

厚生科学研究費補助金
(脳科学研究事業)

平成12年度総括・分担研究報告書
平成10-12年度総合研究報告書

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13年4月

目次

頁	
2-7	平成12年度総括研究報告書 「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
8-11	平成12年度分担研究報告書 「APP細胞外領域結合蛋白質の解析」 分担研究者 新延 道夫
12-16	平成12年度分担研究報告書 「APPによるカスパーゼ3の活性化機構」 分担研究者 植月 太一
17-20	平成12年度分担研究報告書 「E2F1によるニューロン死の分子機構」 分担研究者 谷浦 秀夫
21-24	平成12年度分担研究報告書 「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
.....	
25-30	総合研究報告書（総括） 「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
31-34	総合研究報告書（分担） 「APP結合蛋白質に関する研究」 分担研究者 新延 道夫
35-40	総合研究報告書（分担） 「APPによるニューロン死の分子機構」 分担研究者 植月 太一
41-44	総合研究報告書（分担） 「ニューロンのアポトーシスに関連する蛋白質の解析」 分担研究者 谷浦 秀夫
45-48	総合研究報告書（分担） 「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) APPの細胞外末端領域の中でアポトーシスを誘導する22C11抗体が認識する領域への結合蛋白質として、新規の線虫由来セリン・スレオニンキナーゼ様蛋白質が見出された。この蛋白質はAPP695の細胞外から細胞内へのシグナル伝達に関与している可能性も考えられる。

2) ヒトAPPのA β ドメインがニューロンのアポトーシス誘導に重要な領域であることが明らかとなった。また、APPによってニューロンで細胞内カルシウムの上昇が観察され、カルパイン阻害剤によってAPPによるカスパーゼ3活性化が阻害された。このことから、APPによるカスパーゼ3の活性化にカルパインが関与する可能性が示唆された。

3) ヒトE2F1を高発現するアデノウイルスベクターを用いてヒト分化ニューロンに導入したところ、カスパーゼ3の活性化を伴った典型的なアポトーシスであることを見いだした。強制発現されたE2F1は、細胞死に先だってNuclear Bodyを形成することが見いだされた。

4) APPによる初代培養ニューロンの変性条件を検討し、ニューロン死には、Abeta領域が重要であることが判明した。また、ニューロン変性にはAPPとAbetaの両者が相乗的に働くことが明らかになった。グリア細胞はIL-8を介してAPPによるニューロン死を増強することが判った。

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大脳新皮質（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は大脳新皮質（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に関与する分子を同定し、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細胞外領域結合蛋白質の解析
(新延分担)

脳P2/P3画分の調製は10週齢ddYマウスから低張処理後、1 MNaCl処理を行った抽出液を用いた。結合蛋白質の探索はP2/P3画分の高塩濃度抽出液をビオチン化22C11ペプチドを混合後、アビジンアガロースに結合させ1mMのペプチドを用いて溶出した。各サンプルをSDS-PAGEに供し、CBB染色により蛋白バンドの検出を行った。10% SDS-PAGE分離後の蛋白質はPVDF膜に転写した後にCBB染色し、気相式シーケンサーによって行った。

B-2) APPによるカスパーゼ3の活性化機構
(植月担当)

変異型APP発現アデノウイルスベクターを作製し、ヒト胚性ガン細胞由来のNTera2(NT2)細胞をレチノイン酸処理により分化させた分裂終了ニューロンの培養液に加え、12時間培養した。カスパーゼ3活性測定は蛍光基質 Z-DEVD-AFCの切断を指標にして行った。また、アデノウイルス感染と同時にBAPTA-AM またはカルパイン 阻害剤 を培養液中に添加し、ウイルス感染後48時間でNT2ニューロンを回収し、上述のカスパーゼ3活性測定を行った。細胞死の判定は、エチジウムホモダイマーの死細胞核内の取り込みにより判定した。 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ のニューロン内取り込みは $^{45}\text{Ca}^{2+}$

添加48時間後にアデノウイルスを感染させ、その24時間後に細胞内⁴⁵Ca²⁺の放射活性を測定した。

B-3) E2F1によるニューロン死の分子機構 (谷浦担当)

ヒト胚性ガン細胞NTera2 (NT2細胞) 由来のニューロンとヒト骨肉腫由来のSAOS2細胞をE2F1によるアポトーシス誘導の解析に使用した。アポトーシスは核をヘキスト33342で染色することで観察した。細胞死は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することにより検定した。またE2F1誘導後の細胞核を数種類のアポトーシス関連蛋白質に対する抗体と抗E2F1抗体で二重染色した後、共焦点レーザー走査顕微鏡により観察した。核マトリクスの調製はHeらの方法により行った。

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ラット胎児 (18-19日齢胎児) から海馬領域を取り出し分散状態で1~2ヶ月間ほど培養を継続した。アストロサイトとニューロンの併置培養には、初代培養大脳神経細胞をDMCM/FCSで培養することで得られたアストロサイトの2~3代培養細胞を用いた。初代培養ニューロンにアデノウイルスベクターを用いてAPPまたはその変異体を感染させた。細胞には常法にしたがって免疫染色をした。ニューロンの生存率は抗Map2と抗APP抗体の二重染色によって形態学に変性死滅したニューロン割合を求めた。IL-8の蛋白質定量は、EILSA法により行った

C. 研究結果

C-1) APP細胞外領域結合蛋白質の解析 (新延分担)

APPのN末端領域に対するモノクローン抗体として確立されている22C11が細胞毒性を示すとの報告があるが、本研究では22C11が認識する領域の生理的意義を明らかにするために、ビオチン化した22C11ペプチドをリガンドとしてP2/P3高塩濃度抽出液中に存在する結合蛋白質の探索をアビジン-ビオチンの特異的結合を利用することにより行った。その結果、1mMのペプチドにより溶出される複数の蛋白バンドの存在が認められたので、分離能の高い条件下でSDS-PAGEを行い、PVDF膜にトランスファー後、目的とする蛋白バンドのN末端アミノ酸配列を気相式シーケンサーにより決定した。14本の蛋白バンドのうち2種の蛋白質については数残基のみ解析出来た。データベース検索の結果、β-チュブリンと1231個のアミノ酸からなる、線虫由来のセリン・スレオニンキナーゼと類似する蛋白質であることが判明した。

C-2) APPによるカスパーゼ3の活性化機構 (植月担当)

野生型APPをニューロンに過剰発現するとカスパーゼ3の活性化とアポトーシスが起ころが、Aβドメインの一部を欠失した変異型APPを発現したニューロンではみられなかった。また、野生型APP発現ニューロンでは、カスパーゼ3の活性化がピークとなる以前に細胞内Ca²⁺濃度が上昇していることが明らかになり、さらにCa²⁺依存的プロテアーゼカルパインの阻害剤によってカスパーゼ3の活性化が抑制された。カスパーゼ3切断後のAPP断片のN末端側(APPΔC31)に対する特異抗体を作製して解析したところ、野生型APP発現ニューロン内でAPPΔC31断片が検出された。さらにAPP

△C31自体もカスパーゼ3非依存的にアポトーシスを引き起こすことを見いだした。

C-3) E2F1によるニューロン死の分子機構 (谷浦分担)

ヒト胚性がん細胞NT2から分化したニューロン (NT2ニューロン) およびヒト骨肉腫細胞SAOS2細胞にE2F1を導入し強制発現することにより、そのアポトーシス誘導機構を解析した。E2F1を発現するアデノウイルスベクターを感染させると両方の細胞で核の凝集や断裂化を伴ったアポトーシス様細胞死を起こした。この際、細胞を抗活性化型カスパーゼ3抗体で染色すると、いずれの細胞においてもE2F1を蓄積したアポトーシス細胞で免疫陽性となっていた。さらにE2F1をニューロンやSAOS2細胞で強制発現すると、E2F1が核内に斑点状に集積する像が見られ、この核内構造体は抗PML抗体で染色された。これらの知見からE2F1が核内でPML陽性核内構造体 (Nuclear Body) を中心に集合体を形成することとニューロンでのアポトーシス誘導が重要な関連を持っている可能性が示唆された。また、アポトーシスに関連したBaxやBcl-2がE2F1によってNuclear Bodyに誘導されることが見いだされた。

C-4) APP遺伝子導入細胞に誘導される因子の探索 (林分担)

ミロイド前駆体蛋白質 (APP) 遺伝子導入によりニューロンの変性条件を検討した。野生型APPや細胞質ドメイン (C31) を欠いたAPP変異体cDNA (△C31) はニューロン死を誘導したが、Ab領域を欠いた変異体cDNA (△Ab) や無関係な遺伝子発現では起こらなかった。一方、ワートマニンでAPP代謝産物の細胞外分泌を抑制すると、APPによるニューロン死は加速された。ま

た、ビタミンC (Vc) よりもリン酸型Vcの方がニューロン死を遅延させる作用が強かった。これらのことから、また、APPとAbによるニューロン死誘導を比較したところ、両者によるニューロン死の相乗効果が働くことが本実験で明かになった。一方、APP遺伝子導入によりグリア細胞ではIL-8生産が誘導された。IL-8はAPP高発現ニューロンに対しては強い細胞障害作用を示した。さらに、グリアとニューロンを併置培養すると、APPによるニューロン死が促進された。

D. 考察

新延は、アビジン-ビオチンの特異的結合を利用した結合蛋白質の探索によって、いくつかの蛋白質が見いだした。それぞれの蛋白質についてN末端アミノ酸配列を解析したところ、2種のものについて数残基の解析が出来た。一つは種を越えて普遍的に存在するβ-チュブリンのN-末端アミノ酸配列1~10と同じ配列を持つ蛋白質であり、もう一つは線虫で見出された1231個のアミノ酸からなる、セリン・スレオニンキナーゼ様蛋白質のアミノ酸配列816~821に相当する部分アミノ酸配列を持つ蛋白質であった。β-チュブリンについては豊富に存在する蛋白質であることや、微小管の成分として膜成分に間接的に結合している可能性もあり、P2/P3画分から高塩濃度で抽出されたものが、非特異的に弱いアフィニティーでペプチドに結合したものと考えられる。一方、線虫のセリン・スレオニンキナーゼ様蛋白質と同じ部分アミノ酸配列を持つ蛋白質については、現在のところ、線虫のものについて塩基配列解析のみの結果しか得られておらず、蛋白質の機能に関する情報は全くないが、22C11認識ペプチドの内在性リガンドとして、APPのアポトーシス誘導に関係している可能性がある。

植月は、野生型APPがニューロン内に蓄積するとカスパーゼ3の活性化を介したアポトーシスが誘導されるのに対し、A β ドメインの一部を欠失したAPP Δ A β 20を導入したニューロンではカスパーゼ3の活性化もアポトーシスも起こらないことを示した。野生型APP発現ニューロンでは、カスパーゼ3活性化のピークに先行して細胞内Ca²⁺濃度の上昇が起こることが明らかになり、さらに細胞内Ca²⁺キレーターであるBAPTA-AMによってカスパーゼ3の活性化が強く抑制されたことから、細胞内Ca²⁺濃度の上昇とカスパーゼ3の活性化が密接に関係していると推定される。また、APPの蓄積により活性化したカスパーゼ3がAPP自体を切断し、ニューロン内にAPP Δ C31断片が蓄積していることが示された。APP Δ C31断片によるアポトーシスはカスパーゼ3に非依存的でかつニューロン非特異的であることから、欠失したC末端側の31アミノ酸のドメインがニューロン特異的なカスパーゼ3の活性化に関与する可能性が考えられる。

谷浦は、E2F1によって引き起こされるニューロン死はアポトーシスに典型的な核の変性形態を伴うことを示した。また細胞死にはさまざまな経路があるが、E2F1によるニューロン死の誘導はカスパーゼ3活性化を伴うアポトーシスであることが明らかとなった。また、強制発現し蓄積したE2F1が核内でNuclear Bodyを形成して集積し、その構造物は核マトリクスによって構成されていることが示された。さらに、NT2ニューロンにおいてE2F1強制発現によって、アポトーシス誘導因子Baxやアポトーシス抑制因子Bcl-2が核内のNuclear Bodyに誘導されたが、これらの分子は、核からのアポトーシスシグナルの伝達に何らかの役割を担っている可能性が考えられる。

林は、APPとAbの相乗効果を調べる実験から、両者がニューロン死誘導に関与している可能性を示した。ニューロン単独の培養系に比べ、アストログリア細胞の共存条件がAPPのニューロン死誘導をより著明に促進した。従って、AbあるいはAPPがグリア細胞に対してな何らかの作用をしていると考えられる。特に、IL-8は単独にニューロンに働きかけてもなんの効果もなかったが、APP高発現細胞では細胞死の促進効果を示した。これらの研究によってAPPによるニューロン死へのアストログリア細胞による修飾作用の分子的基盤が明らかにされ、アルツハイマー病の病態の少なくとも一部の説明が可能になった。

E. 結論

1) 22C11認識ペプチドへの結合蛋白質として、線虫のセリン・スレオニンキナーゼ様蛋白質と同じアミノ酸部分配列を持つ蛋白質が見出された。この蛋白質に関しては、APP695の細胞外から細胞内へのシグナル伝達に関与している可能性も考えられる。

2) ヒトAPPのA β 領域がアポトーシス誘導に重要な領域であることが明らかとなった。また、APP導入後のニューロンでは細胞内カルシウムの上昇が観察され、カルパイン阻害剤によってAPPによるカスパーゼ3活性化が阻害された。したがってAPPによってカルシウム濃度の上昇によるカルパインの活性化がカスパーゼ3の活性化を引き起こすことが示唆された。

3) ヒトE2F1をヒト分化ニューロンに導入したところ、カスパーゼ3の活性化を伴った典型的なアポトーシスを起こした。強制

発現されたE2F1は、細胞死に先だって Nuclear Bodyを形成することが見いだされ、核マトリクスに存在していた。また、E2F1によってアポトーシス関連蛋白質であるBax、Bcl-2が誘導され、ニューロン死の機構への関与が示唆された。

4) 初代培養ラット海馬ニューロンはAPP導入すると死滅した。一方、APPはアストログリア細胞でIL-8の産生を高めた。APPによるニューロン死は、細胞内に蓄積したAbやAPP代謝産物によるものと考えられた。アデノウイルスを用いた本病態システムは、AD病因に関わる分子探索の系として、治療薬や抗痴呆性食品のスクリーニング等にも有用な病態モデル細胞系となることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Masumura, M., Hata, R., Nishimura, I., Uetsuki, T., Sawada, T. and Yoshikawa, K.: Caspase-3 activation and inflammatory responses in rat hippocampus inoculated with a recombinant adenovirus expressing the Alzheimer amyloid precursor protein. *Brain Res Mol Brain Res* 80 (2000) 219-227.

Taniguchi, N., Taniura, H., Niinobe, M., Takayama, C., Tominaga-Yoshino, K., Ogura, A. and Yoshikawa, K.: The postmitotic growth suppressor necdin interacts with a calcium-binding protein (NEFA) in neuronal cytoplasm. *J Biol Chem* 275 (2000) 31674-31681.

2. 学会発表

組換えアデノウイルスを用いたラット脳内APP遺伝子導入によるカスパーゼ3活性化と炎症反応誘導
升村誠、秦龍二、西村伊三男、植月太一、澤田徹、吉川和明
第43回日本神経化学会 金沢 (2000)

ニューロン内カスパーゼ3活性化に関与す

るAPPドメインの解析

西村伊三男、桑子賢一郎、原とも子、植月太一、吉川和明
第43回日本神経化学会 金沢 (2000)

核マトリクスにおけるnecdinとp53の相互作用

谷浦秀夫、小林正克、松本国治、吉川和明
第73回日本生化学大会、2000.10

安定遺伝子導入細胞によるnecdinの機能解析

安藤拓、谷浦秀夫、吉川和明
第73回日本生化学大会、2000.10

ニューロンにおけるnecdin結合蛋白質の同定と解析

谷浦秀夫、谷口直子、高山千利、新延道夫、吉川和明
第43回日本神経化学会、2000.10

E2F1強制発現によるニューロンアポトーシス誘導機構の解析

植月太一、西村伊三男、原とも子、谷浦秀夫、吉川和明
第43回日本神経化学会、2000.1

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細胞外領域結合蛋白質の解析

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（APP695）はアルツハイマー病患者の脳皮質に異常沈着する β -アミロイドの前駆体蛋白質として同定された細胞外に長いN末端領域と細胞内に短いC末端領域を持つ1回膜貫通型のレセプター様蛋白質である。APPの生物学的意義については明らかでないが、細胞内領域に対する結合蛋白質や細胞外領域についての種々の生理作用が報告されている。最近、N末端側領域のアミノ酸配列66～81に対するモノクローン抗体22C11が神経細胞に対して細胞毒性を示し、カスパーゼを介する典型的なアポトーシス様変性を引き起こすことが示された。本研究ではAPP695の神経細胞における生物学的意義を明らかにすることがアルツハイマー病発症解明の基礎的知見になると考え、N末端側の約90%を占める細胞外領域に着目し研究を行った。アビジン-ビオチンの特異的結合能を利用して、ビオチン化した22C11で認識されるペプチドを用いて同様の実験を行った。その結果、ペプチドで溶出される複数の結合蛋白質が検出されたのでN末端アミノ酸配列を解析したところ、セリン・スレオニンキナーゼ様の蛋白質と同じ部分アミノ酸配列を持つ蛋白質が見出された。したがって、本蛋白質がレセプター様構造を持つAPP695の細胞外から細胞内へのシグナル伝達に関わる蛋白質である可能性が考えられる。

A. 研究目的

アルツハイマー病（AD）の原因遺伝子の一つと考えられているアミロイド前駆体蛋白質（以下APP695と略す）は発生初期より神経細胞に豊富に存在しており、その局在性は細胞体からシナプス構造体に至るまで及んでいる。この様に細胞全体に普遍的に存在しているにもかかわらず機能については解明されていない。分担研究者はADの初期症状が急激な記憶の減退にあることに着目して、APP695のシナプスにおける機能を解析して来たが、その過程でAPP695の細胞内領域が神経伝達物質放出に重要な役割

を果たしていることをラット交感神経節細胞の初代培養系を用いた電気生理学的解析により明らかにした。一方、APP695はレセプター様構造をした一回膜貫通蛋白質であるが、全体の約90%を占めるN末端側細胞外領域についての機能が全く解明されていない。その原因は細胞外領域とそれに対応する内在性リガンドが特定出来ていないことによる。従って、APP695の神経細胞とくにシナプスにおける生物学的意義を明らかにするためには細胞内同様に細胞外領域にも着目して研究を進めることが必要であり、得られた成果はAD発症解明の基礎的知見とな

と思われる。

B. 研究方法

APP細胞外領域に対する GST融合蛋白質 (GST-APPs β 及び GST-APPad)の作製は、それぞれに対応するPCR産物を作製してGST融合蛋白質として大腸菌 DH5 α で発現させた。GST融合蛋白質はグルタチオンセファロース4Bカラムとイオン交換セルロース (DE-52) によって精製した。P2/P3画分の調製は10週齢ddYマウス脳から低張処理後、1 M NaCl処理を行った抽出液を用いた。結合蛋白質の探索はP2/P3画分の高塩濃度抽出液とアフィニティーリガンドとするGST融合蛋白質を4℃で1時間混合し、グルタチオンセファロース4Bカラムにかけた後、10mMのグルタチオンによって溶出した。次いでSDS-PAGEを行った後、CBB染色、あるいは銀染色による蛋白バンドの検出、さらに一部をPVDF膜にトランスファーして、ECL検出キットによりGSTあるいはGST融合蛋白質を検出した。ビオチン化22C11ペプチドとP2/P3高塩濃度抽出液を混合後、4℃で1時間、アビジンアガロースに結合させ1mMの22C11ペプチドを用いて溶出した。各サンプルをSDS-PAGEに供し、CBB染色により蛋白バンドの検出を行った。精製したN末端アミノ酸配列の決定は10% SDS-PAGEを行い、PVDF膜にトランスファーし、CBB染色したバンドを切り取り、気相式シーケンサーによって行った。

C. 研究結果

GST融合蛋白質の調製

APPの細胞外領域についての2種のGST融合蛋白質 (GST-APPs β :アミノ酸配列1~596、GST-APPad:アミノ酸配列225~267) を、大腸菌に発現させて得ることが出来た。約30kDaのGST-APPadはグルタチオンセファロースによるアフィニティー

クロマトグラフィーにより高純度に精製することが出来たが、分子量約120kDaのGST-APPs β は、分子量約26kDaのGST様蛋白質がメジャー成分として混在したので、グルタチオンによる溶出液をさらに陰イオン交換体であるDE-52にかけ、0.5M NaClを用いた直線濃度勾配による溶出を行って精製した。それぞれの収量はGST-APPs β については500ml培養液より約0.1mg、GST-APPadは500ml培養液より約2.6mgであった。

結合蛋白質の探索

マウス脳P2/P3画分を低張処理した後、1M NaClと5mM EDTAを含む緩衝液で、膜を洗浄抽出したものを試料とした。この試料調製条件下で、内在性APPがどの分画に局在するか、APPのC末端側を認識するAC1抗体によるイムノプロットで調べたところ、内在性APPの殆どが高塩濃度処理後の残査に存在することを確認した。

(1) GST融合蛋白質をリガンドとする場合

GST融合蛋白質をリガンド、GSTをコントロールリガンドとしてP2/P3高塩濃度抽出液と混合し、グルタチオンセファロースに吸着させ、0.5M NaClあるいは0.5M NaClと0.5% NP-40を含む緩衝液で十分に洗浄した後、グルタチオンによって溶出されたサンプルを10% ゲルによるSDS-PAGEに供し、CBB染色により検出した蛋白バンドについて比較検討した。まず、GST-APPs β をリガンドとして用いた結合実験では、コントロールリガンドのGSTでは見られない複数のバンドの存在が見られたが、GST-APPs β より低分子量のものについてはGST-APPs β の分解物である可能性が考えられたので、GSTに対する抗体を用いて、イムノプロットにより調べたところ、グルタチオンで溶出されたGST-APPs β より低分子量の蛋白バンドの殆どが分解物であることが確認された。この結果

はGST-APPs β がP2/P3高塩濃度抽出液中に含まれる複数のプロテアーゼにより分解されたことを示している。そこで、GST-APPs β よりも分子量の大きいものについて比較検討するために、5%ゲルによるSDS-PAGEを行い、銀染色により蛋白バンドの検出を行った。その結果、280-290kDa付近にGSTでは見られない複数のバンドが検出された。これらのバンドについてはGSTの抗体を用いたイムノブロットにより検出されなかったため、GST-APPs β に特異的に結合したものと推定した。なお、これらの蛋白バンドのN末端アミノ酸配列についての解析は高分子量であることと微量であることにより、本実験条件下では困難であると判断した。一方、APP695の酸性領域の43アミノ酸がGSTに融合したGST-APPadを用いた結合実験ではGST-APPadよりも低分子量側にGSTでは検出されない蛋白バンドの出現が見られたが、GSTに対する抗体によるイムノブロットで検出されたため、GST-APPadの分解物であると考えられる。

(2) ビオチン化22C11ペプチドをリガンドとする場合

APPのN末端領域に対するモノクローン抗体として確立されている22C11が細胞毒性を示すとの報告があるが、本研究では22C11が認識する領域の生理的意義を明らかにするために、ビオチン化した22C11ペプチドをリガンドとしてP2/P3高塩濃度抽出液中に存在する結合蛋白質の探索をアビジン-ビオチンの特異的結合を利用することにより行った。その結果、0.1M NaClを含む50mM Tris-HCl、pH7.4による十分な洗浄後、0.3mM及び1mMのペプチドにより溶出される複数の蛋白バンドの存在が認められたため、泳動距離を長くした、より分離能の高い条件下、SDS-PAGEを行い、PVDF膜にトランスファー後、目的とする蛋白バンドのN末端アミノ酸配列を気相式

シーケンサーにより決定した。14本の蛋白バンドについてのN末端アミノ酸配列を調べたが、殆どの試料が量的な問題、あるいは、N末端がブロックされている可能性もあり、解析不能であったが、10番と13番の試料については数残基のみ解析出来たため、データベース検索の結果、10番が β -チュブリンであり、13番が1231個のアミノ酸からなる、線虫のセリン・スレオニンキナーゼ様蛋白質と同様の部分アミノ酸配列を持つ蛋白質であることが確認された。

D. 考察

本研究では、細胞外のほぼ全域に相当するアミノ酸配列1~596に対するGST融合蛋白質、また、酸性領域（アミノ酸配列225~267）に着目し、それに対するGST融合蛋白質を作成し、それらをリガンドとして結合蛋白質の探索を行った。その結果、それぞれのリガンドよりも低分子量側にコントロールリガンドとして用いたGSTでは見られない複数の蛋白バンドが検出されたが、それらの殆どがP2/P3画分の高塩濃度抽出液中に含まれるプロテアーゼによるリガンドの分解物であることが確認された。したがって、本実験条件下では分解物の可能性が低い、リガンドよりも高分子量側に出現する蛋白バンドに着目する必要があり、そのために低濃度ゲルを用いて解析したところ、GST-APPs β をリガンドとした場合にのみ、250kDaより高分子量側に複数の蛋白バンドが検出された。極微量のためN末端アミノ酸配列の解析に供することが出来なかったが、APP細胞外領域のリガンドとして生理的に意味のある蛋白質である可能性もあり、今後、解析を進める必要がある。

本研究ではP2/P3画分の低張処理後の高塩濃度抽出液を試料として用いたが、内在性のAPPの殆どがP2/P3画分に存在してい

たので結合蛋白質探索の試料として最も適当であると考えた。しかしながら、内在性APPに対してどのようなメカニズムで結合しているのかは不明であり、他の脱着条件、例えばAPPが可溶化されてこない様な弱い条件での界面活性剤やカオトロピックイオンなどの処理を試す必要がある。

一方、アビジン-ビオチンの特異的結合を利用した結合蛋白質の探索では、いくつかの蛋白質が見いだされた。それぞれの蛋白質についてN末端アミノ酸配列を解析したところ、2種のものについて数残基の解析が出来た。一つは種を越えて普遍的に存在する β -チュブリンのN-末端アミノ酸配列1~10と同じ配列を持つ蛋白質であり、もう一つは線虫で見出された1231個のアミノ酸からなる、セリン・スレオニンキナーゼ様蛋白質のアミノ酸配列816~821に相当する部分アミノ酸配列を持つ蛋白質であった。 β -チュブリンについては豊富に存在する蛋白質であることや、微小管の成分として膜成分に間接的に結合している可能性もあり、P2/P3画分から高塩濃度で抽出されたものが、非特異的に弱いアフィニティーでペプチドに結合したものと考えられる。一方、線虫のセリン・スレオニンキナーゼ様蛋白質と同じ部分アミノ酸配列を持つ蛋白質については、現在のところ、線虫のものについて塩基配列解析のみの結果しか得られておらず、蛋白質の機能らに関する情報は全くないが、22C11認識ペプチドの内在性リガンドとして、キナーゼ活性を持つ、生理的に重要な蛋白質である可能性もあり、今後、質量分析などの方法を用いて、さらに解析を進める必要がある。

E. 結論

(1) マウス脳P2/P3画分の高塩濃度抽出液を試料として、GSTAPPs β (APP695のアミノ酸配列1~596) 結合蛋白質を探索し

た結果、280~290kDaの分子量を持つ複数の蛋白質が見出された。一方、GST-APPad (APP695のアミノ酸配列225~267) については、本実験条件下では結合蛋白質を見出すことが出来なかった。

(2) 22C11認識ペプチドへの結合蛋白質として、線虫のセリン・スレオニンキナーゼ様蛋白質と同じアミノ酸部分配列を持つ蛋白質が見出された。この蛋白質に関しては、APP695の細胞外から細胞内へのシグナル伝達に関与している可能性も考えられるので更なる解析が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

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の活性化機構

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

野生型APPをニューロンに過剰発現するとカスパーゼ3の活性化とアポトーシスが起こるが、A β ドメインの一部を欠失した変異型APPを発現したニューロンではこれらはみられなかった。また、野生型APP発現ニューロンでは、カスパーゼ3の活性化がピークとなる以前に細胞内Ca²⁺濃度が上昇していることが明らかになり、さらにCa²⁺依存的プロテアーゼカルパインの阻害剤によってカスパーゼ3の活性化が抑制された。APPがカスパーゼ3によって切断されるという報告に基づき、切断後のAPP断片のN末端側(APP Δ C31)に対する特異抗体を作製して解析したところ、野生型APP発現ニューロン内でAPP Δ C31断片が検出された。さらにAPP Δ C31自体を発現させるアデノウイルスベクターを作製してニューロン変性における役割を解析した。その結果カスパーゼ3非依存的にアポトーシスが引き起こされることを見いだした。以上の結果から、野生型APPの細胞内蓄積によって細胞内Ca²⁺濃度が上昇し、カルパインを介してカスパーゼ3が活性化する経路が存在することが推測された。そして、活性化したカスパーゼ3がAPP自体を切断し、その結果生じたAPP Δ C31断片が細胞内に蓄積してカスパーゼ3非依存的な経路により二次的にアポトーシスを促進している可能性が示唆された。さらにこうした過程は生理的条件下で起きるニューロン死にも関与している可能性が示された。

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のヒトニューロンで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を用いて、APPのニューロン変

性における機能を明らかにすることである。またどの様にしてAPPがニューロン死のシグナルを伝えるのかを明らかにすることである。さらに生理的条件下でのニューロン死にもAPP過剰蓄積が関与しているかどうかを明らかにすることも目的とした。

B. 研究方法

APPへの変異の導入と変異型APP発現アデノウイルスベクターの作製
A β のN末端側20アミノ酸を欠失した変異型APP(APP Δ A β 20)のcDNAは、A β 1-20（アミノ酸597-616）を欠失させたものをPCRにより増幅して作製した。カスパーゼ3によってC末端31アミノ酸が切断された変異型APP（APP Δ C31（アミノ酸1-664）の

cDNAは、APPのアミノ酸576-664の配列を3'末端に終止コドンを持つプライマーによってPCRを行い作製した。作製法は、東京大学医科学研究所の齋藤泉博士らの開発した作製法によって行った。得られた変異型APPのcDNAをコスミド (pAxCawt) に挿入した後、EcoT 221で切断されたDNA-TPCと共にヒト胎児腎臓由来の293細胞に遺伝子導入し、相同的遺伝子組換えによって生じた組換えアデノウイルスを得た。

細胞培養及び遺伝子導入法

ヒト胚性ガン細胞由来のNTera2(NT2)細胞をレチノイン酸処理により分化させた分裂終了ニューロンNT2ニューロンおよび未分化NT2, ヒトグリオーマBu17細胞に、組換えアデノウイルスベクターを 2×10^7 pfu/mlで培養液に加え、12時間培養した。その後、アデノウイルスを除去した通常の培養液に交換して24~96時間後まで培養を続けた。

カスパーゼ3活性測定

アデノウイルスを感染させたNT2ニューロンを回収し、細胞抽出緩衝液に懸濁し、4℃で10分間細胞内蛋白質を抽出した。細胞抽出液を遠心分離し上清を回収して、各サンプル蛋白質10 μ gをカスパーゼ3活性測定に用いた。活性測定は、蛍光基質 Z-DEVD-AFCの切断を指標にして行った。細胞内カルシウムキレーター (BAPTA-AM) およびカルパイン阻害剤添加実験の場合、アデノウイルス感染と同時にBAPTA-AM またはカルパイン阻害剤を培養液中に添加し、ウイルス感染後48時間でNT2ニューロンを回収し、上述のカスパーゼ3活性測定を行った。BAPTA-AMは添加後12時間ごとに交換した。

ウェスタンブロット解析

アデノウイルスを感染させたNT2ニューロンを回収し、細胞溶解緩衝液に懸濁しホモゲナイズした後に、SDSポリアクリルアミドゲルによって分離した。分離した蛋白質はPVDF膜に転写し、一次抗体と室温で1時間反応させた。そして、ペルオキシダー

ゼ標識抗ウサギ、抗マウス二次抗体と室温で1時間反応させた後に、化学発光法によって検出した。

免疫組織化学

NT2ニューロンを、35 mmディッシュ内のコラーゲンコートしたカバーガラス上で培養し、アデノウイルス感染後48または72時間で蛍光抗体法により免疫染色を行った。NT2ニューロンはホルムアルデヒドで固定した後、一次抗体と反応させ、次に蛍光ラベルされた抗ウサギ二次抗体と反応させた。またヘキスト33342により染色体DNAの染色を行った。

細胞死の判定と測定

細胞死の判定は、エチジウムホモダイマーの死細胞核内の取り込みにより判定した。NT2ニューロン、NT2未分化細胞およびBu17細胞をアデノウイルス感染後72時間でエチジウムホモダイマー処理後固定し、APP抗体または β -gal抗体によって免疫染色を行った。各サンプルにつき無作為に5カ所の視野を選び、APPまたは β -gal免疫陽性細胞100~200個中のエチジウムホモダイマー陽性細胞数を測定した。

$^{45}\text{Ca}^{2+}$ による細胞内 Ca^{2+} の測定

NT2ニューロンの培養液中に $^{45}\text{Ca}^{2+}$ を終濃度2 m Ci/mlとなるように添加し、48時間前培養して平衡状態にした。 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 添加48時間後にアデノウイルスを感染させ、その24時間後にNT2ニューロンを回収した。細胞内 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の放射活性は液体シンチレーション計測器を用いた。その際、NT2ニューロン懸濁液を各サンプルとも等量ずつ回収して蛋白質定量を行い、得られた各サンプルの放射活性を蛋白質量により補正した。

C. 研究結果

APPの細胞内蓄積によるカスパーゼ3の活性化とアポトーシス誘導

APPの細胞内蓄積によるカスパーゼ3の活性化機構を解析するために、まず、野生型APPおよびA β の膜貫通領域より外側にあ

るA β のN末端側20アミノ酸を欠失させた変異型APP(APP Δ A β 20)を発現するアデノウイルスベクターを作製して解析を行った。NT2ニューロンに野生型APP(WT), APP Δ A β 20および β -galを遺伝子導入し, 72時間後にエチジウムホモダイマーの取り込みにより細胞死の解析を行ない, 遺伝子導入ニューロン中のエチジウムホモダイマー陽性死細胞の割合を定量化した結果, 野生型APP発現ニューロンでは約36%に死細胞が検出されたが, APP Δ A β 20および β -gal発現ニューロンではどちらも約6%しか検出されなかった。このことから, 野生型APPの細胞内蓄積が特異的に細胞死を引き起こすことが明らかになった。また, これまでに報告したように野生型APP発現ニューロンはTUNEL染色陽性のアポトーシス像を示し, 細胞死がアポトーシスであることを確認した。

次に, NT2ニューロンに野生型APPおよびAPP Δ A β 20を遺伝子導入し, 48時間後に抗APP N末抗体と抗活性化型カスパーゼ3抗体によって二重染色を行った。その結果, 野生型APP発現ニューロンで活性化型カスパーゼ3が検出されたが, APP Δ A β 20発現ニューロンでは殆ど検出されなかった。さらに野生型APP, APP Δ A β 20および β -galを遺伝子導入し, 蛍光基質Z-DEVD-AFCの切断を指標にして24時間ごとにカスパーゼ3の活性を測定したところ, 野生型APP発現ニューロンは48時間後をピークとした顕著なカスパーゼ3の活性化がみられたがAPP Δ A β 20および β -gal発現ニューロンは96時間後までではその活性化はみられなかった。これらの結果から, 野生型APP特異的にカスパーゼ3の活性化が起こり, アポトーシスが引き起こされることが示された。

Ca²⁺代謝異常とカスパーゼ3の活性化

NT2ニューロンに野生型APPおよびAPP Δ A β 20を遺伝子導入し, APP導入でカスパーゼ3の活性化がピークとなる以前である導入24時間後にCa²⁺の細胞内量を測定した。その結果, 野生型APP発現ニューロンでは細胞内Ca²⁺量が非発現ニューロンに対して約60%, APP Δ A β 20発現ニューロン

に対して約30%上昇していた。次に, この細胞内⁴⁵Ca²⁺濃度の上昇とカスパーゼ3の活性化との関連を調べるために細胞内Ca²⁺キレーターであるBAPTA-AMで処理し, APP導入48時間後にカスパーゼ3の活性測定を行ったところ, 0.5 mM BAPTA-AMではカスパーゼ3の活性はほとんど抑制されなかったが, 5.0 mM ではAPP Δ A β 20発現ニューロンとほぼ同じレベルまで強く抑制された。このことから, 細胞内Ca²⁺濃度の上昇がカスパーゼ3活性化経路の上流に位置している可能性が考えられた。そこで, Ca²⁺濃度依存的に活性化し細胞死に関与するプロテアーゼであるカルパインの阻害剤で処理し, 同じく48時間後にカスパーゼ3の活性測定を行った。その結果, 野生型APP発現ニューロンのカスパーゼ3活性は, カルパイン阻害剤によりAPP Δ A β 20発現ニューロンの活性レベルにまで強く抑制された。以上の結果から, APPの細胞内蓄積によって細胞内Ca²⁺濃度が上昇し, カルパインを介してカスパーゼ3が活性化する経路の存在が示唆された。

カスパーゼ3の活性化に伴うAPP Δ C31断片の細胞内蓄積

APPはC末端側の細胞内領域に存在するVEVD配列がカスパーゼ3によって認識, 切断され, N末端側の664アミノ酸からなる断片(APP Δ C31)とC末端側の31アミノ酸からなる断片を生ずることが報告されている。そこでAPPの蓄積によって活性化したカスパーゼ3が実際にNT2ニューロン内でAPP自体を切断しているかどうかを調べた。APP Δ C31のC末端側に対する断端特異的な抗体 (APP Δ C31抗体)を用いて解析を行った。その結果, 野生型APPが蓄積したニューロンでは細胞内にAPP Δ C31断片の蓄積がみられた。APP Δ A β 20発現ニューロンでは, APP Δ C31断片は検出されなかった。ウエスタンブロットでも, 野生型APP発現ニューロン群では, APP Δ C31抗体によって認識される約96kDaのAPP Δ C31断片が検出された。また, 野生型APPとAPP Δ C31自体を同レベルで発現させて同じくAPP Δ C31抗体によってウエ

スタンプロットを行ったところ、野生型APP発現ニューロン群ではAPP Δ C31発現ニューロン群とほぼ同レベルのAPP Δ C31断片が検出された。

APP Δ C31断片によるアポトーシス誘導

NT2ニューロンにAPP Δ C31を遺伝子導入し、72時間後にエチジウムホモダイマーの取り込みにより細胞死を解析し定量化したところ、APP Δ C31発現ニューロンのうち約28%が死細胞であった。これに対し、野生型APPまたはAPP Δ A β 20発現ニューロンのエチジウムホモダイマーの取り込み率はそれぞれ、33%、7%であり、APP Δ C31断片は野生型APPと同様に細胞毒性を持つことが示された。APP Δ C31断片が蓄積して変性したニューロンは、TUNEL陽性のアポトーシス像を示した。一方、野生型APPはNT2ニューロンのみで高い毒性を示したが、APP Δ C31はどの細胞にも毒性を示した。APP Δ C31発現ニューロンではカスパーゼ3の活性化はみられなかった。以上のことをまとめると、活性化したカスパーゼ3によって切断され細胞内に蓄積したAPP Δ C31断片はそれ自体が細胞毒性を持ち、野生型APPとは異なってニューロン非特異的かつカスパーゼ3非依存的な機構によりアポトーシスを引き起こすことが判明した。

D. 考察

野生型APPがニューロン内に蓄積するとカスパーゼ3の活性化を介したアポトーシスが誘導されるのに対し、A β ドメインの一部を欠失したAPP Δ A β 20を導入したニューロンではカスパーゼ3の活性化もアポトーシスも起こらない。さらに、野生型APPによる細胞死はニューロンに特異的であることも示された。このことはAPPによるニューロン死は非特異的な膜タンパク質の過剰発現の影響ではなく野生型APPが特異的にアポトーシスが起こしたものと考えられる。Ca²⁺は多くの生体機能に必須のシグナル伝達物質で、その代謝異常は細胞死を引き起こし、アルツハイマー病をはじめ

とする様々な神経変性疾患や筋疾患にも関与していると考えられている。野生型APP発現ニューロンでは、カスパーゼ3活性化のピークに先行して細胞内Ca²⁺濃度の上昇が起こることが明らかになり、さらに細胞内Ca²⁺キレーターであるBAPTA-AMによってカスパーゼ3の活性化が強く抑制されたことから、細胞内Ca²⁺濃度の上昇とカスパーゼ3の活性化が密接に関係していると推測される。また、カルパインの阻害剤によりカスパーゼ3の活性化が抑制されたことから、細胞内Ca²⁺濃度の異常な上昇によってカルパインが活性化され、間接的あるいは直接的にカスパーゼ3を活性化している可能性が考えられる。したがって、アルツハイマー病発症機構の一つとして、APPの過剰な蓄積、細胞内Ca²⁺濃度の上昇、それに伴うカルパインの活性化、そしてアポトーシス実行因子であるカスパーゼ3の活性化という一連の経路が存在している可能性が考えられる。また、APPの蓄積により活性化したカスパーゼ3がAPP自体を切断し、ニューロン内にAPP Δ C31断片が蓄積していることが示された。さらにAPP Δ C31断片自体も細胞毒性を持ち、ニューロンにアポトーシスを誘導することが明らかになった。また、APP Δ C31断片によるアポトーシスはカスパーゼ3に非依存的かつニューロン非特異的であることから、欠失したC末端側の31アミノ酸のドメインがニューロン特異的なカスパーゼ3の活性化に関与する可能性が考えられる。このドメインにはニューロンに特異的なFE65などのアダプター蛋白質の結合配列が存在することから、このドメインを介したシグナル伝達系の異常が野生型APP過剰発現でみられた細胞内Ca²⁺濃度の上昇に関与している可能性も考えられる。

E. 結論

- 1) ヒトAPPに変異を導入し、アデノウイルスベクターを用いてヒト分化ニューロンに導入した結果、A β ドメインがアポトーシス誘導に重要な領域であることが明らかとなった。
- 2) カスパーゼ3で切断された後のAPPN末端側の領域はカスパーゼ非依存的、ニュー

ーロン非依存的にアポトーシスを誘導した。

3) APP導入後のニューロンで細胞内カルシウムの上昇が観察され、カルパイン阻害剤によってAPPによるカスパーゼ3活性化が阻害された。このことから、APPによってカルシウム濃度が上昇し、カルパインの活性化が起こることがカスパーゼ3の活性化を引き起こす可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 発表論文

Masumura, M., Hata, R., Nishimura, I., Uetsuki, T., Sawada, T. and Yoshikawa, K.(2000)
Caspase-3 activation and inflammatory response in rat hippocampus inoculated with a recombinant adenovirus expressing the Alzheimer amyloid precursor protein
Molecular Brain Research 80 219-227

2. 学会発表

1.Necdin の中胚葉系細胞分化における役割
第73回日本生化学会 横浜 (2000)
植月太一、中田祐二、江上洋平、吉川和明

2.組換えアデノウイルスを用いたラット脳内E132遺伝子導入によるカスパーゼ3活性化と炎症反応誘導 第43回日本神経化学会
金沢 (2000) 升村誠、秦龍二、西村伊三男、植月太一、澤田徹、吉川和明

3.E2F1強制発現によるニューロンアポトーシス誘導機構の解析 第43回日本神経化学会 金沢 (2000) 植月太一、西村伊三男、原とも子、谷浦秀夫、吉川和明

4.ニューロン内カスパーゼ3活性化に関与するAPPドメインの解析 第43回日本神経化学会 金沢 (2000) 西村伊三男、桑子賢一郎、原とも子、植月太一、吉川和明

厚生省科学研究費補助金（脳科学研究事業）
分担研究報告書

E2F1によるニューロン死の分子機構

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

ヒト胚性がん細胞NT2から分化したニューロン（NT2ニューロン）およびヒト骨肉腫細胞SAOS2細胞にE2F1を導入し強制発現することにより、そのアポトーシス誘導機構を解析した。E2F1を発現するアデノウイルスベクターを感染させると両方の細胞で核の凝集や断裂化を伴ったアポトーシス様細胞死を起こした。この際、細胞を抗活性型カスパーゼ3抗体で染色すると、いずれの細胞においてもE2F1を蓄積したアポトーシス細胞で免疫陽性となっていた。以上の結果からE2F1をSAOS2細胞や、NT2ニューロンで強制発現するとカスパーゼ3活性化を伴ったアポトーシスを引き起こすことが明らかとなった。さらにE2F1をニューロンやSAOS2細胞で強制発現すると、E2F1が核内に斑点状に集積する像が見られ、この核内構造体は抗PML抗体で染色された。PMLは、前骨髄球性白血病の原因遺伝子の1つとして同定され、核内でPML Nuclear Bodyと名付けられた核内構造体に局在し、PMLを強制発現すると細胞によってはアポトーシスを誘導することが知られている。これらの知見からE2F1が核内でPML陽性核内構造体（Nuclear Body）を中心に集合体を形成することとニューロンでのアポトーシス誘導が重要な関連を持っている可能性が示唆された。また、アポトーシスに関連したBaxやBcl-2がE2F1によってNuclear Bodyに誘導されることが見いだされた。また、この構造物は核マトリクスに存在し、核マトリクスを介したアポトーシス誘導蛋白質群の複合体が形成されている可能性が示唆された。

A. 研究目的

E2F1は、細胞周期のG1/S期移行に重要な役割を果たしている転写因子である。分裂停止ニューロンにおいてもE2F1遺伝子は発現しているがその生理的な意義は不明である。我々は胚性がんP19細胞由来の分化ニューロンにE2F1を強制発現するとアポトーシスを誘導することを既に報告している。また、E2F1はニューロンがアポトーシ

ス刺激を受けた場合に発現が上昇するとの報告がある。我々は細胞周期の調節以外に、特に分裂終了細胞においてはアポトーシスの制御に関与しているものと考え、その分子的な機構を明らかにすることを研究の目的とした。核内因子がアポトーシスを誘導する例としてガン抑制因子 p53が良く知られており、解析も多く行われているが、これまでにE2F1によるアポトーシス誘

導に関しては十分な知見が得られていない。また、細胞膜に存在するレセプターや、ミトコンドリアを介したアポトーシス誘導の分子メカニズムは非常に多くの研究がなされてきた。しかしながら、核を基点とするアポトーシス誘導に関しては、未だその分子機構は充分解明されていない。したがって核を基点とするアポトーシス誘導機構を解析する実験系を確立し、核からのアポトーシス誘導に共通する何らかの分子機構を見いだすことも本研究の目的の一つである。

B. 研究方法

アデノウイルスベクターの作製と精製はCOS-TPC法と塩化セシウムを用いた超遠心によって行われた。細胞としてヒト胚性ガン細胞NTera2 (NT2細胞)由来のニューロンを用いた。また、これまでにE2F1によってアポトーシスが誘導されることが報告されているヒト骨肉腫由来のSAOS2細胞もE2F1アポトーシス誘導の解析に使用した。アポトーシスを検出する方法として、核の形態観察を行った。ニューロンおよびSAOS2細胞の核はヘキスト33342で染色し、抗E2F1抗体と2重染色し、E2F1導入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E2F1誘導後の細胞核を数種類のアポトーシス関連蛋白質に対する抗体と抗E2F1抗体で2重染色した後、共焦点レーザー走査顕微鏡により観察した。核マトリクスの調製はHeらの方法に基づき段階的抽出によって行われた。各マトリクスは免疫染色し共焦点レーザー走査顕微鏡により観察した。ウェスタンブロッティングには段階的に抽出された各細胞抽出液を解析に用いた。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。

C. 研究結果

1.E2F1による細胞死誘導とカスパーゼの活性化

分化して完全に分裂終了したNT2ニューロンにE2F1発現アデノウイルス (AdE2F1) を導入した。すると、導入48時間後からE2F1発現細胞において核の凝集、細胞体の膨潤などのアポトーシス様の変性が明らかとなり、60時間後には殆どのE2F1導入ニューロンが核の断裂化を伴った細胞死を引き起こした。この際、活性型カスパーゼ3に対する抗体で染色すると、E2F1を蓄積している全ての変性ニューロンで免疫陽性になった。また、カスパーゼ8とカスパーゼ3の活性化が認められた。以上の結果から、E2F1はニューロン内で強制発現され、蓄積すると細胞死を引き起こし、それがカスパーゼ3の活性化を伴ったアポトーシスによるものであることが明らかとなった。次にSAOS2細胞にAdE2F1を導入すると、NT2ニューロンよりもやや遅れて約72時間目から導入細胞の内、約30%において変性が顕著になった。SAOS2細胞においても顕著な核の凝集、断裂化が観察され、アポトーシスを引き起こしていることが明らかになった。

2.E2F1発現によるNT2ニューロン核内でのNuclear Body誘導

NT2ニューロンにおいて、導入されたE2F1が変性に先立って核内に斑点状に集積する像が確認された。また、この核内構造を同定するため、細胞増殖抑制やアポトーシス誘導の場として働いているPML Nuclear Bodyの構成蛋白質PMLや、核小体のマーカーであるFibrillarlinに対する抗体で染色した。その結果、PMLと局在が一致した。SAOS2細胞核においても同様の斑点状構造体が見いだされた。SAOS2細胞においてはアポトーシスに至るまでに、構造

体が導入後成長することが観察されたE2F1はPML Nuclear Bodyに集積を開始し、そこを中心にしてE2F1集積構造物が成長していた。しかしながらPML Nuclear Bodyそのものは大きくなり、1部分にとどまっていた。

3.E2F1誘導核内構造物と核マトリクスとの関連

核マトリクスは核の骨組みを成す構造体であり、転写や複製などの核の機能と密接に関連していることが報告されている。そこで発現されたE2F1が集積している核内構造物も核マトリクスに関連しているかどうかを核マトリクス調製を行って検討した。AdE2F1導入72時間後のSAOS2細胞から核マトリクスを抽出した。固定後、免疫組織化学的に抗E2F1抗体で染色し共焦点レーザー走査顕微鏡により立体画像を作製した。その結果E2F1が集積している核内構造物は抽出後も核マトリクスとして残存しており、その構造は内側が中空のボール状のものであることが明らかとなった。

4.E2F1強制発現によるNT2ニューロン核内へのアポトーシス関連蛋白質の誘導

PMLを強制発現するとアポトーシスを引き起こすことが報告されている。その際Baxなどのアポトーシス誘導因子がPML Nuclear Bodyに集積することが報告されている。AdE2F1を導入したNT2ニューロンではアポトーシスを制御する重要な細胞内因子であるBax及びBcl-2が核内に誘導され、これを共焦点レーザー走査顕微鏡下で観察すると両蛋白質ともNuclear Bodyに集積しE2F1と局在が一致した。次にSAOS2細胞においてもNT2ニューロン同様にBax、Bcl-2共にE2F1誘導Nuclear Bodyに集積していることが確認された。

5.E2F1により誘導されたアポトーシス関連蛋白質と核マトリクスの関連

E2F1導入48時間後のNT2ニューロンから核マトリクス画分を抽出して解析した。

BaxはE2F1によって蛋白質の誘導は観察されなかったが細胞質画分から一部が核マトリクス画分に誘導されていた。Bcl-2はE2F1強制発現による蛋白量の増加が認められ、核マトリクス画分にも誘導されていた。この結果からE2F1によって誘導されたアポトーシス関連蛋白質は、核マトリクスでアポトーシス誘導の際、何らかの機能を担っていることが示唆された。

D. 考察

E2F1を分裂終了細胞に導入すると細胞死を引き起こすことはこれまでに報告されてきた。しかしながらその詳しい分子機構は十分に明らかにされていない。本研究によってE2F1によって引き起こされるニューロン死はアポトーシスに典型的な核の変性形態を伴うことが示された。また細胞死にはさまざまな経路があるが、E2F1によるニューロン死の誘導はカスパーゼ活性化を伴うアポトーシスであることが明らかとなった。E2F1が引き起こすニューロン死は核を基点とするアポトーシス解析のモデルとなると考えられる。SAOS2細胞は分裂終了細胞ではないが、E2F1がニューロンで引き起こしたようにカスパーゼ3活性化を伴う典型的なアポトーシスを引き起こすことから、共通の分子機構でアポトーシスのシグナルを伝達している可能性が高いと考えられる。強制発現し蓄積したE2F1が核内でNuclear Bodyを形成し集積した。またこのNuclear Bodyは、NT2ニューロンのみならずSAOS2細胞でも観察されたことから、E2F1がアポトーシス誘導をする際に共通に誘導する構造体である可能性が示された。SAOS2を用いて核マトリクス抽出し、染色して観察した結果から、E2F1が誘導した核内構造物は核マトリクスを構成していることが示された。また立体構造を共焦点レーザー走査顕微鏡によって観察した結果から