

「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」

(H10-脳-014)

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）  
平成11年度 研究報告書

平成12年4月

研究代表者  
田平武

(国立精神・神経センター神経研究所)

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

主任研究者 田平 武 国立精神・神経センター神経研究所 部長

研究要旨

- 1) アルツハイマー病脳の免疫組織化学染色により、神経細胞内 A $\beta$ 42 蓄積が神経細胞死を引き起こす一つの重要な機序であることをはじめて明らかにした。
- 2) 遺伝子変異による A $\beta$ 42 分泌増加にプレセニリン 2 は限定分解を必要としないことが分かった。
- 3) プレセニリンと結合する蛋白質  $\delta$ -catenin、新規 LIM 蛋白、APP と結合する新規蛋白質 Fe65L2、X11L2 をクローニングした。
- 4) カエルプレセニリン  $\alpha$  はリン酸化を受けアポトーシスを抑制すると考えられる。
- 5) KF-1 に FAD 特異的変異は見出さなかった。

分担研究者

橋本 保 京都府立医大 脳血管老化  
研究センター

巻淵隆夫 国立療養所犀潟病院

mRNA の発現パターンから、PS  $\alpha$  がアポトーシスの抑制に関与することを示唆した。本年度は、PS のリン酸化、及び性ホルモン（プロゲステロン）の影響を調べることを目的とする。

A. 研究目的

プレセニリン 1、2 (PS1, PS2) 変異によっておこるアルツハイマー病(AD)の発症機序を明らかにする。昨年度の本研究で、プレセニリン変異は A $\beta$ 42 の産生分泌を増強すること、プレセニリントランスジェニックマウスは老人斑の形成を伴わず、加齢により変異特異的に神経細胞死が有意に促進されていること、神経細胞内に A $\beta$ 42 の沈着があることを示した。本年度は AD 脳について解析する。また、プレセニリンは 1 カ所で限定分解されて、N 側断片と C 側断片がヘテロダイマーを形成して存在する。その切断部位は、PS1 が 298-299 の間、PS2 が 306-307 の間であることを本研究者らが明らかにした。本年度はその分解部位に人為的に変異ないし欠失を入れた遺伝子を構築し、その分解及び A $\beta$ 42 産生に対する影響を調べる。更に、カエルのプレセニリン

B. 研究方法

4%パラフォルムアルデヒド固定ないしホルマリン固定した剖検脳 AD (n=8)、PS1 変異 FAD (n=2)、進行性核上麻痺 (n=2)、非痴呆対照 (n=7) を 20% ショ糖液に浸透し、凍結切片を作製した。切片を浮遊法により免疫組織染色を行った。用いた抗体は Checler が作製した断端特異的 A $\beta$ 42、A $\beta$ 40 抗体（ウサギポロクローナル）である。二次抗体は蛍光標識抗体を用いた。アポトーシスの指標として、TUNEL 染色、Hoechst 33342 染色を行った。染色した標本はオリンパス共焦点レーザー顕微鏡で観察し、画像解析装置に取り込み解析した。

PS2 切断部位の研究には 306KL (WT)、306AL (K306A)、306EL (K306E)、306KL  $\rightarrow$  306AP (KL/AP)、304MAK  $\rightarrow$  AAA (MAK/3A)、304 より 6 アミノ酸の欠失 (Del 1)、300 より 13 アミノ

酸欠失 (Del 2)、297より20アミノ酸欠失 (Del 3)をもつ遺伝子を構築し pCEP4 に組み込み、SH-SY5Y 細胞に導入、安定的に発現する細胞株を解析に用いた。PS1, 2 の切断はそれぞれの N 末抗体、C 末抗体を用いてウエスタンブロット法でしらべた。培養液中 A $\beta$ 40、A $\beta$ 42 は ELISA で測定した。

アフリカツメガエル発生初期における PX  $\alpha$ C 末端片のリン酸化は、PS  $\alpha$ ループ抗体による免疫沈降 ウエスタンブロット解析を行い、アルカリフォスファターゼ処理して確認した。また、プロゲステロンを投与し、その影響をしらべた。

ヒト KF-1 遺伝子はマウスの構造をもとにイントロンを含む DNA 断片を PCR 増巾し、塩基配列を決定した。家族性アルツハイマー病患者由来 DNA について KF-1 の塩基配列をしらべ、変異の有無を検討した。

#### (倫理面への配慮)

剖検は剖検時承諾書をとって行われた。動物実験は神経研究所動物倫理委員会の許可を得て行った。家族性アルツハイマー病患者 DNA は患者家族、及び主治医の口頭での同意を得て EDTA 採血した全血より抽出した (同意の記録はカルテに記載)。アルツハイマー病関連遺伝子の解析は、武蔵地区倫理委員会の承認を得て行った。

#### C. 研究結果

AD 脳の側頭葉第 3 層を中心にニューロンの数を数えた。その結果、AD では有意にニューロン数の減少が見られた。次いで A $\beta$ 40 と A $\beta$ 42 の免疫染色を行った。できるだけ初期の病変部分を用い、老人斑による観察の障害をできるだけなくした。その結果、A $\beta$ 42 の細胞内沈着を示すニューロンが、AD で有意に高値であり (P<0.01 対対照及び PSP)、PS1 変異 FAD では一層高値であった (P<0.01 対 AD)。A $\beta$ 42 を有するニューロンの数は有意でなかった。A $\beta$ 42 陽性でアポトーシス (TUNEL, Hsechst 33342) 陽性細胞は AD で有意に高値で

あった (P<0.01)。AT-8 で染色される NFT 陽性ニューロンでアポトーシス陽性ニューロンは多くはなかった。

PS2 の切断部位に変異ないし欠失を入れた遺伝子を導入した場合、Del 3 を除いてすべて切断を受けた。すべての遺伝子導入に際し、内因性 PS との置換がみられ、変異特異的に A $\beta$ 42 産生増強が見られた。

Yeast two hybrid system を用いて PS1, PS2, APP と結合する蛋白をスクリーニングし、PS1 と結合する  $\delta$ -catenin, PS2 と結合する新規 LIM 量は、APP と結合する Fe65L2, X11L2 を見出し遺伝子をクローニングした。 $\delta$ -catenin は脳特異的に、他は全身で発現がみられた。

カエル卵発生初期には PS  $\alpha$ C 末がリン酸化されていた。これはアルカリフォスファターゼ処理により確認された。プロゲステロンで処理するとリン酸化の増強が見られた。しかし、PS1 を安定的に強発現する SH-SY5Y ではリン酸化は確認されなかった。

KF-1 遺伝子には種差がほとんど見られなかった。ゲノム塩基配列をしらべた所、PS1, PS2, APP 変異のない日本人 FAD で、KF-1 変異は認めなかった。

#### D. 考察

AD 脳では老人斑、神経原線維変化、神経細胞死の 3 つの特徴が見られるが、そのどれが最も重要であるのかは今日も論議されている。昨年の本研究で、PS1 トランスジェニックマウスの解析から、老人斑や神経原線維変化を伴わず、ニューロンの中に A $\beta$ 42 沈着があり、神経細胞死が促進されていることを示した。これを受けて、本年はヒト脳で検討した。その結果、ヒト脳でも、ニューロン内に A $\beta$ 42 の沈着があり、アポトーシスを示すニューロンが AD で有意に高値であったところから、A $\beta$ 42 の細胞内沈着が一つの重要な細胞死誘導機序であると考えられる。今後は、細胞内 A $\beta$ 42 がどのような機序で神経細胞死をひき起こすかを研究することが重要である。

プレセニリンは 1 カ所で限定分解されて、

ヘテロダイマーを形成し機能を発揮する。その分解部位が、PS1 では 298M と 299A の間、PS2 が 306K と 307L の間であることを本研究者らが明らかにした。その切断酵素をさぐる為に切断部にアミノ酸置換ないし欠失を入れた PS2 を構築し、SH-SY5Y 細胞に安定的に発現する細胞株を樹立して調べた。その結果、K306A, K306E, KL/AP, MAK/3A, Del 1, Del 2 いずれもほぼ同じ部位で切断を受け、全長遺伝子を導入した場合、内因性 PS2 との置換がおこった（機能ドメインへ入ったことを示す）。Del 3 は切断は受けなかったが、機能ドメインに入ったことが示された。いずれの場合も、FAD 変異 (N141I, M239V) があると培養液中の  $A\beta_{x-42}/A\beta_{x-40}$  の上昇が見られた。従って、PS2 の分解はアミノ酸配列特異的ではなく、部位特異的であるように思われる。また、 $A\beta_{42}$  の上昇に PS2 の分解は必須ではない。これは PS2 が PS1 のエクソン 10 を欠失する FAD の場合と同様であることを示している。

今回、PS 及び APP と結合する蛋白質を yeast two hybrid 法で明らかにした。これらは PS1 ループ部分と結合する  $\delta$ -catenin, PS2 ループ部分と結合する新規 LIM 蛋白、APP C 末部分と結合する Fe65L2, X11L2 である。 $\delta$ -catenin は armadillo repeat を有し、脳特異的に発現が見られた。 $\beta$ -catenin は Wnt シグナルに関連し、GSK-3 $\beta$  と結合すると言われているが、 $\delta$ -catenin はまだ明らかでない。PS1 は全身臓器で発現しており、脳特異的発現を示す  $\delta$ -catenin のような物質によって、AD の病変が脳特異的に現れている可能性がある。PS2 と結合する新規 LIM 蛋白は骨格筋で発現が強いが、その意義は不明である。

Fe65 はファミリーを形成しており、Fe65, Fe65L1, Fe65L2 がある。いずれも、WW ドメイン 1 個と PID ドメインを 2 個有する。そのうち N 末側の PID1 は LRP などの細胞質側に存在する NPxY モチーフに結合する。一方の C 末側 PID2 は APP の C 末にある NPxY モチーフに結合する。LRP はアポ E,  $\alpha$ 2M と細胞外で結合するので、ここに Fe65 を介してアル

ツハイマー病の遺伝的危険因子とされる。APP, アポ E,  $\alpha$ 2M, LRP が会合できることになる。Fe65 を強制発現すると sAPP $\alpha$  と  $A\beta$  の分泌が増加するといわれ、Fe65 は AD の発症機序にからむ可能性がある。Fe65L2 には多型がみられたので、日本人 FAD について検討したが、調べた範囲で特異的変異は見い出さなかった。

X11 ファミリーは X11, X11L, X11L2 が知られ、いずれも 1 個の PID ドメインに 2 個の PDZ ドメインを有する。PID ドメインは APP の NPxY モチーフに結合する。X11 は *C. elegans* の Lin10 のホモログであり、CASK と結合する。CASK の PDZ ドメインはシナプス前膜に存在する neurexin と結合するので、APP は X11 を介してシナプスで発現し、機能を発揮している可能性がある。

カエルの卵の発生を見ると、初期段階で PS $\alpha$  が強発現していることを本研究者らは見い出した。この時期はアポトーシスが強く押さえられている時期であり、PS1 はアポトーシスに対し抑制的に働いていると考えられる。これにプロゲステロンを加えると PS1 C 末断片のリン酸化が促進された。従って、プロゲステロンは PS1 のリン酸化を介してアポトーシスを抑えている可能性がある。そこで、PS1 をトランスフェクトした SH-SY5Y 細胞で同様にプロゲステロンの作用をみたが、明らかなるリン酸化の増強を見い出さなかった。従って、ヒトとカエルでは異なっており、カエルでの解析は AD の機序解明にあまり有用ではないかもしれない。

KF-1 は AD 脳で発現が増加する遺伝子とにクローニングしたものである。そのホモログをカエル、マウスでみると、極めて種差が少ないことが分かった。その分布は主に ER であり、PS と類似した局在を示した。今回調べた限り FAD 患者に KF-1 の変異を示すものはなかった。今後 AD 発症のどこに絡むのかが明らかにする必要がある。

## E. 結論

1) AD では細胞内  $A\beta$  の蓄積によって神経細

胞死が促進されていると考えられた。

- 2) PS2 の切断部位はアミノ酸配列特異性が見られなかった。PS2 変異による A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 の上昇は切断を必要としない。
- 3) PS1, PS2, APP と結合する  $\delta$ -catenin, 新規 LIM 蛋白, Fe65L2, X11L2 を見出した。
- 4) カエルの卵発生初期に PS $\alpha$ がリン酸化を受け、アポトーシスを抑制している可能性が考えられた。しかし、PS1 をトランスフェクトした SH-SY5Y では確認できなかった。
- 5) KF-1, Fe65L2 は FAD の新規遺伝子である可能性は見い出さなかった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Tanahashi H, Tabira T: Isolation of human delta-catenin and its binding specificity with presenilin 1. *NeuroReport* 10:563-568, 1999
- 2) Tanahashi H, Tabira T: Molecular cloning of human Fe65L2 and its interaction with the Alzheimer's  $\beta$ -amyloid precursor protein. *NeurosciLett* 261:143-146, 1999
- 3) Shirotani K, Takahashi K, Tabira T: Effects of presenilin N-terminal fragments of production of amyloid  $\beta$  peptide and accumulation of endogenous presenilins. *Neurosci Lett* 262:37-40, 1999
- 4) Tanahashi H and Tabira T: X11L2, a New Member of the X11 Protein Family, Interacts with Alzheimer's  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein. *BBRC* 255:663-667, 1999
- 5) Chui DH, Tanahashi H, Ozawa K, Ikeda S, Checler F, Ueda O, Suzuki H, Araki W, Inoue H, Shirotani K, Takahashi K, Gallyas F and Tabira T: Transgenic mice with Alzheimer presenilin 1 mutations show accelerated neurodegeneration without amyloid plaque formation. *Nature Med* 5(5):560-564, 1999
- 6) Tanahashi H and Tabira T: Genome Structure and Chromosomal Mapping of the Gene for Fe65L2 Interacting with Alzheimer's  $\beta$ -amyloid Precursor Protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 258(3):385-389, 1999
- 7) Tanahashi H, Tabira T: Genomic organization of the human X11L2 gene (APBA3), a third member of the X11 protein family interacting with Alzheimer's  $\beta$ -amyloid precursor protein. *NeuroReport* 10:2575-2578, 1999
- 8) Tanahashi H and Tabira T: Two RFLPs (AciI;c954C/T and FokI; c1023FokIT/C) within the coding region of the gene for human FE65L2, interacting with Alzheimer's beta-amyloid precursor protein. *Human Mutation* 15:121, 2000 (#88 Online).
- 9) Shirotani K, Takahashi K, Araki W, Tabira T: Mutational analysis of intrinsic regions of presenilin 2 which determine its endoproteolytic cleavage and pathological function. *J Biol Chem* 275(5):3681-3686, 2000
- 10) Tanahashi H, Tabira T: Alkaline treatment after X-gal staining reaction for escherichia coli  $\beta$ -galactosidase enhances sensitivity. *Analytical Biochemistry* 279: 122-123, 2000
- 11) 田平 武、棚橋 浩：特集 神経変性疾患：ニューロンの変性・死の普遍的メカニズム アルツハイマー病 $\beta$ アミロイド産生と発症機序、細胞工学、18(6):796-802、1999

### 2. 学会発表

- 1) 荒木 亘、城谷圭朗、高橋慶吉、田平 武：プレセニン1 遺伝子変異に関連して発現の変化する遺伝子の解析。第 40 回日本

神経学会総会、平成 11 年 5 月 19 東京  
国際フォーラム

- 2) Cui DH, Tanahashi H, Ozawa K, Ikeda S, Checler F, Ueda O, Suzuki H, Araki W, Inoue H, Shirotani K, Takahashi K, Tabira T: Aged transgenic mice carrying Alzheimer's presenilin 1 mutation show accelerated neurodegeneration. 第 40 回日本神経病理学会総会学術研究会、1999 年 6 月 3 日～5 日 横浜
- 3) Takeshi Tabira: Studies in presenilin 1 transgenic mice. 第 42 回日本神経科学会、第 29 回日本神経精神薬理学会合同公開シンポジウム、平成 11 年 9 月 15 日 広島
- 4) 荒木 亘、湯浅勝敏、武田伸一、城谷圭朗、高橋慶吉、田平 武：Presenilin-2 過剰発現の初代培養神経細胞に対する影響。第 42 回日本神経科学会（広島）大会、平成 11 年 9 月 17 日 広島
- 5) 田平 武：プレセニリン変異と神経細胞死（シンポジウム）。第 18 回日本痴呆学会、平成 11 年 10 月 7 日 熊本
- 6) 城谷圭朗、高橋慶吉、荒木 亘、田平 武：プレセニリン 2 のプロセッシングと A $\beta$ 42 産生。第 18 回日本痴呆学会、平成 11 年 10 月 7 日 熊本
- 7) W. Araki, K. Yuasa, S. Takeda, K. Shirotani, K. Takahash and T. Tabira: Effect of presenilin-2 overexpression on cultured cortical neurons. 29<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society for Neuroscience, 平成 11 年 10 月 27 日, Miami Beach Florida
- 8) 辻村 敦、渡辺義久、橋本 保：Zinc finger protein KF-1 の遺伝子構造と蛋白質機能の解析。第 22 回日本分子生物学会、平成 11 年 12 月 9 日 福岡

- 9) 渡辺義久、辻村 敦、橋本 保：ツメガエル初期発生における X-PS $\alpha$ C 未断片のリン酸化。第 22 回日本分子生物学会、平成 11 年 12 月 9 日 福岡

G. 知的所有権の取得状況

- 10) 特許取得 なし
- 11) 実用新案登録 なし
- 12) その他 なし

## 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

主任研究者 田平 武 国立精神・神経センター神経研究所 部長

### 研究要旨

- 1). アルツハイマー病脳免疫組織化学染色により、神経細胞内 A $\beta$ 42 蓄積が神経細胞死を引き起こす一つの重要な機序であることをはじめて明らかにした。
- 2). 遺伝子変異による A $\beta$ 42 分泌増加にプレセニリン 2 は限定分解を必要としないことが分かった。
- 3). プレセニリンと結合する蛋白質  $\delta$ -catenin、新規 LIM 蛋白、APP と結合する新規蛋白質 Fe65L2, X11-L2 をクローニングした。

### A. 研究目的

プレセニリン 1, 2 (PS1, PS2) 変異によっておこるアルツハイマー病(AD)の発症機序を明らかにする。昨年度の本研究で、プレセニリン変異は A $\beta$ 42 の産生分泌を増強すること、プレセニリントランスジェニックマウスは老人斑の形成を伴わず、加齢により変異特異的に神経細胞死が有意に促進されていること、神経細胞内に A $\beta$ 42 の沈着があることを示した。本年度は AD 脳について解析する。

プレセニリンは 1 カ所で限定分解されて、N 側断片と C 側断片がヘテロダイマーを形成して存在する。その切断部位は、PS1 が 298-299 の間、PS2 が 306-307 の間であることを本研究者らが明らかにした。本年度はその分解部位に人為的に変異ないし欠失を入れた遺伝子を構築し、その分解及び A $\beta$ 42 産生に対する影響を調べる。

プレセニリン、アミロイド前駆体蛋白(APP)の変異により A $\beta$ 42 産生が増強される機序を明らかにするために、PS 及び APP と結合する蛋白質を明らかにする。

### B. 研究方法

4%パラフォルムアルデヒド固定ないしホルマリン固定した剖検脳 AD (n=8)、PS1 変異 FAD

(n=2)、進行性核上麻痺 (n=2)、非痴呆対照 (n=7) を 20% ショ糖液に浸透し、凍結切片を製作した。切片を浮遊法により免疫組織染色を行った。用いた抗体は Checler が作製した断端特異的 A $\beta$ 42、A $\beta$ 40 抗体 (ウサギポロクローナル) である。二次抗体は蛍光標識抗体を用いた。アポトーシスの指標として、TUNEL 染色、Hoechst 33342 染色を行った。染色した標本はオリンパス共焦点レーザー顕微鏡で観察し、画像解析装置に取り込み解析した。

PS2 切断部位の研究には 306KL (WT), 306AL (K306A), 306EL (K306E), 306KL  $\rightarrow$  306AP (KL/AP), 304MAK  $\rightarrow$  AAA (MAK/3A), 304 より 6 アミノ酸の欠失 (Del 1), 300 より 13 アミノ酸欠失 (Del 2), 297 より 20 アミノ酸欠失 (Del 3) をもつ遺伝子を構築し pCEP4 に組み込み、SH-SY5Y 細胞に導入、安定的に発現する細胞株を解析に用いた。PS1, 2 の切断はそれぞれの N 末抗体、C 末抗体を用いてウエスタンブロット法でしらべた。培養液中 A $\beta$ 40、A $\beta$ 42 は ELISA で測定した。

PS1, PS2, APP と結合する蛋白質を明らかにするために、PS1, PS2 の親水性大ループ部分及び APP の C 末部分と結合する蛋白質を yeast two hybrid system により明らかにし、遺伝子をクローニングする。

(倫理面への配慮)

剖検は剖検時承諾書をとって行われた。動物実験は神経研究所動物倫理委員会の許可を得て行った。家族性アルツハイマー病患者 DNA は患者家族、及び主治医の口頭での同意を得て EDTA 採血した全血より抽出した(同意の記録はカルテに記載)。アルツハイマー病関連遺伝子の解析は、武蔵地区倫理委員会の承認を得て行った。

### C. 研究結果

AD 脳の側頭葉第 3 層を中心にニューロンの数を数えた。その結果、AD では有意にニューロン数の減少が見られた。次いで A $\beta$ 40 と A $\beta$ 42 の免疫染色を行った。できるだけ初期の病変部分を用い、老人斑による観察の障害をできるだけなくした。その結果、A $\beta$ 42 の細胞内沈着を示すニューロンが、AD で有意に高値であり(P<0.01 対対照及び PSP)、PS1 変異 FAD では一層高値であった(P<0.01 対 AD)

(図 1)。A $\beta$ 42 を有するニューロンの数は有意でなかった。A $\beta$ 42 陽性でアポトーシス(TUNEL, Hsechst 33342)陽性細胞は AD で有意に高値であった(P<0.01) (図 2)。AT-8 で染色される NFT 陽性ニューロンでアポトーシス陽性ニューロンは多くはなかった(図 2)。

PS2 の切断部位に変異ないし欠失を入れた遺伝子を導入した場合、Del 3 を除いてすべて切断を受けた。すべての遺伝子導入に際し、内因性 PS との置換がみられ、変異特異的に A $\beta$ 42 産生増強が見られた(図 3)。

APP と結合する蛋白の中でも種々の蛋白-蛋白結合ドメインを持つ Fe65 protein family, X11 protein family と呼ばれるアダプター蛋白が APP の代謝に関与している可能性が報告されてきている。われわれは、X11 protein family (X11, X11L)の新しいメンバー X11L2 (X11 like protein 2)の cDNA と genomic DNA をクローニングした。X11L2 は X11, X11L と同様、1 つの PID/PTB ドメインと 2 つの PDZ ドメインを持ち APP の細胞内ドメインと PID/PTB ドメ

インで結合した。X11L2 は X11, X11L が主に脳の神経細胞で発現するのに対してあらゆる組織で発現していた。X11L2 の遺伝子は 11 個のエキソンからなる全長約 11kb の遺伝子でヒト染色体上 19p 13.3 にマップされた。また Fe65 protein family (Fe65, Fe65L, Fe65L2)のヒトホモログ Fe65L2 の cDNA, genomic DNA をクローニングした。ヒト Fe65L2 は種々の組織で発現しており 2.2kb transcript は主に脳で発現していた。いずれのメンバーも 1 つの WW domain と 2 つの PID/PTB ドメインを持つ。Fe65L2 は APP の他に APLP (APP-like protein 1), APLP2 との結合能も持っていた。ヒト Fe65L2 遺伝子は 13 個のエキソンからなる全長 6kb の遺伝子でありヒト染色体上の 5q23-31 にマップされた。

PS1 と結合する蛋白として  $\delta$ -catenin、PS2 と結合する蛋白としてヒト LIM protein 及びこのラットホモログをクローニングした。 $\delta$ -catenin は主に脳で発現しており他臓器では、膵臓を除いて発現がみられない。LIM 蛋白は心臓、骨格筋で多く発現しているが、脳でも各部位で広く発現がみられ、レチノイン酸で分化させた neuroblastoma cell line での発現も見られた。おもしろいことに  $\delta$ -catenin は PS1 の C 端フラグメントの 299-407 残基と結合して PS2 とは結合しない。PS2 と結合するこの LIM protein は PS2 の N 端フラグメントの 269-298 残基に結合した。この領域は PS1 と 3 アミノ酸しか変わらないが PS1 とは結合しなかった。そこで PS2 のこの 3 アミノ酸を PS1 に相当する P287T, 1288L, A297T に置換したところ P287T, 1288L では LIM 蛋白との結合が失われた。また PS2 の 269-298 残基内をアラニンに置換した種々の変異体を用いた実験により 280-292 残基が結合に重要であることがわかった。

### D. 考察

AD 脳では老人斑、神経原線維変化、神経細胞死の 3 つの特徴が見られるが、そのどれが最も重要であるのかは今日も論議されている。昨年の本研究で、PS1 トランスジェニッ



クマウスの解析から、老人斑や神経原線維変化を伴わず、ニューロンの中に A $\beta$ 42 沈着があり、神経細胞死が促進されていることを示した。これを受けて、本年はヒト脳で検討した。その結果、ヒト脳でも、ニューロン内に A $\beta$ 42 の沈着があり、アポトーシスを示すニューロンが AD で有意に高値であったところから、A $\beta$ 42 の細胞内沈着が一つの重要な細胞死誘導機序であると考えられる。今後は、細胞内 A $\beta$ 42 がどのような機序で神経細胞死をひき起こすかを研究することが重要である。

プレセニリンは 1 カ所で限定分解されて、ヘテロダイマーを形成し機能を発揮する。その分解部位が、PS1 では 298M と 299A の間、PS2 が 306K と 307L の間であることを本研究者らが明らかにした。その切断酵素をさぐる為に切断部にアミノ酸置換ないし欠失を入れた PS2 を構築し、SH-SY5Y 細胞に安定的に発する細胞株を樹立して調べた。その結果、K306A, K306E, KL/AP, MAK/3A, Del 1, Del 2 いずれもほぼ同じ部位で切断を受け、全長遺伝子を導入した場合、内因性 PS2 との置換がおこった（機能ドメインへ入ったことを示す）。Del 3 は切断は受けなかったが、機能ドメインに入ったことが示された。いずれの場合も、FAD 変異 (N141I, M239V) があると培養液中の A $\beta$ x-42/A $\beta$ x-40 の上昇が見られた。従って、PS2 の分解はアミノ酸配列特異的ではなく、部位特異的であるように思われる。また、A $\beta$ 42 の上昇に PS2 の分解は必須ではない。これは PS2 が PS1 のエクソン 10 を欠失する FAD の場合と同様であることを示している。

今回、PS 及び APP と結合する蛋白質を yeast two hybrid 法で明らかにした。これらは PS1 ループ部分と結合する  $\delta$ -catenin, PS2 ループ部分と結合する新規 LIM 蛋白、APP C 末部分と結合する Fe65L2, X11L2 である。 $\delta$ -catenin は armadillo repeat を有し、脳特異的に発現が見られた。 $\beta$ -catenin は Wnt シグナルに関連し、GSK-3 $\beta$  と結合すると言われているが、 $\delta$ -catenin はまだ明らかでない。PS1 は全身臓器で発現しており、脳特異的発現を示す  $\delta$ -

catenin のような物質によって、AD の病変が脳特異的に現れている可能性がある。PS2 と結合する新規 LIM 蛋白は骨格筋で発現が強いが、その意義は不明である。

Fe65 はファミリーを形成しており、Fe65, Fe65L1, Fe65L2 がある。いずれも、WW ドメイン 1 個と PID ドメインを 2 個有する。そのうち N 末側の PID1 は LRP などの細胞質側に存在する NPxY モチーフに結合する。一方の C 末側 PID2 は APP の C 末にある NPxY モチーフに結合する。LRP はアポ E,  $\alpha$ 2M と細胞外で結合するので、ここに Fe65 を介してアルツハイマー病の遺伝的危険因子とされる APP, アポ E,  $\alpha$ 2M, LRP が会合できることになる（図 4）。Fe65 を強制発現すると sAPP $\alpha$  と A $\beta$  の分泌が増加するといわれ、Fe65 は AD の発症機序にからむ可能性がある。Fe65L2 には多型がみられたので、日本人 FAD について検討したが、調べた範囲で特異的変異は見い出さなかった。

X11 ファミリーは X11, X11L, X11L2 が知られ、いずれも 1 個の PID ドメインに 2 個の PDZ ドメインを有する。PID ドメインは APP の NPxY モチーフに結合する。X11 は *C. elegans* の Lin10 のホモログであり、CASK と結合する。CASK の PDZ ドメインはシナプス前膜に存在する neuroxin と結合するので、APP は X11 を介してシナプスで発現し、機能を発揮している可能性がある。

## E. 結論

1. AD では細胞内 A $\beta$  の蓄積によって神経細胞死が促進されていると考えられた。
2. PS2 の切断部位はアミノ酸配列特異性が見られなかった。PS2 変異による A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 の上昇は切断を必要としない。
3. PS1, PS2, APP と結合する  $\delta$ -catenin, 新規 LIM 蛋白, Fe65L2, X11L2 を見い出した。

## F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tanahashi H, Tabira T. Isolation of human delta-catenin and its binding specificity with presenilin 1. *NeuroReport* 10:563-568, 1999
  - 2) Tanahashi H, Tabira T. Molecular cloning of human Fe65L2 and its interaction with the Alzheimer's  $\beta$ -amyloid precursor protein. *NeurosciLett* 261:143-146, 1999
  - 3) Shirotani K, Takahashi K, Tabira T. Effects of presenilin N-terminal fragments of production of amyloid  $\beta$  peptide and accumulation of endogenous presenilins. *Neurosci Lett* 262:37-40, 1999
  - 4) Tanahashi H and Tabira T. X11L2, a New Member of the X11 Protein Family, Interacts with Alzheimer's  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein. *BBRC* 255:663-667, 1999
  - 5) Chui DH, Tanahashi H, Ozawa K, Ikeda S, Checler F, Ueda O, Suzuki H, Araki W, Inoue H, Shirotani K, Takahashi K, Gallyas F and Tabira T. Transgenic mice with Alzheimer presenilin 1 mutations show accelerated neurodegeneration without amyloid plaque formation. *Nature Med* 5(5):560-564, 1999
  - 6) Tanahashi H and Tabira T. Genome Structure and Chromosomal Mapping of the Gene for Fe65L2 Interacting with Alzheimer's  $\beta$ -amyloid Precursor Protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 258(3):385-389, 1999
  - 7) Tanahashi H, Tabira T. Genomic organization of the human X11L2 gene (APBA3), a third member of the X11 protein family interacting with Alzheimer's  $\beta$ -amyloid precursor protein. *NeuroReport* 10:2575-2578, 1999
  - 8) Tanahashi H and Tabira T. Two RFLPs (AciI;c954C/T and FokI; c1023FokIT/C) within the coding region of the gene for human FE65L2, interacting with Alzheimer's beta-amyloid precursor protein. *Human Mutation* 15:121, 2000 (#88 Online).
  - 9) Shirotani K, Takahashi K, Araki W, Tabira T. Mutational analysis of intrinsic regions of presenilin 2 which determine its endoproteolytic cleavage and pathological function. *J Biol Chem* 275(5):3681-3686, 2000
  - 10) Tanahashi H, Tabira T. Alkaline treatment after X-gal staining reaction for escherichia coli  $\beta$ -galactosidase enhances sensitivity. *Analytical Biochemistry* 279: 122-123, 2000
  - 11) 田平 武、棚橋 浩：特集 神経変性疾患：ニューロンの変性・死の普遍的メカニズム アルツハイマー病 $\beta$ アミロイド産生と発症機序、細胞工学、18(6):796-802、1999
2. 学会発表
    - 1) 荒木 亘、城谷圭朗、高橋慶吉、田平 武：プレセニリン1遺伝子変異に関連して発現の変化する遺伝子の解析。第40回日本神経学会総会、平成11年5月19日 東京国際フォーラム
    - 2) Cui DH, Tanahashi H, Ozawa K, Ikeda S, Checler F, Ueda O, Suzuki H, Araki W, Inoue H, Shirotani K, Takahashi K, Tabira T: Aged transgenic mice carrying Alzheimer's presenilin 1 mutation show accelerated neurodegeneration. 第40回日本神経病理学会総会学術研究会、1999年6月3日～5日 横浜
    - 3) Takeshi Tabira: Studies in presenilin 1 transgenic mice. 第42回日本神経科学会第29回日本神経精神薬理学会合同公開シンポジウム、平成11年9月15日 広島
    - 4) 荒木 亘、湯浅勝敏、武田伸一、城谷圭朗、高橋慶吉、田平 武：Presenilin-2 過

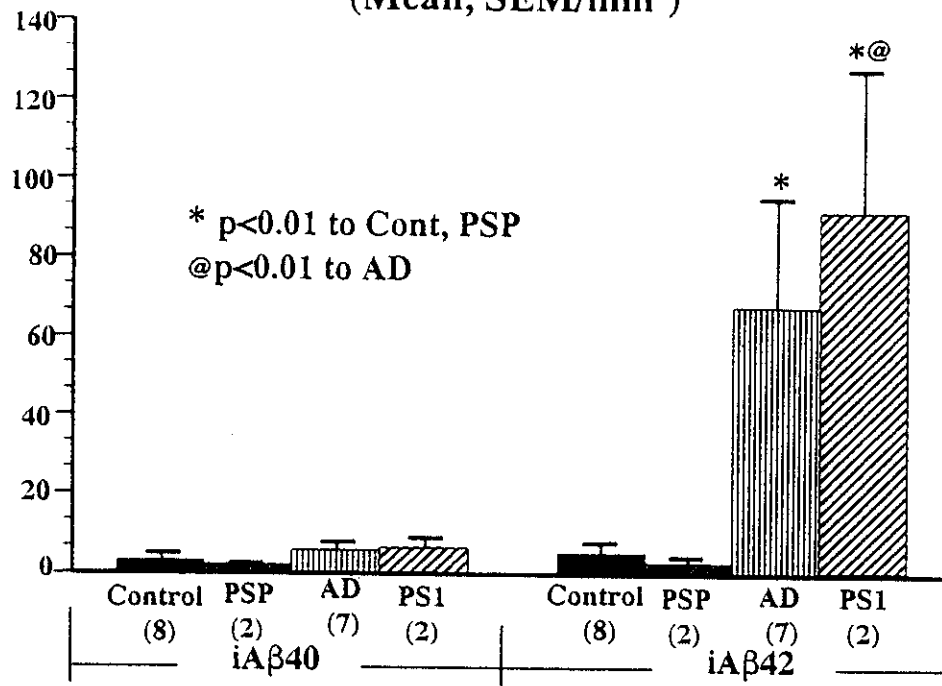
刺発現の初代培養神経細胞に対する影響。  
第 42 回日本神経科学会（広島）大会、平成 11 年 9 月 17 日 広島

- 5) 田平 武：プレセニリン変異と神経細胞死（シンポジウム）。第 18 回日本痴呆学会、平成 11 年 10 月 7 日 熊本
- 6) 城谷圭朗、高橋慶吉、荒木 亘、田平 武：プレセニリン 2 のプロセッシングと A $\beta$ 42 産生。第 18 回日本痴呆学会、平成 11 年 10 月 7 日 熊本
- 7) W. Araki, K. Yuasa, S. Takeda, K. Shirotani, K. Takahash and T. Tabira.: Effect of presenilin-2 overexpression on cultured cortical neurons. 29<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society for Neuroscience, 平成 11 年 10 月 27 日, Miami Beach Florida
- 8) 辻村 敦、渡辺義久、橋本 保：Zinc finger protein KF-1 の遺伝子構造と蛋白質機能の解析。第 22 回日本分子生物学会、平成 11 年 12 月 9 日 福岡
- 9) 渡辺義久、辻村 敦、橋本 保：ツメガエル初期発生における X-PS $\alpha$ C 末断片のリン酸化。第 22 回日本分子生物学会、平成 11 年 12 月 9 日 福岡

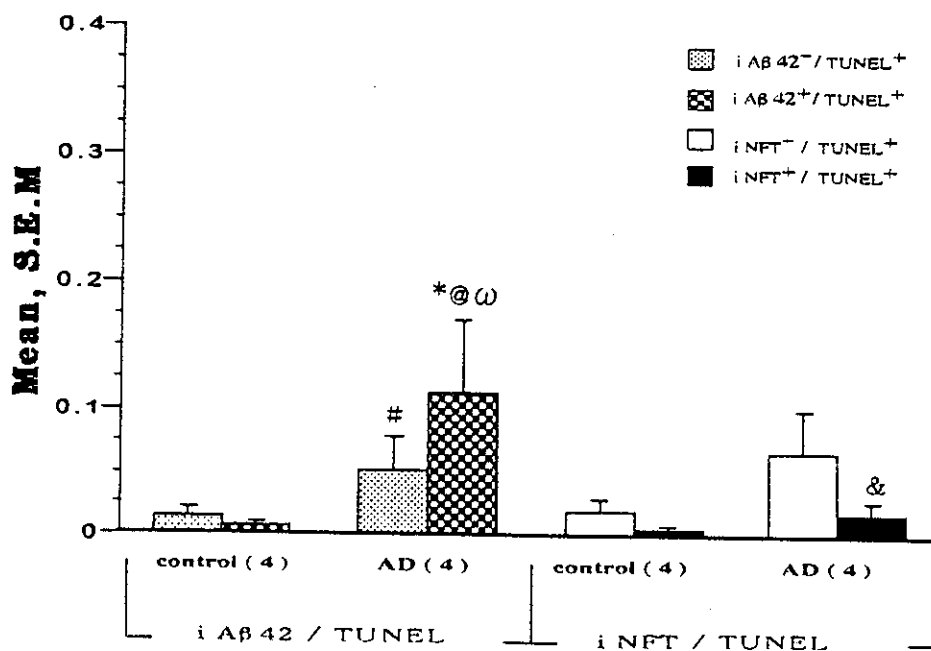
G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得           なし
2. 実用新案登録   なし
3. その他           なし

1271. Neuron Counts with Intracellular A $\beta$ 40 or A $\beta$ 42  
(Mean, SEM/mm<sup>2</sup>)



1272. Analysis of apoptosis in A $\beta$ 42-positive neurons and iNFT-positive neurons



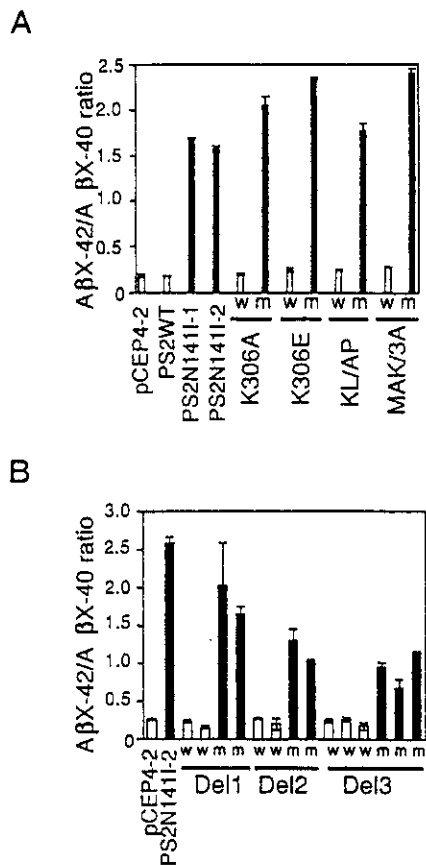


図3 プレセニリン変異株におけるAβ42産生増強  
(w:野生型、m:変異型)

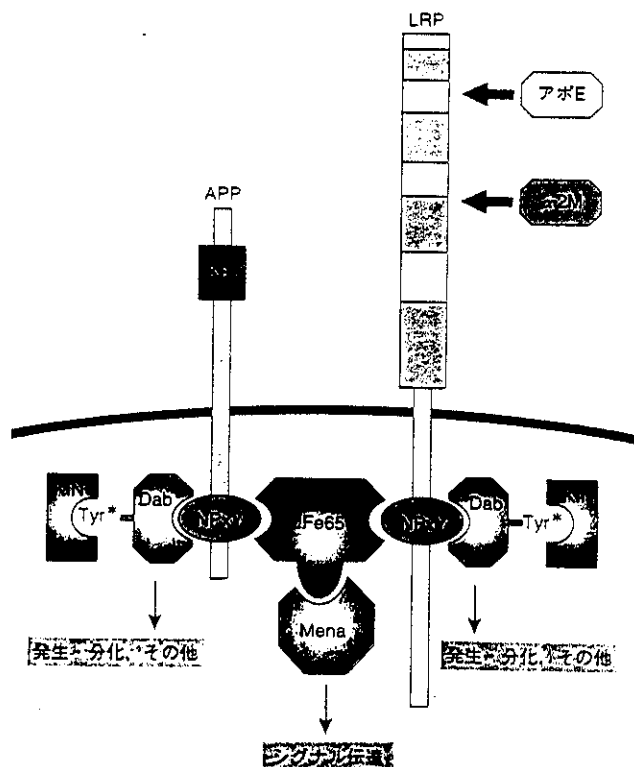


図4 Fe65, β APP, LRP の結合

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

家族性アルツハイマー病 (FAD) 発症に関与するプレセニリン (PS) の生理的機能を解明するため、ツメガエルをモデル動物として、初期発生におけるプロセッシング変化とアポトーシスとの関連を検討した。PS1に対応するツメガエルX-PS $\alpha$ のC末端断片は、発生の最初期にリン酸化を受け、これは黄体ホルモン処理した卵母細胞でも再現された。ヒト培養細胞では、黄体ホルモン処理によりPS1全長分子の細胞内レベルが減少した。また、PSとの相互作用が示唆されたkf1の染色体遺伝子の構造を決定し、15家系のFAD患者の遺伝子を調べた結果、その内の一つの家系のサンプルで翻訳開始点の上流に変異を認めたが、この変異は同一家系内の他の患者の解析では発症との連鎖は見られなかった。

A. 研究目的

(1) 昨年度、我々はヒトPS1蛋白質に対応するツメガエルのX-PS $\alpha$ が発生の最初期 (1細胞期、8細胞期、胞胚期) にN-末端とC-末端にプロセスされて、そのC-末端がリン酸化されることを報告した。この現象は、発生初期ではアポトーシスが強く抑制されていること、またプロセスされたPS1がアポトーシス阻害活性を持つと言われていることに対応しているので、このリン酸化がPS1のアポトーシス阻害活性にとって重要な役割を果たしているのではないかという仮説をたてた。また、このリン酸化は卵母細胞を黄体ホルモンで処理することでも観察されたので、黄体ホルモンで処理されたヒト神経細胞でPS1のリン酸化が同様に昂進されるか否かを調べた。

(2) 家族性アルツハイマー病 (FAD) の原因となる遺伝子として、アミロイド前駆体蛋白質遺伝子 (APP)、プレセニリン (PS) 1、PS2、ApoE等の変異が報告されているが、これらの遺伝子によって説明されるFADは全体の1/4~1/3であり、残り大多数のFADの原因となる変異は同定されていない。大家系の得られにくい日本では連鎖解析によるFAD遺伝子の探索は困難であり、何らかの方法でアルツハイマー病との関連が疑われる遺伝子を絞り込み、多数のFAD家系でその変異の有無を調べるというのも選択肢の一つと言える。そのよ

うな候補遺伝子の一つとして、我々が孤発性アルツハイマー病で発現が昂進している遺伝子として同定、単離したkf1遺伝子がある。kf1は、①両生類からヒトまで生物種を越えて高度に保存されており、②細胞内での蛋白質の分布は、プレセニリンの分布と酷似して核膜、小胞体膜、ゴルジ等に局在しており、また③細胞内での強制発現により細胞はアポトーシス様の変化を起こすなどが、昨年度までの研究成果として得られていたので、今回kf1を取り上げて調べることにした。まず、ヒトkf1遺伝子の染色体上での構造を決定し、原因遺伝子が未知のFAD患者でのkf1変異の有無を解析した。

B. 研究方法

B.1 ツメガエル発生初期におけるX-PS $\alpha$ C末端断片のリン酸化：未受精卵、卵母細胞、黄体ホルモン (プロゲステロン) 処理卵母細胞などの膜分画からX-PS $\alpha$ C末端断片をX-PS $\alpha$ の親水性ループに対するポリクローナル抗体を用いた免疫沈降法により粗精製し、その産物をウエスタンブロッティングで解析し、同時にアルカリフォスファターゼで処理した時のX-PS $\alpha$ C末端断片と比較した。

B.2 黄体ホルモン処理されたヒト神経

経細胞のPS1C末端断片のリン酸化とアポトーシスに対する感受性の解析：野生型またはFAD変異型PS1 (I143T) を安定に発現する神経芽腫細胞 (SH-SY5Y) を黄体ホルモンで処理した時、PS1C末端断片がリン酸化されるかどうかをウエスタンブロッティングにより解析した。また、アポトーシスに対する感受性を解析するために、黄体ホルモンで一晩前処理した後1 $\mu$ Mコルヒチンによってアポトーシスを3日間誘導してDNAの断片化を観察した。

B.3 ヒトkf1染色体遺伝子の構造解析：マウスの染色体遺伝子の構造解析の結果をもとに、染色体上でイントロンが存在すると予想される部位を挟むように、ヒトkf1 cDNA上にPCRプライマーを設定し、正常ヒト末梢血由来のDNAを用いてPCRによってイントロンを含むDNA断片を増幅し、その塩基配列を決定した。また、PCRにより増幅出来なかった部位については、染色体DNAを、HindIIIまたは、PstIで消化後、環状化したDNAを鋳型としてインバースPCRを行い、目的断片の増幅を行って塩基配列を決定した。

B.4 kf1遺伝子の3'-UTRのCAT発現に与える影響の解析：マウスpgk遺伝子プロモーターにより転写されるCAT遺伝子の下流にマウスkf1遺伝子のpolyA付加シグナルを含む3'-UTRの全体またはその一部を持ったプラスミドを作成し、Lipoplectamineを用い、NIH-3T3細胞に導入し、細胞ライセート中のCAT活性を、蛍光標識クロラムフェニコールを用いたCATアッセイにより定量した。

B.5 FAD患者由来のkf1遺伝子の塩基配列の決定：B.3で決定したkf1のヒト染

色体遺伝子の4つのエクソンを挟むように、四対のPCRプライマーを合成し、主任研究者より供与されたFAD患者由来のDNAを、AmpliTaq Goldを使って各エクソンの領域を増幅した。配列決定の前処理として、Shrimp Alkali phosphatase と Exonuclease Iで、残存するPCRプライマーとdNTPを分解後、熱処理により酵素を失活させ、Big Dye-Terminator Sequencing Kitを用いてシーケンス反応を行い、ABI-Prizm 377XLにて、塩基配列の決定を行った。

## C. 研究結果

C.1 ツメガエル各組織および発生全過程を通じてX-PS $\alpha$ の全長分子に相当する50kDaのバンドは全く検出されなかった。組織では19kDaの断片が、また発生初期では主に約19~24kDa付近に複数の断片が検出された。19kDaの断片はC末断片であると考えられるが、22~24kDaの断片はプロセッシング部位の多様性、蛋白質の修飾等の影響などいくつかの可能性が予想された。未受精卵から免疫沈降により粗精製される22~24kDaの断片を、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て単一の19kDaの断片になった(図1)。このことは初期発生過程におけるX-PS $\alpha$ のC-末端断片の19kDaから22~24kDaへのシフトはリン酸化による修飾によることを示している。卵母細胞を黄体ホルモン処理によりin vitroで卵成熟を誘起したときにも、卵母細胞成熟過程では見られなかった22~24kDaの断片が新たに出現したことから、発生初期に見られるリン酸化C末断片は、卵成熟過程において修飾を受けたものであることが確認された。このことは、発生初期のアポトーシス抑制にX-PS $\alpha$ の

リン酸化が関与している可能性を強く示唆している。

C2. 卵母細胞で見られた黄体ホルモン処理によるX-PS $\alpha$ のC末断片のリン酸化が、神経細胞においても観察されるかどうかを調べるため、野生型またはFAD PS1 (I143T) を安定に発現する神経芽腫細胞 SH-SY5Yの培養液中にプロゲステロンを $10^{-10}$ - $10^{-4}$ Mまで加え1時間~3日間培養を行った。しかし、ヒトPS-1のリン酸化に伴う電気泳動度の変化は観察されなかった(図3A)が、プロゲステロン処理に伴うPS1全長分子の減少が観察された(図4)。PSの全長分子はアポトーシスの誘導活性があるとされているので、このことはプロゲステロン処理により神経細胞のアポトーシスへの感受性が低下する可能性を示唆する。そこで、プロゲステロン処理によって細胞のアポトーシス抵抗性が上昇するか否かを検討した。しかし、少なくともコルヒチンによるアポトーシスの誘導では、プロゲステロンで処理した細胞も未処理の細胞と同程度のDNAの断片化が起きており(図3B)、この仮説は支持されなかった。

C3. 昨年報告したマウスkf1染色体遺伝子の構造解析によると、マウスkf-1 cDNA上でイントロンがプロセスされた位置は、first ATGから数えて226/227bp, 366/367bp, 482/483bpの3ヶ所であり、これに対応するヒトkf1 cDNAの位置も保存されているため、これらの部位を挟む3組のPCRプライマーでヒト染色体DNAの増幅を試みた。その結果、マウスのイントロン1、3に対応する部分でそれぞれ約2.0kb、5.5kbのDNA断片が増幅された。イントロン2に対応する部位では、増幅断片が観察されなかった。マウスのイントロン2は約8.7kbでありヒトにおいても同様

に距離が長い可能性があるため、全長の増幅は困難と考えた。ヒトkf1 cDNAのクローニングの際に、イントロン2の部位にスプライシング異常と思われる103bpの挿入を持つクローンが単離されたことがあった。この103bpがエクソンに隣接して存在し、オルタナティブスプライシングによって生じた可能性が考えられたため、この挿入断片と、隣接すると考えられるエクソンとの間でPCRを行ったところ、この断片はエクソン3に相当する部分から約3.0kbの上流位置に存在し、エクソン2、3とは隣接していなかった。残りのエクソン2への近接側に関しては、染色体DNAを、HindIIIまたはPstIで消化後、環状化したDNAを鋳型として、エクソン2に対応する部位から外向きのプライマーを用いてインバースPCRを行い、下流2.7kbの断片を回収した。以上よりヒトkf1染色体遺伝子の構造は、マウスと同様、少なくとも18Kb以上にわたり、4つのエクソン、3つのイントロンから構成されることが確認された(図5)。

C4. 各エクソンに接するイントロン部分の塩基配列を決定し、マウスの塩基配列と比較を行った。翻訳領域において92%以上の相同性を示すにもかかわらず、イントロン部分、5'-UTRでは、有意な相同性は見られなかった(図6)。一つの例外として3'-UTRは非翻訳領域としては異常に高い相同性を示していた。3'-UTRがヒト・マウスで高度に保存されていることから、mRNAの安定性、翻訳効率の調節などの機能を担っていると推定して、3'-UTRの全体、または一部をCAT遺伝子の下流に連結しNIH-3T3細胞に導入し、CAT蛋白質の発現をCATアッセイにより解析した。しかし、CATの発現量で見ると、3'-UTRの有無で有意の差は見られなかった(図7)。



C.5. 国立精神神経センターで収集したFADが疑われる患者で、原因遺伝子が未知の患者15名のDNA検体よりkf-1遺伝子各エクソンをPCRにより増幅し、その塩基配列を解析した。その結果、1つの検体(#14)にheterozygosityを示唆するAとGのピーク(正常人ではG)が重なるシグナルが見られた(図8)。変異が見られたのは、翻訳領域ではなく3'-非翻訳領域(UTR)で開始コドンATGの上流13bpであった。さらに、この変異が、発症と連鎖しているかどうかを確認するため、同一家系の発症患者2名(#63、#67)についても同様に塩基配列の解析を行った。その結果、塩基配列の違いが見られたのは、最初の1検体のみ(#14)で同一家系の他の患者では変異は存在しなかった。これはこの変異がこの家系のアルツハイマー病の原因となる変異ではなく、Single Nucleotide Change polymorphismであることを示している。

#### D. 考察

D.1. ヒトkf1染色体遺伝子の構造解析の結果、その遺伝子構造は、cDNAの配列と同様に、ヒト・マウス間においてもよく保存されていることがわかった。しかし、イントロン部分、5'-UTRの塩基配列はほとんど保存されていなかった。このことは、KF-1蛋白質が生物にとって基本的な機能を有しているという仮説を支持する。さらに、一般的に進化上の選択圧がかからない、3'-UTRが保存されていることは、kf1 mRNAの安定性がこの領域の高次構造で調節されている可能性がある。しかし、培養細胞におけるCAT遺伝子の発現レベルに対するkf1 3'-UTRの影響はほとんど見られなかった。このことは、kf1の3'-UTRがmRNAの安定性にかかわっているのではな

いか、あるいは、kf-1 ORFに特異的にmRNAの安定性を制御している可能性がある。あるいは、他の特異的なターゲット遺伝子の存在、また、神経組織特異的にmRNA安定性を制御している可能性もある。また、FAD家系におけるkf1の変異は、1検体のみに5'-UTRで見つかったが、発症との連鎖は否定された。しかし、kf1遺伝子が生物種を越えて非常に高い相同性を持つことから、微細な蛋白質の構造変化でも発症段階で致命的影響を受ける可能性は依然残っている。ツメガエルを用いた実験からは、発生初期において強い発現が見られることから、KF1がアルツハイマー病に関係するとすれば、量的な変動を考慮する必要があると思われる。また、昨年度から続けていたkf1遺伝子を破壊したノックアウトマウスの作成は、細胞レベルでさえ相同組換え体が全くとれてこないこと、さらに、培養細胞でkf1を過剰発現する安定な組換え体もとれてこないことなどからも、kf1の発現は蛋白質構造的な面だけではなく、発現量の面からも厳密に調節される必要があることが強く示唆された。

D.2. ツメガエルのPS1ホモログであるX-PS $\alpha$ は発生の最初期にリン酸化されたC-末端断片として検出された。同時期がアポトーシスの強く抑制された時期であること、またマウスの同断片にアポトーシスを阻害する活性があることから、このリン酸化がアポトーシスの抑制に関与している可能性を示唆した。このリン酸化はプロゲステロン処理をした卵母細胞でも見られたので、プロゲステロン処理をしたヒト神経細胞でも同様のリン酸化が見られるかどうかを観察したが、それ自身は観察されなかった。しかし、プロゲステロン処理によりアポトーシス誘導作用があると言われるPS1

の全長分子の減少が観察されたので、プロゲステロンがアポトーシスに対して抑制効果があるという仮説は依然として残っている。その場合は、経口避妊薬による黄体ホルモンの連続投与後の服用停止によるリバウンドによって神経細胞のアポトーシスが誘導されるかもしれないという可能性は否定できない。

の解析. 第22会日本分子生物学会、福岡、1999.12.9

渡辺義久、辻村敦、橋本保：ツメガエル初期発生におけるX-PS $\alpha$ C末断片のリン酸化. 第22会日本分子生物学会、福岡、1999.12.9

## E. 結論

ヒトkf1染色体遺伝子の構造を明らかにし、全体の構成がマウスの遺伝子構造と非常に似ていることが明らかとなった。アルツハイマー病が疑われる患者の塩基配列では、1塩基の置換が認められたが、同一家系において発症との連鎖は認められなかった。kf1の細胞内機能に関しては、発現量の増減両方の変化に対して細胞に致死的にはたらいっていると考えられ、その詳しい解析には、更に検討が必要である。例えばcre-lox等を使った組織特異的なジーンターゲットイングなどが考えられるが、今回の研究助成期間内では実行できなかった。

黄体ホルモンが細胞のアポトーシス抵抗性を誘起する可能性が示唆されたが、卵母細胞と神経細胞ではその機構は少なくとも同一の機構ではなく、その証明にはさらなる検討が必要である。

## F. 研究発表

論文発表  
準備中

学会発表

辻村敦、渡辺義久、橋本保：Zinc Finger protein KF-1の遺伝子構造と蛋白質機能

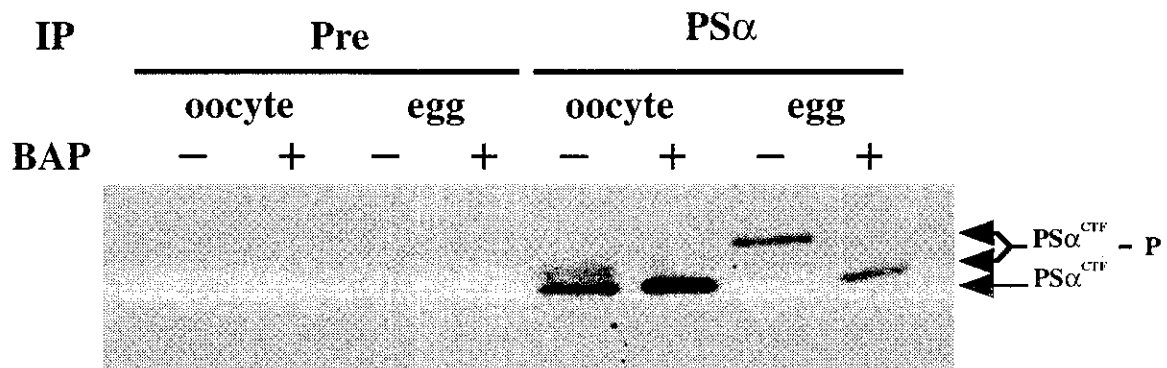


図1 *Xenopus*初期発生におけるX-PS- $\alpha$  CTFのリン酸化

卵母細胞ステージVI (oocyte) または排卵した卵 (egg) の膜画分を免疫前のIgG (Pre IgG) とanti-PS- $\alpha$  IgGで免疫沈降した後、アルカリフォスファターゼ (BAP) で処理した。そして、そのサンプルをウエスタンブロットで解析を行った。

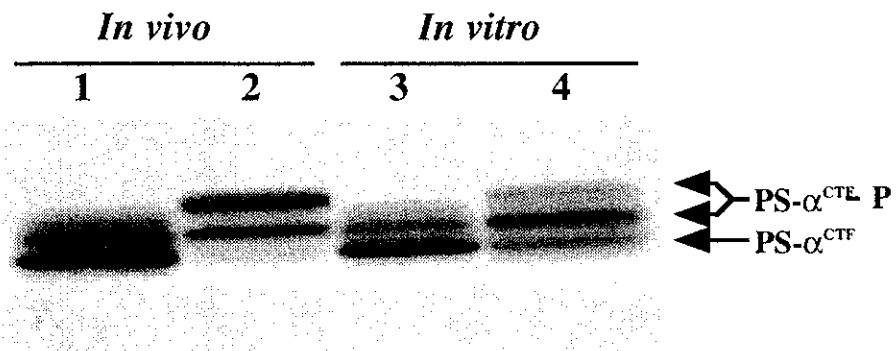


図2 プロゲステロンによる *in vitro* での卵母細胞成熟過程における X-PS- $\alpha$ CTF のリン酸化

卵母細胞ステージVI (Lane 1)、産卵した卵 (Lane 2)、卵母細胞ステージVIをプロゲステロンを添加しないでインキュベートした細胞 (Lane 3) そして1 $\mu$ Mプロゲステロンを添加した細胞 (Lane 4) の膜画分を用いウエスタンブロットを行った。