

平成10年度厚生科学研究費補助金
(脳科学研究事業)

総括・分担研究報告書

アルツハイマー病の神経変性マーカー蛋白質に関する研究
(課題番号 H10-脳-002)

主任研究者	吉川	和明	大阪大学蛋白質研究所教授
分担研究者	新延	道夫	大阪大学蛋白質研究所助教授
同	植月	太一	大阪大学蛋白質研究所助手
同	谷浦	秀夫	大阪大学蛋白質研究所助手

平成11年4月

目次

- 頁
- 1-5 総括研究報告書
「アルツハイマー病の神経変性マーカー蛋白質に関する研究」
主任研究者 吉川 和明
- 6-15 分担研究報告書
「APP細胞内ドメイン結合蛋白質の解析」
分担研究者 新延 道夫
- 16-21 分担研究報告書
「APP強制発現によるニューロン変性系の確立」
分担研究者 植月 太一
- 22-24 分担研究報告書
「酵母two-hybrid法を用いたAPP細胞内ドメインに結合する
蛋白質の解析」
分担研究者 谷浦 秀夫

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
総括研究報告書

アルツハイマー病の神経変性マーカー蛋白質に関する研究

主任研究者 吉川和明 大阪大学・蛋白質研究所教授

研究要旨

本研究の目的は、アルツハイマー病脳のニューロン内部で起こっている病的変化を反映するマーカーを見出し、アルツハイマー病の早期診断のみならず病因の解明に役立てることにある。APPは脳新皮質（連合野）や海馬の大型ニューロンなど、アルツハイマー病で侵されるニューロンに豊富に存在し、APPはニューロンの異常によって細胞内に蓄積することも知られている。そこで、APPと結合する蛋白質やAPPの蓄積によって変動する蛋白質を探索することを試み、以下の成果を得た。

- 1) 遺伝子導入強制発現するベクターとしてアデノウイルスベクターを用いてニューロンに効率よくAPP遺伝子を導入発現する方法を確立した。CAGプロモーターによって発現するアデノウイルスベクターとヒト分化ニューロンに極めて近い性質を持つ胚性ガン細胞NTera2(NT2細胞)由来のニューロンを用いて、ヒトAPP695を強制発現させると、ニューロン死が認められた。
- 2) アデノウイルスを用いたヒトニューロンの変性は形態学的にアポトーシスによることが示された。またアポトーシスの際に機能する蛋白質分解酵素の1つであるカスパーゼ3が変性に先立って活性化されることを見いだした。
- 3) APPの生理作用あるいは病理作用を媒介すると考えられるAPPC末端部に着目し、カスパーゼ3によって遊離するC末端の31アミノ酸配列（C31）に特異的に結合する蛋白質を検出したところ、新規と思われる4種類の高分子量蛋白質が見いだされた。また、阻害実験の結果から、既知のAPP結合蛋白質とは異なるものである可能性が示唆された。
- 4) 酵母two-hybrid法を用いてラット脳cDNAライブラリーよりスクリーニングを行ったところ、既報のラットあるいはヒトFe65とは異なる蛋白質Fe65Nが得られた。Fe65NはAPPと細胞内部で相互作用をすることが示された。
- 5) 以上の結果、APPに結合するFe65Nや新規の蛋白質はAPPによるニューロンのアポトーシスを媒介する可能性があり、アルツハイマー病におけるニューロンの変性のマーカーとなり得る可能性が高い。

分担研究者

新延道夫 大阪大学・蛋白質研究所助教授

植月太一 大阪大学・蛋白質研究所助手

谷浦秀夫 大阪大学・蛋白質研究所助手

A 研究目的

アルツハイマー病は脳新皮質（連合野）や海馬などのニューロンが大量に変性することによって起こる疾患である。現在アルツハイマー病の生前診断では臨床症状やCTによる画像診断などによってなされている。また、確定診断には死後の脳の病理組織学が用いられている。しかし、アルツハイマー病脳のニューロン内部で起こっている病的変化を反映するマーカーがあれば、アルツハイマー病の早期診断のみならず病因の解明にも有効であろう。アルツハイマー病では既にTauやアミロイド蛋白質A β やその前駆体（APP）をはじめ既知の蛋白質の脳組織や脳脊髄液の濃度が測定されている。しかし、アルツハイマー病の本質であるニューロン変性と病気の進行度のマーカーについては、まだ適当なものがないのが現状である。APPはとくに脳新皮質（連合野）や海馬の大型ニューロンなど、アルツハイマー病で侵されるニューロンに豊富に存在することが知られている。また、最近ではAPPの細胞質内ドメインに結合する蛋白質が見いだされている。このようなAPP結合蛋白質はAPPの異常に伴ってその局在を変化させたり、変性に伴って細胞外に漏出する可能性が高い。そこで本研究では、これらの新規蛋白質を明らかにし、アルツハイマー病患者の脳切片や脳脊髄液中の濃度や分解産物を検出する。この研究によってアルツハイマー病に特異的なニューロン変性を検出できる蛋白質マーカー

が見いだされた場合、アルツハイマー病の早期診断や病因の解明に寄与するものと考えられる。

B. 研究方法

本研究ではアルツハイマー病のニューロン変性のマーカーとしてAPP機能を媒介する蛋白質やAPPの変性作用に伴って変動するニューロン特異的蛋白質を同定する。次に、それらの蛋白質の高感度検出系を確立し、疾患モデル系を用いて神経変性のマーカーとなり得るかを検討する。その後、実際のアルツハイマー病脳の病理組織標本や脳脊髄液中の蛋白質を測定することにより、それらの蛋白質がアルツハイマー病におけるニューロン変性のマーカーとなり得るかを総合的に判断する。以下、具体的な研究法を述べる。

APPの細胞内ドメインは進化の過程で極めてよく保存されており、重要な生理機能を媒介していることが推定される。現在までに結合蛋白質としてFE65やX11およびその類似蛋白質が同定され、これらは細胞内の情報伝達に関与することが示唆されている。したがってAPPの細胞内ドメインは種々の蛋白質と複合体を形成しているものと推定される。そこで、酵母two-hybridスクリーニング法とAPPのアフィニティーを利用した生化学的手法によって新しい蛋白質を見つけ、これらの蛋白質のcDNAをクローン化して全長のアミノ酸配列を決定することを試みる。そのcDNAを大腸菌の発現系を用いて融合蛋白質を作製し、in vitroでAPPとの結合を解析する。

APPを強制発現させると細胞死が起こることが明らかにされている。APPのC末端断片が、さらにプロテアーゼで分解を受けて、遊離型ペプチドとして病理作用を媒介する可能性もある。APPはアポトーシスと

類似した機構でDNAの断片化を起こすため、APP自身がアポトーシスの際に活性化するプロテアーゼ、例えばカスパーゼ3などの基質となる可能性が高い。そこで、APPのC末端ペプチドを用いて、蛋白質分解酵素によって限定分解を受けるかを調べる。

これらの蛋白質の変動はAPPによるニューロン変性系によって、その意義を解析する。アデノウイルスベクターを用いたAPP過剰発現によるニューロン変性系において、細胞変性に至る細胞内分子機構に上記の蛋白質が関わるかを検討する。その際、変性ニューロン内でアポトーシス関連蛋白質と連係して変化するかを検討する。

平成10年度は上記の研究方法の中で1)APPの強制発現系によるニューロン変性モデルの確立2)APP結合蛋白質の探索と同定3)酵母two-hybrid法によるAPP結合蛋白質の検索を中心に研究を行った。

C. 研究結果

遺伝子導入強制発現するベクターとしてアデノウイルスベクターを用いてニューロンに効率よくAPP遺伝子を導入発現する方法を確立した。研究材料として全長型APP695を普遍的で強力なCAGプロモーターによって発現するアデノウイルスベクターと分化ニューロンに極めて近い性質を持つヒト胚性ガン細胞NTera2 (NT2細胞)由来のニューロンを用いた。レチノイン酸処理により分化したNT2ニューロンにAPP発現アデノウイルスベクターを感染させてAPPを強制発現した。ニューロンの形態変化を観察したところ、感染後48時間までは変化は見られなかったが72時間から突起を縮退させ、細胞体も膨潤するなどの変性が観察された。さらに96時間になるとAPPを多量に発現して細胞内に蓄積しているニューロンでは突起の縮退、細胞表面の不整化

などの変性像が認められた。ニューロンの変性がどのような経路でもたらされるのかを検討した。変性細胞の核の形態をDNA染色により顕微鏡下で観察しところ、核の凝集、分断化が観察された。さらに、DNAの断片化が起きていることをTUNEL反応により確認した。また細胞死に重要な役割を果たす蛋白質分解酵素の1つであるカスパーゼ3が変性に先立って活性化されることを見いだした。

次に、APPは細胞死に重要な働きをされると考えられているカスパーゼ3の基質となる可能性を検討するため、APPの細胞内ドメインを含む融合蛋白質を大腸菌の発現系で作製し、それにカスパーゼ3を作用させたところ、APPのC末端31残基 (C31) が生じることが認められた。次に、このAPP C末端C31に着目し、C31特異的に結合する蛋白質を検出することを目的として以下の実験を行った。まず、既知のAPP結合蛋白質Fe65を用いて、これがビオチン化ペプチドC31と結合するか否かについて調べたところ、両者の結合が確認された。次に、Bolton-Hunter法でヨードラベルしたペプチドC31を用いて、架橋法によって特異的に結合する蛋白質を探索した。その結果、約195kDa、145kDa、125kDa及び115kDaの分子量を持つ4種類の蛋白質が見いだされた。C31ペプチドを用いた阻害実験よりそれぞれの蛋白質について阻害定数を算出すると、約0.7 μ Mであった。また、これらの蛋白質は、C25及びC47にも結合し、特にC47に対して高い親和性を有すると推定された。さらに、これら結合蛋白質の細胞下局在を調べたところ、シナプトゾームを含むP2画分に多く検出された。

APPの細胞内ドメインに結合する蛋白質を直接単離する目的で、酵母two-hybrid法を用いてラット脳cDNAライブラリーよりスクリーニングを行ったところ、既報のラットあるいはヒトFE65より5'側に新規

の配列を含むFE65Nが得られた。PC12ニューロンにmyc tagged FE65Nを遺伝子導入して発現させたところ核と細胞質にびまん性に免疫陽性物質が観察されたが、myc tagged FE65NとAPPを共導入するとmyc tagged FE65Nは核には存在せずAPPと一致して細胞質に顆粒状の物質として確認された。

D. 考察

APP強制発現によってヒトニューロンは変性細胞死を引き起こし、その過程はアポトーシスによることが推定された。またアポトーシスの際に機能するカスパーゼ3が変性に先立って活性化されることを見いだした。このことは、APPの強制発現、カスパーゼ3の活性化、細胞死の順序でAPPが細胞死を誘導する可能性が高い。また、カスパーゼ3はAPPからC31を遊離させることが、その後の変化を媒介することも考えられる。

APPは細胞死に重要な働きをすると考えられているカスパーゼ3の基質となり、その際にAPPのC末端31残基(C31)が生じることは、APPの細胞内領域がカスパーゼ3によって分解を受けて、ニューロンのアポトーシスに関連する可能性が示唆される。既に私たちはAPPを強制発現させるとニューロンの細胞死が起こることを報告してきた。とくに、アデノウイルスを使ってヒトAPP695をラット海馬に投与すると、ニューロンが急速に死滅するが、それはアポトーシスと類似の形態、たとえば、細胞体の収縮や染色体DNAの断片化など、の変化を示すことを見出した。最近では、米国のNeveらのグループがヘルペスウイルスを用いた系でAPP695を培養ラット海馬ニューロンに強制発現させると、アポトーシスと類似のニューロン変性を起こすことを報告している。これらの事実はAPPの強制発

現によるニューロン死はアポトーシスによる可能性が高い。

アポトーシスによる細胞死には蛋白質分解酵素カスパーゼが重要な働きをするが、特にカスパーゼ3がAPPC末端C31を遊離させることは、その後の病理作用を考える上で示唆に富む知見と思われる。そこで、APPC31特異的に結合する蛋白質を探索したところ、新規の4種類の蛋白質が見いだされた。これらの蛋白質は、Fe65との結合性が異なるため、APPの生理機能に関わる未知の結合蛋白質である可能性がある。また、酵母two-hybrid法を用いて得られた新規のFe65NはAPPと結合することで、核と細胞質(細胞膜)との間を行き来している可能性がある。したがって、カスパーゼ3によってAPPの細胞内領域が切断を受けると、APPの機能を媒介できなくなるため、この相互作用がAPP過剰発現によるニューロン死の機序に関連している可能性が考えられる。

E. 結論

遺伝子導入強制発現するベクターとしてアデノウイルスベクターを用いてニューロンに効率よくAPP遺伝子を導入発現する方法を確立した。CAGプロモーターによって発現するアデノウイルスベクターとヒト分化ニューロンに極めて近い性質を持つ胚性ガン細胞NTera2(NT2細胞)由来のニューロンを用いて、ヒトAPP695を強制発現させると、ニューロンは突起縮退、細胞表面の不整化などの変性像が認められた。この際のニューロン変性はアポトーシスであることが示された。またアポトーシスの際に機能する最も重要な蛋白質分解酵素の1つであるカスパーゼ3が変性に先立って活性化されることを見いだした。APPの生理作用あるいは病理作用を媒介すると考えられるAPPC末端部に着目し、C末端の31ア

ミノ酸配列（C31）に特異的に結合する蛋白質を検出したところ、新規と思われる4種類の高分子量蛋白質が見いだされた。また、阻害実験の結果から、既知のAPP結合蛋白質とは異なるものである可能性が示唆された。また、酵母two-hybrid法を用いてラット脳cDNAライブラリーよりスクリーニングを行ったところ、既報のラットあるいはヒトFE65とは異なる蛋白質FE65Nが得られた。FE65NとAPPは細胞内部で相互作用をすることが示された。これらの結果、ニューロンに存在するアポトーシス関連酵素カスパーゼやシナプス内の新規蛋白質さらにはFE65Nなどは、APPによるアルツハイマー病脳における神経変性や死を媒介する可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし（3編投稿中）
2. 学会発表

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
分担研究報告書

APP細胞内ドメイン結合蛋白質の解析

分担研究者 新延道夫 大阪大学蛋白質研究所 助教授

研究要旨

アミロイド前駆体蛋白質（ β -amyloid precursor protein, APP）はアルツハイマー病患者脳の大脳皮質に異常沈着する β -アミロイドの前駆体蛋白質として同定された。APPは1回膜貫通型蛋白質であり、全体の90%以上が細胞外にあり、細胞内ドメインは47アミノ酸にしかすぎない。構造から細胞表面受容体の特徴を持っていると推測されるが、細胞外のリガンドについては明らかにされていない。一方、APPの細胞内ドメインと結合する蛋白質として、Go、APP-BP1、X11、Fe65などが報告されているがAPPの生理的機能との関連については明らかでない。最近、当研究室と他研究機関との共同研究において、ラット交感神経節細胞の初代培養系に、APPのC末端25残基に対する抗体及びC末端25残基のペプチドを細胞内に注入すると、後シナプス電位が低下することを見いだした。また、本研究において、caspase-3の酵素反応によりAPP C末端31残基（C31）が生じることが認められた。これらの結果から、APPの細胞内領域がシナプスに於いて、何らかの生理的役割を果たすとともに、神経細胞のアポトーシスとも関連している可能性が示唆される。これらのことより、本研究ではこのAPP C末端25残基を含むC31に着目し、C31特異的に結合する蛋白質を検出することを目的として以下の実験を行った。まず、ポジティブコントロールとして、GST融合蛋白質であるGST-Fe65を用いて、これがビオチン化ペプチドC31と結合するか否かについて調べたところ、両者の結合が確認された。その後、ラット脳P2/P3膜画分より界面活性剤を用いて可溶化した試料、あるいはP2/P3膜画分からの高塩濃度抽出液等の試料を用いて、ビオチン化ペプチドC31に対する結合蛋白質の探索を行った。しかしながら、結合条件や検出感度等の問題により特異的に結合する蛋白質を検出することが出来なかった。次に検出感度を上げるために、Bolton-Hunter法でヨードラベルしたペプチドC31を用いて、架橋法によって特異的に結合する蛋白質を探索した。その結果、約195kDa、145kDa、125kDa及び115kDaの分子量を持つ4種類の蛋白質が見いだされた。ペプチドを用いた阻害実験よりそれぞれの蛋白質について阻害定数を算出すると、約0.7 μ Mであった。また、阻害実験の結果から、これらの蛋白質は、C25及びC47にも結合することが予想され、特にC47に対して高い親和性を有すると考えられた。さらに、これら結合蛋白質の局在性を調べたところ、シナプトゾームを含むP2画分に多く検出された。また、阻害実験の結果から、Fe65との結合性が異なること、また、C25にも結合可能であることより、本蛋白質が、APPの生理機能に関わる未知の結合蛋白質である可能性が考えられる。

A. 研究目的

アルツハイマー病 (AD)の原因遺伝子の一つと考えられているアミロイド前駆体蛋白質 (以下APP695 と略す) は発生初期より神経細胞に豊富に存在しており、その局在性は細胞体からシナプス構造体にまで及んでいる。この様に細胞全体に普遍的に存在しているにもかかわらず機能については解明されていない。分担研究者はADの初期症状が急激な記憶の減退にあることに着目して、APP695 のシナプスにおける機能を明らかにすることがAD 発症を生化学的に解明するための基礎的知見の一つになると考え、研究を進めた。ラット交感神経節細胞の初代培養系は哺乳類神経系のシナプス機能を電気生理学的に数値化出来る格好の系であるが、この系を利用して、APP695 のC末端ペプチドに対する抗体を注入し、シナプス伝達効率を調べた結果、抗体注入により後シナプス電位が明らかに低下することが認められた。さらに、C末端ペプチドそのものを注入することによっても同様の低下が認められた。これらの結果はAPP695 の細胞内ドメインがシナプスにおいて何らかの重要な機能を持つことを強く示唆している。一方、ニワトリの運動神経の発生初期におけるアポトーシスにAPP が関与しているとの報告があり、caspase-3 の阻害剤で処理することによりアポトーシス及びAPPの分解が抑えられるところから、APPの細胞内ドメインの caspase-3 による分解がアポトーシスと密接に関わるのではないかと予測された。そこで、分担研究者は実際にAPP 細胞内ドメインを含むGST融合蛋白質を用いて、これがcaspase-3 により切断されるか否か調べたところ、APPC末端31残基が酵素反応により生じることが認められた。これらの結果はAPPのC末端側配列が神経細胞のシナ

プスにおいて何らかの生理的役割を持つことを示唆するだけでなく、神経細胞のアポトーシスとも関わっている可能性を示唆している。従って、これらの分子機構を解明することがAD発症解明の基礎的知見となることは確実であり、その一環としてAPP細胞内ドメインに対する結合蛋白質の探索を行った。

B. 研究方法

APP細胞質領域及びFe65C末端側領域のGST融合蛋白質 (GST-APPcyto、GST-Fe65C) の調製と精製

GST-APPcytoのコンストラクトは、pCALNLYAP (CAG誘導APP695発現プラスミド) を鋳型として以下のプライマーと94°C 1分、52°C 1分、72°C 2分で30サイクルのPCR反応を行うことにより調製した。
APP-U1 5' -CGG GAT CCA AGA AGA AAC AGT ACA CAT CC-3'
APP-L1 5' -CGG AAT TCG GTC TAG TTC TGC ATC TGC TC-3'
PCR反応産物を精製後、制限酵素EcoR I 及びBamH I で処理し、pGEX-2TベクターのEcoR I、BamH I サイトに挿入し、サブクローニングを行った。GST-Fe65Cのコンストラクトについては、Adult Rat cDNA ライブラリーから得られたrat Fe65N遺伝子について制限酵素EcoR I 及びSma I で処理し、5'末端より1681bpから2220bpの539bpsを、pGEX-5X1ベクターのEcoR I、Sma I サイトに挿入し、サブクローニングを行った。

GST融合蛋白質の発現は、形質転換した大腸菌 (DH5 α 株) についてアンピシリン含有LB寒天培地上にコロニーを形成させた後、シングルコロニーを100 μ g/mlのアンピシリンを含むLB培地に植菌した。600nmの吸光度が1.0になるまで培養した後、終濃度1mM IPTG (isopropyl β -D(-)thiogalactopyranoside) で3時間培養す

ることにより発現を誘導した。3,000×gで10分間遠心して集菌し、菌体を10mlの1% Nonidet P-40 /PBSに懸濁した。超音波処理を氷冷下6分間程度(30秒間隔)行った後、21,600×gで10分間遠心して上清を回収し、GST融合タンパク質の粗精製液とした。GST融合タンパク質の精製は、グルタチオンセファロース 4Bを用いた。グルタチオンセファロース 4Bを300μl容量になる様にカラムに充填し、PBSで平衡化した後、粗精製タンパク質溶液を吸着させ、PBSで洗浄した。グルタチオン溶出液(10mM Glutathione、50mM Tris-HCl、pH8.0) 200μlをカラムに加えて室温で10分間放置し溶出させる操作を3回行い精製 GST融合蛋白質を得た。

ペプチドC31のビオチン化

Wang 樹脂 (Hydroxy-Methyl-Phenoxy-Methyl Resin) を出発材料として合成した保護ペプチド樹脂をN-メチルピロリドン (NMP) を用いて室温で30分間平衡化し、ピペリジン:NMP=1:4で室温、25分間攪拌することによりFmoc基の脱保護反応を行った。NMPで洗浄した後、2倍モル量のEZ-Link NHS-LC-Biotinを加え、2時間攪拌することによりペプチドのN末端だけをビオチン化した。NMP、メタノールで樹脂を洗浄後、真空乾燥させ、樹脂80mgに対して、Reagent K (TFA:フェノール:蒸留水:チオアニソール:EDT=82.5:5:5:5:2.5, v/v) を4ml加え、室温で2時間攪拌し、最終脱保護反応を行った。冷却したエーテルでペプチドを沈殿させ、エーテルで2,3回洗浄し、50%アセトニトリル、50%蒸留水で沈殿を溶かし、OSDフィルターで濾過した。凍結乾燥後、逆相カラム (5C18-AR-II 10×250mm、ナカライ) を用いてペプチドを精製した。精製したペプチドは、MALDI-TOF MSを用いて質量を測定した。

P2/P3画分の調製及び可溶化と低張処理

3週齢のWister系雄性ラットをエーテル麻酔下断頭し、脳組織を摘出した。生理食塩水で十分に洗浄した後、9倍量のhomogenation buffer (0.32Mスクロース、0.1mM PMSF、10μM pepstatin、10μM leupeptin、5mM Tris-HCl、pH7.4) を加え、Potter型のテフロンガラスホモゲナイザーを用い、800~900rpmでホモゲナイズした。1,000×gで10分間遠心した後の上清を100,000×gで40分間遠心し、P2/P3画分の沈殿を得た。

低張処理は、P2/P3画分を少量のstandard buffer (140mM NaCl、5mM KCl、5mM NaHCO₃、1.2mM Na₂HPO₄、1mM MgCl₂、10mM Glucose、20mM HEPES-Na、pH7.4) でホモゲナイズすることにより均一にした後、10倍量の冷却した蒸留水を加え、2,000rpmでホモゲナイズした。さらに、NaCl、HEPES-Na、pH7.4、EDTA、pH8.0をそれぞれ終濃度1M、10mM、5mMとなるように加え、氷冷下で10分間攪拌することで膜を洗浄した後、100,000×gで40分間遠心し上清と膜画分とに分けた。上清を液体窒素で凍結した後、-80℃で凍結保存した。また、可溶化は、P2/P3画分の沈殿をsuspension buffer (50mM Tris-HCl、pH8.0、1mM EDTA、1mM 2-ME、0.1mM PMSF、10μM pepstatin、10μM leupeptin) でホモゲナイズし、蛋白質濃度を5mg/mlに合わせ、終濃度1%のTriton X-100を加え、4℃で1時間攪拌した。100,000×gで40分間遠心した上清を回収し、液体窒素で凍結した後、-80℃で凍結保存した。可溶化した試料については、suspension bufferで5倍希釈することでTriton X-100の濃度を0.2%にし、0.2% Triton X-100/suspension bufferで平衡化したDE-52 (Whatman) にかき、0.2% Triton X-100/suspension

bufferで洗浄後、1M NaClを含む同bufferで溶出させたものをアフィニティークロマトグラフィーの試料として用いた。

シナプトゾームの調製

3週齢のWister系雄性ラットをエーテル麻酔下断頭し、脳組織を摘出した後、大脳皮質を分離した。ミエリンを取り除き、生理食塩水で十分に洗浄し、9倍量のhomogenation bufferを加え、Potter型のテフロンガラスホモゲナイザーを用い、800~900rpmでホモゲナイズした。3,000×gで2分間遠心した後、上清を14,000×gで12分間遠心した。得られた沈殿を25mlのhomogenation bufferでホモゲナイズした後、Ficoll 400の不連続密度勾配（5%、9%、13%）を作り、62,000×gで45分間遠心した。9%分画を回収し、standard bufferで3倍希釈した後、14,000×gで12分間遠心し、シナプトゾームの沈殿を得た。それぞれ回収した、P2、P3及びシナプトゾームはP2/P3画分の調製と同様の方法で、低張処理を行い、高塩濃度（1M NaCl、5mM EDTA）で抽出した後、結合実験に用いた。

caspase-3によるGST-APPcytoの切断

caspase-3の粗精製液（大腸菌DE-8で発現させたHistidine tag付きのcaspase-3）を37℃で30分間静置することにより活性化させ、その1μgと精製したGST-APPcyto 0.5μg及びassay buffer（20mM HEPES-Na, pH7.4、0.1M NaCl、0.05% NP-40、5mM MgCl₂）を加えて容量を20μlにし、37℃で2時間反応させた。15%トリシゲルを用いてSDS-PAGEを行い、PVDF膜に転写後、1次抗体にAC1抗体（APPのC末端側671~695に対するペプチド抗体）、2次抗体にHRP-α rabbit IgGを用いてECL検出キットにより切断されたペプチドを検出した。また、反応系に終濃度10μMの

caspase-3インヒビター（Ac-DEVD-CHO）を加えたものを対照とした。2μgのGST-APPをcaspase-3で処理した反応液について、20分間熱処理した後、15,000rpm、5分間遠心した。上清をフィルターで濾過し、逆相のカラムにかけ、2-プロパノール-アセトニトリル（7:3、容量比。0.1%TFA含む）による0~60%直線濃度勾配により溶出させた。カラムから分離、溶出されたピークを回収し、濃縮後、一部をMALDI-TOF MSを用いて質量の測定を行った。

Fe65のin vitro binding

内在性のAPPとの結合

GSTまたはGST-Fe65C 7μg、P2/3画分を可溶化した抽出液 200μl、suspension buffer 800μl、グルタチオンセファロース（50% slurry suspension buffer）15μlを4℃で2時間混和させ、10,000×g、30秒間遠心し、グルタチオンセファロースを沈殿させた。セファロースをsuspension buffer 0.5mlで5回洗浄した後、グルタチオン溶出液 100μlを加えて懸濁し、10,000×gで30秒間遠心した上清に3×SDS サンプルバッファー（150mM Tris-HCl, pH6.8、300mM DTT、6% SDS、0.3% ブロモフェノールブルー、30% グリセロール）を加え、95℃、5分間熱処理し、10%アクリルアミドゲルを用いてSDS-PAGEを行った。泳動後、PVDF膜に転写し1次抗体にAC1抗体、2次抗体にHRP-α rabbit IgGを用いて、ECL検出キットによりAPPを検出した。

ビオチン化ペプチドとの結合

GSTまたはGST-Fe65C 1μg、ビオチン化C31 0.25μg、アビジンセファロース（50% slurry suspension buffer）5μl、P2/P3画分可溶化液 50μlを4℃で1時間攪拌させた。0.2%TX-100、0.12M NaClを含むsuspension buffer 200μlで8回洗浄し

た後、ペプチドC31 (ペプチドC31 7.5 μ g/0.2%TX-100、0.12M NaClを含む suspension buffer 30 μ l) を10 μ lずつ加え、3回に分けて溶出させた。さらにその後、0.2%TX-100、1M NaClを含む suspension buffer を10 μ lずつ加え、3回に分けて溶出させた。各溶出液に3 \times SDS サンプルバッファーを加え、95 $^{\circ}$ C、5分間熱処理し、10%アクリルアミドゲルを用いてSDS-PAGEを行った。泳動後、PVDF膜に転写し1次抗体に α -GST抗体、2次抗体にHRP- α rabbit IgGを用いて、ECL検出キットによりGSTまたはGST-Fe65Cを検出した。

ビオチン化ペプチドC31を用いた結合蛋白質の探索

P2/P3高塩濃度抽出液を0.1M NaClを含む20mM Tris-HCl, pH7.4で透析した後、抽出液50mlにビオチン化C31 10 μ g分を加え、4 $^{\circ}$ Cで1時間攪拌させ、更にアビジンセファロースを100 μ l加え30分間攪拌した。遠心してセファロースを沈殿させた後、0.1M NaClを含む20mM Tris-HCl, pH7.4 1mlで10回洗浄した。溶出は終濃度 1mM のペプチドC31 (50 μ g/20mM Tris-HCl, pH7.4 30 μ l) により30 μ lずつ3回、1M NaClを含む20mM Tris-HCl, pH7.4により30 μ lずつ3回行った。各溶出液に3 \times SDS サンプルバッファーを加え、熱処理を行った後、10%アクリルアミドゲルを用いてSDS-PAGEを行った。蛋白質の検出は銀染色により行った。一方、P2/P3画分可溶化液はそのまま用いるか、もしくは suspension bufferで希釈しTriton X-100濃度を0.2%にし、以降のバッファー系を、0.12M NaCl、0.2% Triton X-100/suspension bufferとし、同様に行った。また、P2/P3画分可溶化液をDE-52にかけた後の1M NaCl溶出液については、0.12M NaClと0.2% Triton X-100を含む

suspension bufferで透析を行い、以降のバッファー系を、0.12M NaCl、0.2% Triton X-100/suspension bufferとし、同様に行った。

ペプチドC31の $[^{125}\text{I}]$ ラベルと結合蛋白質の探索

ペプチドC31の $[^{125}\text{I}]$ ラベルはBolton-Hunter試薬を用いた。ペプチド5nmolと0.5mCiのBolton-Hunter試薬をリン酸バッファー (pH8.3) 中、室温で1時間反応させた後、逆相カラムを用いて未反応のBolton-Hunter試薬とペプチドとを分離精製した (20%~80% CH_3CN /60分間、流速 1ml/min)。未反応のペプチドが溶出された後、1mlずつ回収し、15%トリシンゲルにより電気泳動を行い、ラベルされたペプチドを確認した。ラベルされたペプチド ($[^{125}\text{I}]\text{BH-C31}$) を用いた結合実験は以下のように行った。P2/P3画分の高塩濃度抽出液 200 μ lを、PBSで平衡化したMicro Spin G-25 Columnに加え、735 \times gで1分間遠心することにより濾過した液を次の反応に用いた。精製した $[^{125}\text{I}]\text{BH-C31}$ 5 μ l ($1\times 10^5\sim 5\times 10^5\text{cpm}$)、PBSで平衡化した抽出液 90 μ l、蒸留水又はペプチドC31 5 μ lを混合し、氷上で1時間静置した後、架橋剤

Bis(sulfosuccinimidyl)suberate(BS^3)を終濃度1mMになるように加え、更に氷上で2時間静置し、架橋反応を行った。反応停止のため、終濃度50mMのグリシンを加え室温で5分間置き、3 \times SDS サンプルバッファーを加え、10%アクリルアミドゲルを用いてSDS-PAGEを行った後、乾燥させ、BAS2000によりバンドを検出した。また、カーブフィッティングは、Multi Fit 2.01を用いた。

C. 研究結果

caspase-3によるGST-APPcytoの切断

APPの細胞内ドメインにはcaspase-3認識配列 (VEVD) が存在するとの報告があり、APPの細胞内ドメインを含むGST融合蛋白質 (GST-APPcyto) を作製、精製し、その融合蛋白質がcaspase-3により切断されるかどうか検討した。また、その反応がcaspase-3特異的なものであるか確認するためcaspase-3の阻害剤であるAc-DEVD-CHOをコントロールとして加えた。その結果、GST-APPcytoとcaspase-3を37°Cで2時間反応させた時に、AC1抗体で認識しうる低分子量のペプチドが検出できた。また、そのバンドの出現は反応時にcaspase-3阻害剤を加えることで消失した。次に、そのバンドに相当するペプチドを同定するため、GST-APPcytoをcaspase-3と反応させ、熱処理した後の上清を0.45 μmのフィルターで濾過し、逆相のカラムにかけた。回収したピーク画分を濃縮後、MALDI-TOF MSにより質量を測定した。その結果、 $m/z = 3750.67$ のピークが検出できた。APPC末端31アミノ酸残基の質量は計算上、 $[M+H]^+ = 3718.1$ であるから、2カ所のメチオニンが酸化されているものと予想された。以上のことより、caspase-3によってAPPは切断され、C末端31アミノ酸のペプチドが生じることが確認できた。

Fe65とAPPのin vitro binding

本研究における、ポジティブコントロールとしてFe65とAPPとの結合について検討した。方法として、Fe65がAPPと結合するのに必要な領域であるPID2を含むGST融合蛋白質であるGST-Fe65Cを作製するとともに、APP源としてはラット脳組織よりP2/P3分画を1% Triton X-100で可溶化したものを用いた。また、反応系にAPPC末端のペプチド (C25及びC31) を加えることにより、APPC末端側のどの領域が結合

に必要なのかを調べた。その結果、GST-Fe65Cと内在性のAPPとの結合は、C31で阻害されるが、C25では阻害されないことが明らかとなり、少なくともC末端側25残基以上のアミノ酸残基が結合に必要であることが示唆された。このAPPとFe65の結合は、MBP (Maltose binding protein) 融合蛋白質のFe65CとGST-APPcytoの結合実験や、APPのC末端47アミノ酸をFMP活性化セルロファインに結合したものとGST-Fe65Cの結合実験においても確認できた。次に、目的の結合蛋白質をスクリーニングするために、ビオチン化したペプチドC31についてもFe65と結合するかを検討した。その結果、アビジンカラムに吸着したビオチン化ペプチドC31とGST-Fe65Cの複合体から、ペプチドC31により特異的にGST-Fe65Cが溶出されることが認められ、この系がAPPC末端結合蛋白質のスクリーニングに使用可能であることが確認できた。また、GST-Fe65Cはペプチドのみで溶出され、その後の1M NaClでは溶出されなかった。従って、ペプチド特異的に溶出される蛋白質を、特異的な結合蛋白質であると判断し、以下のスクリーニングを行った。

ビオチン化ペプチドC31による結合蛋白質の探索

GST-Fe65Cとビオチン化ペプチドC31の結合実験の結果を参考にして、スケールアップを行い、ビオチン化ペプチドとアビジンセファロースの量を40倍、試料の量を約400倍にし、同様の実験を行った。用いたビオチン化ペプチドの量は銀染色の検出限界に対して100倍モル量であり、結合蛋白質の検出には充分だと考えられた。試料として、P2/P3画分を1% Triton X-100で可溶化したものを用いて、ビオチン化ペプチドとの結合を調べた。しかし、GST-Fe65Cとの結合で見られたような、ペプチ

ド特異的に溶出されるバンドは検出されなかった。また、可溶化した試料をDE-52にかけて得られた、1M NaCl溶出画分にもペプチド特異的に溶出されるバンドは検出できなかった。この原因として、界面活性剤等を用いて試料を調製すると、試料中に内在性のAPPが存在することになり、この内在性のAPPが、結合を阻害しているのではないかと考えた。そこで次に、P2/P3画分を低張処理した後、1M NaCl、5mM EDTAで膜を洗浄抽出した試料を用いた。この条件でAC1抗体を用いイムノブロットで内在性APPを検出したところ、内在性APPの大部分が残存する不溶性の膜画分に回収されることが認められた。また得られた試料の蛋白量を測定したところ、不溶性画分とはほぼ等量の蛋白質が高塩濃度抽出液として回収されていた。しかし、この試料を用いて同様の実験を行ったが、ペプチド特異的なバンドは検出できなかった。次に、検出感度を上げるために、ヨードラベルしたペプチドを用い結合蛋白質を探索することにした。

[¹²⁵I]BH-C31による結合蛋白質の探索

Bolton-Hunter試薬を用いて、室温で1時間、ペプチドをヨードラベルした。反応後の液を逆相カラムを用いてHPLCにかけ、ラベルされていないペプチドが溶出された後、1mlずつを回収しSDS-PAGEを行った。次に、ラベルされたペプチドを含む画分について、P2/P3高塩濃度抽出液と架橋反応を行い、結合蛋白質を探索した。但し、アミノ基を含む緩衝液が含むと、架橋反応が十分に行われなため、G-25スピンカラムを用いてP2/P3高塩濃度抽出液をPBSにバッファー交換し、反応に用いた。その結果、アセトニトリル濃度約40%で溶出される画分（溶出No. 9）のみにペプチドで特異的に消失するバンドを検出することができた。No. 9を用いて架橋された蛋白質の分子量はマーカの位置より計算す

ると、それぞれ約200kDa、150kDa、130kDa、110kDaであり、その分子量から架橋されたペプチドと架橋剤の分子量を除くと、それぞれ約195kDa、145kDa、125kDa、105kDaであった。次に、ラベルされていないペプチドC31を 10^{-8} ~ 5×10^{-5} Mの各濃度で反応液中加入することによって得られたバンドの出現強度の変化から、阻害定数を算出したところ、200kDaの蛋白質については解析が困難であったが、150kDa、130kDa、110kDaとも約 $0.7 \mu\text{M}$ のKi値を示した。次に、他のペプチド（C47及びC25）により結合反応が阻害されるかどうかを調べた。その結果、C47、C25のいずれでも結合が阻害されることが示された。また、結合の条件を検討するため、37℃、室温（約20℃）及び氷上のそれぞれの条件において結合反応を行った。その結果、氷上の場合が最も結合効率が高く、37℃ではほとんどバンドは認められなかった。阻害の結果及び諸性質から、この蛋白質が既知の結合蛋白質であるFe65やGoやX11ではなく、APP細胞質領域に対する新規の結合蛋白質である可能性が考えられる。また、阻害曲線より、150kDa、130kDa、110kDaともC25やC31よりもC47に対して阻害されやすい傾向にあった。

結合蛋白質の局在性

本研究で検出できた蛋白質の局在性を調べた。ラット脳より各抽出液（P2画分、P3画分、cytosol画分）を調製し、P2及びP3画分については、低張処理を行い、高塩濃度抽出を行った。そして、各試料をPBSにバッファー交換した後、ヨードラベルしたペプチドを用いて同じ条件で結合実験を行った。その結果、P2画分と弱いながらP3画分にも110kDaの特異的に出現するバンドが検出された。一方、cytosol画分には特異的に出現するバンドは存在しなかった。

また、ラット交感神経節細胞の初代培養系にAPPのC末端ペプチドやC末端抗体を注入した実験でシナプス伝達効率が低下した結果、さらに、シナプトゾームにAPPが豊富に存在していることなどから、シナプスにおけるAPPの重要性が考えられたので、P2画分より、シナプトゾームを調製し、その試料を用いて同様の実験を行った。その結果、シナプトゾーム画分においても、P2画分と同様の110kDaのバンドの出現が認められた。

D. 考察

結合蛋白質の探索に関する問題点等について

本研究では、APPの細胞内領域、特にC31に結合する物質を探索するために、様々な方法を用い、実験を行った。それらは、GST融合蛋白質をプローブとしてグルタチオンアフィニティーで分離する方法、FMP活性化セルロファインにペプチドを結合させてアフィニティークロマトグラフィーを行う方法、ペプチドをビオチン化させ、アビジンセファロースを用いて結合物質を単離する方法、そしてペプチドをヨードラベルし、架橋反応を用いて結合する蛋白質を間接的に検出する方法である。しかしながら、いずれの場合においても、いくつかの問題点が存在する。まず、GST融合蛋白質を使った系については、プローブであるGST融合蛋白質を発現させるときに用いる大腸菌由来の蛋白質の混入が考えられる。また、作製したGST融合蛋白質には、それ自身の分解産物が多く存在し、グルタチオン等で結合物質を溶出させたとき、非特異的なバンドとして検出され問題となる。次に、FMP活性化セルロファインについては、試料によっては担体に対する非特異的結合が考えられるし、また、ペプチドを直接セルロファインに結合させるため立体的な障害が生じ、本来結合するものが結

合しなくなるという結果も生じる。また、非特異的結合と立体障害の問題は、アビジン・ビオチンを用いた系やヨードラベルを用いた系についても当てはまる。つまり、ペプチドをビオチンやヨードでラベルした結果、そのペプチド自身の性質や構造などが変化する可能性が十分に考えられる。更に厄介な問題として、脳抽出液の方に起因する問題もある。例えば、抽出液を調製するために界面活性剤を用いた場合、界面活性剤の濃度を下げる必要が生じる。その結果、溶解していた脂質や一部の蛋白質が不溶性となり、カラムなどの目詰まりの原因になるとともに、非特異的に溶出される蛋白質が多くなる。また、高塩濃度抽出液についても界面活性剤の場合と同様の現象が生じる。即ち、溶解していた蛋白質が塩濃度を下げることにより再び不溶性となる場合がある。次に、目的とする結合蛋白質が非常に微量な場合には検出感度が重要な問題となる。本研究において、コントロールとしてGST-Fe65Cを用いて、ビオチン化ペプチド・アビジンセファロースの系で実験を行った結果、抽出液に加えた1 μ gのGST-Fe65Cのうち、約1/20がペプチド特異的に溶出された。この結果が実験の規模を大きくしても当てはまり、また目的物がFe65と同じように結合すると仮定し、銀染色の検出感度が約10ngであることより逆算すると、試料中に目的物が0.2 μ g以上あれば検出可能となる。1回に用いた試料は蛋白質量で約150mgであるから、全蛋白質中約 1.3×10^{-4} %含まれる目的蛋白質が検出できる計算となる。一方、ヨードラベルを用いた場合の検出感度は、計算より結合物が0.02fmol程度あれば検出できる。目的物が100kDaとし、目的物の1/100が結合したと仮定し逆算すると、試料中に0.2ng以上存在すれば検出可能となる。1回に用いた試料は蛋白質量で約0.5mgであるから、全蛋白質中約 0.4×10^{-4} %含まれる目的蛋白質

が検出できる計算となる。従って、本研究で行ったヨードラベルを用いる方法は、アビジン・ビオチンの系と比較して、用いた試料の量が約1/300であるにもかかわらず、約3倍検出感度が良いことになる。つまり、単純に感度だけを比較すると約1000倍近く上昇することになる。しかしながら、ヨードラベルしたペプチドを架橋させて結合蛋白質を探索する方法は、以下の問題点が存在する。即ち、一般に用いられる架橋剤はアミノ基とアミノ基を架橋するため、ペプチドと目的蛋白質の架橋には適さない場合が多い。今回使用したペプチドC31を例にとると、C31にはアミノ基はN末端の α -アミノ基と2ヶ所のリジンの ϵ -アミノ基の計3ヶ所しか無く、今回の実験ではその中のどれか1ヶ所がBolton-Hunter試薬によりラベルされており、従って、実際に架橋するときには使えるアミノ基は2ヶ所しか存在しないことになる。とくに、アミノ基が蛋白質との結合に必要な場合はこのような架橋法が適さないことになる。Fe65が検出できなかった原因として、これらの架橋の問題があるかも知れない。このような場合は性質の異なる架橋剤（光反応基を利用したものなど）を用いて検討を行うことも必要だろう。

本実験で確認できた結合蛋白質について

ヨードラベルされたペプチドを用いた架橋実験により検出された蛋白質の分子量は、それぞれ約200kDa、150kDa、130kDa、110kDaであり、その分子量から架橋されたペプチドと架橋剤の分子量を除くと、それぞれ約195kDa、145kDa、125kDa、105kDaとなる。また、110kDa以下のバンドが検出されないことより、その蛋白質はモノマーである可能性が高いと推測されるが、150kDa、130kDaを含めて200kDa蛋白質の分解産物である可能性もある。また、3種類のペプチドを用いた架

橋反応に対する阻害実験において、C47が最も効果的に抑える傾向にあったことより、C47に対する結合のアフィニティーが最も強いと考えられた。一方、200kDaを除く蛋白質は、ペプチドC31による阻害定数が約0.7 μ Mの値を示し、今迄に報告されているFe65やX11などの結合蛋白質の解離定数（それぞれ488nM、320nM）と比較して大きな差は認められなかった。また、それぞれのペプチドによる阻害の特異性から、本研究で得られた結合蛋白質はFe65やGoではない可能性が高いと考えられるが、X11との関係については、X11自身の蛋白質化学的性質などが解明されていないので、現時点では、特定することが出来ない。しかし、X11は膜貫通ドメインを持つとされており、本実験で調製した方法では抽出されていない可能性が高いと考えられる。従って、これらのことを考え合わせると、本実験で確認できた蛋白質はシナプトゾームに豊富に存在する新規のAPP結合蛋白質である可能性が高く、ラット交感神経節細胞の初代培養系を用いた実験結果などを考え合わせると、シナプスにおいてAPPと共に機能している可能性が考えられる。本研究はcaspase-3の切断によって生じるペプチドC31に着目して、実験を行ってきたが、今後はより長いペプチド、例えばC47などについてもスクリーニングを行うべきである。また、本実験で確認することができた蛋白質は非常に微量であるため、精製して同定することはかなり困難であると予想される。従って、cDNAライブラリーなどを用いて遺伝子の方からスクリーニングを行う方が同定出来る可能性が高い。

E. 結論

(1) アミロイド前駆体蛋白質(APP695)の細胞内領域に位置するC末端31残基のペプチド(C31)に対する結合蛋白質をラット脳の

P2/P3膜分画の高塩濃度抽出液を試料として、また、C31をボルトンハンター法でヨードラベルしたものをプローブとして、架橋法により探索した結果、約195KDa、145KDa、125KDa及び105KDaの分子量を持つ蛋白質を見出した。

(2) C31を用いた阻害実験より、それぞれの蛋白質について阻害定数を算出したところ約 $0.7\mu\text{M}$ であった。また、それぞれのペプチド(C25、C31及びC47)による阻害実験の結果から、これらの蛋白質はC31のみならず、C25及びC47にも結合することが推測された。とくに、C47に対して高い親和性を有すると考えられた。

(3) 本蛋白質の局在性を調べたところ、シナプトゾームを含むP2画分に多く検出されることから、シナプスの機能に関わりのある新規のAPP細胞内領域結合蛋白質であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

なし

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
分担研究報告書

APP強制発現によるニューロン変性系の確立

分担研究者 植月太一 大阪大学蛋白質研究所 助手

研究要旨

アミロイド前駆体蛋白質（APP）はアルツハイマー病の老人斑の主成分A β 蛋白質の前駆体であり、病因遺伝子の1つとして同定されている。

本研究では遺伝子導入強制発現するベクターとしてアデノウイルスベクターを用いてニューロンに効率よくAPP遺伝子を導入発現する方法を確立し、アミロイド前駆体蛋白質（APP）のニューロンでの作用と神経変性との関連を研究した。

研究材料として全長型APP695を普遍的で強力なCAGプロモーターによって発現するアデノウイルスベクターを作製した。ヒト分化ニューロンに極めて近い性質を持つ胚性ガン細胞NTera2（NT2細胞）由来のニューロンを培養系に用いた。レチノイン酸処理により分化したNT2ニューロンにAPP発現アデノウイルスベクターを感染、APPを強制発現した。ニューロンの形態変化を観察したところ、感染後48時間までは変化は見られなかったが72時間から突起を縮退させ、細胞体も膨潤するなどの変性が観察された。さらに96時間になるとAPPを多量に細胞内に蓄積しているニューロンでは突起の縮退、細胞表面の不整化などの変性像が認められた。

ニューロンの変性がどのような経路でもたらされるのかをさらに検討した。まず変性細胞の核の形態をヘキスト染色により顕微鏡下で観察した。その結果、核の凝集、分裂化が観察された。さらにDNAの断片化が起きていることをタネル反応により確認した。以上の結果からAPP強制発現によってヒトニューロンは変性細胞死をひきおこすこと、この際のニューロン変性はアポトーシスであることが示された。またアポトーシスの際に機能する最も重要な蛋白質分解酵素の1つであるカスパーゼ3が変性に先立って活性化されることを見いだした。またラット海馬初代培養細胞に導入した場合グルタミン酸依存的に細胞内カルシウム濃度が異常に上昇することが見いだされた。

A. 研究目的

アルツハイマー病脳で観察される老人斑の主成分 β アミロイド蛋白質の前駆体、アミロイド前駆体蛋白質（APP）がアルツハイマー病原因遺伝子の1つであることは明らかにされている。しかしながらAPPとア

ルツハイマー病にみられるニューロンの変性および細胞死との関連、そのニューロンにおける機能は、明確な結論を見るまでにはいたっていない。本研究の目的は個体脳および培養系のニューロンでAPPを大量に

発現させ、実際の病態におけるニューロン変性を再現する実験系を確立することである。更に確立された系を用いて、APPの機能やアルツハイマー病におけるニューロン死との関連を解析することにある。

B. 研究方法

APP遺伝子のニューロンで果たす機能を解析するためにニューロンへのAPP遺伝子導入実験を行った。分化したニューロンは分裂を終了しているため遺伝子導入効率が非常に悪く、ニューロンへの遺伝子導入は困難である。そのため分裂終了ニューロンへの遺伝子導入ベクターとしてアデノウイルスベクターを用いた。

(B-1) アデノウイルスベクターの作製

ニューロンで豊富に発現しているアミロイド前駆体蛋白質 (APP695) を発現するアデノウイルスベクターを作製した。ウイルスベクターの作製方法は東京大学医科学研究所の斎藤泉博士らが開発したCOS-TPC法によった。非常に強い転写活性を持つCAGプロモーターによってAPP695を発現するウイルスゲノムを含むコスミドを作製し、このコスミドDNAを制限酵素によって切断後の野生型アデノウイルスゲノムと293細胞に共導入した。相同組換えによってAPPを発現するアデノウイルス粒子

(AxCAYAP)を得た。AxCAYAPをCOS細胞に感染させ免疫組織化学によってAPPが強く発現すること、ウイルスゲノムの解析から組換えを起こしていないことを確認した。このベクターウイルス粒子を293細胞内での増殖後、塩化セシウムを用いた超遠心によって精製して実験に使用した。対照として同じCAGプロモーターによってβガラクトシダーゼを発現するアデノウイルスベクター (AxCalacZ)を使用した。

(B-2) 培養ニューロンを用いたニューロン変性系の確立

ヒト神経変性疾患であるアルツハイマー病とAPPの関連を解析する目的でヒト培養ニューロンを実験に用いることにした。ラット、マウスなどの実験動物と異なり、ヒトからは初代培養ニューロンを得ることが困難である。そこで分裂を停止した本来の分化ニューロンに極めて近い性質を持つと考えられる胚性ガン細胞NTera2 (NT2細胞)由来のニューロンを用いた。NT2細胞は4~5週間レチノイン酸処理した後2週間シトシンアラビノシド処理を行ってニューロンに分化させたものを実験に用いた。この条件下ではNT2由来ニューロンは完全に分裂を停止し、神経突起を伸長した成熟したニューロンの形態を示した。また、神経のマーカーであるMAP2にたいする抗体を用いて免疫組織化学を行うと分化したニューロン様細胞が強く染色された。この培養条件下ではニューロン以外に細胞体の大きな扁平細胞が現れた。この培養細胞系は分裂終了したニューロンの性質をよく反映していることがこれまでに報告されている。そこでAxCAYAPを感染させAPPを大量に発現した。また18日胚のラット胎児海馬より初代培養したニューロンにAxCAYAPを導入し、それぞれの変化を観察した。

(B-3) 成熟ラット脳内への遺伝子導入
アルツハイマー病におけるニューロン変性をより直接的に検討する目的、およびニューロン変性疾患に対する遺伝子治療の可能性を探る目的でラット脳実質内に直接アデノウイルスベクターを注入し、高効率にニューロンに遺伝子導入する方法を検討した。直接の遺伝子導入には脳定位固定装置を使用し約 6×10^7 pfuのウイルス粒子を含む $5 \mu\text{l}$ の緩衝液を脳内に注入した。これまでにアデノウイルスベクターを用いて脳実質内に遺伝子導入する方法は行われてきた

が、ニューロンへの導入効率は低かった。PBSに懸濁したウイルス粒子を海馬内に注入したところ、血管内皮細胞とグリア様細胞には高効率に遺伝子導入されたが、ニューロンへの効率は極めて低いことが分かった。この結果から、血液脳関門と同じ機構でウイルス粒子がニューロンに取り込まれるのを妨げている可能性がある」と推論した。そこで血液脳関門を一時的に開放することが知られている高張緩衝液にウイルス粒子を懸濁して直接ラット脳内に遺伝子導入する方法を試みた。

C. 研究結果

(C-1) NT2ニューロン系

最初にアデノウイルスベクターによってNT2細胞に効率よく遺伝子導入する条件を検討した。 β ガラクトシダーゼ発現アデノウイルス (AxCALacz)を感染させた後、3日後に発色反応により遺伝子導入された細胞を検出した。その結果、ウイルス量約30 m.o.iでほぼ全ての細胞に導入されていることが確認された。またラット海馬から調製した初代培養ニューロンおよび切片培養に対してもほぼ同じ力価のウイルスで殆ど100%の細胞に遺伝子導入されることが確認できた。また、いずれの場合もアデノウイルス感染による細胞傷害は5日目まで顕著に観察されないことを確認した。そこで、この条件下でAPP発現ウイルスを感染させ強制発現実験をした。

分化成熟したNT2ニューロンにAxCAYAPを感染させた後に免疫組織科学によってAPPを蓄積している細胞の形態変化を観察した。感染後48時間までは変化は見られなかったが約72時間後から突起を縮退させ、細胞体も膨潤するなどの変性が観察された。さらに96時間後になるとAPPを多量に発現して細胞内に蓄積しているニューロンでは突起の縮退、細胞表面の不整

などの変性像が認められた。これに対してニューロン以外の扁平細胞ではAPPの蓄積は見られたが顕著な変性は観察されなかった。変性しているニューロンが細胞死を起こしているかどうかをエチジウムホモダイマーの取り込みで検討したところ、変性の進んだ細胞の核が強く染色され、細胞死に陥っていることが確認された。 β ガラクトシダーゼを導入して強制発現したニューロンではこのような変性は96時間までには確認されなかった。APPN末端に対する抗体とC末端に対する抗体を用いたウェスタンブロッティングによりニューロンに蓄積された蛋白質の解析を行ったところ、蓄積されているAPPは主として全長型であった。また細胞内に β A4部位にたいする抗体が認識する短いフラグメントのバンドが検出された。細胞外液に同様のフラグメントが出ているか検討したが、検出できなかった。

APP強制発現による変性細胞死が、どのような形態のものかを検討した。核をヘキストにより染色して観察した結果、72時間以降の変性ニューロンの核は凝集を開始し、96時間の完全に変性したニューロンの核は凝集、または断裂していた。このことからアポトーシスによるニューロン変性が強く示唆された。そこで、タネル染色法を行ったところ、核内のDNAの断片化が確認された。以上の結果から、ヒトNT2ニューロンでAPP695を強制発現すると変性細胞死を引き起こすこと、その変性過程はアポトーシスであることが結論された。近年アポトーシスを引き起こす細胞内の様々な経路が明らかにされつつある。APP強制発現によるニューロンアポトーシスがどのような経路で起こるのかを検討する目的でカスパーゼが活性化されるかどうかを検討した。その結果、カスパーゼ1の活性化は検出されなかったが、カスパーゼ3が変性に