

先立って活性化されることが確認された。ウエスタンブロッティングによりこの活性化が、プロカスペーゼ3の切断による活性化断片の出現によることが明らかとなった。ニューロンを切断された活性化カスパーゼ3を特異的に認識する抗体で染色すると、APPを蓄積して変性しているニューロンだけが陽性となった。

(C-2) 成熟ラット海馬ニューロン系  
ラット脳内への効率的な遺伝子導入法をAxCALacZを用いて検討した。ラット脳内にウイルスベクター注入する際に1 M mannitolを含む緩衝液を用いた場合、等張液を用いた場合に比べニューロンへの遺伝子導入効率が10倍以上高くなった。1 M sucroseを加えた場合も同様の結果が得られた。さらに、この方法で注入した場合、ウイルス液の注入部位である海馬だけでなく、注入部位に投射している海馬領域外のニューロン(同側嗅内野など)にもシナプス終末から逆行性に効率よく遺伝子導入されることを見いだした。次にAPPによるニューロン変性がラット脳内でも観察されるのかを、同様の方法で直接ラット脳内にAxCAYAPを注入することによって検討した。ラット海馬内に高張緩衝液に懸濁したAxCAYAPを注入してAPPを強制発現させた結果、ウイルス注入5日後にはAPPを多量に発現しているニューロンが変性していることを見いだした。これらの変性ニューロンは例外なく抗APP抗体で強く染色された。これに対しグリア細胞ではAPPを蓄積しているものでも目立った形態変化が見られなかった。同じ量のβガラクトシダーゼ発現ウイルスを導入した場合、βガラクトシダーゼが発現しているニューロンでは変性は確認されなかった。ウエスタンブロッティングによって蓄積しているAPPを解析したところ全長型のAPPが蓄積していることが確認された。またNT2ニューロンの場

合と同様、核の凝集、核内DNAの断片化が観察された。またNT2ニューロンの場合と同様に変性ニューロンでカスパーゼ3の活性化が免疫組織化学によって見いだされた。変性ニューロンを電子顕微鏡によって観察したところ、自己消化像、変性ニューロン周辺のミクログリアの集結、シナプス終末部の膨大や消失、などの変性像が認められた。これらの観察から成熟ラット海馬ニューロン内でAPPが蓄積されると、細胞体萎縮、シナプスの異常を伴う変性が起き、自己消化とミクログリアによる貪食が引き起こされるものと推定された。

(C-4) ラット海馬初代培養細胞系  
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APPを導入したところ、NT2由来ニューロンやラット脳内ニューロンの場合とは異なり、5日目までには顕著な変性は観察されなかった。ウエスタンブロッティングによりAPP蛋白質を解析したところ全長型のAPP蛋白質が膜画分に蓄積していた。細胞内カルシウムの量を蛍光ラベル法によって測定したところ、非刺激時の細胞内カルシウム量はAPP蓄積ニューロンでも蓄積されていない細胞との差がなかったが、グルタミン酸によって刺激条件下での細胞内カルシウム濃度上昇がAPP蓄積ニューロンで有意に増強していた。これに対しβガラクトシダーゼ発現ウイルスを感染させたニューロンではこのような変化が認められなかった。このことから膜に存在する全長型APPが、直接的あるいは間接的にグルタミン酸受容体に作用して、グルタミン酸依存的に細胞内カルシウム濃度を上昇させていることが示された。

#### D. 考察

(D-1) アデノウイルスベクターによるニューロンへの遺伝子導入  
アデノウイルスベクターは以下のような特

徴を持っている。1) 他の遺伝子導入法と異なり分裂終了細胞にも高効率に遺伝子導入する事が出来る。2) 高力価のウイルス粒子を調製する方法が確立されている。

3) ウイルスベクターに用いられているゲノムはアデノウイルスの増殖に必須のE1A領域を欠失している。このためE1Aを恒常的に発現しているヒト293細胞以外の細胞では増殖能がなく、ウイルス粒子を用いた遺伝子導入法として安全に使用することが出来る。4) 鳥類や哺乳類などの高等動物細胞に遺伝子導入が可能である。このような性質から本研究では分裂終了した分化後のニューロンにAPP遺伝子導入強制発現するベクターとして最適と考えてアデノウイルスベクターを用いた。

実際アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入法はニューロンに効率的に遺伝子導入できることが確認された。この方法は現在分裂終了細胞であるニューロンや骨格筋細胞などにもっとも効率よく遺伝子導入する方法であると考えられる。脳実質内への遺伝子導入においては、高張緩衝液を用いる方法によってニューロンへのベクターの導入効率が著しく増加する事を見いだした。これは高張緩衝液がニューロン周辺のグリア細胞などの一時的な収縮を引き起こし、ウイルス粒子がニューロンに接種されるのを増強したためと推測される。

現在、動物個体を用いた遺伝子導入法としてトランスジェニックマウスが用いられているが、アデノウイルスベクターを用いた直接の遺伝子導入法は次のような利点を持っている。1) トランスジェニック動物を作製するのに比較して格段に手軽に行え、実験全体にかかる時間と費用が低くすむ。2) 一旦ベクターを作製すれば色々な動物種に適用することが可能である。3) トランスジェニックマウスの場合、発現の時期および部位を限局して実験することが難しい。それに対して直接の遺伝子導入法

では発現時期と部位を限局して実験を行えるため、ある遺伝子の特定の部位での働きを探る上で解析しやすい、などの利点がある。特に個体脳を用いた研究に本実験で用いた遺伝子導入法は非常に有効な方法であると考えられる。

#### (D-2) APP強制発現によるニューロン変性

アデノウイルスベクターを用いてAPP遺伝子導入系によってAPPがNT2ニューロン内に蓄積すると変性、細胞死を起こすことが示された。またこの際、 $\beta$ A4ドメインを含む断片が細胞内に検出された。これらの断片が老人斑の形成能のあるアミロイドジェニックフラグメントであるかどうかは現在のところ不明であり、解析が必要である。細胞外液に同じようなフラグメントが検出できなかったことは、この断片が細胞外に放出されたものの沈着でないことを示している。これは、従来考えられてきた作業仮説、すなわち、APPの分解によって生じたA $\beta$ ペプチドが細胞外に蓄積してニューロン変性を引き起こすという説に反した結果となっている。APPの蓄積とアミロイドジェニックフラグメントの産生のどちらか、あるいは両方が変性と関連があるのかは今後明らかにする必要がある。最近ニワトリの運動神経において栄養因子除去によってアポトーシスを起こす際にAPPの発現が上昇し、 $\beta$ アミロイドフラグメントが産生されることが報告された。本研究の結果ではAPPの発現がカスパーゼの活性化、アポトーシス誘導を引き起こしたことを併せて考えると、APPの機能の1つにアポトーシスシグナルの伝達に関与している可能性が考えられ興味深い。また実際のアルツハイマー脳のニューロンがカスパーゼ3の活性化を変性に先立って起こしていることを示唆するデータが報告されている。こうしたことからAPPが過剰にニューロン内に

蓄積することによって何らかのアポトーシスを引き起こすシグナルを伝達しやすくすることが考えられる。APP蓄積からカスパーゼ3活性化にいたる経路を明らかにすることは今後の大きな課題である。

ラット海馬初代培養を用いた実験結果はその経路の1つの可能性を示唆している。細胞内カルシウム濃度が上昇するとアポトーシスなどの細胞死を誘発することが知られている。このことからAPPによる細胞変性死の原因として異常に膜に蓄積したAPPがグルタミン酸受容体の感受性を通常状態から変化させ、細胞内カルシウム濃度の上昇を引き起こして細胞を変性させる可能性が考えられる。

しかしながらアポトーシスを引き起こす経路は様々報告されておりAPPが関与するものが状況、細胞の違いによって異なっていることも考えられる。今後はAPPのニューロン内蓄積が神経変性を引き起こす分子機構を、確立された培養細胞を用いたニューロン変性系を用いて検討していくことが重要である。またこの系を用いて変性死を抑制する方法を検討することが治療への応用としては重要であろう。

#### E. 結論

- 1) アデノウイルスベクターを用いてヒトAPP695を高発現するベクターを作製した。
- 2) アデノウイルスベクターを高効率にラット海馬ニューロンに直接導入する方法を確立した。
- 3) ヒト分裂終了ニューロン培養系にNT2ニューロンを用いてAPPを高発現させ形態を観察した。その結果、ニューロンがアポトーシスを引き起こすことを見いだした。
- 4) 成熟ラット海馬ニューロンに直接ウイルスベクターを用いてAPPを高発現させた場合NT2ニューロンに見られた様にアポトーシス様の細胞変性死を引き起こすことが

明らかとなった。

5) ラット海馬初代培養ニューロンでAPPを高発現し、細胞カルシウム濃度を測定したところ、グルタミン酸依存的に細胞カルシウム濃度が異常に上昇する事が見いだされた。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし

#### 2. 学会発表

1. 全長型APP695強制発現によるヒト分裂終了ニューロンの変性 第41回 日本神経化学会 東京 (1998、9) 植月太一、岡本まりこ、竹本研、西村伊三男、吉川和明

2. アミロイドβ蛋白質前駆体の海馬及び小脳顆粒細胞の生存に及ぼす影響 第41回 神経化学会 東京 (1998、9) 富永恵子、植月太一、吉川和明、小倉明彦

3. 大脳皮質ニューロンにおけるSHP 2の機能解析 第71回日本生化学会 名古屋 (1998、10) 荒木敏行、山田雅司、植月太一、畠中寛

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

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検索

分担研究者 谷浦秀夫 大阪大学蛋白質研究所助手

研究要旨

APP (amyloid precursor protein) の細胞内ドメインに結合する蛋白質を単離する目的で、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漫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。以上の所見より、ニューロン内でのAPPとFE65Nの相互作用が示唆され、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。

A. 研究目的

アルツハイマー病(AD)脳にみられる老人斑の中心には、アミロイドとよばれる線維状の構造物が集積している。アミロイド線維は、A $\beta$ 蛋白質が $\beta$ シート構造をとることにより形成される。A $\beta$ 領域は膜貫通型受容体の構造を持つアミロイド前駆体蛋白質 (amyloid precursor protein: APP) の一部に含まれている。私達はこれまでに組換えアデノウイルスベクターを用いてラット脳で野生型APPを過剰発現させると、短期間にニューロンが変性し一部はTUNEL陽性の核を持つことを示した (J. Neurosci.18:2387-2398)。APPが何らかの細胞内シグナル伝達系に関与することが示唆されていることを考慮すると、APP過剰発現ニューロンでは、APP本来の生理機能が障害されアポトーシスに至る可能性がある。そこでAPPに結合する蛋白質が、APP過剰発現系におけるニューロン死において

何らかの役割を果たしている可能性を検討する目的で、酵母two-hybrid法を用いてAPP細胞内ドメインに結合する蛋白質をスクリーニングし、APPとの相互作用を解析した。

B. 研究方法

1. APP細胞内ドメインへの結合蛋白質のスクリーニング

1. APP細胞内ドメインへの結合蛋白質のスクリーニング

GAL4 DNA binding domainに融合したAPPの細胞内ドメイン (C末端47アミノ酸; APP-C) に結合する蛋白質を、酵母two-hybrid systemラット脳cDNAライブラリー (CLONTECH社)を用いてスクリーニングした。得られた陽性クローン ABP4の塩基配列はシークエンサー (LI-COR社: Model4000) を用いdye-primer法で決定した。

## 2. FE65NのC末端に対するポリクローナル抗体の作製

GSTに融合したFE65NのC末端(180アミノ酸)を精製しウサギに免疫した。3回目免疫の1週間後に採血し調整した抗血清(FEC2)を実験に用いた。

## 3. COS1細胞への遺伝子導入

COS1細胞にリン酸カルシウム法を用いて遺伝子導入した。myc tagged FE65Nを遺伝子導入して24時間後にウエスタンブロットあるいは免疫染色に用いた。

## 4. PC12ニューロンへの遺伝子導入

PC12細胞にNGFを添加してニューロンへ分化させ、24時間後にLipofectamine法を用いて遺伝子導入を行いAPPのみ、myc tagged FE65Nのみ、およびこの両者を発現させた。遺伝子導入の48時間後にPC12ニューロンをホルマリン固定して、免疫染色を行った。

## C. 研究結果

### 1. APP細胞内ドメインへの結合蛋白質のスクリーニング

$1 \times 10^6$ 個のクローンから6個の陽性クローンを得たが、このうち3個(ABP3, ABP4, ABP7)は同一の制限酵素切断パターンを示した。得られたクローンABP4をGAL4 DNA activation domainに融合した蛋白質と、GAL4 DNA binding domainに融合したAPPの細胞内ドメインについて、酵母two-hybrid法を行ったところ、X-gal反応陽性であり両者が結合することが確認された。一方、ABP4をGAL4 DNA activation domainに融合した蛋白質と、GAL4 DNA binding domainのみについては結合しなかった。

### 2. ABP4の塩基配列

ABP4の塩基配列を決定したところ2644塩基対のcDNAであり、既報のラットFE65の5'側に新規の塩基配列を持つクローンであ

ることが判明した(FE65N)。FE65は神経系に特異的に発現する蛋白質として見出され、N末端側に転写活性を持つ部位が存在し、またC末端側がretrovirusのintegraseと高い相同性を持つことが報告されている。その後N末端側より順にWWドメインと2つのPTBドメイン(PTB-NとPTB-C)の蛋白質相互作用ドメインが同定され、このうちPTB-CドメインがAPP C末端のNTPYモチーフと結合することが示されている。また、FE65のC末端側には核移行シグナル(NLS)が存在する。

今回得られたFE65Nは、ヒトFE65よりさらに5'側に新規の配列を含んでおり、未知のペプチド配列をコードすることが示唆される。

### 3. FE65(N)のC末端に対するポリクローナル抗体の特異性の確認

Myc tagged FE65NをCOS細胞に遺伝子導入して発現させた。24時間後に細胞抽出液を調整して、preimmune serum、抗myc抗体、FEC2血清により免疫ブロットを行った。対照としては、遺伝子導入していないCOS細胞抽出液を用いた。抗myc抗体(9E10)およびFEC2血清により約100kDaのバンドが検出されたが、これはpreimmune serumでは検出されず、また対照でも認められなかった。

同様にmyc tagged FE65NをCOS細胞に遺伝子導入して発現させ、24時間後に固定し、抗myc抗体およびFEC2血清により二重免疫染色を行った。myc免疫陽性細胞とFEC2免疫陽性細胞は一致し、その細胞内分布も一致した。

以上の結果より、FEC2血清は免疫ブロットおよび免疫染色において過剰発現したFE65Nを認識することが分かった。

### 4. PC12ニューロンにおけるFE65とAPPの相互作用

PC12ニューロンに以下の遺伝子導入を行い発現させ、免疫染色を行った。

はじめに、APPのみ遺伝子導入しAPPのC末端25アミノ酸からなるペプチドに対するウサギポリクローナル抗体 (AC1) で免疫染色を行った。APP C末端免疫陽性ニューロンでは核周囲に免疫陽性物質が蓄積していた。Myc tagged FE65Nのみ遺伝子導入すると、FEC2あるいはmyc免疫陽性ニューロンでは核と細胞質がともに強く染色された。APPとmyc tagged FE65Nを共導入した場合には、AC1とmycいずれの免疫活性も有するニューロンでは、それぞれの免疫陽性物質は核周囲を中心として顆粒状に細胞質に存在し、その局在は一致していた。Myc tagged FE65Nのみの導入でみられたFEC2免疫陽性の核は、これらのニューロンでは認められなかった。

以上の結果より、PC12ニューロンにおいて核と細胞質に発現するmyc tagged FE65Nは、APPとの共発現に伴い細胞質に移行する可能性が示唆された。

#### F. 考察

酵母two-hybrid法を用いてAPPの細胞内ドメインに結合する蛋白質FE65Nが得られた。PC12ニューロンにおいてFE65Nを遺伝子導入して発現させたところ核と細胞質にび漫性に免疫陽性物質が観察されたが、APPを共導入すると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。組換えアデノウイルスベクターを用いてニューロンに分化させたNT2細胞に野生型APPを過剰発現させるとニューロンが変性するが、この際にも同様の現象すなわちFE65の局在の変化が起こっていることが予想される。FE65の機能は不明であるが核移行シグナル (NLS)を持つことやN末端側に転写活性を持つ部位が存在することから核内で転写因子として働いていることが考えられる。APPの過剰発現によるFE65の局在の変化は、その核内での機能に影響を及ぼし、ニューロン死に至る可能

性がある。今後NT2細胞を用いたAPPの過剰発現による変性条件下でのFE65の分布の変化やcell-free systemを用いた変性機構の解析が必要と思われる。

#### E. 結論

1. 酵母two-hybrid法を用いてラット脳cDNAライブラリーよりAPPの細胞内ドメインに結合する蛋白質をスクリーニングしたところ、既報のラットあるいはヒトFE65類似のFE65Nが得られた。
2. FE65NのC末端に対するウサギポリクローナル抗体を作製した。
3. 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漫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。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
西村伊三男、谷浦秀夫、植月太一、新延道夫、吉川和明: APP細胞内ドメインに結合するニューロン特異的蛋白質の解析  
第41回日本神経化学学会大会 東京  
1998. 9. 23.

#### G. 知的所有権の取得状況

なし

