

酸ウランを添加した後、電子顕微鏡で観察した。

上清分画はサイズ・エクスクルージョン・カラム (SEC) Superdex 75 PC3.2/30 column (Amersham) で分離した。

C. 研究成果

1) アミロイド β 蛋白を4日間インキュベーションすると、アミロイド・フィブリルの形成が認められる。

500 μ M の40アミノ酸残基のアミロイド β 蛋白を4日間インキュベーションしたところ、15000Gの沈査分画に、1時間のインキュベーションでは認められなかった、直径約10nmのフィブリルが形成された。このフィブリルは過去の報告のアミロイドフィブリルと形態上もよく似ており、アミロイド β フィブリルが形成されたと考えた。

その時の15000Gの上清分画をサイズエクスクルージョンカラム、以下SEC、を用いて分離し、上清分画に凝集物があるかどうか検討した。その結果、アミロイド β 蛋白を4日間インキュベーションしたあとの上清分画には、未重合の単量体アミロイド β 蛋白が認められる他に特に凝集物は認められなかった。

2) アミロイド・プロトフィブリルは電子顕微鏡で観察すると、約10nmの直径で200nm以下である。

Nilsberthらはアミロイド β 蛋白内のアミノ酸に点突然変異のあるAPP家系を見つけ、アークティック・ミューテーションと名付けた。そのアークティック・ミューテーションの入ったアミロイド β 蛋白と野生型アミロイド β 蛋白で、アミロイド・プロトフィブリル形成の速度にどのような差があるか検討した。その結果、時間の経過と共に、上清中のカラム素通り分画にピークが認められるようになり、このことは小さな凝集物が生じていることを示唆し、これがアミロイド・プロトフィブリルであることを示しました。従って彼らはアークティックミューテーションの入ったアミロイド β 蛋白は野生型に比べアミロイドプロトフィブリル形成が非常に早いことを示した。電子顕微鏡で観察すると、このアミロイドプロトフィブリルは、約10nmの直径で200nm以下の長さであるとされている。また、彼らは我々が使用したのと同じカラムを用いている。

3) アミロイド・プロトフィブリルはアミロイド β 蛋白を4日間インキュベーションした場合形成されなかった。

上述したアミロイド β 蛋白を4日間インキュベーションしてアミロイドフィブリルが形成されたとき、上清分画をSECで分析すると、素通り分画にアミロイド β 蛋白の凝集物は認められなかった。即ち、アミロイド

ロトフィブリルは形成されていないことが明らかになった。

そのため、我々はこのアミロイドフィブリルが生成される途中でアミロイドプロト・フィブリルは形成されていたかどうかを検討した。

4) アミロイド・プロトフィブリルはアミロイド β 蛋白を1日間インキュベーションした時点で形成されていた。

アミロイド β 蛋白を4日間インキュベーションしてアミロイドフィブリルが形成される過程で、4日間毎日溶液の一部を抜き取り SEC により解析したところ、1日後に加えたアミロイド β 蛋白が沈査分画に行かない程度に微妙に凝集し、カラムの素通り分画を含む高分子量ピークを形成した。おもしろいことにこの時、単量体のアミロイド β 蛋白はほとんど認められなかった。さらに不思議なことに2日後になりますと、この凝集物が完全に消失した。また、同時に単量体のアミロイド β 蛋白のピークが再び出現した。この結果は、アミロイド β 蛋白のフィブリル形成過程は単なる凝集の結果というよりは、凝集と溶解の混合したプロセスであることを示唆している。また、2日後以降に再び現れた単量体のアミロイド β 蛋白の量が、それから後のインキュベーションの時間の経過により変化しない点も注目すべきであると考えられる。それでは、この間の沈査分画のフィブ

リル形成はどうなっているのか、次に検討した。

5) アミロイド・フィブリル形成はアミロイド β 蛋白を4日間インキュベーションする間単調に増加している。

1日後から4日後の沈査分画の検討では、上清中のダイナミックな凝集や溶解の過程を反映したような事態は起こらず、フィブリル形成が凝集過程が一方向的に進んでいる様に見えた。そしてやはり、今回も4日後にはほぼ完全なアミロイド β フィブリル形成が認められた。

それでは、SEC で素通りした高分子量のアミロイド・プロトフィブリルとはどのようなものなのか次に検討した。

6) SEC で素通り分画にピークが認められたときの電子顕微鏡観察でアミロイド・プロトフィブリル形成が認められた。

SEC による検討でアミロイドの凝集によると考えられるカラムの素通りピークが認められたときの上清を電子顕微鏡で観察した。その結果、この部分には、直径10nm で長さが100nm 程度の細長い凝集物が認められた。大多数の、直径10nm で長さが100nm 程度の細長い凝集物は単一で存在した。

続いて、このように複雑なアミロイド β 蛋白のアミロイドフィブリル形

成にアルミニウムなどの金属がどのような影響を示すかを検討した。

7) アルミニウムなどの金属イオンはアミロイド・プロトフィブリル形成を遅らせる働きがある。

0.5 mM のアミロイドβ蛋白に3 mM のアルミニウム、亜鉛そして銅イオンを加え最初は4日間今までに記したのと同じ条件で実験した。しかし、この場合4日後でもアミロイドフィブリル形成は認められず、代わりによりアモルファスな凝集物を認めた。そのため、インキュベーション時間を8日まで延長した。その結果、未成熟なアミロイド・フィブリル様の凝集物を認めた。この傾向はアルミニウム、亜鉛、銅イオンでも同じであった。このことから、これらの金属イオンにはアミロイドβ蛋白の凝集を遅らせる働きがあると考えられる。

次に、プロト・フィブリル形成はこれらの金属イオンによりどのような影響を受けるのかを検討しました。

8) アルミニウムはアミロイド・プロトフィブリル形成を阻害する可能性がある。

アルミニウムを添加し1日目、2日目、4日目、6日目、8日目に電子顕微鏡で検討した。しかし、不思議なことに、我々はプロトフィブリル形成を確認できなかった。

D. 考察

アルミニウムや亜鉛は老人斑に蓄積が認められている。また、銅イオンはアミロイドβ蛋白に直接結合し活性酸素を介した毒性の発現に関連があるとされている。今回の結果は、アルミニウムなどの金属がプロトフィブリル形成を阻害し、フィブリル形成を遅延させることを示唆している。しかし、今回の検討では加えた金属イオンの濃度が高すぎたのかもしれない。我々は、引き続きアミロイドβ蛋白のプロトフィブリル形成、フィブリル形成、細胞毒性とアルミニウムなどの金属イオンとの関連についてさらに検討を続けることを希望している。

E. 結論

本年度の検討の結果、アルミニウムなどの金属イオンは、アミロイド・プロトフィブリル形成を遅らせる働きがあること、および、アルミニウムはアミロイド・プロトフィブリル形成を阻害する可能性があることを明らかにした。このメカニズムについて詳細に検討することが今後の課題であると思われる。

F. 引用文献

Selkoe DJ

Physiological production of the beta-amyloid protein and the mechanism of Alzheimer's disease.

Trends Neurosci. 1993 Oct;16 (10) :403-9

Harper JD, et al.,

Observation of metastable Abeta amyloid protofibrils by atomic force microscopy.

Chem Biol 1997 Feb;4(2):119-25

Nilsberth C et al.,

The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced Abeta protofibril formation.

Nat Neurosci 2001 Sep;4(9):887-93.

G. 論文および学会発表なし。

アルミニウムとストレス応答に関する研究

ーアルミニウムにより誘発されるスプライシング異常ー

分担研究者：遠山正彌（大阪大学大学院医学系研究科

プロセシング機能形態分野）

研究協力者：片山泰一、眞部孝幸、松崎伸介

（大阪大学大学院医学系研究科

プロセシング機能形態分野）

研究要旨

これまでにアルミニウムは小胞体(ER)ストレストランスデューサー群（IRE1, ATF6, PERK）の活性化を阻害して ER ストレス時、ER 分子シャペロン GRP78 発現誘導の減弱あるいはタンパク質翻訳抑制の減弱により、細胞を脆弱にしていることを明らかにしてきた。一方、我々は以前から孤発性アルツハイマー病患者の脳内において、プレセニリン 2（PS2）遺伝子のエクソン 5 を欠いたスプライシング変種（PS2V）が高頻度に発現していることを報告してきた。この PS2V を発現しているヒト神経芽細胞腫（SK-N-SH 細胞）は各種小胞体ストレスに対し脆弱で、さらにその培養液中で有意な A β の上昇が認められたことから PS2V の孤発性アルツハイマー病への関与は明らかであると考えられる。今回、PS2V 産生機構にアルミニウムが関与する可能性を探る目的で検討を試みた。すなわち、PS2V は培養細胞では SK-N-SH 細胞に低酸素負荷することにより発現することを確認しているため、アルミニウム負荷単独、あるいはアルミニウム+低酸素負荷により PS2V の発現あるいは発現変化が見られるか否かについて検討した。その結果アルミニウム負荷単独では用量依存性は認められないものの明らかな PS2V の発現を確認した。更に低濃度のアルミニウムを長時間暴露させた後に低酸素負荷を行った結果、PS2V は低濃度アルミニウム長時間負荷において、コントロール群（低酸素負荷単独）より早期から発現することが明らかとなった。我々は既に PS2 遺伝子 mRNA 前駆体のエクソン 5 上の特異的配列に HMG-I というタンパク質が発現誘導され結合するとエクソン 5 がスキップして PS2V が産生されることを突き止めている。そこでアルミニウムの HMG-I 誘導能についても検討したところ予想通り、上記 PS2V 発現条件において並行して HMG-I タンパク質の発現上昇を確認した。以上の結果から、アルミニウムは孤発性アルツハイマー病の発症の少なくとも増悪因子として関与する可能性が示唆された。

キーワード：アルツハイマー病、アルミニウム、小胞体ストレス、PS2 バリエーション、スプライシング、HMG-I

A. 研究目的

昨年までに我々はアルミニウムが小胞体ストレストランスデューサーであるIRE1,ATF6,PERKなどの活性化を障害することによって分子シャペロン誘導減弱、タンパク質翻訳停止の抑制などを引き起こし、小胞体ストレスに対する生体の防御機構を攪乱し、細胞死を引き起こしやすくしていることを報告してきた。一方、我々はADの大多数を占める孤発性AD

(SAD)患者脳においてプレセニリン2 (PS2) 遺伝子のエクソン5を欠くスプライシングバリエーション (PS2V) が高頻度に発現していることを見出し、その産生機構について詳細な解析を行ってきた^{1),2)}。このPS2Vは培養細胞に強制発現させると、発現した細胞は小胞体ストレスに対して脆弱になり、その際、上記IRE1の活性化が阻害されて分子シャペロンの誘導が減弱していることも明らかにした²⁾。また細胞外へ分泌されるA β 量も増加しており、明らかに孤発性アルツハイマー病の発症に関わるものが強く示唆されている。

本研究の目的は、細胞外から取り込まれたアルミニウムが変異 PS1 と同様な効果³⁾すなわち小胞体ストレス応答性の低下を引き起こすメカニズムを明らかにすることである。そこでアルミニウムが前述のように小胞体ストレス応答性を低下させる PS2V 産生機構に関わっているか否かについて、アルミニウム単独による PS2V 産生能、低酸素刺激と組み合わせた PS2V 産生能、更には PS2mRNA 前駆体のエクソン5に結合してエクソン5をスキップさせてしまう HMG-I の誘導能等

の観点から検討を行い、アルミニウムによる PS2V 発現について詳細に検討を行った。

B. 研究方法

1) 細胞培養とストレス負荷

ヒト神経芽細胞腫 SK-N-SH 細胞は、10%FCSを含む α -MEM培地で培養した。低酸素刺激は既報 1) のように低酸素チャンバー内に dish を置くこと培地中の溶存酸素を低下させることにより実行した。アルミニウムはマルトールとの混合液として用いた。本実験ではアルミニウム-マルトール混合液を一過性にあるいは持続的に培地中に処理したあと、細胞を回収し、RNA 抽出あるいはタンパク質抽出を行い後の実験に供した。

2) PS2V 発現の確認および HMG-I タンパク質の検出

PS2V の検出は既報 1) に従い、PS2 遺伝子のエクソン2とエクソン7を挟むプライマーを用いて RT-PCR 方により検出した。HMG-I タンパク質の検出は遠心により核分核を得た後、可溶化し、可溶化成分を定法に従って HMG-I の特異的な抗体で Western ブロットした。

C. 研究成果

1) 一過性アルミニウム添加の効果；

低酸素刺激単独では刺激後 16-21 時間後回収した細胞から RNA を抽出し、RT-PCR を行った際、本来増幅されるべき PS2 由来のバンドの下方に、

すなわち低い分子量にPS2エクソン5が欠失した長さのバンドが検出される。このPS2Vのバンドを指標にアルミニウム単独でのPS2Vの検出を試みた。アルミニウム 25,100,250 μ M 添加後 24 時間で用量依存性は認められないものの明らかに低酸素刺激により検出される位置にPS2V由来のバンドを検出した。それではアルミニウムは低酸素刺激によるPS2V産生を増強するか否かを検討する目的で上記濃度のアルミニウム添加後低酸素刺激 12 時間、24 時間でPS2Vの検出を試みた。その結果、通常低酸素 12 時間後ではPS2Vは検出されないにもかかわらず、アルミニウム添加によりどの濃度においてもPS2Vを検出した。しかも、このPS2V濃度を反映するバンドの密度がアルミニウム単独によるそれをどの群においても上回っていたことからアルミニウムは低酸素刺激によるPS2V産生能を増強していると考えられた。

2) 持続的アルミニウム添加の効果；
一過性アルミニウム添加によって低酸素刺激で見られるようなPS2V産生が認められたものの最大濃度である250 μ M では低酸素刺激後 24 時間のPS2V濃度が25,100 μ M群より著しく低かったこと、実際の生体内で暴露されるアルミニウム濃度を大きく逸脱していると考えられることなどから、我々は低濃度のアルミニウム刺激を持続的に行い、より生理的条件に近づけ実験を行った。2.5,25 μ M アルミニ

ウムを含む培地で 1、2 週間、1,2,3 ヶ月間培養した後、一過性負荷実験同様の操作を行いPS2Vの検出を試みた。驚いたことにアルミニウム 3 ヶ月持続負荷した群では低酸素刺激 2 時間後から既にPS2Vが検出され、その発現ピークは 4~6 時間と低酸素刺激単独の際の発現時間（16-21 時間）を大きく短縮させた。

3) アルミニウム添加による HMG-I タンパク質発現に及ぼす影響；

PS2V は低酸素刺激によって誘導される HMG-I タンパク質が PS2mRNA 前駆体上のエクソン5に結合してエクソン5が脱落してしまうことが分かっている。アルミニウムがPS2V産生を増強あるいは単独でPS2V産生能を持つことから、アルミニウムによるHMG-Iタンパク質の発現変化について検討した。予想通り、アルミニウム添加細胞から抽出した核分画においてアルミニウム非添加群に比べてHMG-Iタンパク質の濃度が上昇していることをWesternブロット法により確認した。

4) アルミニウム添加による細胞死への影響；

PS2Vを強制発現させた細胞、あるいはアルミニウムを一過性に高濃度作用させた細胞においては小胞体ストレスに対して脆弱になっていることを既に報告している。今回得られたアルミニウム低濃度持続負荷による結果が実際に細胞死に反映されているか否かについて検討を行った。アルミニ

ウム 25 μ M 一過性添加群、持続的負荷群、マルトール 25 μ M 持続的添加群にそれぞれ低酸素+小胞体ストレスであるツニカマイシン 2 μ g/ml 刺激を行い、その後の細胞死の程度を培養液中に漏出する LDH を測定することにより評価した。アルミニウム持続負荷群では低酸素+Tm 刺激後 20 時間で明らかにマルトール持続負荷群に比べ細胞死が進んでいた。

D. 考察

我々はこれまでに、アルミニウムが小胞体ストレストランスデューサーの活性化機構を障害していることを明らかにし、この小胞体ストレス応答機構の障害は FAD における PS1 変異体、SAD における PS2V による障害と同様の傾向であることからアルミニウムによる神経細胞死は小胞体ストレス応答機構の抑制に基づいて起こる可能性が強く示唆される。そこで本研究ではアルミニウムが PS2V のようなスプライシング変種を産生する機構に関わっているか否か検討を行った。その結果、一過性のアルミニウム負荷が低酸素刺激と同様の刺激となつて PS2V 産生を引き起こし、持続的アルミニウム負荷は低酸素刺激と同様の刺激となるばかりではなく、低酸素刺激による PS2V 産生を促進していた。このことはアルミニウムが生体内に存在すると PS2V が増加してくるので低酸素刺激などのストレスに加え小胞体ストレスに対して感受性が亢進することを示している。しかも、持続負荷で検討したアルミニウム濃度はわずか 2.5 μ M であり、生体に取り込まれてもアルミニウム毒性を引

き起こさない濃度であると思われる。今後の検討課題として、低酸素負荷とアルミニウム負荷がともに HMG-I の誘導を促して、PS2V 産生につながることから、アルミニウム負荷（さらには他の金属イオン）によって HMG-I を誘導する機構について明らかにすることによって孤発性アルツハイマー病を発症させる真の因子が同定できるか可能性を示唆している。候補としては、PS2V 産生がいくつかの抗酸化剤、ラジカルスカベンジャーによって抑制されることからある種の酸化ストレスが関わっていることは間違いない。アルミニウムやその他の金属が引き起こす酸化ストレスが分子生物学的にどのようなメカニズムを介して生体に伝えられていくのか興味を持たれる。

E. 結論

本年度の検討で、アルミニウムが孤発性アルツハイマー病患者に特異的に見られる PS2V 産生機構を促進し、あるいは自ら関わり、PS2V を産生することを明らかにした。PS2V 産生に関わるアルミニウム濃度は過去にアルミニウムの生体に対する影響を調べられた濃度よりはるかに低濃度で生理的範囲に入っていた。アルミニウムがどのようなメカニズムで HMG-I を誘導しているのかを調べるのが今後の課題であると思われる。

F. 引用文献

1. Sato, N., et al.: A novel presenilin-2 splice variant in human Alzheimer's disease brain tissue.

J.Neurochem.72,2498-2505,1999
 2.Sato,N.,et.al.:Increased production of β -amyloid and vulnerability to ER stress by an aberrant spliced form of presenilin-2. J.Biol.Chem.276,2108-2114, 2001
 3. Katayama, T.et al.: Presenilin-1 mutation downregulates the

signalling pathway of the unfolded protein response. Nature Cell Biol. 1, 479-484, 1999.

G. 論文および学会発表なし。

アルミニウムに対する生体防御機構の研究

研究分担者：飯塚舜介（鳥取大学医学部医学科医療環境学）

研究協力者：David A. Aremu, 富永里香, 疋田 純, 井上 仁（同上）

研究要旨

正常マウス腎臓においてアルミニウム排泄に関与する遺伝子を Differential display により検討した。23 種類の特異的なバンドを確認した。最終的に 13 種類の塩基配列を決定できた。7 種類は既知の遺伝子、6 種類は未知の遺伝子だった。アストロサイトの初代培養細胞を用い、1- ^{13}C グルコースを加えた培養液で培養後、培養液を $^1\text{H}\{^{13}\text{C}\}$ NMR 法によって代謝物を解析した。 ^{13}C で標識された乳酸、アラニン、グルタミン、酢酸、などの主要な生成物に加えて、クエン酸が観測された。低グルコース栄養条件では、培養液中に多量のクエン酸を排出した。培養液にアルミニウムグリシネートを 0.1 mM 添加した場合、グルタミンなどの主要な代謝物の生成は変化がなかったが、クエン酸の放出が特異的に阻害され細胞中に蓄積していることがわかった。中枢神経系に入ったアルミニウムに対して、アストロサイトがアルミニウムを取り込みクエン酸塩として保持することにより、神経細胞に影響を及ぼさないように防御作用をしていることがうかがわれた。一方、顆粒神経細胞との共培養を行うと、クエン酸は顆粒神経細胞に取り込まれた。神経細胞に対してアストログリア細胞はクエン酸を栄養源として供給していることが解った。アルミニウム等神経毒性のある金属を加えるとクエン酸の放出が阻害され、アストロサイトに対する毒性が神経細胞に及ぶことがうかがわれた。

キーワード：アルミニウム, mRNA 解析, $^1\text{H}\{^{13}\text{C}\}$ NMR 法, クエン酸, アストロサイト初代培養, 神経細胞・アストロサイト共培養

A. 研究目的

アルミニウムは生活環境中に極めて多く存在する。多くの用途を介してヒトはかなりの暴露を受けているにもかかわらず体内蓄積量は少なく、ほとんどが速やかに尿中に排泄されることが明らかになっている。また、単位時間当たりのアルミニウム尿中

排泄量は一定、或いは上限値をもつという実験結果が得られている。しかし、過剰にアルミニウムを摂取した場合には排泄遅延がみられる。また、排泄能が低く体内に蓄積する症例が見つかった。このことは、腎にはアルミニウムの特異的な排泄機構が存在することを示唆している。そ

こで、アルミニウム排泄機構を説明することを第一の目的とする。

脳代謝においてアストロサイトを中心としたグリア系細胞が重要な役割をしていることが明らかにされてきた。神経細胞はアストロサイトからの栄養物質の供給を受けて、生存に必要な物質とエネルギーを生成し、また、神経細胞特有の神経伝達物質の合成においても前駆体となる物質の供給を受けていることが明らかにされてきた。アストロサイトの代謝物の NMR による解析は、主として 1 次元の測定で行われてきた。そのため、いくつかの重要な代謝物が見落とされてきた。今回、マウスのアストロサイト初代培養細胞を用い¹³C ラベルしたグルコースを用いて 2 次元 NMR 法で代謝物を観測することにより、アルミニウムのアストロサイトに対する作用及び中枢神経系に入ったアルミニウムの代謝についての知見を得ることを第二の目的とする。

B. 研究方法

1) ディファレンシャル ディスプレイ法による mRNA の解析材料としては正常な 8 週齢の ICR マウスを用い、1 ヶ月間米のみをえさとして与えた。米はアルミニウム含有量が少ない飼料であるので、アルミニウムの負荷の少ない状態のマウスを得た。アルミニウム投与は、50mg Al /kg をクエン酸アルミニウム溶液として腹腔内 1 回投与した。今回用いたマウ

スは、0.965mg Al/体重 19.3g であった。コントロールとしたマウスには、クエン酸ナトリウムを同様に投与した。投与後 3 日目の腎臓を採取した。腎臓は採取後ただちに液体窒素にて冷凍し、-80℃にて保存した。1 ヶ月間保存の腎臓を用いた。

RNA の抽出は Guanidine-CsCl 法で行った。0.1g の腎臓を 10ml Guanidine-isothiocyanate にてホモジナイズし、5.7M CsCl 溶液上に重層し 10,000g 24 時間遠心し RNA を抽出した。プライマーは Fluorescence Differential Display Kit (TaKaRa) を用いた。組み合わせは Downstream primer 6 種類 × Upstream primer 24 種類の 144 通りを用いた。変性ポリアクリルアミドゲルは FMBIO II Multi-View により解析した。特異的なバンドはさらに PCR により増幅し、H.A.-Yellow を添加した高性能アガロースゲル電気泳動にて精製し、さらに Extended primer にて増幅した。塩基配列は Genetic Analyzer 3100 (ABI) を用い Direct sequencing により決定した。

2) 細胞培養

生後 2 ～ 4 日のマウスから大腦を採取し、物理的攪拌により細胞を分離した。DMEM 培養液に F12 培養液を加えた (1 : 1) 培養液に 15% 仔牛胎児血清を添加した条件で培養した。週 2 回培養液を交換し、増殖の状態を見て植え継ぎを行いアストロサイトの単一培養細胞を得た。代謝物の観測は、グルコースを含まない DMEM に 1-¹³C グルコースを 1g/l の

濃度で添加し、10%仔牛胎児血清を添加した条件で培養した。培養液にアルミニウムグリシネートを 0.01mM, 0.1mM, 1mM の濃度で添加し、アルミニウム塩を添加していないものと比較した。6 時間, 12 時間, 24 時間後の培養液と培養細胞を採取し NMR 測定試料とした。

3) NMR の測定

$^1\text{H}\{^{13}\text{C}\}$ NMR の測定は Varian Unity-500 で行った。試料に 10% D_2O を添加した。測定条件は pulse width=13.5 μs , acquisition time = 0.197s, spectral width = 5200Hz(^1H), 13000Hz(^{13}C), number of transient = 128, number of increment = 256, decoupler sequence = garp1, temp = 27°Cであった。ケミカルシフトは乳酸のメチル基を ^1H :1.33ppm, ^{13}C :21.2ppm とした。

C. 結果

1. Differential Display でアルミニウム投与マウスの腎臓で発現が亢進または低下していたバンドを 38 種類確認した。このうち 13 種類のバンドの塩基配列を決定することができた。特異的な発現を示した 13 種類の遺伝子のうち 8 種類はアルミニウム投与マウスで発現が亢進し、5 種類は低下していた。

2. 培養液中には lactate, alanine, acetate, pyruvate, glutamine, citrate の isotopomer が観測された。1H の 1D 測定から succinate, glutamate が放出されると報告されているが、我々が

今回行った培養では、succinate, glutamate は全く検出されなかった。小脳アストロサイトの特徴は、大脳由来と比べて citrate の放出が極めて多いことであった。また、0.1mM Al-glycinate の存在で citrate の放出が抑制された。小脳顆粒神経細胞とアストロサイトの共培養においても同様に、lactate, alanine, (acetate, pyruvate,) glutamine, citrate の isotopomer が観測されたアストロサイトの単一培養と比べて、citrate の濃度が少なかった。顆粒神経細胞によって取り込まれたと考えられる。

D. 考察

腎臓における特異的なアルミニウム排泄機構を検討した報告はほとんどない。これまでにアルミニウムの毒性については、透析痴呆やアルツハイマー病が知られている。アルミニウムはトランスフェリンと結合し、血液脳関門を通り脳内で毒性を示すと考えられている。腎臓において、このようにアルミニウムと結合するタンパク質を探る上でも今回の方法は有用であると考えられる。今後はリアルタイム PCR を用いて、発現量に差があると思われる遺伝子についてさらに検討を行う予定である。

中枢神経系において citrate がどのような役割をしているのか明らかにされていない。三塩基酸であることから、 Ca^{2+} , Mg^{2+} などの 2 価金属イオンの調節をしていると予想されているが、よく解っていない。脳脊

髄液中には、citrate がほぼ一定の濃度に保たれている。ミトコンドリアの TCA 回路で生成されて細胞外に放出されているが、小脳アストロサイトが citrate 濃度の調節に重要な役割をしていることがわかった。大脳皮質から採取したアストロサイトでは、citrate の放出は観測されるが、極めて僅かな量であった。脳内の代謝物を通じた細胞間の相互作用について、NMR を用いた研究がなされてきたが、混合系のスペクトルはにおいて DQCOSY, HSQC が有効であることが解った。

クエン酸のシグナルはアルミニウム 0.1mM 添加時には極僅かしか観測されなかった。クエン酸はアルミニウムと安定な錯体を形成することが知られている。TCA 回路は十分機能しているわけであるから、細胞内でアルミニウムと錯体を形成し、培養液中に出てこないものと考えられる。

E. 結論

正常マウス腎臓においてアルミニウム排泄に関与する遺伝子を Differential display により検討した。23 種類の特異的なバンドを確認した。最終的に 13 種類の塩基配列を決定できた。7 種類は既知の遺伝子、6 種類は未知の遺伝子だった。

中枢神経系に入ったアルミニウムに対して、アストロサイトがアルミニウムを取り込みクエン酸塩として保持することにより、神経細胞に影響を及ぼさないように防御作用をしていることがわかった。

影響を及ぼさないように防御作用をしていることがわかった。

F. 研究発表

- 1) Inoue, M., Meshitsuka, S., Yoshioka, S., Kawahara, R.: Development of computerized screening system for dementia and its preliminary field test. . Computer Methods and Programs in Biomedicine 61,151-155 (2000).
- 2) Kamba M., Meshitsuka S., Iriguchi, N., Koda, M., Kimura, K., Ogawa, T.: Measurement of relative fat content by proton magnetic resonance spectroscopy using a clinical imager. Journal of Magnetic Resonance Imaging 11, 330-335 (2000).
- 3) 足田 純, 富永里香, 井上 仁, 難波栄二, 大塚 譲, 飯塚舜介: HMQC 法によるアストログリア細胞の代謝物の観測. 第39回 NMR 討論会予稿集 266-267 (2000).
- 4) 井上 仁, 長谷川伸作, 陶山昭彦, 飯塚舜介: 動的グラフ表示と注意警報発令機能を組み込んだ感染症情報システムの開発. 医療情報学 21: 575-576 (2001).
- 5) 松島文子, 飯塚舜介 : 食物および医薬品からのアルミニウム摂取と排泄. 日本衛生

- 学雑誌 56: 528-534 (2001).
- 6) Meshitsuka, S., Koeda, T., Hara, T., Takeshita, K.: Abnormal aluminum metabolism in two siblings with progressive CNS calcification. *Developmental Medicine and Neurology and Clinics in Developmental Medicine* 43: 286-288 (2001).
- 7) 飯塚舜介, 富永里香, 疋田 純, 井上 仁, David A. Aremu : 3D-DOSY-COSY 法によるマウス脳内代謝物の拡散係数の測定. *日本磁気共鳴医学会雑誌 supp* 277(2001).
- 8) 飯塚舜介, 疋田 純, 富永里香, 井上 仁, David A. Aremu. 小脳アストログリア細胞の代謝と機能. 第40回 NMR 討論会予稿集 290 (2001).
- 9) 富永里香, 疋田 純, David A. Aremu, 井上 仁, 難波栄二, 飯塚舜介 : Differential Displayを用いた腎におけるアルミニウム排泄機構の解明. 第24回日本分子生物学会年会講演要旨集 844 (2001).
- 10) Meshitsuka, S. Tominaga, L. Hikita, J. Inoue, J. Aremu, D.A., Matsushima, F: Intake, metabolism and excretion of aluminum: *Proceedings Book of 3rd International Symposium on Trace Elements in Human: New Perspectives.* 801-808 (2001).

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Masatoshi Takeda, Toshihisa Tanaka, Hiroyuki Arai, Hidetaka Sasaki, Mikio Shoji, Koichiro Okamoto, Katsuya Urakami, Kenji Nakashima, Takeyuki Matsubayashi, Mitsumori Suigita, and Hiroshi Yoshida	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	PSYCHOGERIATRICS	1	56-63	2001
S.Meshituka, L.Tominaga, J.Hikita, M.Inoue, D.A.Aremu, F.Matsushima	Intake, Metabolism and Excretion of Aluminium	3 rd INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TRACE ELEMENTS IN HUMAN: NEW PERSPECTIVES PROCEEDINGS BOOK		801-808	2001
松島 文子、飯塚舜介	食物および医薬品からのアルミニウム摂取と排泄 Ingestion and Excretion of Aluminium in Foods and Pharmaceuticals	Japanese Journal of Hygiene 日本衛生学雑誌	56 (2)	528-534	2001
Shunsuke Meshiusuka, Tatsuya Koeda, Toshihiro Hara Kenzo Takeshita	Abnormal aluminium and element metabolism in two Siblings with Progressive CNS Calcification	Development Medicine And Child Nerology	43	286-288	2001

20010939

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、P.33の「研究成果の刊行に関する一覧」をご参照ください。