思われる。その薬物治療の一環として、本研究のような神経栄養因子を利用した薬物の臨床応用が実現されて効果を発揮していくとしたら、それは筆者にとって大きな喜びである。

**謝辞** 本研究のスカブロニン類並びに  $\beta$ -ユーデスモールの研究は、東北大学大学院薬学研究所細胞情報薬学分野並びに分子生物薬学分野にて行われました。終始、筆者をご熱心に指導をしてくださった中畑則道教授及び大泉康教授にこの場を借りて厚くお礼申し上げます。また、NGF の情報伝達機構の研究はオレゴンヘルスサイエンス大学ポララム研



究所で行われました。丁寧に指導して下さった Philip Stork 博士に深く感謝致します。また、スカブロン類を単離し供与して下さった太田富久教授（現金沢大学）、また、その誘導体を作成して下さった豊田真宏教授（現大阪府立大学）、スカブロン類縁体のシルネイン類を供与して下さった Maria Marcotullio 博士（イタリア）に厚くお礼申し上げます。

#### REFERENCES

- 1) Hardy J., Allsop D., *Trends Pharmacol. Sci.*, **12**, 383–388 (1991).
- 2) Selkoe D. J., *Annu. Rev. Cell Biol.*, **10**, 373–403 (1994).
- 3) Obara Y., Nakahata N., *Drug News Perspect*, **15**, 290–298 (2002).
- 4) Collerton D., *Neuroscience*, **19**, 1–28 (1986).
- 5) Ohta T., Kita T., Kobayashi N., Obara Y., Nakahata N., Ohizumi Y., Takaya Y., Oshima Y., *Tetrahedron Lett.*, **39**, 6229–6232 (1998).
- 6) Obara Y., Nakahata N., Kita T., Takaya Y., Kobayashi H., Hosoi S., Kiuchi F., Ohta T., Oshima Y., Ohizumi Y., *Eur. J. Pharmacol.*, **370**, 79–84 (1999).
- 7) Obara Y., Kobayashi H., Ohta T., Ohizumi Y., Nakahata N., *Mol. Pharmacol.*, **59**, 1287–1297 (2001).
- 8) Shibata H., Tokunaga T., Karasawa D., Hirota A., Nakayama M., Nozaki H., Tada T., *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 3373–3375 (1989).
- 9) Waters S. P., Tian Y., Li Y. M., Danishefsky S. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 13514–13515 (2005).
- 10) Satoh K., Nagai F., Ushiyama K., Yasuda I., Akiyama K., Kano I., *Biochem. Pharmacol.*, **44**, 373–378 (1992).
- 11) Kimura M., Nojima H., Muroi M., Kimura I., *Neuropharmacology*, **30**, 835–841 (1991).
- 12) Tachikawa E., Takahashi M., Kashimoto T., *Biochem. Pharmacol.*, **60**, 433–440 (2000).
- 13) Asakura K., Kanemasa T., Minagawa K., Kagawa K., Yagami T., Nakajima M., Ninomiya M., *Brain Res.*, **873**, 94–101 (2000).
- 14) Obara Y., Aoki T., Kusano M., Ohizumi Y., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **301**, 803–811 (2002).
- 15) Cowley S., Paterson H., Kemp P., Marshall C. J., *Cell*, **77**, 841–852 (1994).
- 16) Harada T., Morooka T., Ogawa S., Nishida E., *Nat. Cell Biol.*, **3**, 453–459 (2001).
- 17) Sasagawa S., Ozaki Y., Fujita K., Kuroda S., *Nat. Cell Biol.*, **7**, 365–373 (2005).
- 18) Kao S., Jaiswal R. K., Kolch W., Landreth G. E., *J. Biol. Chem.*, **276**, 18169–18177 (2001).
- 19) Arevalo J. C., Yano H., Teng K. K., Chao M. V., *EMBO J.*, **23**, 2358–2368 (2004).
- 20) Vossler M. R., Yao H., York R. D., Pan M. G., Rim C. S., Stork P. J., *Cell*, **89**, 73–82 (1997).
- 21) Obara Y., Labudda K., Dillon T. J., Stork P. J., *J. Cell Sci.*, **117**, 6085–6094 (2004).
- 22) Schmitt J. M., Stork P. J., *Mol. Cell*, **9**, 85–94 (2002).
- 23) Roth C. W., Richert N. D., Pastan I., Gottesman M. M., *J. Biol. Chem.*, **258**, 10768–10773 (1983).
- 24) York R. D., Molliver D. C., Grewal S. S., Stenberg P. E., McCleskey E. W., Stork P. J., *Mol. Cell Biol.*, **20**, 8069–8083 (2000).
- 25) York R. D., Yao H., Dillon T., Ellig C. L., Eckert S. P., McCleskey E. W., Stork P. J., *Nature*, **392**, 622–626 (1998).