

200/0614

厚生科学研究費補助金

脳科学総合研究事業

アルツハイマー病の発症分子機構に関する研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 柳澤勝彦

平成14 (2002) 年 3月

目 次

I. 総括研究報告書

- アルツハイマー病の発症分子機構に関する研究 ————— 1
柳澤勝彦

II. 分担研究報告書

1. アミロイド β 蛋白蓄積開始機序の研究 ————— 10
柳澤勝彦
2. γ -セクレターゼ活性を調節する因子の解析 ————— 14
駒野宏人
3. アルツハイマー病におけるアポリポプロテイン E の分子機構の解明 ————— 17
道川 誠
4. アポリポ蛋白質 E の構造・機能と中枢神経系に於けるコレステロール代謝の研究 ————— 22
横山信治
5. プレセニリン変異神経細胞における脂質代謝の ER および細胞死への影響 ————— 25
田中稔久

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ————— 30

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ————— 32

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発症分子機構に関する研究

主任研究者 柳澤勝彦 国立療養所中部病院・長寿医療研究センター 痴呆疾患研究部 部長

研究要旨

アミロイドβ蛋白 (Aβ) の異常凝集ならびにそれによる神経毒性発現をアルツハイマー病成立過程の中核と捉え、その分子機構に関する検討をアルツハイマー病発症の遺伝的要因であるプレセニリンならびにアポリポ蛋白Eの病的役割に焦点をあてながら進めている。本年度は、特にプレセニリン依存性のAβ産生を制御する遺伝子の同定に成功するとともに、Aβの凝集ならびに毒性発現過程に神経細胞のコレステロール代謝動態が深く関わることを示す実験結果を得た。

分担研究者

駒野宏人	長寿医療研究センター 痴呆疾患研究部 室長
道川 誠	同上
横山信治	名古屋市立大学医学部 生化学第一講座 教授
田中稔久	大阪大学大学院医学研究科 神経機能講座 助手

の分子機構の全体を解明することを目的とする。

B. 研究方法

(柳澤)

(1) liposome 作製および Aβ凝集実験

In vitro における Aβ凝集実験は、昨年度構築した実験系を用いた。即ち、liposome の作製にあたっては、コレステロール (CH)、スフィンゴリエリン (SM)、フォスファチジルコリン (PC) を有機溶媒に溶解し、窒素ガス気流にて乾燥後、トリス生食緩衝液 (tris-buffered saline: TBS) 中で攪拌し、凍結・融解を反復の上、超音波破碎機にかけ、均一な liposome を形成させた。

Aβ凝集によるアミロイド線維化を定量的ならびに定性的に評価するにあたっては、アミロイド構造を特異的に認識し、蛍光を発する薬剤である thioflavin T (ThT) を用いた。同時に、インキュベート液を遠心して得られた沈澱物の電子顕微鏡学的観察を行い、形態学的に Aβ線維の構造

A. 研究目的

アルツハイマー病 (AD) 発症病態の中核にはアミロイドβ蛋白 (Aβ) の異常凝集ならびにそれによる神経毒性発現の病的過程が存在するという所謂「アミロイド・カスケード仮説」が広く受け入れられている。しかしながら、この病的カスケードの個々のステップの分子機構については不明の点が多い。本研究は、Aβを中心に、AD 発症の遺伝的要因であるプレセニリンならびにアポリポ蛋白 E の病的役割の検討を通して、AD 発症

を観察した。

(2) 抗 GM1-A β 抗体

GM1-A β の seed 作用を分子レベルで検討する為、ヒト脳より調整した GM1-A β を抗原として作製した IgM モノクローナル抗体 (Yanagisawa et al., FEBS Lett 420: 43-46, 1997) を遺伝子工学的な操作により class switch した IgG モノクローナル抗体 (4396C) を用いた。

(駒野)

γ -セクレターゼ活性を上げる cDNA の同定には、次の様な独自に開発したスクリーニング系を用いた。まず、A β の N 末端から γ -セクレターゼ切断部位を含む APP 領域 (C53) と Notch (Schroeter et al., Nature 393:382-386 1998) の C 端側転写因子領域との fusion gene を安定に遺伝子導入した細胞株を得た。また、この細胞は、Notch の転写活性により、ピューロマイシン耐性遺伝子がオンとなるように作製する。すなわち、細胞内で C53-Notch キメラ蛋白が γ -セクレターゼによって切断を受け、Notch が遊離すると、細胞がピューロマイシン耐性になるという系を構築した。また、cDNA library をヒトの脳の mRNA より調製した。この細胞株に cDNA library をトランスフェクトし、ピューロマイシン耐性を与える cDNA をセレクションし、この cDNA が A β 産生活性をもつかどうかを確認することにより、 γ -セクレターゼ活性を促進する cDNA を単離した。その結果、得られた cDNA のひとつは、Herp をコードしていることが明らかとなった。Herp が A β 産生に関与するか否かの確認実験は、Herp cDNA を Human kidney 293 (HEK293) 細胞に導入し、この細胞の産生する A β 量が増加するか否かで解析した。また、Herp とプレセニリンとの結合性は、Herp に対する抗体、および、プレセニリンに対する抗体を用いて、

免疫沈降実験により解析した。

(道川)

神経細胞培養：妊娠 17-18 日目のラット胎仔脳を無菌的に取り出し、膜を剥離した後メスで細かく切断した後、0.25%のトリプシンで 37°C、20 分間 incubation した後、パスツールピペットでピペッティングして、神経細胞を単離し poly-D-lysine でコートした 12 ウェルあるいは 6 ウェルで培養した。ペプチド研から購入した AB1-40 は、蒸留水で溶解し、PBS あるいは活性酸素のスキャベンジャーなしの培地で 10 μ M の濃度に希釈したものを 24 時間 37 度 C で インキュベーションしたものをを用いた。

(横山)

ラットまたはマウス胎児脳より分離培養したアストロサイトを用いた。細胞から培地中へのコレステロール・磷脂質の分泌はアポリポ蛋白質存在下などで放射標識脂質や酵素法による微量定量により測定した。また培養液の密度勾配超遠心による分析により HDL の新生とその組成を解析した。細胞内や培養液中のアポ E はイムノブロット法で、その mRNA は RT-PCR により分析した。

(田中)

SY5Y 神経芽細胞腫は 5% FCS を含む D-MEM/F-12 にて培養し、singlet oxygen を介する核酸への酸化ストレスとして色素 (2 μ g/ml rose bengal, 2 μ g/ml methylene blue) を添加後さらに光 (100W, 10cm) を照射し、30 分から 2 時間後までの細胞を集めた。このとき、singlet oxygen のスキャベンジャーとなる 1mM azide, 一般に抗酸化剤としてよく使用される 30 mM N-acetyl-L-cystein を同時添加したのも同様の系にて検討した。さらに、および脂質の影響を見るために細胞を 1 μ M compactin で 24 時間処理し

cholesterol を deplete したものの、1 μ M compactin と同時に 1 μ g/ml cholesterol を添加して内因性 cholesterol 合成を阻害すると同時に外因性 cholesterol を補充したものについても同様の系にて検討した。細胞はバッファー(100 mM PIPES、pH6.8、2 mM MgCl₂、0.1 mM EDTA、1 mM MEGTA、25 mM NaF、1 mM Na₃VO₄、1 mM PMSF、5 μ g/ml aprotinin、5 μ g/ml leupeptin、0.1% Triton-X100) にて溶解した lysates を 200K x G にて遠心し、その supernatant を得て、ウエスタンブロット解析をおこなった。タウ蛋白のリン酸化レベルの変化は、抗リン酸化タウ蛋白特異抗体 (PHF-1 (Ser396/404)(Dr. Davies P. より 供与)、M4 (Thr231/Ser235)(Dr. Ihara Y. より 供与)、12E8(Ser262/356)(Dr. Shenk D. より 供与)、S422(Ser422)(Dr. Iqbal K. より 供与)) によって検討し、p38 MAP キナーゼまた SAPK のキナーゼ活性は、抗リン酸化 p38 抗体 (New England Lab より 購入) および抗リン酸化 SAPK 抗体 (New England Lab より 購入) により検討した。また、核酸 (ribosomal RNA) への酸化を確認するために、細胞から RNA isolation kit (Ambion) を用いて RNA を回収し、それをアガロース/ポリアクリルアミドゲルに電気泳動させた後ニトロセルロース膜に転写し、抗 8-ヒドロキシグアノシン抗体 (1F7 抗体) を用いてウエスタンブロットの要領で 28S および 18S の ribosomal RNA の酸化を解析した。さらに、細胞死のレベルは Live and Dead kit (Molecular Probe より 購入) にて測定した。

(倫理面への配慮)

本研究の実施にあたっては実験動物としてマウスを用いるが、その使用にあたっては屠殺を麻酔下において実施する等の十分な配慮を加える。動物

愛護上問題となる実験手技は本研究の遂行上にはないと考えられる。

C. 研究結果

(柳澤)

SM/CH/GM1 liposome 添加によって A β の凝集を示す ThT 値の上昇は lag time なく誘導され、その反応曲線の解析より、A β 重合は一次反応速度論モデルに従うことが確認された。対照実験として行った 細断 A β アミロイド線維 (fA β) 添加系における ThT 値の上昇も一次反応速度論モデルに従うことが確認されたが、peak に達した後、ThT 値は低下した。これに対して、SM/CH/GM1 liposome 添加による場合は peak に達した後、ThT 値は plateau を形成し、高値を保った。

SM/CH/GM1 liposome 添加によって A β の凝集に対する抗体の抑制効果を検討したところ、4396C は用量依存的に A β 凝集を抑制した。これに対して、合成ペプチドを抗原に作製した抗 A β 抗体 (4G8 および 6E10) は可溶性 A β の凝集を全く抑制しなかった。4G8 の A β 凝集に対する非抑制性の実態を明らかにする為、4G8 添加反応液の免疫電子顕微鏡観察を行ったところ、4G8 は形成されたアミロイド線維の側面に結合することが確認された。

(駒野)

我々のスクリーニングにより得られた cDNA のひとつが、小胞体ストレスによって誘導される Herp と命名された機能不明な既知の膜蛋白 (Kokame et al., J.Biol.Chem. 275, 32846-32853, 2000) をコードしていることが明らかとなった。次に、Herp cDNA を HEK293 細胞に導入し、この細胞の産生する A β 量が増加するか否かを解析したところ、Herp cDNA を遺伝子導入するこ

とにより、細胞の産生する A β 量が1.8倍に増加することが明らかとなった。さらに、Herp 蛋白が、家族性アルツハイマー病原因遺伝子産物プレセニリンと結合し、 γ -セクレターゼ活性をあげることを見いだした。また、Herp に対する抗体を用いて、脳内で Herp 蛋白を発現している細胞を解析したところ、脳内では、神経細胞および血管平滑筋で高く発現し、アルツハイマー病患者の脳内では、A β の沈着している老人斑のまわりミクログリア細胞が特に高く発現していることを見いだした (Sai et al., J. Biol. Chem. in press. 2002)。

(道川)

インキュベーション後の A β は一度 0.45 ミクロメーターのポアサイズのフィルターを通して線維成分を除去した後、再度蛋白定量したものを重合体 A β として添加した。単体の A β は用事調整した A β を用いた。それぞれの A β の添加前および処理後における重合度は Thioflavin-T アッセイおよび架橋剤処理による電気泳動/銀染色によって確認した。神経細胞をスカベンジャーなしの培地で培養すると、2 日後にはほぼすべての細胞が、金属(鉄)との反応により産生される活性酸素毒性により細胞死をおこすが、単体の A β を 5 μ M 以上の濃度で加えるとこの細胞死は抑制された。この時、細胞内活性酸素の産生量も低下していた。また、単体 A β は他の金属キレーターと同様に金属添加による細胞死は抑制したが、過酸化水素の細胞毒性は抑制できなかった。以上を考え併せると、単体 A β は活性酸素のスカベンジャーとして働いているのではなく、金属に結合することで活性酸素の産生を抑制し、細胞保護作用を発揮していると考えられた。重合体 A β にはこの保護作用は認めなかった。

(横山)

アストロサイトによる HDL 新生反応において、新たに生成されたコレステロールと磷脂質はアポ A-I 刺激によって細胞質内に転移し caveolin-1 と cydophilin A に結合した HDL 粒子として現れる。これは時間的にはこのコレステロール分子が細胞外に新生する HDL 粒子に組み込まれる以前である。またアストロサイトのアポE合成・HDL 分泌・コレステロール生成、は自ら産生する酸性 FGF の autocrine 刺激により著明に増加し、これらは中枢神経系障害修復機転に於けるアストロサイトの重要な役割を示すと考えられる。ApoE ノックアウトマウスのアストロサイトを用いて検討すると、aFGF はコレステロール生成を apoE 生合成とは独立に増強するが、apoJ-HDL 新生を促進せず、利用コレステロールコンパートメントが異なることを示唆した。apoE ノックアウトマウスでは、脳の冷凍障害後の障害修復が遅く、この時患側ではアストロサイトに 酸性 FGF の著明な増加と apoE ノックアウトに於ける開腹の遷延が認められた。

(田中)

核酸への酸化ストレス導入法として色素 rose bengal または methylene blue を添加し、光照射を行うと、SAPK 活性とタウ蛋白のリン酸化 (Ser396/404、Thr231/Ser235、Ser422 部位) が亢進した。この変化は、azide によって強く阻害され、N-acetyl-cystein によってもある程度抑制され、この実験系におけるタウ蛋白リン酸化が酸化ストレスに依存することが示唆された。また、1 μ g/ml compactin 添加後に rose bengal を添加し光を照射したものは、compactin 添加なしで同様の処理をおこなったものに比べて、タウ蛋白のリン酸化は増加し、さらに 1 μ M compactin と

同時に 1 μ g/ml cholesterol を添加して外因性に cholesterol を補充したものについては、タウ蛋白リン酸化の増加は減弱した。よって、cholesterol には singlet oxygen を介する核酸への酸化ストレスを減弱させる可能性が示唆された。このタウ蛋白リン酸化の変化は p38MAPK および SAPK のリン酸化と対応しており、cholesterol はタウリン酸化キナーゼの上流で効果をもつことが示唆された。そこで、28S および 18S ribosomal RNA の酸化のレベルを抗 8-ヒドロキシグアノシン抗体 (1F7 抗体) を用いて検討したところ、compactin の添加後に 2 μ g/ml rose bengal 添加後光照射をおこなった細胞では 28S および 18S ribosomal RNA の酸化が増大していたが、compactin と同時に cholesterol を添加して外因性に補充したものについては compactin のみを添加しておいたものに比べて 28S および 18S ribosomal RNA の酸化が減少していた。

そして、以上のような条件で細胞死のレベルについても検討したところ、2 μ g/ml rose bengal 添加後光照射をおこなうと細胞死数は時間とともに増大し、この処理を compactin をあらかじめ添加した SY5Y 細胞でおこなうと、細胞死数の増加は促進された。しかし、compactin と同時に cholesterol を添加して外因性に補充したものについては、その細胞死促進効果が減弱していた。以上より、cholesterol には singlet oxygen を介する核酸への酸化ストレスを減弱させる可能性が示唆された。

D. 考察

A β は AD 成立の物質的基盤として中核的な役割を果たしていると考えられるが、その産生、凝集、ならびに毒性発現機構の詳細は依然不明である。今年度の本研究によって、A β の産生は複数

の遺伝子の関与のもとに制御されている可能性が示唆された。家族性 AD の遺伝子変異によって A β の産生は増加することが確認されているが、その分子機構の詳細は不明である。今後、本研究の成果は細胞内の生理的ならびに病的 A β 産生の分子機構の解明に有用な情報を提供するものと期待される。

A β の凝集は、AD 発症における最初の病的変化であると考えられ、とりわけ AD 患者の大多数を占める孤発性 AD においては A β の産生異常を示す明らかな実験的事実が得られていないことから、A β 凝集機構の解明が重要な課題であると考えられる。昨年度までの本研究によって明らかにされたコレステロールに依存して形成される内因性 seed 分子は、可溶性 A β の凝集ならびにアミロイド線維化を一次反応速度論モデルに従って促進することが確認された。以上の成果は、AD 発症の危険因子として働いている可能性が指摘されているコレステロールと A β 凝集との関係に初めて分子レベルでの説明を与えたと考えられる。今後は、加齢やアポリポ蛋白Eなどの既知の AD 発症危険因子が神経細胞のコレステロール代謝に影響を与えている可能性の有無を詳細に検討することが重要であると考えられる。

A β の毒性発現機構の詳細は不明であるが、今年度の本研究により、A β の神経毒性は A β の存在形態、即ち、重合体か単体かに決定的に依存することが確認された。この事実は既に他の研究者によって指摘されているが、今回初めて単体 A β は抗酸化作用により神経細胞に対して保護的に働くことが明らかとなった。この事実は、更めて、可溶性 A β の重合が AD 発症において本質的に重要であることを強く示唆したといえる。

中枢神経系におけるコレステロール代謝動態を明らかにすることは、AD 発症の背景を探る上

で重要な意義をもつ。本研究により漸くアストロサイトによるリポ蛋白産生を介したコレステロール代謝制御機構の実態が見え始めて来た。アストロサイトによるリポ蛋白の産生ならびに分泌に関しては、既に液性因子による調節機構の存在を示唆する実験事実が得られており、コレステロールが AD 発症の危険因子として働いていることに対する全く新しい治療戦略として、さらに研究を進めたいと考える。

E. 結論

A β の産生、凝集ならびに毒性発現機構に関して新しい知見が得られ、また中枢神経系におけるコレステロール代謝の制御機構におけるアストロサイトの役割が確認された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kakio A, Nishimoto S, Yanagisawa K, Kozutsumi Y and Matsuzaki K.
Cholesterol-dependent formation of GM1 ganglioside-bound amyloid β -protein, an endogenous seed for Alzheimer amyloid.
J Biol Chem 276:24985-24990,2001

Michikawa M, Gong JS, Fan QW, Sawamura N, Yanagisawa K.
A novel action of Alzheimer's amyloid β -protein (A β): oligomeric A β promotes lipid release. J Neurosci 21(18):7226-7235,2001

Fan Q-W., Isobe I, Asou H, Yanagisawa K and Michikawa M.
Expression and regulation of apolipoprotein E receptors in the cells of the central nervous system in culture: A review.
J Amer Aging Assoc 24:1-10,2001

Isobe I, Yanagisawa K and Michikawa M.
3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyltetrazolium bromide(MTT) causes Akt phosphorylation and morphological

changes in intracellular organelles in cultured rat astrocytes. J Neurochem 77: 274-280,2001

Sawamura N, Gong J-S, Garver W S, Heidenreich R A, Ninomiya H, Ohno K, Yanagisawa K and Michikawa M.
Site-specific phosphorylation of tau accompanied by activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) in brains of Niemann-Pick type C mice.
J Biol Chem 276:10314-10319,2001

Fan QW, Yu W, Senda T, Yanagisawa K and Michikawa M.
Cholesterol-dependent modulation of tau phosphorylation in cultured neurons.
J Neurochem 76:391-400, 2001

Kawamura Y, Kikuchi A, Takada R, Takada S, Shibamoto S, Yanagisawa K and Komano H.
Inhibitory effect of a presenilin 1 mutation on the Wnt signalling pathway by enhancement of β -catenin phosphorylation.
Eur J Biochem 268: 3036-3041, 2001

Fan QW, Yu W, Gong JS, Zou K, Sawamura N, Senda T, Yanagisawa K and Michikawa M.
Cholesterol-dependent dendrite outgrowth and microtubule stability in cultured neurons.
J Neurochem 80: 178-190, 2002

Sai X, Kawamura Y, Kokam K, Yamaguchi H, Shiraishi H, Suzuki R, Suzuki T, Kawaiichi M, Miyata T, Kitamura T, De Strooper B, Yanagisawa K and Komano H.
Endoplasmic reticulum stress-inducible protein, Herp, enhances presenilin-mediated generation of amyloid β -protein.
J Biol Chem (in press)

Hayashi H, Igbavoa U, Hamanaka H, Kobayashi M, Fujita S C, Wood W G and Yanagisawa K.
Cholesterol is increased in the exofacial leaflet of synaptic plasma membranes of human apolipoprotein E4 knock-in mice.
Neuroreport (in press)

Garver WS, Krishnan K, Michikawa M, Francis Ga and Heidenreich RA. The Neimann-Pick C1 protein facilitates cholesterol transport to the *trans*-Golgi network and plasma membrane caveolae. J Lipid Res (in press)

Gong JS, Sawamura N, Zou K, Sakai J, Yanagisawa K, Michikawa M.
Amyloid β -protein affects cholesterol metabolism in cultured neurons: Implications for

pivotal role of cholesterol in the amyloid cascade. J Neurosci Res (in press)

Tomimoto S, Tsujita M, Okazaki M, Usui S, Tada T, Ito S, Itoh M and Yokoyama S. Effect of probucol in lecithin-cholesterol acyltransferase deficient mice: Inhibition of two independent cellular cholesterol releasing pathways in vivo. Arterioscler Thromb Vasc Biol 21: 394-400,2001

Goto A, Sasai K, Suzuki S, Fukutomi T, Ito S, Matsushita T, Okamoto M, Suzuki T, Itoh M, Okuyama-Noji K and Yokoyama S. Cholesteryl ester transfer protein and atherosclerosis in Japanese subjects: A study based on coronary angiography. Atherosclerosis 159: 153-163,2001

Kojima K, Abe-Dohmae S, Arakawa R, Murakami I, Suzumori K and Yokoyama S. Progesterone inhibits apolipoprotein-mediated cellular lipid release: a putative mechanism for the decrease of HDL. Biochim Biophys Acta 1532: 173-184,2001

Tanaka A R, Ikeda Y, Abe-Dohmae S, Arakawa R, Sadanami K, Kidera A, Nakagawa S, Nagase T, Aoki R, Kioka N, Amachi T, Yokoyama S and Ueda K. Human ABCA1 contains a large amino-terminal extracellular domain homologous to an epitope of Sjogren's syndrome. Biochem Biophys Res Commun 283:1019-1025,2001

Okumura-Noji K, Sasai K, Zhan R, Kawaguchi H, Maruyama H, Tada T, Takahashi H, Okazaki M, Miida T, Sakuma N, Kimura G, Ohta N and Yokoyama S. Cholesteryl ester transfer protein-deficiency causes slow egg embryonation of schistosoma japonicum. Biochem Biophys Res Commun 286: 305-310,2001

Li O, Yokoyama S and Agellon L B. Active taurocholic acid flux through hepatoma cells increases the cellular pool of unesterified cholesterol derived from lipoproteins. Biochim Biophys Acta (in press)

Ito J, Nagayasu Y, Kato K, Sato R and Yokoyama S. Apolipoprotein A-I induces translocation of cholesterol, phospholipid and caveolin-1 to cytosol in rat astrocytes. J Biol Chem (in press)

Ueno S, Ito J, Nagayasu Y, Furukawa T and Yokoyama S. An acidic fibroblast growth factor-like factor secreted into the brain cell culture medium upregulates apoE synthesis, HDL secretion and cholesterol metabolism in rat astrocytes. Biochim Biophys Acta (in press)

Fukusyo E, Nakamura Y, Kashiwagi Y, Kudo T, Tanaka T, Matsumoto N, Kida T, Nakano Y, Shinosaki K and Takeda M. Effects of presenilin 1 missense mutation and aluminum on early neuronal development of mouse brain. Psychogeriatrics 1: 126-132, 2001

Takeda M, Tanaka T, Arai H, Sasaki H, Shoji M, Okamoto K, Urakami K, Nakashima K, Matshubayashi T, Sugita M and Yoshida H. Basic and clinical studies on the measurement of β -amyloid(1-42) in cerebrospinal fluid as a diagnostic marker for Alzheimer's disease and related disorders: multi study in Japan. Psychogeriatrics 1: 56-63,2001

田中稔久、武田雅俊
シリーズ精神医学用語解説 タウオパチー
臨床精神医学 30: 80-82,2001

田中稔久、武田雅俊
文献抄録「アミロイド β ペプチドの免疫はアルツ
ハイマー病モデルマウスの行動障害および老人
斑を減少させる」「変異タウ蛋白(P301L)を発現
するマウスにおける神経原線維変化、筋萎縮、進
行性運動障害」
老年精神医学雑誌 12: 305, 2001

田中稔久、山森英長、和田健二、辻尾一郎、
工藤喬、中村祐、柏木雄次郎、車谷隆宏、
田上真次、森裕、小池裕子、神野由華、
松本均彦、瀬川優子、福所英理子、武田雅俊
一次変性痴呆治療のためのタウ蛋白重合阻害に
ついての研究
精神薬療研究年報 33: 2-10, 2001

田中稔久、武田雅俊
タウ蛋白の異常リン酸化機構
先端医療シリーズ 14 神経・筋疾患 杉田秀夫、
福内靖男、柴崎浩監修 先端医療技術研究所
190-194, 2001

2. 学会発表
柳澤勝彦「アルツハイマー病研究・最新の進歩」
第43回老年医学会学術集会 教育講演 2001年
6月13日 大阪

道川 誠
アルツハイマー病の分子機構におけるコレステ
ロールの役割

第 43 回老年医学会学術集会 プレナリーレクチャー 2001 年 6 月 13 日 大阪

柳澤勝彦、道川 誠、林 秀樹、澤村直哉、松崎勝巳
脂質代謝とアルツハイマー病の分子病理
第 44 回日本神経化学会 2001 年 9 月 26-28 日 京都

道川 誠、范 企文、ユ ウエイ、千田隆夫、キョウ 建生、ソウ クン、柳澤勝彦
培養神経細胞におけるコレステロールによる樹状突起伸長調節作用の検討
第 44 回日本神経化学会 2001 年 9 月 26-28 日 京都

駒野宏人、川村勇樹、蔡 曉蕊、川市正史、北村俊雄、柳澤勝彦
ガンマーセクレターゼ活性調節因子 cDNA 同定のための新しいスクリーニング法
第 44 回 日本神経化学会 2001 年 9 月 26-28 日 京都

蔡曉蕊、川村勇樹、小亀浩市、宮田俊行、柳澤勝彦、駒野宏人
γ-セクレターゼ活性を促進する因子
第 44 回 日本神経化学会 2001 年 9 月 26-28 日 京都

柳澤勝彦
コレステロールとアルツハイマー病
第 20 回日本痴呆学会 シンポジウム 2001 年 10 月 4 日 三重

キョウ 建生、柳澤勝彦、道川 誠
Amyloid β-protein のコレステロール代謝に対する影響 第 20 回日本痴呆学会 2001 年 10 月 4 日 三重

澤村直哉、キョウ 建生、二宮治明、大野耕策、柳澤勝彦、道川 誠
ニーマンピック病 C 型モデルマウスにおける MAPK の活性化に伴うタウ蛋白の部位特異的なリン酸化
第 20 回日本痴呆学会 2001 年 10 月 4 日 三重

駒野宏人、川村勇樹、蔡 曉蕊、川市正史、北村俊雄、柳澤勝彦
新しいスクリーニング系を用いたガンマーセクレターゼ活性調節因子の同定について
第 74 回 日本生化学会 2001 年 10 月 28 日 京都

蔡曉蕊、川村勇樹、小亀浩市、宮田俊行、柳澤勝彦、駒野宏人
γ-セクレターゼ活性におよぼす Herp の影響
第 74 回 日本生化学会 2001 年 10 月 28 日 京都

駒野宏人
γ-セクレターゼ活性を調節する因子について
第 37 回 脳のシンポジウム 2002 年 3 月 15 日 長野

伊藤仁一、長安祐子、横山信治
apoA-I 依存性コレステロール放出におけるスフィンゴミエリンの役割
第 44 回日本神経化学会 2001 年 9 月 26-28 日 京都

上野幸子、伊藤仁一、長安祐子、横山信治
セロトニンによるアストロサイトのコレステロール代謝調節
第 44 回日本神経化学会 2001 年 9 月 26-28 日 京都

伊藤仁一、長安祐子、横山信治
スフィンゴミエリンによるラットアストロサイトの細胞内コレステロール輸送の促進
第 74 回日本生化学会 2001 年 10 月 25-28 日 京都

田中稔久、和田健二、山森英長、武田雅俊
リチウムによるタウ蛋白のリン酸化誘導
第 21 回リチウム研究会 2001 年 4 月 21 日 東京

田中稔久、山森英長、和田健二、中島健二、武田雅俊
2 本鎖 RNA によるタウ蛋白リン酸化への影響の検討 第 42 回日本神経学会総会
2001 年 5 月 11-13 日 東京

和田健二、田中稔久、中島健二、武田雅俊
Ribotoxic stress 応答におけるタウ蛋白リン酸化の検討 第 42 回日本神経学会総会 2001 年 5 月 11-13 日 東京

田中稔久、和田健二、山森英長、武田雅俊
アルツハイマー病のリン酸化調節異常
第 44 回日本神経化学 2001 年 9 月 26 日 京都

田中稔久、山森英長、和田健二、中島健二、武田雅俊
タウ蛋白リン酸化と結合蛋白
第 20 回日本痴呆学会 2001 年 10 月 4 日 三重

和田健二、田中稔久、浦谷陽介、浦上克哉、山形薫、中島健二、武田雅俊
酸化ストレスによるタウ蛋白リン酸化の検討
第 20 回日本痴呆学会 2001 年 10 月 4 日 三重

山森英長、田中稔久、武田雅俊
カスパーゼ阻害とタウ蛋白リン酸化について
第 20 回日本痴呆学会 2001 年 10 月 4 日 三重

田中稔久、山森英長、和田健二、田中修二、鈴木英雄、工藤喬、紙野晃人、大河内正康、谷井久志、小池裕子、安田由華、貴田智之、松本均彦、福森亮雄、武田雅俊

タウ蛋白重合蓄積への結合因子の関与とその阻害剤開発についての 第 34 回精神神経系薬物治療研究報告会、2001 年 12 月 7 日 大阪

Yanagisawa K and Matsuzaki K.
Amyloidogenesis and cholesterol.
5th ADPD International Conference
Apr.1-6,2001, Kyoto, Japan

Yanagisawa K.
Cholesterol-dependent pathological processes in Alzheimer's disease. Brain Membrane Alteration in Alzheimer's Disease.
7th World Congress of Biological Psychiatry (WCBP), July 1-6,2001 Berlin, Germany

Yanagisawa K.
Molecular pathogenesis of Alzheimer's disease: A novel viewpoint from cholesterol metabolism of neurons. The 4th Annual Meeting of The Korean Society for Brain and Neural Sciences.
Dec. 1, 2001, Seoul, Korea

Michikawa M, Gong J. S., Fan Q-W, Sawamura N and Yanagisawa K.
A novel action of amyloid β -protein in cellular lipid metabolism in the central nervous system.
31th Society for Neuroscience Annual Meeting, Nov.10-15,2001, San Diego, California, USA.

Michikawa M.
Aggregation state-dependent actions of amyloid β -protein.
Cheju-Ajou University Joint Conference on Neuroscience Feb. 21-22,2002, Cheju, Korea

Ito J, Nagayasu Y and Yokoyama S.
Stimulation by acidic FGF of cholesterol metabolism of rat astrocytes.
The 14th Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience, Jan.31- Feb.4,2002, Sydney, Australia

Yamamori H, Tanaka T and Takeda M.
Changes of phosphorylation level of tau protein in cultured cells by cytotoxic reagents.
5th International Conference on Progress in Alzheimer's and Parkinson's Disease (ADPD 2001), May 31-Apr.5,2001, Kyoto, Japan

Tanaka T, Yamamori H, Wada K, Nakashima K and Takeda M.
Phosphorylation of Tau Protein in Cultured Cells by Polyinosinic-Polycytidylic Acid.
5th International Conference on Progress in Alzheimer's and Parkinson's Disease (ADPD 2001), May 31-Apr,5,2001, Kyoto, Japan

Takeda M., Tanaka T, Arai H, Sasaki H, Shoji M, Okamoto K, Urakami K, Nakashima K, Katsubayashi T, Sugita M and Yoshida H.
Basic and clinical studies on the measurement of β -amyloid (1-42) in cerebrospinal fluid as a diagnostic marker for Alzheimer's disease and related disorders: multi center study in Japan.
Tenth Congress of the International Psychogeriatric Association. Sept.9-13, 2001, Nice, France

Tanaka T, Yamamori H and Takeda M.
Effects of lithium on phosphorylation levels of tau protein.
Tenth Congress of the International Psychogeriatric Association. Sept, 9-13, 2001, Nice, France

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

（柳澤）

抗 GM1-A β 抗体（4396C）DNA 配列
（出願中）

（駒野）

1) アルツハイマー病関連遺伝子のスクリーニング法（出願中）

2) アルツハイマー病関連遺伝子、タンパク質およびそれらの用途（出願中）

（横山）

1) 横山信治他、「アポリポ蛋白質 E の分泌促進剤」2001. 8. 31、特願 2001-263547

2) 横山信治他、「低 HDL 血症改善剤」2001.10.12、特願 2001-314756

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

アミロイドβ蛋白蓄積開始機序の研究

主任研究者 柳澤勝彦 国立療養所中部病院・長寿医療研究センター 痴呆疾患研究部 部長

研究要旨

Aβの脳内沈着の初期過程を解明することを目的に、可溶性 Aβの凝集を促進する作用（seeding 作用）をもつ GM1 ガングリオシド結合型 Aβ（GM1-Aβ）の形成ならびに、それによる可溶性 Aβ凝集促進の分子機構を、反応速度論的に詳細に検討するとともに、seed 作用の分子基盤を抗 GM1-Aβ抗体を用いて検討した。その結果、GM1-Aβによる Aβ凝集は一次反応速度論モデルに従うこと、また同 Aβ分子の seed 作用は GM1 への結合により獲得される Aβの構造変化を基盤とすることが確認された。

A. 研究目的

アルツハイマー病（AD）脳内における Aβ蓄積機構を解明することは、AD の病態解明の上で最も重要な研究課題の一つである。本主任研究者らは初期 AD 脳内に、選択的に細胞膜を構成する糖脂質の一つである GM1 ガングリオシドと結合した特異な Aβ（GM1-Aβ）が形成されることを報告した。本研究は GM1-Aβの形成ならびに、それによる可溶性 Aβ凝集促進の分子機構を *in vitro* の実験系を用いて明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

(1) liposome 作製および Aβ凝集実験

In vitro における Aβ凝集実験は、昨年度構築した実験系を用いた。即ち、liposome の作製にあたっては、コレステロール（CH）、スフィンゴミエリン（SM）、フォスファチジルコリン（PC）を有機溶媒に溶解し、窒素ガス気流にて乾燥後、

トリス生食緩衝液（tris-buffered saline: TBS）中で攪拌し、凍結・融解を反復の上、超音波破碎機にかけ、均一な liposome を形成させた。Aβ凝集によるアミロイド線維化を定量的ならびに定性的に評価するにあたっては、アミロイド構造を特異的に認識し、蛍光を発する薬剤である thioflavin T（ThT）を用いた。同時に、インキュベート液を遠心して得られた沈澱物の電子顕微鏡学的観察を行い、形態学的に Aβ線維の構造を観察した。

(2) 抗 GM1-Aβ抗体

GM1-Aβの seed 作用を分子レベルで検討する為、ヒト脳より調整した GM1-Aβを抗原として作製した IgM モノクローナル抗体（Yanagisawa et al., FEBS Lett 420: 43-46, 1997）を遺伝子工学的な操作により class switch した IgGモノクローナル抗体（4396C）を用いた。

（倫理面への配慮）

本研究は全て試薬を用いた試験管内実験であり、

倫理的問題はない。

C. 研究結果

SM/CH/GM1 liposome 添加によって A β の凝集を示す ThT 値の上昇は lag time なく誘導され、その反応曲線の解析より、A β 重合は一次反応速度論モデルに従うことが確認された。対照実験として行った 細断 A β アミロイド線維 (fA β) 添加系における ThT 値の上昇も一次反応速度論モデルに従うことが確認されたが、peak に達した後、ThT 値は低下した。これに対して、SM/CH/GM1 liposome 添加による場合は peak に達した後、ThT 値は plateau を形成し、高値を保った。

SM/CH/GM1 liposome 添加によって A β の凝集に対する抗体の抑制効果を検討したところ、4396C は用量依存的に A β 凝集を抑制した。これに対して、合成ペプチドを抗原に作製した抗 A β 抗体 (4G8 および 6E10) は可溶性 A β の凝集を全く抑制しなかった。4G8 の A β 凝集に対する非抑制性の実態を明らかにする為、4G8 添加反応液の免疫電子顕微鏡観察を行ったところ、4G8 は形成されたアミロイド線維の側面に結合することが確認された。

D. 考察

反応速度論解析の結果、GM1-A β によるA β 重合過程においては、まず liposome 上の GM1 ガングリオシドに A β が結合し、これが seed となって順次可溶性 A β が A β 重合体の断端に結合して線維が伸長することが示唆された。fA β 添加による場合に比して、ThT 値が peak 後 plateau を形成したことは、GM1-A β による A β 重合は、全体として安定は線維形成をもたらすと考えられた。ア

ミロイド線維の安定性を seed の特性との関連で検討することが今後重要と考えられた。

抗体による A β 凝集抑制効果に顕著な違いがあり、合成ペプチドを抗原として作製した抗体には、全く抑制効果がなく、一方、4396C は用量依存的に A β 凝集を抑制した。このことから、A β が GM1 ガングリオシドとの結合により特異な構造を獲得し、この構造が可溶性 A β の構造変化を連続的に誘導し、アミロイド線維伸長をもたらす基盤となると考えられた。。アルツハイマー病をはじめ、プリオン病、パーキンソン病、さらにはトリプレット病など多くの神経変性疾患は脳内蛋白の構造変化によって発症する可能性が考えられている。本研究成果は、これらの所謂、conformational disease の発症機構に関する一つの視点を与えるものと考えられる。

E. 結論

A β は GM1 ガングリオシドと結合し構造変化を獲得し、seed となって可溶性 A β の重合を促進することが確認された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kakio A, Nishimoto S, Yanagisawa K, Kozutsumi Y and Matsuzaki K.
Cholesterol-dependent formation of GM1 ganglioside-bound amyloid β -protein, an endogenous seed for Alzheimer amyloid. J Biol Chem 276:24985-24990,2001

Michikawa M, Gong JS, Fan QW, Sawamura N, Yanagisawa K.
A novel action of Alzheimer's amyloid β -protein (A β): oligomeric A β promotes lipid release. J Neurosci 21(18):7226-7235,2001

Fan Q-W., Isobe I, Asou H, Yanagisawa K and Michikawa M.

Expression and regulation of apolipoprotein E receptors in the cells of the central nervous system in culture: A review.

J Amer Aging Assoc 24:1-10,2001

Isobe I, Yanagisawa K and Michikawa M.

3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) causes Akt phosphorylation and morphological changes in intracellular organelles in cultured rat astrocytes. J Neurochem 77: 274-280,2001

Sawamura N, Gong J-S, Garver W S, Heidenreich R A, Ninomiya H, Ohno K, Yanagisawa K and Michikawa M.

Site-specific phosphorylation of tau accompanied by activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) in brains of Niemann-Pick type C mice.

J Biol Chem 276:10314-10319,2001

Fan Q-W, Yu-W, Senda T, Yanagisawa K and Michikawa M.

Cholesterol-dependent modulation of tau phosphorylation in cultured neurons.

J Neurochem 76:391-400, 2001

Kawamura Y, Kikuchi A, Takada R, Takada S, Sudoh S, Shibamoto S, Yanagisawa K and Komano H.

Inhibitory effect of a presenilin 1 mutation on the Wnt signalling pathway by enhancement of β -catenin phosphorylation.

Eur J Biochem 268:3036-3041,2001

Fan QW, Yu W, Gong JS, Zou K, Sawamura N, Senda T, Yanagisawa K and Michikawa M.

Cholesterol-dependent modulation of dendrite outgrowth and microtubule stability in cultured neurons. J Neurochem 80:178-190,2002

Sai X, Kawamura Y, Kokam K, Yamaguchi H, Shiraishi H, Suzuki R, Suzuki T, Kawaichi M, Miyata T, Kitamura T, De Strooper B, Yanagisawa K and Komano H.

Endoplasmic reticulum stress-inducible protein, Herp, enhances presenilin-mediated generation of amyloid β -protein. J Biol Chem (in press)

Hayashi H, Igbavoa U, Hamanaka H, Kobayashi M, Fujita S C, Wood W G and Yanagisawa K.

Cholesterol is increased in the exofacial leaflet of synaptic plasma membranes of human apolipoprotein E4 knock-in mice.

Neuroreport (in press)

Gong JS, Sawamura N, Zou K, Sakai J, Yanagisawa K, Michikawa M.

Amyloid β -protein affects cholesterol metabolism in cultured neurons: Implications for pivotal role of cholesterol in the amyloid cascade. J Neurosci Res (in press)

2. 学会発表

柳澤勝彦 「アルツハイマー病研究・最新の進歩」
第43回老年医学会学術集会 教育講演 2001年
6月13日 大阪

柳澤勝彦、道川 誠、林 秀樹、澤村直哉、
松崎勝巳

脂質代謝とアルツハイマー病の分子病理
第44回日本神経化学会 2001年9月26-28日
京都

道川 誠、范 企文、ユ ウェイ、千田隆夫、
キョウ 建生、ゾウ クン、柳澤勝彦
培養神経細胞におけるコレステロールによる樹
状突起伸長調節作用の検討

第44回日本神経化学会 2001年9月26-28日
京都

駒野宏人、川村勇樹、蔡 曉蕊、川市正史、
北村俊雄、柳澤勝彦

ガンマーセクレターゼ活性調節因子 cDNA 同定
のための新しいスクリーニング法
第44回 日本神経化学 2001年9月26-28日 京
都

蔡曉蕊、川村勇樹、小亀浩市、宮田俊行、
柳澤勝彦、駒野宏人

γ -セクレターゼ活性を促進する因子
第44回 日本神経化学 2001年9月26-28日 京
都

柳澤勝彦

コレステロールとアルツハイマー病
第20回日本痴呆学会 シンポジウム 2001年
10月4日 三重

キョウ 建生、柳澤勝彦、道川 誠

Amyloid β -protein のコレステロール代謝に対
する影響 第20回日本痴呆学会 2001年10月4
日 三重

澤村直哉、キョウ 建生、二宮治明、大野耕策、
柳澤勝彦、道川 誠

ニーマンピック病 C 型モデルマウスにおける
MAPK の活性化に伴うタウ蛋白の部位特異的な
リン酸化
第20回日本痴呆学会 2001年10月4日 三重

駒野宏人、川村勇樹、蔡 曉蕊、川市正史、

北村俊雄、柳澤勝彦
新しいスクリーニング系を用いたガンマーセクレターゼ活性調節因子の同定について
第 74 回 日本生化学会 2001 年 10 月 28 日 京都

蔡曉蕊、川村勇樹、小亀浩市、宮田俊行、
柳澤勝彦、駒野宏人
γ-セクレターゼ活性におよぼす Herp の影響
第 74 回 日本生化学会 2001 年 10 月 28 日 京都

Yanagisawa K and Matuzaki K.
Amyloidogenesis and cholesterol.
5th ADPD International Conference
Apr.1-6,2001, Kyoto, Japan

Yanagisawa K.
Cholesterol-dependent pathological processes
in Alzheimer's disease.
Brain Membrane Alteration in Alzheimer's
Disease. 7th World Congress of Biological
Psychiatry (WCBP),
July 1-6,2001, Berlin,Germany

Michikawa M, Gong J. S., Fan Q-W,
Sawamura N and Yanagisawa K.
A novel action of amyloid β-protein in cellular
lipid metabolism in the central nervous system.
31th Society for Neuroscience Annual Meeting,
Nov.10-15,2001, San Diego, California, USA.

Yanagisawa K. Molecular pathogenesis of
Alzheimer's disease: A novel viewpoint from
cholesterol metabolism of neurons. The 4th
Annual Meeting of The Korean Society for Brain
and Neural Sciences. Dec. 1, 2001, Seoul, Korea

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

抗 GM1-Aβ抗体 (4396C) DNA 配列
(出願中)

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

γ -セクレターゼ活性を調節する因子の解析

分担研究者 駒野 宏人 国立療養所中部病院 長寿医療研究センター 痴呆疾患研究部 室長

研究要旨

A β のN末端とC末端は、APPが、それぞれ、 β -セクレターゼと γ -セクレターゼと呼ばれるプロテアーゼによって切断を受けて産生される。このうち、 γ -セクレターゼ活性は、家族性アルツハイマー病原因遺伝子産物であるプレセニリンを含む複数の因子による複合体が担っていることが明らかとなってきた。我々は、これら γ -セクレターゼ活性に必要な因子のcDNAを同定することを目標とし、これらcDNAを同定するための独自のスクリーニング法を確立し、これを用いてスクリーニングを行った。その結果、得られたcDNAのひとつは、小胞体ストレスによって誘導されるHerpと命名された機能不明な膜蛋白をコードしていることが明らかとなった。Herp cDNAを細胞に強制発現することにより、細胞の産生するA β レベルの増加が確認され、また、Herp蛋白がプレセニリンと結合していることを見いだした。以上の結果から、Herpは、プレセニリンに作用し、 γ -セクレターゼ活性を上昇させる γ -セクレターゼ活性調節因子としての機能をもつことが考えられた。

A. 研究目的

アルツハイマー病（AD）患者の脳ではA β を主成分とする老人斑が多く観察されている。A β は細胞毒性を有し、A β の脳内蓄積がADにおいて深刻な問題となっている。

A β のN末端とC末端は、APPが、それぞれ、 β -セクレターゼと γ -セクレターゼと呼ばれるプロテアーゼによって切断を受けて産生される。 β -セクレターゼは、新規のアスパラギン酸プロテアーゼであることが明らかとなったが、 γ -セクレターゼについてはこれまでにない新しいタイプのプロテアーゼであることが明らかになりつつある。すなわち、 γ -セクレターゼ活性は、

家族性アルツハイマー病原因遺伝子産物であるプレセニリンを含む複数の因子による複合体が担っていることが明らかとなってきた。しかしながら、プレセニリン以外の因子に関して、どのような分子による複合体なのか、その実体は明らかとなっていない。

平成12年度は、これら γ -セクレターゼ活性に必要な因子のcDNAを同定することを目標とした。スクリーニングを容易にするため、 γ -セクレターゼによる切断がおこると細胞がピューロマイシン耐性になるという独自の系を構築し（特許出願）、これを用いてスクリーニングを行った。平成13年度は、この方法により得られたcDNAのひとつについて着目し、それがどのような蛋白をコードし、この蛋白が γ -セクレターゼ活性複合

体をになっているのか否かを明らかにすることを目的とした。

(倫理面への配慮)

本研究は全て試薬を用いた試験管内実験であり、倫理的問題はない。

B. 研究方法

γ -セクレターゼ活性を上げる cDNA の同定には、次の様な独自に開発したスクリーニング系を用いた。まず、 $A\beta$ の N 末端から γ -セクレターゼ切断部位を含む APP 領域 (C53) と Notch (Schroeter et al., Nature 393:382-386 1998) の C 端側転写因子領域との fusion gene を安定に遺伝子導入した細胞株を得る。また、この細胞は、Notch の転写活性により、ピューロマイシン耐性遺伝子がオンとなるように作製する。すなわち、細胞内で C53-Notch キメラ蛋白が γ -セクレターゼによって切断を受け、Notch が遊離すると、細胞がピューロマイシン耐性になるという系を構築した。また、cDNA library をヒトの脳の mRNA より調製した。この細胞株に cDNA library をトランスフェクトし、ピューロマイシン耐性を与える cDNA をセレクションし、この cDNA が $A\beta$ 産生活性をもつかどうかを確認することにより、 γ -セクレターゼ活性を促進する cDNA を単離した。その結果、得られた cDNA のひとつは、Herp をコードしていることが明らかとなった。Herp が $A\beta$ 産生に関与するか否かの確認実験は、Herp cDNA を Human kidney 293 (HEK293) 細胞に導入し、この細胞の産生する $A\beta$ 量が増加するか否かで解析した。また、Herp とプレセニリンとの結合性は、Herp に対する抗体、および、プレセニリンに対する抗体を用いて、免疫沈降実験により解析した。

C. 研究結果

我々のスクリーニングにより得られた cDNA のひとつが、小胞体ストレスによって誘導される Herp と命名された機能不明な既知の膜蛋白 (Kokame et al., J. Biol. Chem. 275, 32846-32853, 2000) をコードしていることが明らかとなった。次に、Herp cDNA を HEK293 細胞に導入し、この細胞の産生する $A\beta$ 量が増加するか否かを解析したところ、Herp cDNA を遺伝子導入することにより、細胞の産生する $A\beta$ 量が 1.8 倍に増加することが明らかとなった。さらに、Herp 蛋白が、家族性アルツハイマー病原因遺伝子産物プレセニリンと結合し、 γ -セクレターゼ活性をあげることを見いだした。また、Herp に対する抗体を用いて、脳内で Herp 蛋白を発現している細胞を解析したところ、脳内では、神経細胞および血管平滑筋で高く発現し、アルツハイマー病患者の脳内では、 $A\beta$ の沈着している老人斑のまわりミクログリア細胞が特に高く発現していることを見いだした (Sai et al., J. Biol. Chem. in press. 2002)。

D. 考察

これらの結果から、Herp は、家族性アルツハイマー病原因遺伝子産物プレセニリンに作用し、 γ -セクレターゼ活性を上昇させる γ -セクレターゼ活性調節因子としての機能をもつことが考えられた。また、Herp の脳内での発現の解析結果とを考えあわせると、老化に伴う脳内で認められる老人斑の形成や脳血管内へ $A\beta$ の沈着に、小胞体ストレスによる Herp 発現の誘導が関与している可能性が示唆された。

E. 結論

本研究により、独自に開発したスクリーニング系を用いることにより、 γ -セクレターゼ活性の調節因子のひとつが小胞体ストレスによって誘導される Herp であることが明らかとなった。この蛋白は、プレセニリンと結合しており、 γ -セクレターゼ活性複合体を形成しているものと思われる。今後は、この蛋白がどのような分子機構で、 γ -セクレターゼ活性を上昇させるのかをより詳細に明らかにするとともに、老化やアルツハイマー病で認められる脳内での A β 蓄積に、Herp の誘導が関与しているのか否かをさらに解析する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kawamura Y, Kikuchi A, Takada R, Takada S, Sudoh S, Shibamoto S, Yanagisawa K and Komano H.

Inhibitory effect of a presenilin 1 mutation on the Wnt signalling pathway by enhancement of β -catenin phosphorylation.

Eur J Biochem 268:3036-3041,2001

Sai X, Kawamura Y, Kokam K, Yamaguchi H, Shiraishi H, Suzuki R, Suzuki T, Kawaichi M, Miyata T, Kitamura T, De Strooper B, Yanagisawa K and Komano H.

Endoplasmic reticulum stress-inducible protein, Herp, enhances presenilin-mediated generation of amyloid β -protein. J Biol Chem (in press)

2. 学会発表

駒野宏人、川村勇樹、蔡 暁蕊、川市正史、北村俊雄、柳澤勝彦

ガンマーセクレターゼ活性調節因子 cDNA 同定のための新しいスクリーニング法

第 44 回 日本神経化学 2001 年 9 月 26-28 日 京都

蔡暁蕊、川村勇樹、小亀浩市、宮田俊行、柳澤勝彦、駒野宏人

γ -セクレターゼ活性を促進する因子

第 44 回 日本神経化学 2001 年 9 月 26-28 日 京

都

駒野宏人、川村勇樹、蔡 暁蕊、川市正史、北村俊雄、柳澤勝彦
新しいスクリーニング系を用いたガンマーセクレターゼ活性調節因子の同定について
第 74 回 日本生化学会 2001 年 10 月 28 日 京都

蔡暁蕊、川村勇樹、小亀浩市、宮田俊行、柳澤勝彦、駒野宏人
 γ -セクレターゼ活性におよぼす Herp の影響
第 74 回 日本生化学会 2001 年 10 月 28 日 京都

駒野宏人
 γ -セクレターゼ活性を調節する因子について
第 37 回 脳のシンポジウム 2002 年 3 月 15 日 長野

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

1) アルツハイマー病関連遺伝子のスクリーニング法（出願）

2) アルツハイマー病関連遺伝子、タンパク質およびそれらの用途（出願）

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

アルツハイマー病におけるアポリipoprotein E の分子機構の解明

分担研究者 道川 誠 国立療養所中部病院・長寿医療研究センター 痴呆疾患研究部 室長

研究要旨

Amyloid β -蛋白(A β)単体の中枢神経細胞に対する作用を検討した。A β は単体で細胞外へ分泌され、その後、重合体さらに線維形成に至り脳内に沈着すると考えられるため重合状態の違いによる A β の作用の検討が必要である。昨年度、我々は A β 重合体が神経細胞からコレステロール、リン脂質などを搬出し細胞に取り込まれない異常な HDL 様粒子を形成最終的に細胞内コレステロール量を低下させることを明らかにした。これらの結果から、A β 重合体が細胞内コレステロール量を低下させ、その結果シナプス可塑性の低下およびタウのリン酸化亢進を誘導し、最終的に細胞死を引き起こす可能性が示された。apoE は脂質の搬出と取り込みの双方の機構により脂質代謝の恒常性維持に貢献すると考えられるが、脂質搬出作用の強さにはアイソフォーム特異性があるためアイソフォームの違いが疾患発症に関連すると思われる。本年度は重合体ではない単体 A β の作用について検討した。その結果、単体の A β は細胞内コレステロール代謝に対して影響を与えないばかりでなく、強い抗酸化作用を持ち、むしろ神経細胞の保護作用を有することが明らかになった。単体 A β の持つこのような強い抗酸化作用発揮の機構として、A β が鉄や銅などの金属と結合し、金属による活性酸素の発生を抑制する機序が考えられた。従来から凝集または重合 A β は活性酸素を産生することで強い神経細胞毒性を有することが知られているが、単体 A β は強い神経保護作用を持つという結果は、疾患の予防法や治療法の開発に A β の重合抑制という新たな視点を提供すると考えられた。

A. 研究目的

痴呆老人の増加は我が国をはじめとして先進国の抱える深刻な問題である。なかでもアルツハイマー病は脳血管性痴呆と並んで痴呆性疾患患者数の大きな割合を占めるにも関わらずその原因は不明であることから、その病因解明は予防法、治療法の開発に重要であると考えられる。最近 apolipoprotein E(ApoE)のアイソフォームの一つである ApoE4 がアルツハイマー病の

強力な危険因子であることが明らかとなったが、ApoE のアルツハイマー病発症に関与する分子機構についての詳細は明らかではない。apoE4 が如何にアルツハイマー病発症機構に関わるかを明らかにするために、我々は apoE のコレステロール代謝調節作用に着目し研究を続けてきた。その結果、(1) 神経細胞は他の細胞と異なり、その生存が細胞内コレステロール量に依存すること、および (2) apoE は神経細胞およ

びアストロサイトからアイソフォーム特異的なコレステロール搬出作用を持つことを明らかにした。これは神経細胞生存を左右するコレステロール代謝が apoE によりアイソフォーム依存的に制御されることを示している。そこで我々は、直接コレステロール量を変化させ、(3) 細胞内コレステロールの減少がアルツハイマー病病理に特徴的なタウ蛋白のリン酸化を誘導し、軸索の脱重合、シナプス形成能の低下を招くことを見いだした。昨年度、我々は更に注目すべき事実として、(4) 重合したアミロイドβ蛋白は神経細胞からコレステロールを搬出して異常な HDL を形成し、(5) 神経細胞内コレステロール合成抑制を通して細胞内コレステロール量の減少を招くところを明らかにした。Aβの重合状態あるいは凝集状態の違いに依存した Aβの生物活性を検討することにより、アルツハイマー病における細胞レベルでの病態を明らかにすることを目的に、本年度は残された問題、すなわち単体 Aβの作用について検討を加えた。

B. 研究方法

神経細胞培養：妊娠 17-18 日目のラット胎仔脳を無菌的に取り出し、膜を剥離した後メスで細かく切断した後、0.25%のトリプシンで 37°C、20 分間 incubation した後、パスツールピペットでピペッティングして、神経細胞を単離し poly-D-lysine でコートした 12 ウェルあるいは 6 ウェルで培養した。ペプチド研から購入した Aβ1-40 は、蒸留水で溶解し、PBS あるいは活性酸素のスカルベンジャーなしの培地で 10μM の濃度に希釈したものを 24 時間 37 度 C でインキュベーションしたものをを用いた。

C. 研究結果

インキュベーション後の Aβは一度 0.45 ミクロメーターのポアサイズのフィルターを通して線維成分を除去した後、再度蛋白定量したものを重合体 Aβとして添加した。単体の Aβは用事調整した Aβを用いた。それぞれの Aβの添加前および処理後における重合度は Thioflavin-T アッセイ および架橋剤処理による電気泳動/銀染色によって確認した。神経細胞をスカベンジャーなしの培地で培養すると、2 日後にはほぼすべての細胞が、金属（鉄）との反応により産生される活性酸素毒性により細胞死をおこすが、単体の Aβを 5μM 以上の濃度で加えるとこの細胞死は抑制された。この時、細胞内活性酸素の産生量も低下していた。また、単体 Aβは他の金属キレーターと同様に金属添加による細胞死は抑制したが、過酸化水素の細胞毒性は抑制できなかった。以上を考え併せると、単体 Aβは活性酸素のスカルベンジャーとして働いているのではなく、金属に結合することで活性酸素の産生を抑制し、細胞保護作用を発揮していると考えられた。重合体 Aβにはこの保護作用は認めなかった。

(倫理面への配慮)

本研究の実施にあたっては実験動物としてマウスを用いるが、その使用にあたっては屠殺を麻酔下において実施する等の十分な配慮を加える。動物愛護上問題となる実験手技は本研究の遂行上にはないと考えられる。

D. 考察

中枢神経系で脂質代謝を司る主なアポリポ蛋白の一つとして apoE が知られており、脂質を運搬するリガンドとしての働いていると考えら