

平成11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
同	林 要喜知	旭川医科大学医学部教授

平成12年4月

## 目次

頁	
1-6	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
7-12	分担研究報告書 「APPによるニューロンのアポトーシスモデル系の樹立」 分担研究者 植月 太一
13-16	分担研究報告書 「APPによるカスパーゼ3活性化機構」 分担研究者 新延 道夫
17-20	分担研究報告書 「ニューロン死誘導因子p53とnecdinの相互作用」 分担研究者 谷浦 秀夫
21-28	分担研究報告書 「APP遺伝子導入細胞に誘導される因子の探索」 分担研究者 林 要喜知

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は大脳新皮質（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が知られている。そこで、APPによってニューロン死を起こす系を開発し、APPの蓄積によって起こる細胞死の分子機構を検討し、その際に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ヒトニューロンに効率よくAPP遺伝子を発現する方法を確立した。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。
- 2) 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が変性に先立って著しく活性化されることを見いだした。
- 3) APPによるニューロン内のカスパーゼ3の活性化は、細胞内カルシウムのキレーターやリアノジン受容体の阻害剤によって抑制された。したがって、APPによるカスパーゼ3の活性化にはリアノジン受容体を介する小胞体からのカルシウム遊離が関与することが示唆された。
- 4) p53は分裂終了ニューロンのアポトーシスを起こすことが知られているが、ニューロン特異的蛋白質Necdinはp53と結合し、アポトーシス誘発作用を阻止した。
- 5) 初代培養ラット海馬ニューロンでは、APPに対する感受性はニューロンの成熟（老化）度に依存することが明らかになった。
- 6) アストロサイトーマの亜株は初代培養細胞と同様にAPP過剰発現によって細胞死を起こした。また、アストロサイトーマ亜株はAPPによってインターロイキン8の分泌が上昇した。
- 7) 以上の結果、APPの細胞内蓄積がニューロン死を導くこと、また、その際に誘導されるカスパーゼ3やインターロイキン8などが、実際の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。また、ニューロン内におけるAPP-カスパーゼ3系の制御は、アルツハイマー病の本質であるニューロン死の分子機構を研究する上で重要である。

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  
林要喜知 旭川医科大学 医学部教授

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が、その原因についてはほとんど明らかにはなっていない。したがって、アルツハイマー病の予防や治療の根拠となる病因の分子機構の解明が急務となっている。現在、アルツハイマー病の確定診断には死後脳の病理像、すなわちニューロン脱落、神経原線維変化、老人斑などがそのマーカーとなっている。しかし、これらの変化はアルツハイマー病の終末像である可能性が高い。したがって、アルツハイマー病脳で変性脱落する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病因解明に有効である。APPは脳新皮質（連合野）や海馬の錐体細胞などのアルツハイマー病で侵される大型ニューロンに豊富に存在すること、また、アルツハイマー病脳における変性ニューロン内にAPP断片が蓄積されていることが報告されている。さらに、APPはニューロンの種々の病態で発現が上昇し、ニューロン内に蓄積することが知られている。一方、細胞死の遂行にはプロテアーゼであるカスパーゼ群が重要な役割を果たすことが知られているが、アルツハイマー病の脳でもカスパーゼ3陽性の変性ニューロンが見られることが報告されている。そこで本研究では、アルツハイマー病におけるAPPの蓄積やカスパーゼによる中間代謝産物がニューロン死のマーカーとなる可能性を検討する。また、APPによるニューロンのアポトーシスの際に誘導される遺伝子（蛋白質）を同定し、アルツハイマー病の本質であるニューロン変性死のマーカーとなるかを検討する。

B. 研究方法

B-1) APPによるニューロンのアポトーシスモデル系の樹立（植月分担）

APPによってニューロンのアポトーシスを起こす実験系を開発するため、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東京大学医科学研究所齊藤泉博士らが開発したCOS-TPC法によって作製した。アルツハイマー病はヒトニューロンの変性疾患であるため、培養系細胞として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研究に用いた。レチノイン酸処理により分化した分裂終了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、APPを強制発現した。ニューロンは経時的にサンプルとして採取し、免疫学的手法によって形態学的変化や活性化カスパーゼ3の存在を調べた。カスパーゼ3活性は蛍光基質を用いて、蛍光分光光度計によって測定した。

B-2) APPによるカスパーゼ3活性化機構（新延分担）

植月らが作製したヒトニューロンのAPPによる変性系を用いて、カスパーゼ3活性を指標として、APPの過剰発現による細胞変性の機構を解析した。NT2ニューロンを分化させた後に、種々のカルシウムチャンネルのブロッカーや細胞内カルシウム阻害剤で細胞を処理し、その後、APPによるカスパーゼ3活性の変化を上記と同じ方法で調べた。また、細胞内カルシウム濃度を測定するため、Fura 2-AMを負荷した後に、カフェインを添加し、蛍光顕微鏡によって測光した。

B-3) がん抑制遺伝子産物p53とNecdinの相互作用（谷浦分担）

Necdinとp53の結合は酵母two-hybrid法による方法、および大腸菌で発現させたp53 deletion mutantsはマルトース結合蛋白質(MBP)との融合蛋白質とbaculovirus系を用いて発現させたヒスチジンNecdin融

合蛋白質のin vitro結合反応をしらべた。また、ゲルシフトアッセイによってp53結合配列を含むoligonucleotideを用いてNecdinとp53複合体の反応を調べた。レポーターアッセイとしてp21/WAF1プロモーター(2.4kbp)を含むluciferase reporter vectorとp53発現ベクターおよびnecdin発現ベクターを共にSaos-2細胞に遺伝子導入し、luciferase活性を測定した。細胞増殖への影響  
細胞増殖への影響は、colony formation assayとbromodeoxyuridine(BrdUrd)の取り込み実験を行った。Colony formation assayは、Saos-2細胞にp53およびnecdin発現ベクターを遺伝子導入し、48時間後より2週間G418で選択した。p53依存性アポトーシスは  
U2OS細胞にp53単独あるいはnecdin発現ベクターと共導入し、p53陽性細胞の生存率を時間経過とともに観察し、同時にHoechst dyeでクロマチンを染色し核の変性を確認した。

#### B-4) APP遺伝子導入細胞に誘導される因子の探索 (林分担)

ラット胎児海馬ニューロンの初代培養はウイスター系ラット胎児(18-19日齢胎児)から調製し、1~2ヶ月間ほど培養を継続した後に実験に使用した。ヒトアストロサイトーマU373MG細胞はコラーゲン塗布マルチウエル(ファルコン96穴)にまき、コンフルエントになるまで培養を続けた。初代培養ニューロンやU373MG細胞に植月らの方法でアデノウイルス感染実験を行った。培養細胞は固定後、通常の免疫染色を施した。ニューロンの生存率を測定するためには、抗Map2モノクローナル抗体を、APP遺伝子陽性細胞を検出するためにはウサギ抗APP抗体を1次抗体として用いた。これらの免疫染色細胞を位相差顕微鏡下で観察および写真撮影し、形態学的指標により良好な生存状態のニューロンと変性死滅しつつあるニューロンの割合を求め、各実験における生存率を算出した。一方、ヒトアストロサイトーマの生存率測定は、扁平な接着細胞を生細胞としてカウントし、形態が崩れた細胞や自己溶解した細胞を変性死滅細胞と見なし、両者の割合から生存率を算出した。活性酸素種の測定は、2',7'-

dichlorofluorescein diacetateを最終濃度が7mMになるように添加し、蛍光強度を測定して、活性酸素種の生産初速度を求めた。インターロイキン-8の定量は2抗体を用いたEILSA法により定量した。

#### C. 研究結果

##### C-1) APPによるニューロンのアポトーシスモデル系の樹立 (植月分担)

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培養系で詳細に検討した。まず変性細胞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法により確認した。以上の結果からAPP強制発現によって引き起こされるニューロン変性はアポトーシスであることが示された。アポトーシスの際に蛋白質分解酵素であるカスパーゼ群が活性化されることが報告されている。そこでAPPによる変性死の際にカスパーゼが活性化されているかを蛍光ラベルした基質ペプチドの切断により検討した。その結果、顕著な神経変性に先立ってカスパーゼ3の急速な活性の上昇が見いだされた。またカスパーゼ3の活性型断片がAPP導入によって生じてくることをウェスタンブロット法によって確認した。抗活性型カスパーゼ3断端抗体を用いて免疫組織化学を行うと、培養系でもラット海馬でもAPP強制発現によって、APPの異常蓄積の見られるニューロンで免疫陽性細胞が見いだされた。以上の結果から、APPがニューロン内で多量に蓄積すると、細胞に何らかの負荷がかかり、カスパーゼの活性化を引き起こすシグナルが伝わり、変性細胞死が誘導されることが示された。この系の開発により、他の分担研究(新延や林の研究参照)が可能になった。

##### C-2) APPによるカスパーゼ3活性化機構 (新延分担)

種々のカルシウムチャンネルのブロッカーや細胞内カルシウム阻害剤のAPP695誘発性カスパーゼ3活性化の影響を調べた。

APP695 遺伝子を過剰発現した NT2-N を NMDA型・non-NMDA 型グルタミン酸レセプター阻害剤で処理したが、カスパーゼ3 活性は抑制されなかった。それに対し、細胞内カルシウムキレーター BAPTA-AM で処理すると、カスパーゼ3 活性は薬剤濃度依存的に有意に抑制された。また小胞体のカルシウム放出チャンネルを阻害する Dantrolene でも、カスパーゼ3 活性を薬剤濃度依存的に抑制した。さらに、caffeine 添加による小胞体からのカルシウム放出を、蛍光カルシウムインディケータ Fura-2-AM を用いて測定したところ、LacZ 感染ニューロン群に比べAPP発現アデノウイルス感染ニューロン群で顕著な細胞内カルシウム濃度の上昇が観察された。このことから、APP の細胞内蓄積による NT-N内 カスパーゼ3 の活性化は小胞体カルシウムチャンネルを介した、サイトゾルへのカルシウム放出増加に関わるものと考えられる。これらのことからAPPによるカスパーゼ3 の活性化を指標にして、分子機構を研究する系が開発できた。

#### C-3) がん抑制遺伝子産物p53とNecdinの相互作用 (谷浦分担)

Necdinは、神経細胞の発生分化に伴って発現誘導されるニューロン特異的蛋白質である。Necdinは、DNA virus由来のがん蛋白質SV40 largeT抗原、adenovirus E1A やS期進行に関与する転写因子E2F1と結合し、E2F1の転写活性を抑制する。がん抑制遺伝子産物p53もまた細胞増殖やアポトーシスに関与する転写因子であるが、necdin はp53のN末端領域の転写活性化ドメインに結合し、その転写活性を抑制することがわかった。U2OS細胞は、p53の過剰発現によってアポトーシスが誘導されることが知られているが、necdinとの共発現によってp53依存性アポトーシスは抑制された。これらのことからnecdinが、ニューロンのアポトーシスの調節に関わっていることが示唆された。Necdinはアルツハイマー病におけるニューロン死の際に上昇する可能性も考えられる。

#### C-4) APP遺伝子導入細胞に誘導される因子の探索 (林分担)

初代培養ラット海馬ニューロンを調整し、1~2ヶ月の長期培養を行った。この培養系にアデノウイルスベクターを添加すると、in vitroで成熟したニューロンは、数日間のうちに変性、死滅した。同じ培養皿に存在する非感染ニューロンや共存するグリア細胞は、ほとんど死滅しなかった。ウイルス感染させた後に培養ニューロンにペプチド性カスパーゼ阻害剤を作用させたところ、幾つかのカスパーゼに作用する阻害剤やカスパーゼ3 の阻害剤は、APPによるニューロン死の遅延をもたらした。次に、ニューロンの変性、死滅過程に関わる遺伝子群を明らかにするため、初代培養海馬ニューロンと同じような細胞変性を示す株化細胞があるかどうかを広く探索した。その結果、ヒトアストロサイトマ

(U373MG) の亜株の一種が培養初代海馬ニューロンと同じようにAPPにより死滅することを見出した。この細胞では変性が現われ始める初期には、活性酸素種の増大や細胞形態の変化が初代培養ニューロンと同じ経過で出現し、細胞死がおこる直前にはインターロイキン8生産が増大することが観察された。これらの、アデノウイルスを用いたAPP遺伝子強制発現システムは、アルツハイマー病病因に関わる分子機構を解析に役立つものと考えられる。

#### D. 考察

植月らの開発した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カスパーゼ3 の活性化が起こり、引き続いてニューロン死を起こすことが明らかになった。このことからAPPによる細胞変性は典型的なアポトーシスであることが示された。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、 $\beta$ アミロイド断片が産生されることが報告されている。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つとして、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る。しかし現在のところAPP異常蓄積がどのような機構でアポトーシスシグナルを伝えるのかはまだ不明である。最近ではミトコンドリアを經由

する系が非常によく研究されているが、本研究でもミトコンドリアを介しているかどうかについては明確な結果は得られていない。既に、ラット海馬初代培養ニューロンでAPPを高発現すると、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事が報告されている。今回、新延らの研究によりNT2ニューロンの系で細胞内カルシウムキレーターを加えるとカスパーゼ3の活性化が抑制されることを見いだした。これらのデータからAPPのアポトーシス誘導に細胞内カルシウム濃度の異常な変動が関与する可能性が示唆される。とくにニューロンの小胞体からのリアノジン受容体を介したカルシウム遊離の増大が、カスパーゼ3活性の上昇に寄与している可能性が高い。また、APP分子内のどの領域がアポトーシス誘導に関与する領域であるのかはまだはっきりしていない。従ってアポトーシスに必須の領域を検討する目的で、様々な変異APPを発現するウイルスベクターを作製して検討する必要がある。

谷浦の見出したp53とNecdinとの相互作用は、ニューロン死とその抑制機構に関して興味深い。がん抑制遺伝子産物p53は、UVや各種DNA障害性薬物で発現誘導され、細胞をアポトーシスに導く蛋白質として知られている。ニューロンにおいてもアデノウイルスを用いたp53の過剰発現によってアポトーシスが誘導されることや、p53欠損ニューロンがグルタミン酸、カイン酸やカンプトテシンなどの薬物に対して障害の抵抗性を示すことが報告されている。Necdinがp53依存性アポトーシスを抑制することから、ニューロンにおいてもp53依存性アポトーシスを調節している可能性が示唆される。さらに、細胞周期進行に関与する転写因子E2F1が、ニューロンへの分化に伴って活性化されたユビキチンプロテアソームで分解をうけること、またプロテアソームインヒビターで分解を抑制したりE2F1を強制発現させることによりニューロンのアポトーシスが誘導されるなども報告されている。NecdinがE2F1とも結合することを考慮すると、Necdinはニューロンのp53やE2F依存性アポトーシスの抑制に関与していることが示唆される。

林らは、APP遺伝子高発現が長期培養した成熟ニューロンで誘導されると、そのニューロンは死滅することを明らかにし

た。長期培養を施した胎仔海馬ニューロンを用いた場合、アデノウイルスによるAPP遺伝子導入効果が細胞変性として観察されたが、培養期間が1~2週間である場合、非特異的な毒性が他の遺伝子を発現するウイルスでも認められた。グルタミン酸の受容体などの機能は培養1~2週間のニューロンで形成されるが、さらなる成熟環境、あるいは、加齢や老化の環境を作り出す分子の存在が必要であるのかも知れない。アデノウイルスベクターを用いたAPPによる変性過程がヒトアストロサイトーマ

(U373MG)の垂株に於いて認められた。APPによるU373MGの垂株細胞での変化が、実際に、アストロサイトやミクログリアに起こる変化だけなのか、あるいは、ニューロンにも認められる共通の変化であるのか、今後さらに解析する必要がある。いずれにしても、APP遺伝子の高発現にともなう下流における反応解析は、APPによる細胞死の分子機構や細胞死に伴うマーカー分子の変動を研究する上で重要な細胞系である。

## E. 結論

ヒト分裂終了ニューロン培養系としてNT2ニューロンを用いてAPPを高発現させカスパーゼ3によるアポトーシスを引き起こす細胞系を確立した。APPによる変性はカスパーゼ3阻害剤で抑制された。また、細胞内カルシウムキレーターやリアノジン受容体抑制剤がAPPによるカスパーゼ3活性化を抑制することからAPPによるカスパーゼ3活性化は細胞内カルシウム濃度の上昇が原因である可能性が示された。分化したニューロンに特異的に発現しているnecdinはアポトーシス誘導能をもつ転写因子p53のN末端転写活性化ドメインと結合した。p21/WAF1プロモーターを用いたreporter assayによりnecdinはp53転写活性を抑制した。さらに、Necdinはp53依存性アポトーシスを抑制した。初代培養ラット海馬ニューロンでも1~2ヶ月の長期培養にアデノウイルスベクターを添加すると、数日間のうちに変性、死滅した。また、ヒトアストロサイトーマ(U373MG)の垂株の一種が培養初代海馬ニューロンと同じようにAPPにより死滅することが観察された。細胞死がおこる直前にはインターロイキン8

生産が増大することが観察された。以上の結果から、アデノウイルスを用いたAPP遺伝子強制発現システムは、アルツハイマー病病因に関わる分子機構やニューロン死に際してマーカーとなる分子群を探索する上で、優れた病態細胞モデル系であると考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Azuma-Hara M, Taniura H, Uetsuki T, Niinobe M, Yoshikawa K (1999) Regulation and deregulation of E2F1 in postmitotic neurons differentiated from embryonal carcinoma P19 cells. *Exp Cell Res* 251:442-451.

Taniura H, Matsumoto K, Yoshikawa K (1999) Physical and functional interactions of neuronal growth suppressor necdin with p53. *J Biol Chem* 274:16242-16248.

Uetsuki T, Takemoto K, Nishimura I, Okamoto M, Niinobe M, Momoi T, Miura M, Yoshikawa K (1999) Activation of neuronal caspase-3 by intracellular accumulation of wild-type Alzheimer amyloid precursor protein. *J Neurosci* 19:6955-6964.

### 2. 学会発表

植月太一、西村伊三男、竹本研、桃井隆、三浦正幸、吉川和明：分裂終了ニューロンのAPP695強制発現によるカスパーゼ活性化とアポトーシス誘導  
第42回日本神経化学学会大会 広島  
1999. 9. 16.

西村伊三男、植月太一、原とも子、吉川和明：NT2ニューロンのアポトーシスに伴うAPPの蓄積  
第42回日本神経化学学会大会 広島  
1999. 9. 16.

中田祐二、植月太一、小林正克、原とも子、吉川和明：Necdin変異マウスを用いた

ゲノムインプリンティングの解析  
第42回日本神経化学学会大会 広島  
1999. 9. 16.

竹本研、植月太一、三浦正幸、桃井隆、吉川和明：APPによるニューロン内caspase-3の活性化  
第72回日本生化学学会大会 横浜  
1999. 10. 8.

谷浦秀夫、浅野徹、松本国治、吉川和明：ニューロン増殖抑制因子necdinと核マトリックス蛋白質hnRNP-Uの相互作用  
第42回日本神経化学学会大会 広島  
1999. 9. 16.

松本国治、谷浦秀夫、植月太一、吉川和明：ニューロン由来の細胞増殖抑制因子necdinによる転写抑制機構  
第72回日本生化学学会大会 横浜  
1999. 10. 8.

谷口直子、谷浦秀夫、植月太一、新延道夫、吉川和明：ニューロン特異的蛋白質necdinとカルシウム結合蛋白質nucleobindinファミリーの相互作用  
第72回日本生化学学会大会 横浜  
1999. 10. 8.

谷浦秀夫、松本国治、吉川和明：ニューロン増殖抑制因子necdinとp53の相互作用  
第72回日本生化学学会大会 横浜  
1999. 10. 9.

小林正克、谷浦秀夫、吉川和明：NecdinによるG1/S期移行制御機構の解析  
第72回日本生化学学会大会 横浜  
1999. 10. 9.

## 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によるニューロンのアポトーシスモデル系の樹立

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 $\beta$ 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。

本研究の目的は、APPがニューロン変性にどの様に関与しているのかを遺伝子導入などの方法を用いて分子レベルで解析し、最終的にはアルツハイマー病におけるニューロン変性、細胞死の機構を明らかにすることにある。我々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遺伝子導入が困難な分裂終了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、その方法によってアミロイド前駆体蛋白質（APP）のニューロンでの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。アルツハイマー病はヒトニューロンの変性疾患である。そこで培養系としてヒト分化中枢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研究に用いた。レチノイン酸処理により分化した分裂終了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、変性ニューロンは細胞死を引き起こしていた。この結果は、我々がラット海馬に直接遺伝子導入した際の観察結果と非常によく一致していた。

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培養系で詳細に検討した。まず変性細胞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法により確認した。以上の結果からAPP強制発現によって引き起こされるニューロン変性はアポトーシスであることが示された。アポトーシスの際に蛋白質分解酵素であるカスパーゼ群が活性化されることが報告されている。そこでAPPによる変性死の際にカスパーゼが活性化されているかを蛍光ラベルした基質ペプチドの切断により検討した。その結果、顕著な神経変性に先立ってカスパーゼ3の急速な活性の上昇が見いだされた。またカスパーゼ3の活性型断片がAPP導入によって生じてくることをウェスタンブロット法によっても確認された。抗活性型カスパーゼ3断端抗体を用いて免疫組織化学を行うと、培養系でもラット海馬でもAPP強制発現によって、APPの異常蓄積の見られるニューロンで免疫陽性細胞が見いだされた。以上の結果から、APPがニューロン内で多量に蓄積すると、細胞に何らかの負荷がかかり、カスパーゼの活性化を引き起こすシグナルが伝わり、変性細胞死が誘導されることが示された。

## A. 研究目的

アルツハイマー病脳で特徴的に観察される老人斑の主成分βアミロイド蛋白質は、その前駆体、アミロイド前駆体蛋白質

(APP) がプロセスされることにより生じてくる。またAPPがアルツハイマー病原因遺伝子の1つであることは家族性アルツハイマー病患者遺伝子の解析から間違いないものと考えられている。しかし現在に至るまで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本来の機能は、明確な結論を見るまでにはいたっていない。本研究の第一の目的は培養系および個体脳のニューロンでAPPを遺伝子導入し、高発現させ、実際の病態におけるニューロン変性を再現する実験系の確立をめざすことである。さらに確立された実験系を用いて、アルツハイマー病におけるニューロン死とAPPがどの様に関連しているかを分子レベルで解析し、明らかにしていくことにある。

## B. 研究方法

(B-1) アデノウイルスベクターの作製  
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。

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。そこで分裂を終了した中枢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終了し、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、ニューロンのマーカーである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非神経扁平細胞が現れた。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。

(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 $6 \times 10^7$  pfuのウイルス粒子を含む5  $\mu$ 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

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、非常に高効率にニューロンに遺伝子導入する方法を確立した。APP遺伝子は同じ方法により導入した。

#### (B-4) ニューロン変性の検討法

アポトーシスにおいては、細胞死に先行して核の凝集、分断化が見られる。また、染色体DNAがヌクレオソーム単位の大きさに寸断されることが知られている。そこでアポトーシスを検出する方法として、核の形態観察とタネル染色法を行った。ニューロンの核はヘキスト33342で染色し、APP C末端に対する抗体 (AC1抗体) と2重染色し、APP蓄積細胞の核の形態を蛍光顕微鏡下で観察した。細胞死を検出する方法としてエチジウムホモダイマーの核内への取り込みを蛍光顕微鏡下で観察した。また染色体DNAの断片化はタネル法によって解析した。これはDNAの断片化により増加した3'-OH末端をbiotin-dUTPとTdTを用いて標識する方法である。

#### (B-5) カスパーゼ活性化の検出法

カスパーゼの活性化の検出は蛍光ラベルしたペプチド基質がカスパーゼにより切断され、遊離した蛍光物質を検出する方法により行った。活性化されたカスパーゼがカスパーゼ3であることの確認は抗カスパーゼ3抗体を用いたウェスタンブロット法により行った。免疫組織化学的にカスパーゼの活性化を検討する目的で、活性型カスパーゼ3断片に特異的な抗体を用いて、抗APP抗体との2重染色を行った。

### C. 研究結果

#### (C-1) NT2ニューロンを用いたAPPによる変性

最初にβガラクトシダーゼ発現アデノウイルスベクターを用いてNT2細胞に効率よく遺伝子導入する条件を検討した。その結果、ウイルス量約30 m.o.i.では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、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、細胞表面の不整化などの変性像が認められた。ニューロンのマーカー蛋白質であるMAP2との2重染色を行って細胞変性を定量化すると96時間後までに約95%のニューロンが変性していることが確認された。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。APP N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ト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βA4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。さらに細胞外液に3μMのAβ1-40を加えて、変性を引き起こすかどうかを検討した所、変性は引き起こさなかった。

#### (C-2) APP強制発現によるアポトーシス誘導

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。

#### (C-3) APPによるカスパーゼ3の活性化

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蛍光ラベル基質の切断によって検討した。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が変性に先立って48時間目から急速に活性化されることが確認された。このカスパーゼ酵素活性の急速な上昇がカスパーゼ3によるものかどうかを抗カスパーゼ3抗体を用いたウェスタンブロット法により検討した。その結果、48時間後から21K, 19Kの活性化されたカスパーゼ3断片が明瞭に出現した。これに対し $\beta$ ガラクトシダーゼを強制発現したニューロンでは全く活性型カスパーゼのバンドは検出されなかった。以上の結果からAPPによるカスパーゼの活性化はプロカスパーゼ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。切断された活性化カスパーゼ3断片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のみが陽性となった。このことから蛍光基質の切断で検出されたカスパーゼ3の活性化がニューロンで特異的に起こっている現象であることが確認された。

#### (C-4) カスパーゼ阻害剤による変性阻害効果

APPによるニューロン変性の主要な経路がカスパーゼ3を活性化するものであるかどうかを検討する目的でカスパーゼ3の基質を細胞に投与し、変性の阻害効果を検討した。100 $\mu$ Mのペプチド基質を加え、競合阻害により変性が緩和されるかどうかを細胞の形態を観察、定量化することでアッセイした。阻害剤非存在下では、ニューロンはAPP導入96時間目までで95%の細胞が変性死を起こしたが、阻害剤存在下では変性が抑制され、変性が顕著に遅延することが確認された。しかしながら変性を完全に阻害することはできなかった。

#### (C-5) 成熟ラット海馬ニューロンにおけるカスパーゼ3活性化

我々はAPPによるニューロン変性がラット脳内でも観察されているのかを、直接ラット脳内にAxCAYAPを注入することによって確認されていること既に報告した。すなわちラット海馬内に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、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の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 $\beta$ ガラクトシダーゼ発現ウイルスを導入した場合、 $\beta$ 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。そこで、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の活性化が起きているかどうかを抗活性型カスパーゼ3抗体を用いた免疫組織化学によって検討した。APPウイルス導入後3日目のラット海馬ニューロンを抗活性型カスパーゼ3抗体と抗APP抗体で2重染色すると変性がやや進んだニューロンで両抗体で陽性になるニューロンが見いだされた。以上の結果からラット個体脳内のニューロンでもAPP強制発現によって引き起こされるニューロン変性はカスパーゼ3の活性化を伴っていることが確かめられた。

#### D. 考察

##### (D-1) APP強制発現によるヒトニューロンの変性

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。また合成されたA $\beta$ 1-40を細胞外液に多量に加えてもNT2ニューロンは変性を引き起こされなかった。これらは、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 $\beta$ ペプチドが細胞外から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。

#### (D-2) APPによるカスパーゼ3の活性化

本研究によってAPP異常蓄積による細胞変性死にはカスパーゼ3の顕著な活性化を伴うことが明らかとなった。現在のところカスパーゼ3は、ニューロンのみならず多くの細胞でアポトーシスの際、最も決定的な働きをする蛋白質分解酵素の一つである。このことからAPPによる細胞変性は典型的なアポトーシスであることが示された。

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。しかし現在のところAPP異常蓄積がどのようなアポトーシスシグナルを細胞内で伝えるのかはまだ不明である。これまでにアポトーシスシグナルを伝えるいろいろな経路が報告されてきた。その中で、ミトコンドリアを経由する系が非常によく研究されてきた。本研究でもミトコンドリアを介しているかどうかの検討を加えてきたが、はっきりしたポジティブな結果は得られず、主要な経路ではないのではないかと考えられる。我々は既に、ラット海馬初代培養ニューロンでAPPを高発現すると、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事を報告した。またNT2ニューロンの系で細胞内カルシウムキレーターを加えるとカスパーゼ3の活性化が抑制され、細胞変性も遅延することを見いだした。これらのデータからAPPのアポトーシス誘導に細胞内カルシウム濃度の異常な変動が関与する可能性が示唆された。細胞内カルシウムのホメオスタシスに関与する細胞内小器官にたいするストレスが原因となっている可能

性も考えられる。現在、本研究で得られた知見を元にしてAPP蓄積の下流にある経路の検索を行っている。

最近、実際のアルツハイマー脳のニューロンにおいてカスパーゼ3の活性化が変性に先立って起きていること、APPそのものがカスパーゼ3の標的分子の一つであること、老人斑にカスパーゼ3で切断されたAPP断片が検出されること、等の報告が出された。このことはAPPがカスパーゼ3の活性化を引き起こすだけではなく変性において何らかのフィードバック機構に関与する可能性を示唆するものである。

APP分子内のどの領域がアポトーシス誘導に関与する領域であるのかはまだはっきりしていない。従ってアポトーシスに必須の領域を検討する目的で、様々な変異APPを発現するウイルスベクターを作製して検討する必要がある。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。また本研究で行っているように種々の薬剤や阻害剤を加え、この系で変性、死を抑制する方法を検討することは治療への応用として意味のあることであろう。

#### E. 結論

- 1) ヒト分裂終了ニューロン培養系として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。
- 2) NT2ニューロンにおいても成熟ラット海馬ニューロンにおいてもAPPの細胞内蓄積がカスパーゼ3の活性化を引き起こした。
- 3) APPによる変性はカスパーゼ3阻害剤で抑制された。
- 4) APPによるカスパーゼ活性化は細胞内カルシウム濃度の上昇が原因である可能性が示された。またカルシウムキレーターがAPPによるカスパーゼ3活性化を抑制することが示された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Uetsuki, T., Takemoto, K., Nishimura, I., Okamoto, M., Niinobe, M., Momoi, T., Miura, M. and Yoshikawa, K. (1999)  
Activation of Neuronal Caspase-3 by Intracellular Accumulation of wild-Type Alzheimer Amyloid Precursor Protein. *The Journal of Neuroscience* 19, 6955-6964
2. Hara, M., Taniura, H., Uetsuki, T., Niinobe, M. and Yoshikawa, K. (1999)  
Regulation and Deregulation of E2F1 in Postmitotic Neurons Differentiated from Embryonal Carcinoma P19 cells. *Experimental Cell Research* 251, 442-451
3. Araki, T., Yamada, M., Ohnishi, H., Sano, S., Uetsuki, T., and Hatanaka, H. (2000)  
Shp-2 Specifically Regulates Several Tyrosine-Phosphorylated Proteins in Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling in Cultured Cerebral cortical Neurons  
*J. Neurochem.* 74, 659-668
4. Nakada, Y., Taniura, H., Uetsuki, T., and Yoshikawa, K. (2000)  
Characterization and Chromosomal Mapping of a human necdin pseudogene  
Gene in press.

### 2. 学会発表

1. 分裂終了ニューロンのAPP695強制発現によるカスパーゼ活性化とアポトーシス誘導 第42回日本神経化学会 広島 (1999, 9) 植月太一、西村伊三男、竹本研、桃井隆、三浦正幸、吉川和明
2. Necdin変異マウスを用いたゲノムインプリンティングの解析 第42回日本神経化学会 広島 (1999, 9) 中田祐二、植月太一、小林正克、原とも子、吉川和明
3. NT2ニューロンのアポトーシスに伴うAPPの蓄積 第42回日本神経化学会 広島 (1999, 9) 西村伊三男、植月太一、原とも子、吉川和明

4. ニューロン由来の細胞増殖抑制因子necdinによる転写抑制機構 第72回日本生化学会 横浜 (1999, 10) 松本国治、谷浦秀夫、植月太一、吉川和明

5. ニューロン特異的核蛋白質Necdinとカルシウム結合蛋白質Nucleobindinファミリーの相互作用 第72回日本生化学会 横浜 (1999, 10) 谷口直子、谷浦秀夫、植月太一、新延道夫、吉川和明

6. APPによるニューロン内 Caspase-3の活性化 第72回日本生化学会 横浜 (1999, 10) 竹本研、三浦正幸、桃井隆、植月太一、吉川和明

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によるカスパーゼ3活性化機構

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（APP）は、アルツハイマー病患者脳に特徴的な老人斑に沈着するアミロイドの主成分、 $A\beta$ ペプチドの前駆体である。当研究室ではラット脳内にアデノウイルスベクター（AxCAYAP）を用いて野生型ヒトAPP695を過剰発現すると、カスパーゼ-3が活性化されニューロンが変性することを見出している。本研究ではAPP695過剰発現細胞におけるカスパーゼ-3活性化機構を指標にして、ニューロンの変性機構の解析を試みた。当研究室では既にAPPを過剰発現したラット海馬初代培養細胞ではグルタミン酸濃度依存的に細胞内カルシウム濃度の異常な上昇が起こることを報告している。このことは、APPの細胞内蓄積によるニューロン内カルシウム濃度の上昇とアポトーシスとの関連が示唆される。そこで、本研究では種々のカルシウムチャンネルのブロッカーや細胞内カルシウム阻害剤のAPP695誘発性カスパーゼ-3活性化の影響を調べた。APP695遺伝子を過剰発現したNT2-NをNMDA型・non-NMDA型グルタミン酸レセプター阻害剤で処理したが、カスパーゼ-3活性は抑制されなかった。それに対し、細胞内カルシウムキレーターBAPTA-AMで処理すると、カスパーゼ-3活性は薬剤濃度依存的に有意に抑制された。また小胞体のカルシウム放出チャンネルを阻害するDantroleneでも、カスパーゼ-3活性を薬剤濃度依存的に抑制した。さらに、caffeine添加による小胞体からのカルシウム放出を、蛍光カルシウムインディケーターFura-2-AMを用いて測定したところ、LacZ感染ニューロン群に比べAxCAYAP感染ニューロン群で顕著な細胞内カルシウム濃度の上昇が観察された。このことから、APPの細胞内蓄積によるNT-N内カスパーゼ-3の活性化は小胞体カルシウムチャンネルを介したサイトゾルへのカルシウム放出に関わるものと考えられる。

A. 研究目的

胚性ガン細胞P19由来の分裂終了ニューロンに野生型APP695を過剰発現させるとニューロン変性が誘導される。また、アデノウイルスベクターを用いてラット海馬にAPPを過剰発現すると、染色体DNAの断片化を伴うアポトーシス様のニューロン変性を誘導する。これらの実験事実から、なんらかの代謝の変化によりAPPの細胞内蓄積が生体内で起こると、ニューロン特異的な変性が誘導されることが示唆される。

アポトーシスは染色体DNAの断片化・核の形態変化を伴う細胞死の一つである。その機構にはカスパーゼと呼ばれるシステインプロテアーゼ群が関与している。カスパーゼファミリーに属するプロテアーゼは、通常不活性な前駆体として存在しており、数カ所で切断を受け活性化される。前駆体カスパーゼの切断はシグナル伝達カスケード上、特定の上下関係が存在する。

カスパーゼはカスパーゼの前駆体を基

質とするだけでなく、細胞内の様々な蛋白質を基質とする。最近、APP自体もカスパーゼの基質となることが示されている。たとえば、NicholsonのグループはAPP細胞内ドメインがカスパーゼ-3により切断されると、アミロイド産性が増加することも示している)。さらにアルツハイマー病患者の脳において活性型カスパーゼ-3免疫活性の上昇が認められており、アルツハイマー病とカスパーゼの関連が示唆されている。したがって何らかの細胞死刺激によりカスパーゼ-3が活性化されるとアミロイドが産性されることが示唆され、ニューロン死誘導刺激の結果としてアミロイド産性・沈着が起こることも想像される。

本研究ではアルツハイマー病がヒトに特異的な疾患であることに注目し、ヒト胚性ガン細胞 NTera 2 (NT2) 由来のニューロン (NT2-N) にアデノウイルスベクターを用いてニューロン変性を誘導する実験系において、その変性メカニズムにカスパーゼ-3が関与していることを示し、カスパーゼ-3活性化に至る経路に細胞内カルシウム貯蔵部位から細胞質へのカルシウム放出が関与していることを見いだした。最後に本研究と最近の知見から、アルツハイマー病発症のメカニズムを考察した。

## B. 研究方法

### アデノウイルスベクターを用いたNT2細胞への遺伝子導入

未分化のNT2細胞は5% FBS / OPTI-MEMで培養した。75 cm<sup>2</sup> に3.5×10<sup>6</sup> cellをまき、翌日から10 μM all-trans レチノイン酸で処理した。レチノイン酸処理後、30日目に細胞をtrypsin/PBSで剥がし、3倍希釈になるように75 cm<sup>2</sup> ボトルにまき直した。その2日後、細胞集塊をピペッティングで選択的に剥がし、75 cm<sup>2</sup> ボトルにまき直した。さらに翌日、細胞をtrypsin/PBSで剥がし3時間 incubate 後、軽くピペッティングして濃縮されたニューロンを得た。35 mm dish には3.5×10<sup>6</sup> cell、6 cm dish には1.0×10<sup>6</sup> cellをまき、2週間以上10% FBS/OPTI-MEM +1 μM AraCで培養し、matureにした。アデノウイルスベクターはウイルス感染後、12時間で培地を交換した

### カスパーゼ 活性測定

APP・β-galを過剰発現したNT2-Nをピペッティングによりニューロンを選択的に回収しPBSで2回洗浄後、ジギトニン buffer (50mM Tris-HCl(pH7.5), 1mM EDTA, 10mM EGTA, 10 μM ジギトニン) で懸濁し、37°C・10分間 incubate した。15000rpm・10分遠心後、上清を回収しサンプルとした。回収したサンプル2 μgを蛍光基質 Z-DEVD-AFC あるいはAc-YVAD-MCA と37°C・30分反応させ、蛍光を測定した。

### 蛍光カルシウムインディケーターを用いた細胞内カルシウム濃度測定

ウイルス感染後2日目のNT2-Nに対し、5 μM fura 2-AM in BSS buffer (130mM NaCl, 5.4mM KCl, 2mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 5.5mM glucose, 10mM HEPES(pH7.5))を負荷し、37°C・1 hr 静置した。上清を新しいBSSに交換し、37°C・30min 静置した。BSS灌流下において、caffeine やKClをそれぞれ30秒添加し蛍光顕微鏡により蛍光を測定した。

## C. 研究結果

### APPによるカスパーゼ-3 活性化 - カルシウムホメオスタシスとの関連

ラット海馬初代培養ニューロンにAPPを過剰発現するとグルタミン酸添加による細胞内カルシウム濃度上昇の増強が観察されている。このことから、excitotoxicityとAPP蓄積によるニューロン変性作用との関連が示唆される。グルタミン酸受容体は細胞膜に局在し、チャンネル共役型とGタンパク共役型の2種が存在する。チャンネル共役型は、NMDA受容体とnon-NMDA受容体に分類されている。本研究では、まずAPPがチャンネル共役型グルタミン酸受容体に直接作用し、カルシウム放出を増強され、ニューロン変性が誘導されることを想定した。そこで、NMDA受容体とnon-NMDA受容体の阻害剤を培養上清に添加したが、カスパーゼ-3の活性を抑制しなかった。しかし、細胞質内のカルシウムキレーター BAPTA-AMの添加ではカスパーゼ-3活性は薬剤濃度依存的に抑制された。細胞



内へのカルシウム放出には、グルタミン酸受容体のように細胞外からカルシウムを流入させるものと、小胞体から放出させるものが存在する。そこで、小胞体のカルシウム放出チャンネル阻害剤 Dantrolene を培養上清に添加したところ薬剤濃度依存的にカスパーゼ-3 活性を抑制した。以上のことからAPP は小胞体のカルシウム放出を増強させ、カスパーゼ-3 の活性化を誘導すると考えられる。

以上の結果より、APP は小胞体からのカルシウム放出に影響を与えるものと考えられた。小胞体からのカルシウム放出は caffeine により誘導することができる。そこで、カルシウムに結合すると蛍光を発する、カルシウム指示薬 Fura2-AM を細胞に負荷することでカフェイン添加時の細胞内カルシウム濃度を測定した。測定終了後、脱分極刺激である（細胞外からカルシウムを流入させる）50mM KCl 添加に反応した細胞をニューロンと判断し、加算平均をもとめた。50mM KCl では、AxCAYAP 感染ニューロンでも細胞内カルシウム濃度の上昇について増強効果は認められないが、20mM caffeine 添加時には AxCALacZ 感染ニューロンに比べて細胞内カルシウム濃度が有意に増強された。これらから、細胞内に蓄積されたAPP は小胞体から細胞質ゾルへのカルシウム放出を増強させることが示された。以上の結果より、APP が細胞内に蓄積すると小胞体からの異常なカルシウム放出誘導し、カスパーゼ-3 活性化・神経変性を誘導すると考えられる。

#### D. 考察

小胞体からのカルシウム放出には IP3-receptor と ryanodine receptor が関与している。IP3-receptor は細胞内の IP3 産性系により産性された IP3 を結合すると局所的なカルシウム放出を誘導する。Ryanodine receptor は IP3-receptor により起こるカルシウムに反応してカルシウム放出を起こす、<sup>2</sup>Calcium-induced calcium release (CICR) を誘導する。これにより、小胞体からのカルシウム放出は相乗的に増大する。本研究で小胞体からのカルシウム放出を誘導する際に用いた caffeine は主に ryanodine receptor から

のカルシウム放出を誘導する。よって、APP の細胞内蓄積によって ryanodine receptor からの異常なカルシウム放出が起こり、細胞内のカルシウムホメオスタシスを攪乱させることで、カスパーゼ-3 の活性化を誘導することが示唆される。抗APP 抗体で免疫染色した結果では、過剰発現した APP は細胞内全体に免疫活性が認められる。ニューロンでは小胞体にも APP は蓄積しているものと考えられる。APP は直接 ryanodine receptor のカルシウム放出を活性化しているのかは不明である。また、もう一つの可能性として、小胞体のカルシウム貯蔵量が増加していることも考えられる。しかし、小胞体のカルシウム濃度は細胞質のその1000倍以上で保たれている。よって多少の貯蔵量が増えたとしても、caffeine で小胞体からの放出を誘導した際の顕著な放出量の増加は起きないものと推定される。従ってこの増加は APP がカルシウムの放出そのものを促進していると考えられる。

細胞に蓄積した APP は小胞体で直接 ryanodine receptor を活性化するのか、間接的に小胞体にシグナルを送り ryanodine receptor を活性化するのかは現在のところ不明である。今後の研究では、本実験系において APP は細胞内でどこに蓄積のか、どのような機構で ryanodine receptor を活性化するのかを明らかにする必要がある。最近の報告から小胞体に限って見ると、アルツハイマー病では変異型 presenilin は蓄積型細胞死のエフェクターであり、細胞死実行のトリガーは APP の蓄積であると推定できる

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Uetsuki, T., Takemoto, K., Nishimura, I., Okamoto, M., Niinobe, M., Momoi, T., Miura, M. and Yoshikawa, K. (1999)

Activation of Neuronal caspase-3 by Intracellular Accumulation of wild-Type Alzheimer Amyloid Precursor Protein. *Journal of Neuroscience* 19: 6955-6964

2. Hara, M., Taniura, H., Uetsuki, T., Niinobe, M. and Yoshikawa, K. (1999)

Regulation and Deregulation of E2F1 in

Postmitotic Neurons Differentiated from  
Embryonal Carcinoma P19 cells.  
Experimental Cell Research 251: 442-451

3. Niinobe M, Koyama K, Yoshikawa K (2000)  
Cellular and subcellular localization of necdin in  
fetal and adult mouse brain. Developmental  
Neuroscience (in press)

## 2. 学会発表

ニューロン特異的核蛋白質Necdinとカルシウム結合蛋白質Nucleobindinファミリーの相互作用 第72回日本生化学会 横浜  
(1999、10) 谷口直子、谷浦秀夫、植月太一、新延道夫、吉川和明

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

ニューロン死誘導因子p53とnecdinの相互作用

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

Necdinは、神経細胞の発生分化に伴って発現誘導されるニューロン特異的蛋白質である。Necdinは、DNA virus由来のがん蛋白質SV40 largeT抗原、adenovirus E1AやS期進行に関与する転写因子E2F1と結合し、E2F1の転写活性を抑制する。がん抑制遺伝子産物p53もまた細胞増殖やアポトーシスに関与する転写因子であるが、necdinはp53のN末端領域の転写活性化ドメインに結合し、その転写活性を抑制することがわかった。U2OS細胞は、p53の過剰発現によってアポトーシスが誘導されることが知られているが、necdinとの共発現によってp53依存性アポトーシスは抑制された。これらのことからnecdinが、ニューロンのアポトーシスの調節に関わっていることが示唆された。

A. 研究目的

Necdinは、レチノイン酸処理により神経細胞への分化刺激を行った胚性がんP19細胞より得られた325個のアミノ酸からなる蛋白質である。Necdinは、神経系の発生分化に伴って発現誘導されるニューロン特異的蛋白質である。Necdinを増殖細胞に強制発現させると、その増殖が強く抑制されることや、necdinがDNA virus由来のがん蛋白質SV40 largeT抗原やadenovirus E1Aと結合すること、更にS期進行に関与する転写因子E2F1と結合し、その転写活性を抑制することから、ニューロンの基本的性質である不可逆的分裂抑制機構に関与するのではないかと推察される。がん抑制遺伝子産物p53は、UVや各種DNA障害性薬物で発現誘導され細胞をアポトーシスに導く蛋白質として知られている。またニューロンにおいてもp53の過剰発現やDNA障害性薬物でp53依存性アポトーシスが誘導される。E2F1のC末端転写活性化ドメインは、p53のN末端転写活性化ドメインとアミノ酸配列上類似性があることが報告されている。本研究ではnecdinとp53との相互作用について検討を行った。

B. 研究方法

1. 酵母two-hybrid法によるnecdinとp53の結合

GAL4 DNA binding domain (pGAD424)に融合したp53各種deletion mutantsとGAL4 activation domain (pGBT9)に融合したnecdinを酵母SFY526に発現させ、colony lift filter assayで $\beta$ -galactosidase活性を測定して両者の結合を調べた。

2. in vitro 結合実験

各種p53 deletion mutantsはマルトース結合蛋白質(MBP)との融合蛋白質として大腸菌で発現させた。Necdin蛋白質はヒスチジンtagged融合蛋白質としてbaculovirus系を用いて昆虫細胞sf9で発現させ、metal-binding resinで精製した。MBP-p53融合蛋白質をamylose resinに固定し、そこにnecdin蛋白質を加え結合蛋白質をマルトースで溶出し、immunoblotで結合したnecdinを検出した。

3. ゲルシフト

p53結合配列を含むoligonucleotideをT4 polynucleotide kinaseでラベルしたものをプローブとして用いた。各種p53 deletion

mutantsを発現ベクター(pRc/CMV)に組み込みp53<sup>-/-</sup>Saos-2細胞で発現させ、その核抽出を用いてゲルシフトアッセイを行った。Necdinによるsupershiftは、反応液中にHis-tagged necdin蛋白質を加えて行った。

#### 4. レポーターアッセイ

p21/WAF1プロモーター(2.4kbp)をpGL-basicに組み込んだluciferase reporter vectorとp53発現ベクターおよびnecdin発現ベクターを共にSaos-2細胞に遺伝子導入し、luciferase活性を測定することによりプロモーター活性を測定した。遺伝子導入の効率をLacZ発現ベクターを共導入することによって補正した。

#### 5. 細胞増殖への影響

細胞増殖への影響は、colony formation assayとbromodeoxyuridine(BrdUrd)の取り込み実験を行った。Colony formation assayは、Saos-2細胞にp53およびnecdin発現ベクターを遺伝子導入し、48時間後より2週間G418で選択した。出現したcolonyはcrystal violetで染色した。BrdUrdは遺伝子導入後36時間目に2時間取り込ませ、固定後抗BrdUrd抗体で染色した。

#### 6. p53依存性アポトーシスへの影響

U2OS細胞にp53単独あるいはnecdin発現ベクターと共導入し、p53陽性細胞の生存率を時間経過とともに観察した。また同時にHoechst dyeでクロマチンを染色し核の変性を確認した。

### C. 研究結果

#### 1. Necdinとp53の結合

まず酵母two-hybrid法にてnecdinとp53の結合を調べた。全長p53(1-393)およびN末端を欠いたp53(35-393)はnecdinと強い結合活性を示したが、更にN末端を欠いたp53(55-393)およびp53(75-393)とは結合しなかった。次にMBP-p53融合蛋白質を用いてin vitro結合実験を行った。酵母two-hybrid法での結果と一致して、necdinはp53(1-393)およびp53(35-393)とは結合したが、p53(55-393)およびp53(75-393)とは結合しなかった。p53のN末端領域をさらに解析すると、necdinはp53(35-62)に結合し、MDM2結合ドメインであるp53(1-37)には結合しないことがわかった。したがってnecdinはp53のN末端転写活性化領域に結合すると考えられた。

2. Necdinとp53-DNA複合体との相互作用  
p53は塩基配列特異的にDNAに結合する。そこでp53-DNA複合体へのnecdinの影響をゲルシフトを用いて調べた。p53(1-393)、p53(55-393)およびp53(75-393)をSaos-2細胞に発現させその核抽出液をもちいてゲルシフトを行ったところ、これらのp53はDNA結合ドメインを有しており、塩基配列特異的にDNAと結合した。これらの反応液中にnecdin蛋白質を加えたところp53(1-393)およびp53(55-393)-DNA複合体がsupershiftすることがわかった。それに対してp53(75-393)-DNA複合体に対しては影響が認められなかった。このことからnecdinはDNA上でp53と複合体を形成することが示唆された。

#### 3. Necdinのp53転写活性へ及ぼす影響

p21/WAF1プロモーターを用いてluciferase reporter assayを行った。p53<sup>-/-</sup>Saos-2細胞にp53を発現させると転写活性は約6倍に上昇し、necdinとの共発現によってその上昇した転写活性は容量依存的に完全に抑制された。しかしnecdinはプロモーターの基礎活性には影響を及ぼさなかった。またp53のnecdin結合領域であるp53(35-62)をさらに共発現させるとnecdinの転写抑制効果が解除されることがわかった。これらのことからnecdinはDNA上でp53の転写活性化ドメインに結合し、その転写活性を抑制すると考えられた。

#### 4. Necdinのp53増殖抑制効果へ及ぼす影響

p53の細胞増殖抑制効果はp21/WAF1の発現誘導を介するものと考えられている。Necdinがp53のp21/WAF1プロモーターの活性化を抑制することから次にp53の細胞増殖抑制効果に及ぼすnecdinの作用について調べた。Saos-2細胞を用いてcolony formation assayを行うと、空ベクターと比較してp53の発現によってその形成colony数は著しく減少したが、necdinとの共発現によってその数はさらに減少した。この細胞ではp53依存性アポトーシスも誘導されているため次にp53の過剰発現によってもアポトーシスが誘導されない293細胞を用いてBrdUrd取り込み実験を行った。2時間のBrdUrdの取り込みで約30%の細胞がBrdUrd陽性だった。p53の発現によりBrdUrd陽性細胞の割合を15-20%まで減