

図3 ヒト神経芽腫細胞におけるプロゲステロンによるPS-1のリン酸化解析とアポトーシスへの影響

A 野生型 (WT) またはアルツハイマー変異 (I143T) を安定に発現するヒト神経芽腫細胞 (SH-SY5Y) をプロゲステロン $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ M含む培養液で一晩培養した。PS-1C末端断片のリン酸化解析のために、それぞれの細胞抽出液のウエスタンブローディングを行った。

B また、アポトーシスへの影響を観察する為に、プロゲステロン存在下で培養した後、 $1\mu$ Mのコレヒチンをさらに培養液に加え3日間培養した。そして、DNAの電気泳動を行うことで、DNAの断片化を解析した。

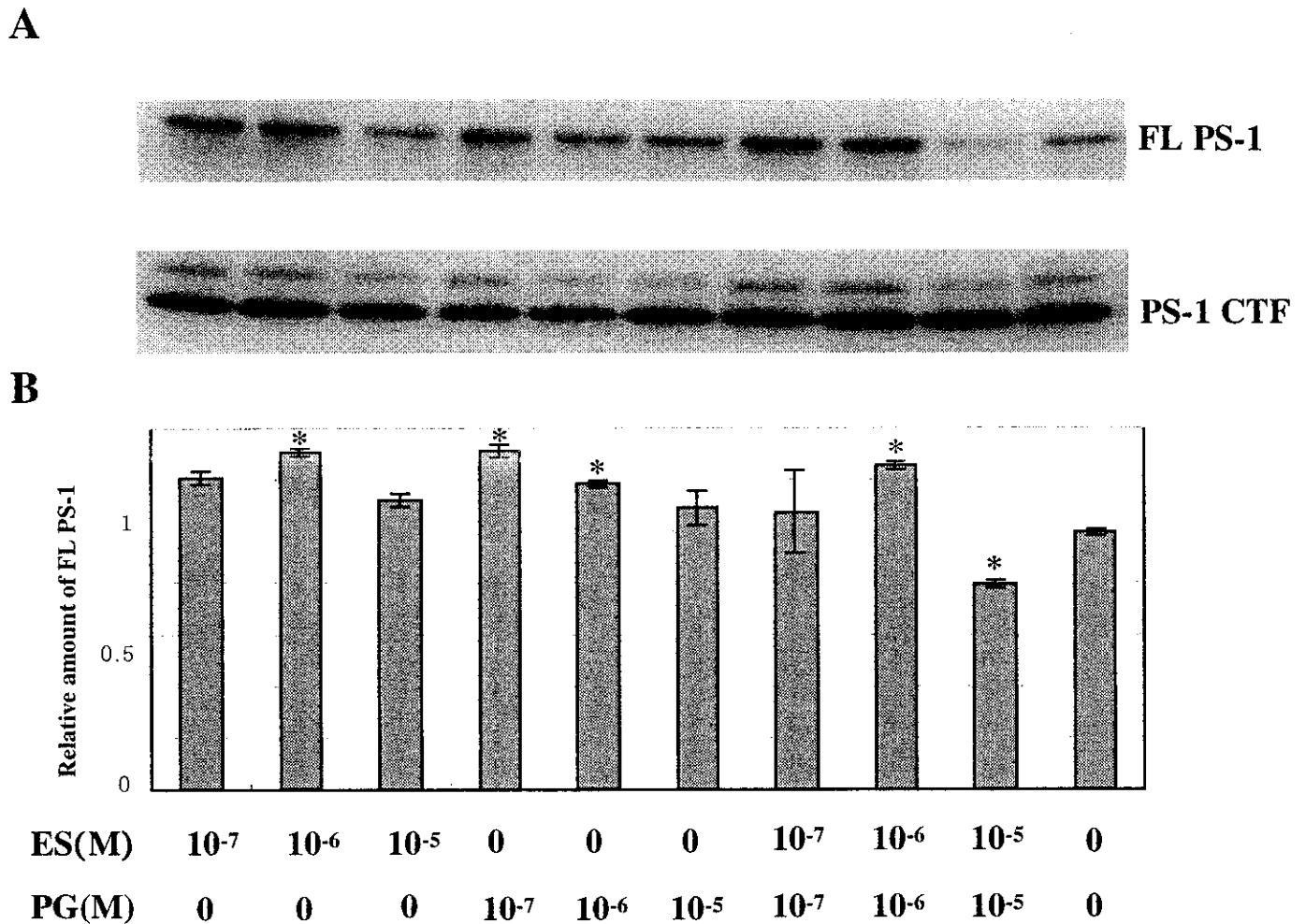


図4 プロゲステロンおよびエストロゲンによる全長分子PS-1の細胞内レベルへの影響

A プロゲステロン (PG) またはエストロゲン (ES) を上記の濃度存在下で1時間培養後、細胞抽出液をウエスタンブロットにより解析した。B 定量化した後、ES 0M, PG 0Mに対する相対量をグラフにした。

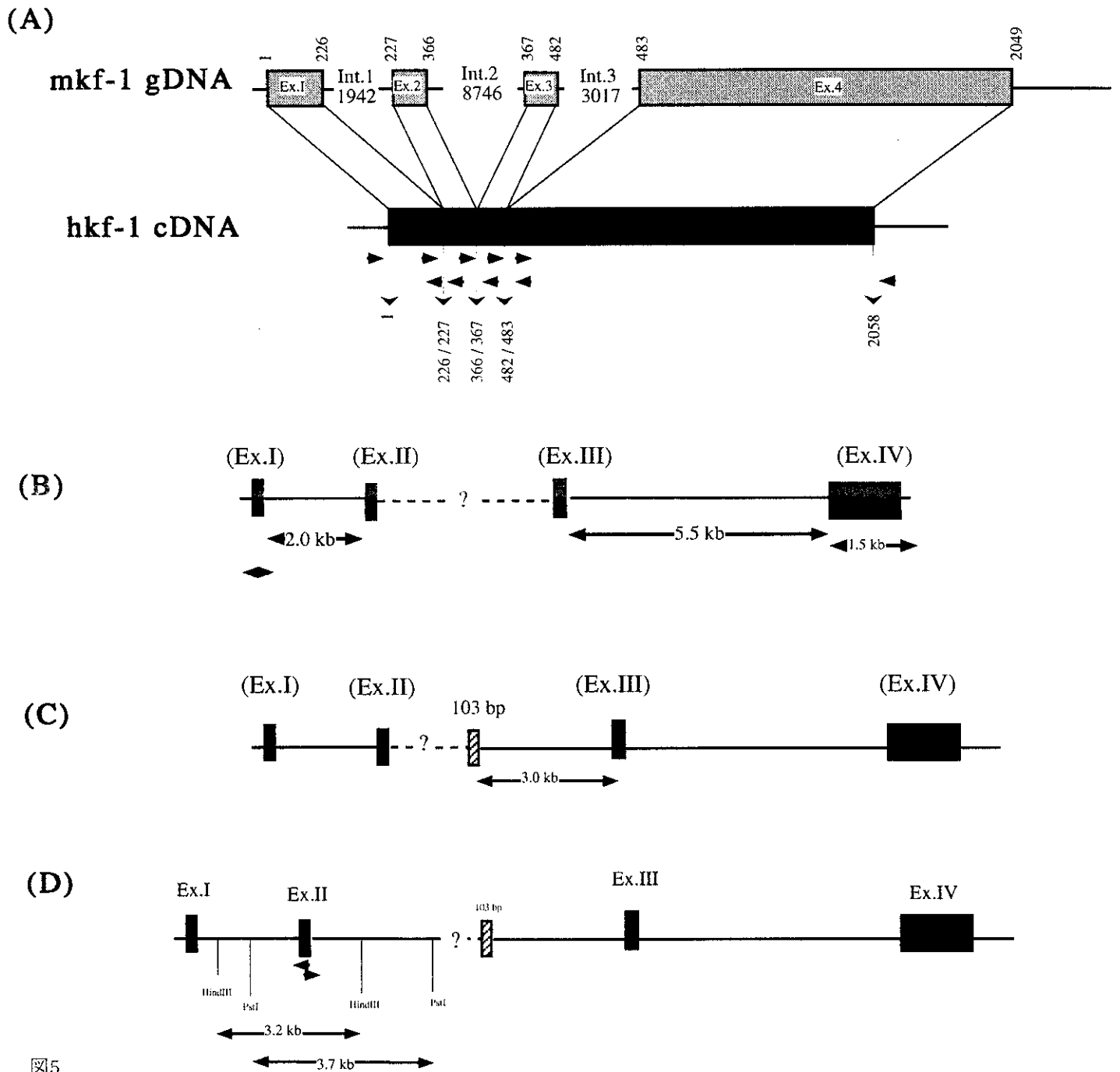


図5.

(A): *mf-1*染色体遺伝子の構造とスプライシングジャンクション

マウス染色体は約17kbに渡って存在し、4つのエクソン、3つのイントロンから構成される。マウス遺伝子におけるスプライシング部位をCDSの塩基数で示すとともに、これに対応するヒトcDNAのの部位をCDSでの塩基数で示す。矢印は、ジャンクションを挟むPCRプライマーの位置を示す。

(B): ジャンクションを挟むプライマーによるPCR

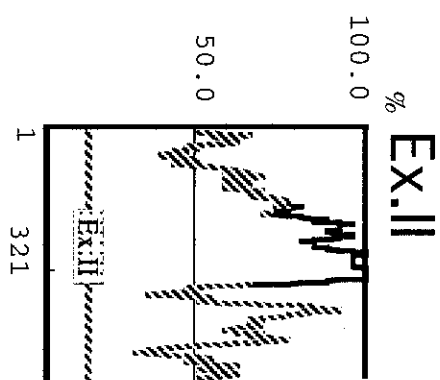
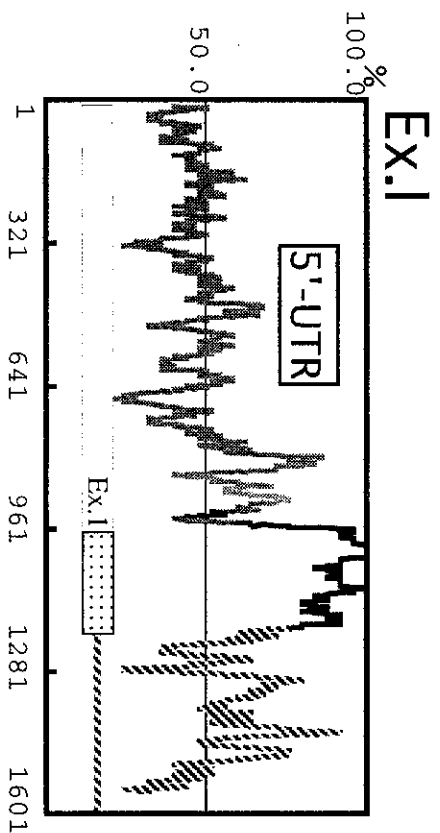
スプライシングジャンクションと予想される部分間でのPCRの結果、イントロン1、イントロン3に相当する部分でそれぞれ2.0 kb、5.5 kbの断片が増幅されたが、イントロン2に相当する部分では、増幅断片は観察されなかった。

(C): オルタナティブスプライシング103bp断片の染色体上の位置

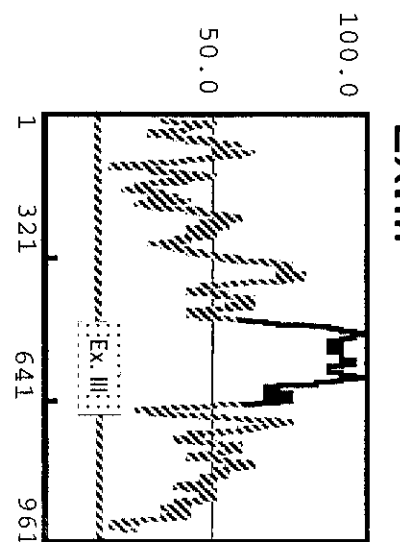
cDNAクローンで見つかったスプライシング異常と思われる103bpの挿入断片は、各エクソンには隣接せずエクソン3の上流約3 kbに位置していた。

(D) インバースPCRによるイントロン領域の単離

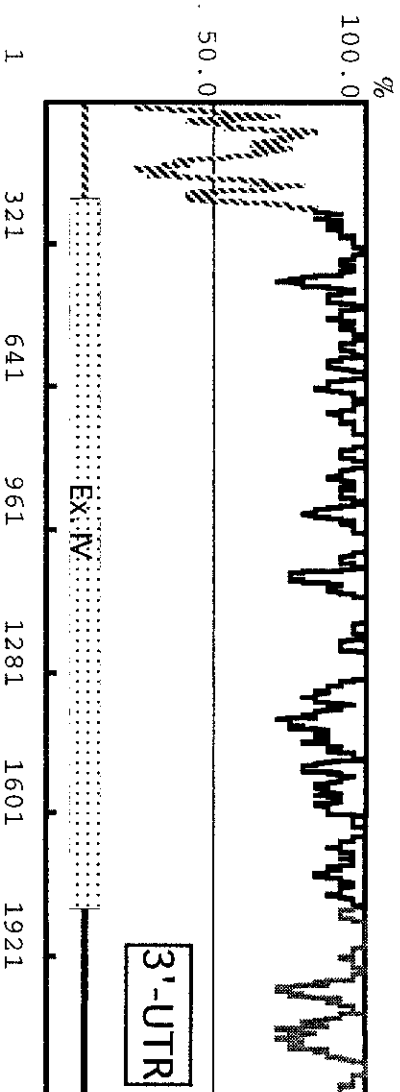
PstI, HindIIIで切断し、環状化した染色体DNAを鋳型としてエクソン2より外向きに向かうPCRプライマーにより、新たにエクソン2の下流2.4 kbが単離された。



EX.III



EX.IV



▨ : intron    ▬ : UTR    ▬ : CDS

図6.ヒト、マウスの各エクソンの近傍の塩基配列をアライメントし、Windows サイズ25bpとして相同性をプロットした。エクソンの構成は共通性が見られ、CDS領域では塩基配列の相同性が高いが、5'-UTR、イントロン部分には優位な相同性は見られなかった。3'-UTRは例外で非常に高い相同性が見られる。3'の非翻訳領域は、RNAの安定性、翻訳効率制御など機能面での選択圧がかかり高度に保存されていると考えられる。

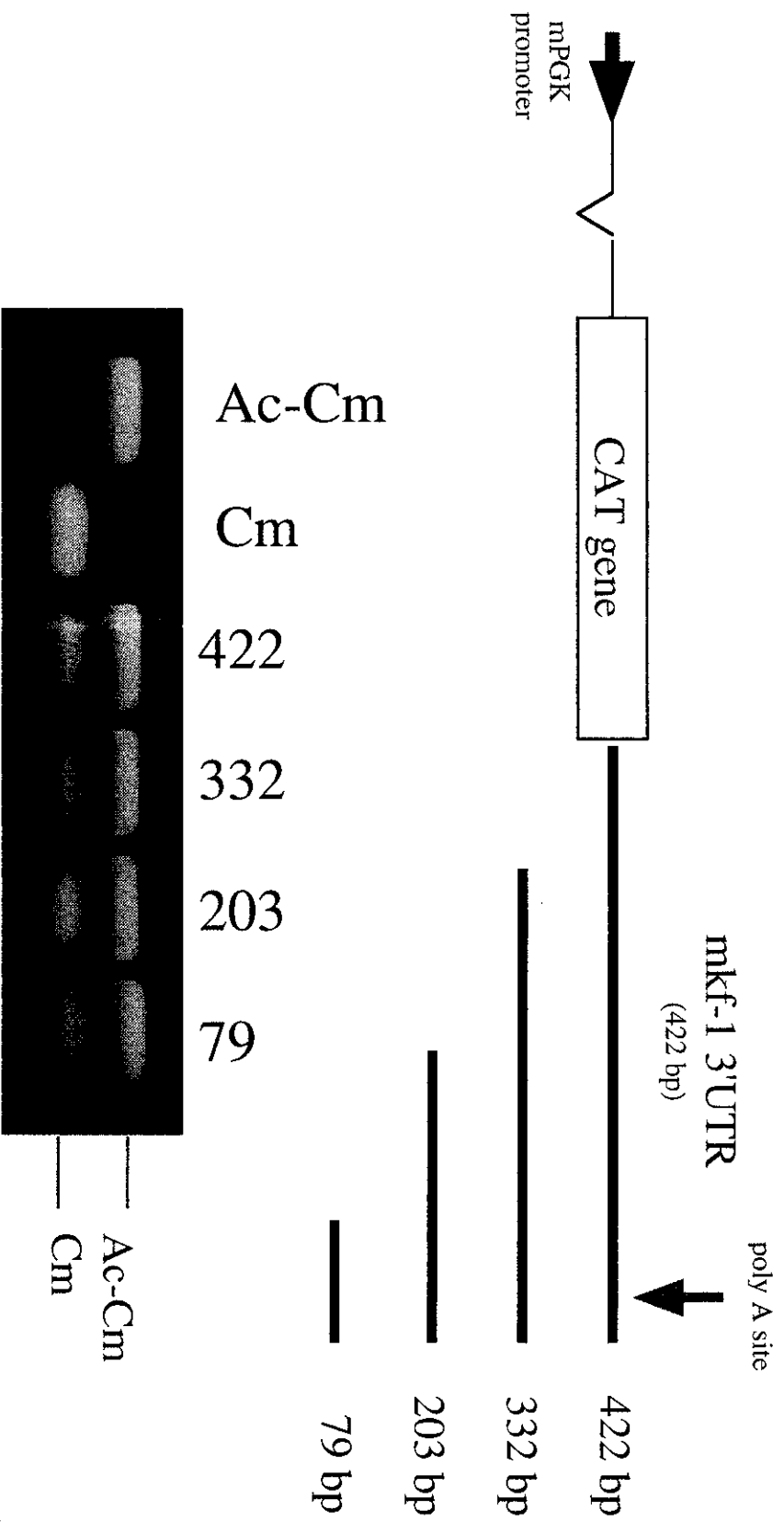
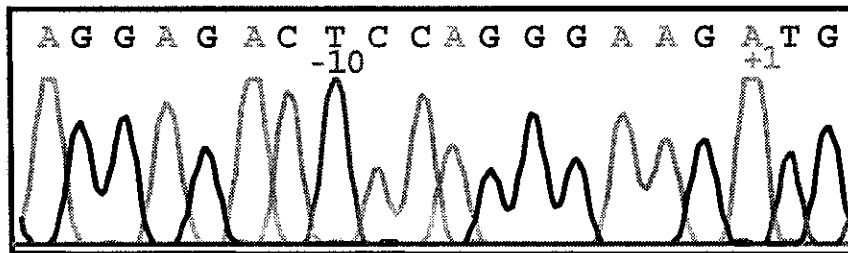


図7. kf-1 3'UTRが遺伝子発現に与える影響

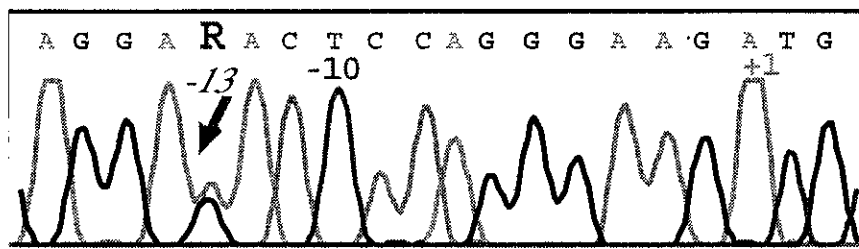
mouse PGK プロモーターによって転写されるCAT遺伝子の下流に、mouse kf-1の3'-UTRを連結し、NIH-3T3中でのCAT蛋白質の発現をCAT-アッセイにより解析した。UTRの polyA付加シグナルサイトから上流の部分の長さを変えたものについて調べたが、有意な差は見られなかった。

## *hkf-1 5' nucleotide sequences*

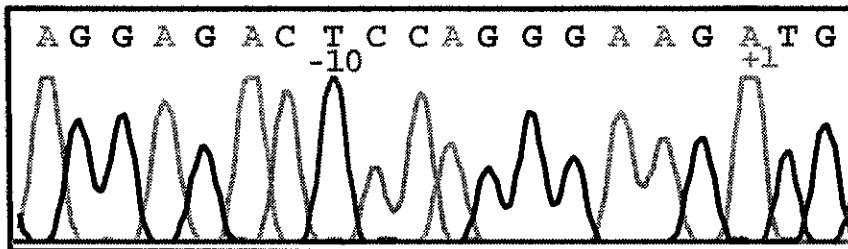
### Normal



### #14



### #63



### #67

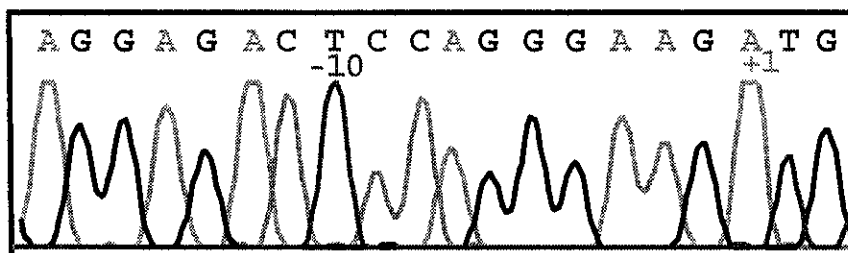


図8. 同一家系におけるkf-1遺伝子上流の変異  
同一家系の発症患者 (#14, #63, #67) に関して翻訳開始点の上流の塩基配列を決定した。#14の検体では翻訳開始点の上流13bpにG-Aへの変異が認められた。しかし変異が認められるのは、#14の1検体のみであった。

プレセニリン 1 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

プレセニリン 1 (PS1) トランスジェニックマウスの神経細胞について、抗 $\beta$ アミロイド 42 (Abeta42) 抗体を用いたリフレクションコントラスト顕微鏡と免疫電顕微鏡による検討を行った。両方の方法で明らかな Abeta42 陽性所見を認めなかった。通常の電子顕微鏡で神経細胞内にアミロイドフィラメントは認めなかった。PS1 トランスジェニックマウスの神経細胞内には Abeta42 はフィラメントを形成しない状態で存在する可能性がある。

A. 研究目的

近年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) のアルツハイマー病の病理発生を検討する目的で、PS1 のトランスジェニックマウスを作成し、アミロイドの形成の有無を、リフレクションコントラスト顕微鏡 (reflection contrast microscope: RCM) と免疫電子顕微鏡を用いて検討を行った。

B. 研究方法

PS1 トランスジェニックマウス (L/V#8 と対照として wild type) を作成した。4%paraformaldehyde で灌流固定後、大脳のピプラトーム切片を作成し、抗 $\beta$ アミロイド 42 抗体 (Abeta42) を用いて浮遊法で免疫組織化学染色を行い DAB で発色させた。2.5%glutaraldehyde 固定した。光学顕微鏡で観察して所見を確認しながら大脳皮質を細切して電子顕微鏡用小片を切出した。1%osmium oxide で後固定した。先に作成しておいたエポブロックで曲らないようにして水平にエポン包埋した。電顕ミクロトームで準超薄切片と超薄切片を連続切片で作成した。準超薄切片はスライドグラスに貼り付けトルイジンブルー染色した後、RCM の油浸 1000 倍像で所見を確認した。超薄切片は電子染色したものと染めないものを電子顕微鏡で観察した。

C. 研究結果

①抗 Abeta42 抗体で免疫染色したピプラトーム切片を光学顕微鏡で観察すると、PS1 トランスジェニックマウス (L/V#8) では対照の wild type のものに対して、大脳皮質の神経細胞の胞体が軽度染色されているように見えた。しかし、通常の DAB の発色とはよりは淡い感じであった。  
②トルイジンブルー染色した準超薄切片を RCM の油浸 1000 倍像で観察すると、PS1 トランスジ

ェニックマウスの L/V#8 と対照の wild type 共に明らかな陽性像は認められなかった。

③電子染色してない超薄切片を電子顕微鏡で観察すると、PS1 トランスジェニックマウスの L/V#8 と対照の wild type 共に明らかな陽性像は認められなかった。

電子染色した超薄切片では、PS1 トランスジェニックマウスの L/V#8 の神経細胞の胞体にはアミロイドフィラメントは認められなかった。

D. 考察

①PS1 トランスジェニックマウス (L/V#8) の大脳を抗 Abeta42 抗体で蛍光染色して共焦点顕微鏡で観察した研究 (崔ら) では、大脳皮質の一部の神経細胞が Abeta42 に陽性である。抗 Abeta42 抗体で免疫染色したピプラトーム切片でも神経細胞の胞体が軽度染色されているように見えたのは、これに対応する所見かもしれない。

②RCM の観察で Abeta42 の明らかな陽性像が認められなかったことは、PS1 トランスジェニックマウス (L/V#8) の神経細胞の胞体内の Abeta42 が RCM での検出感度以下あるいは検出されない形態であることを示唆する。RCM は新しい方法であり、検出様式について今後も検討する必要がある。

③超薄切片の電子顕微鏡での観察で、アミロイドフィラメントが認められなかったことは、神経細胞内の Abeta42 は soluble の状態で存在する可能性が考えられる。しかし、DAB 陽性構造が認められなかったことは、ピプラトーム切片で軽度陽性に見えたことと共に再検討する必要がある。

E. 結論

PS1 トランスジェニックマウスの大脳皮質の神経細胞の胞体内には Abeta42 はフィラメントを形成しない状態で存在する可能性がある。