

199800365A

厚生科学研究費補助金
(脳科学研究事業)

プレセニリン1,2 異常によるアルツハイマー病の
発症機序の解明

平成10年度研究報告書

主任研究者
田平武

平成11年3月

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

総括研究報告書

プレセニン1,2異常によるアルツハイマー病の発症機序の解明

主任研究者 田平 武 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第6部

研究要旨

1. 家族性アルツハイマー病変異プレセニン1トランスジェニックマウスは加齢とともに大脳皮質、海馬の神経細胞が対照に比し有意に減少しており、変性ニューロン及び細胞内A β 42陽性ニューロンの数が有意に増加していた。プレセニン1変異はA β 42の細胞内沈着を介して神経細胞死を促進している。
2. この細胞死促進機構はカエルプレセニン2の野生型でも確認された。
3. プレセニン1は神経原線維変化に一致して沈着していることが免疫電顕で確認され、神経原線維変化の形成にも絡むことが分かった。

分担研究者

橋本 保（京都府立大学脳血管系老化研究センター）

卷淵隆夫（国立療養所犀潟病院神経病理）

A. 研究目的

プレセニン1,2は若年発症家族性アルツハイマー病遺伝子である。その遺伝子変異によるアルツハイマー病の早期発症メカニズムの解明は、大多数の孤発性アルツハイマー病の発症機序の解明に有効であると期待される。本年度はプレセニン1トランスジェニックマウスの解析、カエルプレセニンの機能の解析、及びプレセニン1の免疫電顕所見を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

1. プレセニン1の野生株、および家族性アルツハイマー病変異L286VあるいはH163Rをもつ遺伝子をPDGF β プロモーターにつな

ぎトランスジェニックマウスを作製する。遺伝子導入のない同胞をコントロールとして経時的に脳の変化を観察する。脳はHE染色、ニッスル染色、ダークニューロン染色の為の銀染色の他、TUNEL染色、ヘキスト33342染色を行う。またA β 40、A β 42、APP、GFAP、tau抗体を用いて免疫組織染色を行う。残存するニューロンの数の計測にはオリンパスイメージアナライザーを用いて自動的に行う。

2. カエル卵母細胞の可溶画分を調整し、別に調整した肝細胞核と22℃でインキュベートする。60分後のカスパーゼ活性を測定し、プレセニン α 、プレセニン β に対する抗体による抑制効果を調べる。

3. プレセニン1のN端フラグメントを認識する抗体、C端フラグメントを認識する抗体を用いてアルツハイマー病患者脳の免疫組織染色を行う。DAB発色後オスミウム固定をしてエポンに包埋し、電子顕微鏡で観察する。

C. 研究結果

家族性アルツハイマー病変異を有するプレセニリン 1 トランスジェニックマウスは加齢とともに大脳皮質及び海馬神経細胞の数が有意に減少した。老人斑及び神経原線維変化は観察されなかった。またアポトーシスを示すニューロンの数は有意に増加した。A β 42 の沈着を有する神経細胞の数が有意に増加した。

カエル卵母細胞から調整したプレセニリン α 、 β と肝細胞核をインキュベートするとカスパーゼ活性の上昇が見られ、その上昇はプレセニリン β の抗体でのみ特異的に抑制された。

プレセニリン 1 を認識する抗体でアルツハイマー病患者脳の実験を行った。プレセニリンは老人斑や変性突起の神経原線維変化に一致して沈着が見られた。

D. 考察

プレセニリン変異は A β 42 の切り出しを増加させるのでアミロイドカスケードに絡むことが分かっている。今回のトランスジェニックマウスの解析からプレセニリンはアミロイドカスケードに絡むが、老人斑の形成、免疫反応を必要とせず神経細胞死を引き起こすことが分かった。

カエルプレセニリンの実験で、プレセニリン β (=プレセニリン 2) が野生型でもアポトーシスを促進することが分かった。プレセニリン 1 の野生型はこの条件ではアポトーシスを起こさなかった。

プレセニリン 1 の免疫電顕ではプレセニリンが神経原線維と一緒に沈着していることが分かった。プレセニリンはタウのリン酸化酵素 GSK-3 β と結合することが知られているが、リン酸化タウと一緒に神経原線維変化として

沈着していると推定される。

E. 結論

1. プレセニリン 1 は A β 42 産生を増強し、神経細胞内沈着を介して神経細胞死を引き起こす。

2. カエルプレセニリン 2 はアポトーシスを促進する。

3. プレセニリン 1 は神経原線維変化の形成にも関与する。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kamimura K, Tanahashi H, Yamanaka H, Takahashi K, Asada T, Tabira T: Familial Alzheimer's disease genes in Japanese. J. Neurol. Sci. 160: 76-81, 1998.

2. Tanahashi H, Tabira T: Isolation of human delta-catenin and its binding specificity with presenilin 1. NeuroReport 10: 563-568, 1999.

3. Shirotani K, Takahashi K, Tabira T: Effect of presenilin N-terminal fragments on production of amyloid β peptide accumulation of endogenous presenilins. Neurosci. Lett. 262: 37-40, 1999.

4. Chui DH, Tanahashi H, Ozawa K, Ikeda S, Checler F, Ueda O, Suzuki H, Araki W, Inoue H, Shirotani K, Takahashi K, Gallyas F, Tabira T: Transgenic mice with Alzheimer presenilin 1 mutations show accelerated neurodegeneration without amyloid plaque formation. Nature Medicine 1999 (in press).

5. 田平 武: Alzheimer 病および関連遺伝子. 医学のあゆみ 185: 633-636, 1998.

6. 田平 武: プレセニリン 1,2 遺伝子変異と Alzheimer 病. 医学のあゆみ 187: 113-116, 1998.

7. 橋本 保: 骨芽細胞刺激因子-1 (OSF-1) に

よるエストロゲン欠乏性骨減少の代償作用
Osteoporosis Japan 6: 101-105, 1998.

2. 学会発表

1. 崔得華、棚橋浩、小澤和春、城谷圭朗、井上治久、荒木亘、高橋慶吉、田平武：プレセニリン1 遺伝子導入高齢マウスにおける脳組織の変化。第17回日本痴呆学会 平成10年10月2日 東京。

2. Tabira T, Chui DH, Tanahashi H, Ozawa K, Takahashi K: Accelerated neuronal apoptosis in

transgenic mice carrying Alzheimer's presenilin1 (PS-1) mutation. The 10th Naito Conference on Molecular Biological Approaches for Intractable Diseases. Oct. 29- Nov. 1, 1998, Kanagawa.

3. Tabira T, Chui DH, Tanahashi H, Ozawa K, Takahashi K: Accelerated neuronal apoptosis in transgenic mice carrying Alzheimer's presenilin1 (PS-1) mutation. A Keystone Symposium. Molecular Mechanisms in Alzheimer's Disease. Mar. 4, 1999, Taos, New Mexico.

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

分担研究報告書

プレセニリン 1,2 異常によるアルツハイマー病の発症機序の解明

分担研究者 田平 武 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第 6 部

研究要旨

家族性アルツハイマー病変異プレセニリン 1 トランスジェニックマウスは加齢とともに大脳皮質、海馬の神経細胞が対照に比し有意に減少しており、変性ニューロン及び細胞内 A β 42 陽性ニューロンの数が有意に増加していた。プレセニリン 1 変異は A β 42 の細胞内沈着を介して神経細胞死を促進している。

A. 研究目的

プレセニリン 1,2 は若年発症家族性アルツハイマー病遺伝子である。その遺伝子変異によるアルツハイマー病の早期発症メカニズムの解明は、大多数の孤発性アルツハイマー病の発症機序の解明に有効であると期待される。本年度はプレセニリン 1 トランスジェニックマウスを作製し解析することを目的とする。

B. 研究方法

1. プレセニリン 1 の野生株 (Wild) トランスジェニックマウスを 2 系統、家族性アルツハイマー病変異 L286V を 2 系統、H163R を 1 系統作製した。プロモーターは PDGF β 2 プロモーター、founder を作製し、IVF にて増産した。遺伝子導入のない同胞をコントロールとして経時的に脳の変化を観察した。脳は 4% パラフォルムアルデヒド固定後一側をパラフィン包埋し HE 染色、ニッスル染色、ダークニューロン染色の為の銀染色の他、TUNEL 染色、ヘキスト 33342 染色を行った。また反対側を 20% ショ糖に浸透後凍結切片を作製し、A β 40、

A β 42、APP、GFAP、tau 抗体を用いて免疫組織染色を行った。残存するニューロンの数の計測には一定領域を選択し、オリンパスイメージアナライザーを用いて自動的に行った。A β 40、A β 42 陽性ニューロンの計測にはオリンパス共焦点レーザー顕微鏡を用いた。

C. 研究結果

家族性アルツハイマー病変異を有するプレセニリン 1 トランスジェニックマウスは加齢とともに大脳皮質及び海馬神経細胞の数が有意に減少した (図 1)。即ち、6 カ月、13 カ月では対照との有意差はなかったが、17 カ月、24 カ月では有意差が見られた。一部のマウスでは野生株遺伝子導入トランスジェニックマウスに比しても有意な低下が見られた。しかし、24 カ月齢でも老人斑及び神経原線維変化は観察されなかった。

一方アポトーシスを示すニューロンの数は有意に増加した。アポトーシスは Gallyas の dark neuron 法という銀染色で検出され (図 2)、TUNEL、ヘキスト 33342 染色で陽性であった。

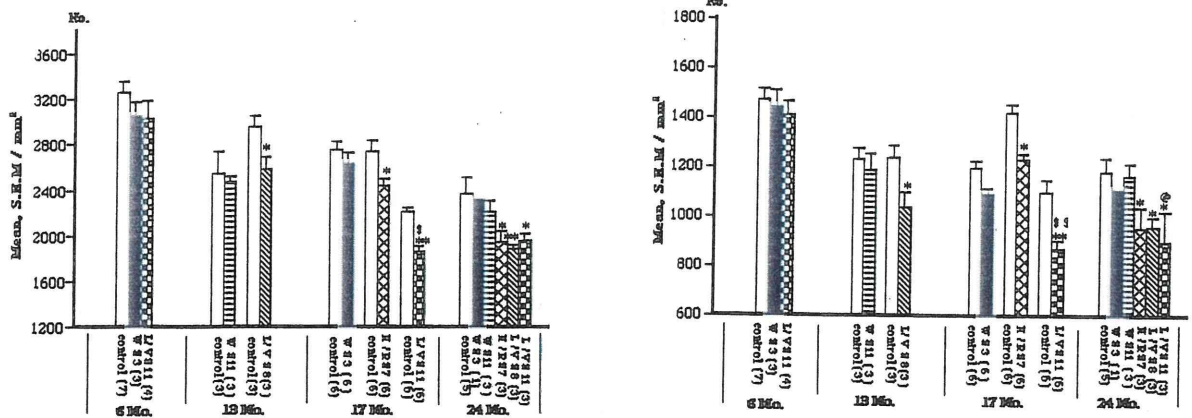


図1. プレセニン1トランスジェニックマウスにおける前頭葉皮質神経細胞の数。図に示す如く変異プレセニン1トランスジェニックマウスでは加齢により有意の神経細胞の減少が見られた。左：大脳皮質、右：海馬CA1。

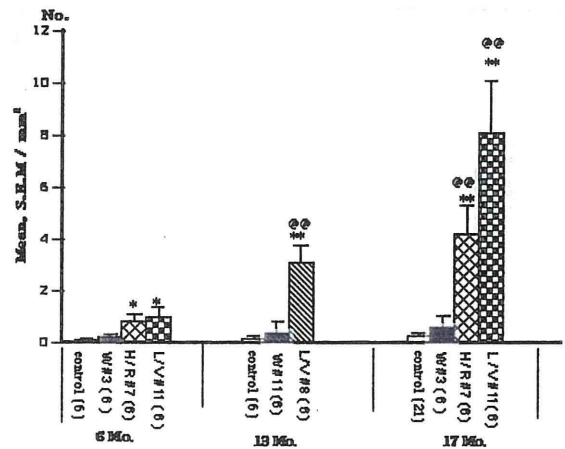
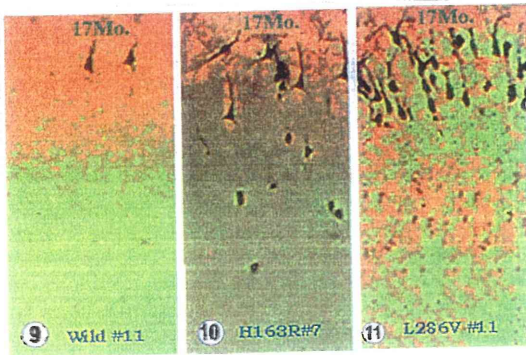


図2. プレセニン1トランスジェニックマウスにおけるダークニューロン。図の如く変異プレセニン1トランスジェニックマウスでは加齢によりダークニューロンの数が有意に多く観察された。左：Gallyas染色、右：ダークニューロンの数 (/mm²)。

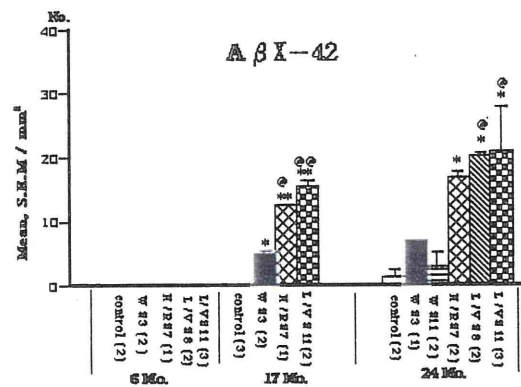
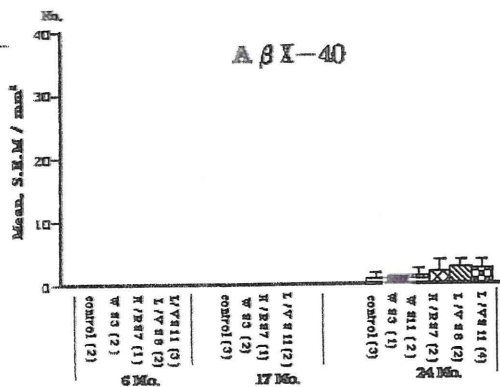


図3. Aβ40、Aβ42染色。プレセニン1トランスジェニックマウスでは加齢により神経細胞内Aβ42陽性ニューロンが有意に多く観察された。Aβ40陽性ニューロンは有意ではなかった。

A β 42 の沈着を有する神経細胞の数が有意に増加したが、A β 40 は有意ではなかった（図3）。

D. 考察

プレセニリン変異は A β 42 の切り出しを増加させるのでアミロイドカスケードに絡むことが分かっている。これまでの研究はアルツハイマー病の発症に A β が老人斑に沈着し、その毒性あるいは免疫反応を介して神経突起の変性、ひいては神経細胞死が起こると考えられてきた。しかし、今回のトランスジェニックマウスの解析からプレセニリンはアミロイドカスケードに絡むが、老人斑の形成、免疫反応を必要とせず神経細胞死を引き起こすことが分かった。神経細胞内に A β 42 が沈着していたことから、細胞内に沈着した A β 42 がアポトーシスの誘導を引き起こしたと考えられる。今後、細胞内 A β 42 がどのようにしてアポトーシスを引き起こすのか追求すれば、アルツハイマー病の発症機序ひいては予防・治療法が開発されると期待される。

E. 結論

プレセニリン 1 は A β 42 産生を増強し、神経細胞内沈着を介して神経細胞死を引き起こす。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kamimura K, Tanahashi H, Yamanaka H, Takahashi K, Asada T, Tabira T: Familial Alzheimer's disease genes in Japanese. *J. Neurol. Sci.* 160: 76-81, 1998.

2. Tanahashi H, Tabira T: Isolation of human delta-catenin and its binding specificity with

presenilin 1. *NeuroReport* 10: 563-568, 1999.

3. Shirotani K, Takahashi K, Tabira T: Effect of presenilin N-terminal fragments on production of amyloid β peptide accumulation of endogenous presenilins. *Neurosci. Lett.* 262: 37-40, 1999.

4. Chui DH, Tanahashi H, Ozawa K, Ikeda S, Checler F, Ueda O, Suzuki H, Araki W, Inoue H, Shirotani K, Takahashi K, Gallyas F, Tabira T: Transgenic mice with Alzheimer presenilin 1 mutations show accelerated neurodegeneration without amyloid plaque formation. *Nature Medicine* 1999 (in press).

5. 田平 武: Alzheimer 病および関連遺伝子. *医学のあゆみ* 185: 633-636, 1998.

6. 田平 武: プレセニリン 1,2 遺伝子変異と Alzheimer 病. *医学のあゆみ* 187: 113-116, 1998.

2. 学会発表

1. 崔得華、棚橋浩、小澤和春、城谷圭朗、井上治久、荒木亘、高橋慶吉、田平武: プレセニリン 1 遺伝子導入高齢マウスにおける脳組織の変化。第 17 回日本痴呆学会 平成 10 年 10 月 2 日 東京。

2. Tabira T, Chui DH, Tanahashi H, Ozawa K, Takahashi K: Accelerated neuronal apoptosis in transgenic mice carrying Alzheimer's presenilin1 (PS-1) mutation. The 10th Naito Conference on Molecular Biological Approaches for Intractable Diseases. Oct. 29- Nov. 1, 1998, Kanagawa.

3. Tabira T, Chui DH, Tanahashi H, Ozawa K, Takahashi K: Accelerated neuronal apoptosis in transgenic mice carrying Alzheimer's presenilin1 (PS-1) mutation. A Keystone Symposium. Molecular Mechanisms in Alzheimer's Disease. Mar. 4, 1999, Taos, New Mexico.

プレセニリン-1、-2異常によるアルツハイマー病の発症機序の解析
分担研究者 橋本 保 京都府立医科大学附属・脳血管系老化研究センター助教授

研究要旨

プレセニリンとアルツハイマー病患者大脳皮質で発現が増加するring-H2蛋白質KF-1が生体内で担っている生理的な機能を解析するため、ツメガエルの相同遺伝子産物であるX-PS- α 、X-PS- β 、X-KF-1の発生過程におけるプロセッシング、アポトーシス活性に対する影響を調べた。X-PS- β はアポトーシスに促進的に機能することが明らかになった。また、X-PS- α は逆に阻害的に機能する可能性が示唆された。X-PS- α の脱リン酸化によってアポトーシスがスイッチオンされることを示唆する結果が得られた。

A. 研究目的

プレセニリンの分子異常が家族性アルツハイマー病の主要な原因であることは明らかになっているが、その発症機序や正常生体内での生理的機能については不明な点が多い。本研究では、プレセニリン蛋白質のプロセッシング特異性、アポトーシスに与える影響を明らかにするために、アフリカツメガエルの卵形成、胚発生の過程での蛋白質動態を解析することで、アルツハイマー病発症機序におけるプレセニリン異常の役割を推定することを目的とする。また、同時に孤発性アルツハイマー病大脳皮質で発現が昂進する遺伝子として単離されたkf-1とプレセニリンの関係を調べた。

B. 研究方法

B.1 X-PS- α の親水性ループ領域をチオレドキシンの融合蛋白質として大腸菌で発現させ、精製した融合蛋白質を抗原としてウサギを免疫し、抗X-PS- α 抗血清を得た。アフィニティーカラムにより、抗X-PS- α 抗体を精製し、以後の実験に用いた。ツメガエルX-PS- α の組織分布、発生過程における変化は、膜分画を粗精製し、ウエスタンブロットィングにより解析を行った。

B.2 抗X-PS- α 抗体がアポトーシス活性に与える影響は、Nyemeyerらの方法 (Nyewmeyer et al. [1994] Cell, 79:353-364) に従いツメガエル卵抽出液

を調製し、そのアポトーシス活性への阻害能を計測した。膜分画および可溶性分画に抗X-PS- α 抗体を1 μ g加え4 $^{\circ}$ Cでインキュベーション後、25 $^{\circ}$ Cでインキュベーションし、一定時間ごとに一部を分取し、DEVD-MCAを基質として、CPP32の活性測定を行った。

B.3 酵母Two-hybrid法を用いたKF-1と相互作用する蛋白質の検索：X-KF-1のRing-H2 finger motifを除く領域をLexAとの融合蛋白質としたbait proteinとし、レポーター遺伝子であるlac Z 遺伝子、Leu2遺伝子の活性化を選択マーカーとしてマウス脳cDNAライブラリーをスクリーニングし、クローンを得た。得られたクローンの塩基配列を決定し、塩基配列データベースでの検索を行った。

B.4 マウス染色体ライブラリーをマウスkf-1 cDNAをプローブとしてスクリーニングすることにより複数個のクローンを得て、そのDNA塩基配列を決定した。プライマーエクステンションとCATアッセイ法によりその転写調節領域を解析した。

C. 研究結果

C.1. X-PS- α 、- β の細胞内における分布を調べるために、COS細胞にx-ps- α 、x-ps- β 、x-kf-1の各cDNAを発現ベクターに挿入したものを導入し、抗x-PS- α 、抗

x-PS- β 、抗x-KF-1抗体および、FITC標識2次抗体を用いて染色し、蛍光顕微鏡で観察を行った。その結果X-PS- α 、X-PS- β はともに、細胞質内に繊維状に分布し、また、核膜周辺、ゴルジ体周辺に局在していた。これはこれまでに報告されている、ヒト、マウスのプレセニリンの細胞内分布とほぼ同様であることが確認された。また、抗抗X-KF-1抗体を用いた染色においてもX-PS- α 、X-PS- β の分布と同様に、細胞内に繊維状に分布し、特に核膜周辺、ゴルジ体に強いシグナルが観察され、細胞内での共存を示唆する結果が得られた。KF-1蛋白質はその構造から膜受容体型蛋白質の膜内配置と安定化に関与するアンカー蛋白質であることが明らかになっているのでKF-1がアンカリングする対象がプレセニリンである可能性があることが示唆された。

C.2. 卵母細胞から初期発生におけるX-PS- α の動態を解析するために、各発生過程における、卵、初期胚より膜分画を調製し、抗X-PS- α 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。昨年度はmRNAの発現様式は、卵母細胞成熟過程において高い発現が見られ、卵成熟受精期に急激に減少すると報告したが、本年度の蛋白質レベルでの観察では、全過程を通じてX-PS- α の全長分子に相当する50 kDaのバンドは全く検出されず、主に約19~24 kDa付近に複数本の断片が検出された。19 kDaのバンドは、C末端にHisエピトープを含む合成mRNAを卵母細胞に注入して発現させたX-PS- α を抗His抗体で染色した断片に対応しており、卵母細胞中で全長X-PS- α は、プロセッシングを受け、この抗体はそのC末断片を認識していると考えられた。この19 kDa（以下19-断片）のバンドは、卵母細胞成熟後期において増加するが、卵成熟期から排卵期に入ると顕著

に減少し、22、23、24 kDaのバンド（以下22~24-断片）が出現した。これらのバンドは、卵割期から中胚葉期、神経胚にかけて観察されるが、その後、22~24-kDaの断片は減少し19-断片のバンドが再び増加した。22~24-断片の出現はmRNAの発現パターンに対応しておらず、これらの出現が転写レベルでの発現の結果ではないことが示唆されたのでその起源を調べた。未受精卵から免疫沈降により粗精製した22~24-断片を、アルカリフォスファターゼで処理すると、これらの断片は消失し、単一の19-断片になった。このことは初期発生過程におけるX-PS- α の19-断片から22~24-断片へのシフトは蛋白質の修飾（リン酸化）に負っていることを示している。全過程を通じて顕著な変化は観察されず、50、30、20kDaの大きさの断片が全ての時期で同程度観察された。

C.3. ツメガエル卵抽出液におけるアポトーシスアッセイ系では、抗X-PS- α 、抗kf-1抗体ではアポトーシスの進行には影響を与えなかったが、抗X-PS- β 抗体を加えたときには、卵抽出液が本来有するアポトーシス活性（CPP32活性）は全く出現せずX-PS- β 分子がアポトーシスの進行に必須であることが明らかになった。X-PS- α についてはアポトーシスに対して関与していないか、しているとすれば阻害的に機能している可能性が示唆された。

C.4. 酵母Two-hybrid法を用いたKF-1と相互作用する蛋白質の検索では、複数種のクローンが得られた。イオンチャンネルのサブユニットを含むATPase、ミトコンドリア蛋白質である cytochrome C oxidase, pyruvate dehydrogenase 等の遺伝子が単離された。

C.5. マウスkf-1遺伝子は、全長約17 kbにわたって存在し、1942、8737、

3017bpの3つのイントロンで分断された4つのエクソンから構成されていた。プライマーエクステンションにより転写開始点を検討したところ、翻訳開始コドンの上流、818bpおよび767bpの2ヶ所の転写開始点を同定した。この配列の上流付近には典型的なプロモータ様配列は見つからなかった。そこで転写開始点の上流領域をCat遺伝子の上流に連結し、NIH3T3細胞に導入して、プロモーター活性をキャットアッセイにより検討した。翻訳開始コドンの上流874bpまで持つと100%の活性を示す時、811bp、775bp、725bpまでではそれぞれ51%、12%、<5%の活性を示し、プライマーエクステンションの結果を考慮すると転写開始点の上流57bpという狭い範囲にプロモーター領域が限定された。得られた遺伝子領域を用い、pgk-Neo遺伝子、ジフテリアトキシン遺伝子を含むターゲティングベクターを作成し、ES細胞に導入した。1次スクリーニングにより得られたNeo耐性細胞250個のクローンの内一つだけがPCRでターゲティングジーンの存在を示した。通常の場合に比べてこの効率是非常に低く、実際にサザンハイブリダイゼーションで挿入されたDNA断片はもとのターゲティングジーンとはサイズが合わなかったので相同組換えを起こしてはいないことが示唆された。現在、プロモーター領域を含む上流域でターゲティングジーンを作り直し、再度ES細胞へのDNA注入を行っている。

D. 考察

D.1. X-PS- α 、X-PS- β の細胞内での分布は、既報のマウス、ヒトのプレセニリンと同様に、細胞内膜系に極在することが観察され、両生類においても基本的に同じ機能を有することが示唆された。蛋白質のプロセッシングにおいても、共通性が見ら

れ、X-PS- α に関しては、全長の分子種は生体内ではほとんど観察されず、我々の抗体では約19kDaのC末断片のみが観察された。今回観察されたプレセニリン蛋白質のプロセッシングパターンは、X-PS- β では、ほとんど変化が見られないのに対し、X-PS- α では、初期発生の特異的な時期にリン酸化による制御を受けていることが判明した。これらの傾向はそれぞれのmRNAの発現ともおおまかに対応していた。X-PS- α がリン酸化を受ける時期は、アポトーシス活性が非常に低く抑えられている時期であり、リン酸化が解除されるのは、組織分化が進行し、アポトーシスが必須となる時期であることから、X-PS- α のC末断片はリン酸化されることによりアポトーシス活性阻害を起こすと考えられる。また、未成熟卵母細胞をプロゲステロンを含む溶液でインキュベートするとリン酸化した22~24-断片が観察されたが、プロゲステロンを含まない溶液では抗X-PS- β 抗体を用いたウエスタンブロッティングでは19-断片のみが観察された。このことは、このリン酸化が卵の成熟に対応していることを示唆しておりプロゲステロン欠乏性にアポトーシスが進行する可能性を示唆しており、閉経後の女性に多い孤発性アルツハイマー病との関連が注目される。これまでにも、プレセニリンのリン酸化は、培養細胞、組織において観察されているが、生理的な条件下での発生ステージ特異的なリン酸化についての知見は今回が初めてである。X-PS- β のプロセッシングパターンに大きな変化は観察されないが、抗X-PS- β 抗体が卵抽出液中でのアポトーシス活性を強く抑制することから、X-PS- β はアポトーシスに必須の要素であり、細胞が潜在的にアポトーシスを実行できる状態で待機していることの反映と思われる。X-PS- α のリン酸化が

解除されることがアポトーシスのスイッチングであると考えられる。家族性アルツハイマー病の原因となるプレセニリンの分子異常がPS-1に多発しPS-2ではまれなことも、アポトーシスの進行の制御が主にX-PS- α のによって行われていることと合致する。換言すれば、PS-1分子異常によるアルツハイマー病の発症は機能欠失変異によるもので、PS-2分子異常によるものは機能獲得変異であると言える。

また、kf-1についてもその発現パターンがps-1と相似していること、アミノ酸配列が高度に保存されていること、細胞内分布がプレセニリンと一致することからプレセニリンとの関与が予想されるが、今回two-hybrid法による検索では、直接kf-1と相互作用する分子としてプレセニリンは、得られなかった。しかし、kf-1と相互作用する分子種として単離された物の多くは、ミトコンドリア蛋白質であり、細胞のアポトーシス経路ではミトコンドリアからのcytochrome Cの細胞内への流出が起ることが分かっており、KF-1がミトコンドリア蛋白質の細胞質内への輸送に関与していることが考えられる。

D.2. kf-1遺伝子のノックアウトマウス作成は組換え効率が非常に低く、現在までに相同組換え体は得られていない。再度、ターゲティングジーンを作り直してだめな場合は、この遺伝子が厳密に保存されている必要があり、ヘテロ接合体も致死になる可能性があり、Cre遺伝子を使った条件致死固体を作成する必要があるだろう。

E. 結論

プレセニリンの遺伝子発現と蛋白質プロセッシングの動態は、発生期細胞のアポトーシス実行の時期のスイッチングとほぼ対応していた。X-PS- β はアポトーシスの必要因

子であり細胞を潜在的にアポトーシス可能な状態に常に置くために普遍的に存在し、X-PS- α のプロゲステロン依存的なリン酸化により細胞のアポトーシスが抑制され、その脱リン酸化によりアポトーシスがスイッチオンされると考えられた。

KF-1の細胞内分布はプレセニリンと酷似しており、先の発現パターンの相似性も考慮すれば、KF-1がアンカリングする膜蛋白質がプレセニリンである可能性は依然として残っている。さらに、それを検証するために取り組んでいるノックアウトマウスの作成は組換え効率の低さで成功していない。

F. 研究発表

1. 論文発表

準備中

2. 学会発表

○辻村敦、渡部隆之、橋本保：Zinc finger protein KF-1の遺伝子構造と蛋白質の細胞内分布の解析. 第21回日本分子生物学会、横浜、1998.12.17.

○渡部隆之、渡辺義久、辻村敦、橋本保：ツメガエル初期発生過程におけるプレセニリンの挙動の解析. 第21回日本分子生物学会、横浜、1998.12.17.

プレセニリン 1,2 異常によるアルツハイマー病の発症機序の解明

分担研究者 卷淵 隆夫 国立療養所犀潟病院臨床研究部長
共同研究者 田平 武 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第 6 部長
崔 得華 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第 6 部

研究要旨

抗プレセニリン 1 抗体を用いてアルツハイマー病脳を免疫電顕微鏡学的に検討した結果、神経原線維変化と neuropil threads の paired helical filaments を認識することが明らかになった。Met239Val プレセニリン 2 トランスジェニックマウスの病理形態学的検討を行った結果、老人斑や神経原線維変化は出現しないことが明らかになった。

A. 研究目的

高齢化社会を迎える現在、アルツハイマー病の発症機序は未だ明らかでない。しかし、一部の家族性アルツハイマー病では遺伝子異常が報告されており、アルツハイマー病の発症機序解明の手掛りとして期待される。この遺伝子異常、プレセニリン 1 (PS1) とプレセニリン 2 (PS2) のアルツハイマー病の病理発生を検討する目的で、PS1 に対する抗体を用いた免疫電子顕微鏡学的検討と、PS2 のトランスジェニックマウスを作成し病理形態学的検討を行った。

B. 研究方法

①抗 PS1 抗体を用いた免疫電顕微鏡学的検討：田平らが作成した抗 PS1 抗体 (ab444)、抗 β アミロイド抗体 (affi28) を用いて、アルツハイマー病と非痴呆例の剖検例大脳皮質の凍結切片を浮遊法で免疫組織化学染色を行い、オスミウム固定した。その切片を光顕で陽性所見を確認しながら細切し、エポン包埋した。準超薄切片を作成し光顕で陽性所見を確認した後、超薄切片を作成し、電子染色は染めずに電顕で観察した。

②PS2 トランスジェニックマウスの病理形態学的検討：生後 1 年以上経た高齢の Met239Val トランスジェニックマウス (雄 4 匹、雌 8 匹) と対照マウス (雌 5 匹) をエーテルで深麻酔後、脳、脊髄、心臓、肺臓、肝臓、脾臓、腎臓の一部を摘出し、4%パラフォルムアルデヒドに 2 日間浸漬固定した後、蔗糖緩衝液で保存した。大脳、脳幹、脊髄、心臓、肺臓、肝臓、脾臓、腎臓を切り出し、パラフィン包埋して、HE 染色、Gallyas 染色、メセナミン銀染色、免疫組織化学染色標本を作成し、光顕で病理学的に検索した。HE 染色では一般的の病理所見の他、dark neuron の出現を目視にて 1 から 2+ まで半定量的に検索した。Gallyas 染色では神経原線維変化 (NFTs) と neuropil threads (NTs) の出現を検索し、メセナミン銀染色では老人斑アミロイドの出現を検索した。免疫組織化学は抗 GFAP 抗体 (DAKO)、抗合成 β アミロイド抗体 (Boehringer Mannheim) を用いて、ABC 法で行った。抗 GFAP 抗体ではグリオーシスの出現を、抗合成 β アミロイド抗体では老人斑アミロイドの出現をそれぞれ検索した。

C. 研究結果

①抗 PS1 抗体を用いた免疫電顕微鏡学的検討：抗 PS1 抗体 (ab444) は光顕では NFTs と NTs を染色しており、電顕では paired helical filaments 全体に一致して陽性であった。抗 β アミロイド抗体 (affi28) は光顕では老人斑のアミロイドを染色しており、電顕ではアミロイド細線維に一致して陽性であった。

②PS2 トランスジェニックマウスの病理形態学的検討：NFTs、NTs、 β アミロイドの出現は認められなかった。グリオーシスは、トランスジェニックマウスで + から 2+、対照マウスで 2+ で、有意差は認められなかった。dark neuron はトランスジェニックマウスと対照マウスの両群共に大脳皮質では + から 1+、海馬では - から 2+ まで認められ、有意差は認められなかった。内臓器にアミロイド出現などの異常は認められなかった。

D. 考察

抗 PS1 抗体を用いた免疫電顕微鏡学的検討では、paired helical filaments を認識することが明らかになったが、それ以上の超微形態は pre-embedding method の解像度の限界で明らかでなかった。今後 post-embedding method でも検討する必要がある。

崔らによる灌流固定した PS1 トランスジェニックマウスの詳細な検討では dark neuron が有意に認められたが、今回の PS2 トランスジェニックマウスの半定量的検討では有意差は認められなかった。dark neuron は各種のストレスでも出現する可能性があり、今回は灌流固定でないため屠殺時のストレスがオーバーラップした可能性も考えられる。

E. 結論

抗 PS1 抗体を用いてアルツハイマー病脳を免疫電顕微鏡学的に検討した結果、NFTs と NTs の paired helical filaments を認識することが明らかになった。高齢 Met239Val プレセニリン 2 トランスジェニックマウスの病理形態学的検討を行った結果、老人斑や NFTs は出現しないことが明らかになった。