

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

アルツハイマー病の発症分子機構に関する研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 柳澤勝彦

平成15 (2003) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

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た。最終年度は、特にAβ産生系についてそれに関わるプロテアーゼ活性調節因子の解析、Aβの毒性発現機構とこのペプチド重合形態の関係、さらにはAβカスケードとAD発症危険因子であるコレステロールとの関係について、多くの新しい知見を確認した。本研究で得られた成果をもとに新しいAD治療、予防法の開発に活用することが今後の課題と考えられる。

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	名古屋市立大学大学院 医学研究科 代謝細胞生化学I 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

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。

A β 凝集によるアミロイド線維化を定量的ならび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 A β 線維の構造を観察した。

(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。同抗体の反応特異性を(1)で作製した liposome 上で形成させた GM1-A β 、可溶性の単体 A β 、ならびにアミロイド線維化した重合 A β に対して評価した。

(3)AD モデル動物脳神経細胞膜の脂質化学的解析

ヒト型 apoE 遺伝子導入マウスを対象にシナプトゾームを調整し、TNBS 法でシナプス脂質二重膜内のコレステロール分布を評価するとともに、GM1 ガングリオシドに特異的に反応するコレラ毒素の結合を定量的に評価した。

(駒野)

γ -セクレターゼ活性を上げる cDNA の同定のためのスクリーニング法は、昨年度報告した。すなわち、独自に開発した細胞株を用いて、その細胞に 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。

プレセニリン複合体の構成因子として、これまで、生化学的解析から Nicastrin という膜蛋白(Yu G., et al, Nature 407:48, 2000) が、また、線虫を

に定性的に評価するにあたっては、アミロイド用いた遺伝学的解析から、新たな因子として、APH-1, PEN-2 と命名された膜蛋白が明らかにされた(Francis et al., Dev. Cell 3:85, 2002)。今回、これら因子の cDNA をレトロウイルスを用いた方法により細胞内で発現させ、A β 産生における影響を解析した。A β の検出は、ELISA 法を用いた。

(道川)

1) apoE の研究は、ヒト apoE3 および apoE4 をノックインしたマウス (三菱化学生命科学研究 所 藤田博士との共同研究) から培養したアストロサイトを用了。

2) アミロイド β 蛋白(A β)のコレステロール代謝および神経細胞への影響の検討にはラット大脳皮質から調製した神経細胞を用了。

3) コレステロールとタウのリン酸化の分子機構の検討では、コレステロール代謝障害からタウのリン酸化亢進と神経原線維変化および神経変性を来たす疾患であるニーマンピック病 C 型(NPC)のモデルマウス脳の解析あるいは、その原因遺伝子 NPC1 欠損細胞の解析を行った。得られたサンプルは、生化学、脂質生化学、および神経科学的手法により解析した。

(横山)

ラット胎児脳から分離したアストロサイトを中心に、そのアポ E 産生と外因性アポ AI 添加に反応しておこる HDL 産生を詳細に検討した

(田中)

SY5Y 神経芽細胞腫にプレセニリン (wild type, L250S 変異、 Δ Exon9) を強制発現した細胞株は、Dr. Tanii H より供与いただき(Tanii, H., et al. Neuroscience. 2000;95(2):593-601.)、これを 5% FCS を含む D-MEM/F-12 にて培養して実験に使用した。以前と同様に、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。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, 2mM MgCl₂, 0.1mM EDTA, 1mM EGTA, 25mM NaF, 1mM Na₃VO₄, 1mM PMSF, 5 μ g/ml aprotinine, 5 μ g/ml leupeptine, 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)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。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 上で形成された GM1-A β ならびに可溶性単体 A β に対する反応を dot blot で解析した結果、我々が作製した抗 GM1-A β 抗体は GM1-A β のみに反応することが確認され

た。さらに liposome 上での GM1-A β に対する反応を binding assay により定量的に検討した結果、本抗体の liposome への結合は反応させた A β 量に依存して増加することが確認された。以上より、本抗体は GM1-A β を検出する有用なプローブとなりうることを確認された。

次に、GM1-A β 形成の背景を脂質化学的に解析することを目的にヒト型 apoE 遺伝子導入マウス脳シナプス膜の脂質化学的解析を行った結果、昨年度までの apoE4 発現マウスにおけるシナプス脂質二重膜外葉中のコレステロール含量の増加所見に加え、本年度は同マウス脳シナプトゾームにおける GM1 ガングリオシドの増加を示唆するコレラ毒素結合性の増加が認められた。

(駒野)

我々のスクリーニングにより得られた cDNA は、小胞体からゴルジ体に蛋白輸送する Rab1A、および、オートファジーに関与する GATE-16 をコードするものであった。そこで、Rab1A および GATE-16 の cDNA を、それぞれ、マウス繊維芽細胞に導入し、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、これら cDNA を遺伝子導入することにより、細胞の産生する A β 量がほぼ二倍に増加することが明らかとなった。また、Rab1A および GATE -16 は、プレセニリン複合体の構成因子ではないことが明らかとなった。したがって、これらの因子は、プレセニリン複合体、あるいは、基質である APP の細胞内輸送を間接的に調節し、A β 産生を促進している可能性が考えられた。

一方、プレセニリン複合体の構成因子として線虫を用いた遺伝学的解析等で、他の研究グループによって、APH-1, Nicastrin, PEN-2 と命名された膜蛋白が同定された。我々は、これら因

子の Ab 産生に及ぼす影響を詳細に解析した。その結果、PEN-2 が、 γ -セクレターゼ活性に極めて重要な役割を果たしていることが明らかとなった (Sai et al., Submitted)。すなわち、APH-1, Nicastrin, PEN-2 の共発現は、プレセニリンが細胞内でうける分子内切断 (エンドプロテオリシス) に必要であるが、 γ -セクレターゼ活性の促進には、PEN-2 だけが必要であることを見出した。

(道川)

1) apoE はアストロサイトからのコレステロール搬出し HDL を産生すること、その作用がアイソフォーム特異的である (apoE3 > apoE4) ことを明らかにした (Michiakawa et al., J. Neurochem., 2000; Gong et al., J. Biol. Chem., 2002)。

2) アルツハイマー病脳で増加していると考えられる $A\beta$ の重合体が神経細胞におけるコレステロール代謝に影響を与え (Michikawa et al., J. Neurosci., 2001)、最終的に細胞内コレステロール量を減少させる (Gong et al., J. Neurosci. Res., 2002) が、単体 $A\beta$ にはこうした作用はなく、むしろ神経保護的に働くこと (Zou et al., J. Neurosci., 2002) を示した。

3) 細胞内コレステロールが減少すると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、軸索の脱重合を促進させること (Fan et al., J. Neurochem., 2001)、コレステロール代謝障害を持つ NPC マウス脳では MAPK の活性の亢進を伴った tau の異常リン酸化を来すこと (Sawamura et al., J. Biol. Chem., 2001)、その場合ラフトにおけるコレステロール量の減少が原因である可能性があること (Sawamura et al., J. Neurochem., in press) を明らかにした。

(横山)

1) 脳の障害後における、アストロサイトによ

る HDL 産生の制御。脳の損傷後に、局所に於けるアストロサイトのアポ E 産生が刺激されることが知られ、それによる HDL 産生も増加すると考えられている。アポ E は癌化したアストロサイトからは合成されにくく、アストロサイトの分化マーカーの一つと考えられる (Zhang et al.

JB 128, 837, 2000)。このメカニズムを *in vivo* と *in vitro* で検討した。マウスの脳を液体窒素の接触で損傷させ、その後の治癒を瘢痕の収縮で観察すると、アポ E 欠損マウスでは正常マウスに比べ有意に遅延することが認められた。この時、正常マウスの患部のアストロサイトには、アポ E 合成増加に先立ち酸性 FGF の産生が認められ、アポ E 欠損マウスでも同じ時期に同じことが認められた (Tada, Ito, Yokoyama, manuscript submitted)。この病態生理的意義を検討するため、アストロサイトをストレス状態に置くために、長期培養を試みた。ラット小脳細胞を一ヶ月培養し、その後1週間アストロサイトとして2次培養すると、アポ E の合成、分泌が大幅に高まっており、培地中には HDL の産生が増加していた。この状態のアストロサイトの培地を通常の1週間1次、1週間2次培養で得たアストロサイトに添加すると、アポ E-HDL の産生増加が認められ、この効果は産生 FGF の得意的抗体による培地の事前処理で消失した。また、長期培養細胞培地添加と同じアポ E - HDL 増産効果が、産生 FGF のアストロサイトへの添加によって再現された (Ueno et al., BBA 1589, 261, 2002)。

2) アストロサイトに於けるアポリポタンパク質による HDL 新生の機構。アストロサイトは、自ら合成するアポ E によってコレステロールに富んだ HDL を産生し、外因性のアポ A-I など

により相対的にコレステロールの少ない HDL を産生することは以前報告した (Ito et al. J. Neurochem. 72, 2362, 1999)。この機序について、外因性のアポ A-I に反応するコレステロールは、スフィンゴミエリンと堅く結合していることで運動性が低く、HDL に積み込まれにくいことが理由であることが示されて、所謂ラフト・ドメインの HDL 新生への関与が示唆された (Ito et al. J. LipidRes. 41, 894, 2000)。外因性アポ A-I との反応において、細胞内コレステロールと caveolin-1 の細胞質中の脂質蛋白複合粒子への移行が観察され、HDL 新生へのコレステロール動員の重要な機構であると考えられる (JBC 277, 7929, 2002)。また、HDL 新生に伴いスフィンゴミエリンが細胞から奪われるのに伴って、フォスファチジルコリンからセラミドへの磷酸コリンの転移で補填されることが示され、このときに結果的にジグリセリドが産生されて、シグナル起動の機序であることが想定された (JBC 277, 44709, 2002)。

(田中)

プレセニリン (wild type, L250S 変異、 Δ Exon9) を強制発現した細胞株において、rose bengal を添加し光照射を行って、核酸への酸化ストレスを導入して、15 分、30 分、60 分、120 後の細胞を回収して検討をおこなった。まず、wild type のものに比べて L250S 変異および Δ Exon9 の細胞においては、p38 および SAPK のリン酸化反応はほとんど消失していた。このとき、p38 および SAPK の発現量は一定であった (リン酸化非依存性抗体により確認)。さらに、タウ蛋白リン酸化 (Ser396/404) についても、wild type のものに比べて L250S 変異および Δ Exon9 の細胞においては、リン酸化の亢進はほとんど消失していた。しかし、細胞死に関しては、wild type

のものでも刺激後時間とともに細胞死は増大したが、変異プレセニリン導入細胞の方が細胞死亡率が高かった。以上により、変異プレセニリンは、何らかの機序でストレスに関する情報が p38 および SAPK に伝達する過程で障害が生じている可能性が示唆された。

次に、このプレセニリン導入細胞に 1 μ g/ml compactin 添加した後に rose bengal を添加し光を照射して検討をおこなった。昨年度の検討では、通常の SY5Y 神経芽細胞腫において compactin 添加したものと添加しなかったものに刺激をおこない比較したところ、compactin 添加したもののほうが、28S および 18S の ribosomal RNA の酸化は亢進し、また SAPK 活性とタウ蛋白のリン酸化が亢進していた。プレセニリン導入細胞に compactin を添加したものと添加しなかったものに刺激をおこない比較したところ、wild type のもので昨年と同様に、compactin を添加したものにおいては SAPK 活性とタウ蛋白のリン酸化が亢進が増強していた。しかし、L250S 変異および Δ Exon9 の変異プレセニリン導入細胞においては、SAPK 活性とタウ蛋白のリン酸化は compactin を添加したものにおいても添加しなかったものにおいてもどちらも認められなかった。さらに細胞死に関しての検討では、compactin 添加したもののほうが細胞死が多いという現象は、wild type のものでも L250S 変異および Δ Exon9 のものでも認められた。よって、cholesterol には SAPK 活性とタウ蛋白のリン酸化に直接関与するのではなく、より上流のレベルで関与すること、および細胞死に関しては cholesterol がなくなることにより加算的に関与することが示唆された。

D. 考察

Aβ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。過去 2 年間の研究成果に加え、最終年度の本研究によって、Aβ産生に関しては、家族性 AD の原因遺伝子産物であるプレセニリンを中心に、複数の遺伝子産物が Aβ産生の最終段階を担うγ-cleavage 調節因子として働いていることが明らかとなった。本研究により同定されたそれらの遺伝子の生物学的役割を明らかにすることで、Aβ産生調節薬の開発の可能性を探ることが重要と考えられる。

Aβの重合機構に関しては、Aβが神経細胞膜を構成する脂質分子と結合することにより形成される特異構造を獲得した Aβ分子(GM1-Aβ)が可溶性 Aβ重合の開始点に seed として働いている可能性が強く示唆された。GM1-Aβ分子の形成は神経細胞膜のコレステロール濃度の増加により促進されることも確認され、AD 発症の危険因子としてのコレステロールの役割に新たな視点を提供したと考えられる。

Aβの毒性発現機構に関しては、従来の考え方、即ち、可溶性の単体Aβには毒性はなく凝集 Aβ(アミロイド線維)になって初めて毒性が示されるという仮説に検討を加えた結果、Aβはアミロイド線維に至る前の重合形態であるオリゴマーの段階で特異な生物作用を発揮することが確認された。このオリゴマーAβの活性は神経細胞に対して認められ、興味深いことに神経細胞膜からの一方向的な脂質分子搬出作用として現れた。

以上の知見は、今後、新しい AD 予防薬、治療薬の開発に有用な基礎的情報に成りうると考えられた。

E. 結論

Aβ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

Hayashi H, Igbavboa 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* 13:383-386, 2002

Yanagisawa K.

Cholesterol and pathological processes in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 70:361-366, 2002

Gong JS, Kobayashi M, Hayashi H, Zou K, Sawamura N, Fujita SC, Yanagisawa K and Michikawa M. Apolipoprotein E (apoE) isoform-dependent lipid release from astrocytes prepared from human-apoE3- and apoE4-knock-in mice.

J Biol Chem 277(33): 29919-29926, 2002

Fan QW, Yu W, Gong J S, 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

Zou K, Gong JS, Yanagisawa K and Michikawa M.

A Novel function of monomeric amyloid β-protein serving as an antioxidant molecule against metal-induced oxidative damage.

J Neurosci 22:4833-4841, 2002

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

Amyloid β-protein affects cholesterol metabolism in cultured neurons: Implications for pivotal role of cholesterol in the amyloid cascade. *J Neurosci Res* 70:438-446, 2002

- Komano H, Shiraishi H, Kawamura Y, Sai X, Suzuki R, Serneels L, Kawaichi M, Kitamura T and Yanagisawa K.
A new functional screening system for identification of regulators for the generation of amyloid β -protein.
J Biol Chem. 277:39627-39633, 2002
- Sai X, Kawamura Y, Kokame 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 277:12915-12920, 2002
- Kakio A, Nishimoto S, Yanagisawa K, Kozutsumi Y and Matsuzaki K.
Interactions of amyloid β -protein with various gangliosides in raft like membranes: Importance of GM1 ganglioside-bound form as an endogenous seed for Alzheimer amyloid.
Biochemistry 23:7385-7390, 2002
- Watarai M, Makino S, Michikawa M, Yanagisawa K, Murakami S and Shirahata T.
Macrophage plasma membrane cholesterol contributes *Brucella abortus* infection of mice.
Infection and Immunity 70:4818-4825, 2002
- Sawamura N, Gong JS, Chang TY, Yanagisawa K, and Michikawa M.
Promotion of Tau Phosphorylation by MAP Kinase Erk1/2 Is Accompanied by Reduced Cholesterol Level in Detergent-Insoluble Membrane Domains in Niemann-Pick C1-Deficient Cells. J Neurochem 84:1086-1096, 2003
- Garver WS, Krishnan K, Gallagos JR, Michikawa M, Francis GA, Heidenreich RA. Niemann-Pick C1 protein regulates cholesterol transport to the trans-Golgi network and plasma membrane caveolae.
J Lipid Res 43(4):579-89, 2002
- Watarai M, Makino S, Michikawa M, Yanagisawa K, Murakami S and Shirahata T.
Macrophage plasma membrane cholesterol contributes *Brucella abortus* infection of mice.
Infection and Immunity 70:4818-4825, 2002
- Li Q, Yokoyama S, Agellon LB.
Active taurocholic acid flux through hepatoma cells increases the cellular pool of unesterified cholesterol derived from lipoproteins. Biochim Biophys Acta 1580:22-30, 2002
- 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 277: 7929-7935, 2002
- Ueno S, Ito J, Nagayasu Y, Furukawa T, 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 1589: 261-272, 2002
- Arakawa R and Yokoyama S.
Helical apolipoproteins stabilize ATP-binding cassette transporter A1 by protecting it from thiol protease-mediated degradation.
J Biol Chem 277: 22426-22429, 2002
- Wu C, Tsujita M, Okumura-Noji K, Usui S, Kakuuchi H, Okazaki M, Yokoyama S. Cholesteryl Ester Transfer Protein Expressed in Lecithin: Cholesterol Acyltransferase-Deficient Mice. Arterioscler. Thromb Vasc Biol 22: 1347-1353, 2002
- Wada Y, Sugiyama A, Yamamoto T, Naito M, Noguchi N, Yokoyama S, Tsujita M, Kawabe Y, Kobayashi M, Izumi A, Khoro T, Tanaka T, Taniguchi H, Koyama H, Hirano K, Yamashita S, Matsuzawa Y, Niki E, THamakubo T and Kodama T. Lipid accumulation in smooth muscle cells under LDL loading is independent of the LDL receptor pathway and enhanced by hypoxic conditions. Arterioscler. Thromb Vasc Biol 22: 1712-1719, 2002
- Ito J, Nagayasu Y, Ueno S and Yokoyama S. Apolipoprotein-Mediated Cellular Lipid Release Requires Replenishment of Sphingomyelin in a Phosphatidylcholine-Specific Phospholipase C-Dependent Manner. J Biol Chem 277: 44709-44714, 2002
- Yamauchi Y, Abe-Dohmae S and Yokoyama S. Differential Regulation of Apolipoprotein A-I/ATP binding Cassette Transporter A1 mediated Cholesterol and Phospholipid release. Biochim Biophys Acta 1585: 1-10, 2002
- Michikawa M.
Cholesterol paradox: is high total or low HDL Cholesterol level a risk for Alzheimer's disease? J Neuro Res 72, 2003 (in press)
- Michikawa M.
Role of cholesterol in pathogenesis of

Alzheimer's disease.
Mol Neurobiol (in press)

Harada-Shiba M, Takagi A, Miyamoto Y, Tsushima M, Ikeda Y, Yokoyama S and Yamamoto A. Clinical Features and Genetic Analysis of Autosomal Recessive Hypercholesterolemia. J Clin Endocrin and Met. 2002 (in press)

Goto A, Sasai K, Suzuki S, Fukutomi T, Ito S, Matsushita T, Okamoto M, Suzuki T, Itoh M, Okumura-Noji K and Yokoyama S. Plasma Concentrations of LPL and LCAT are in Putative Association with Female Sex and Alcohol That are Independent Negative Risk Factors For Coronary Atherosclerosis in Japanese. Clin Chim Acta 2002 (in press)

Tanaka AR, Abe-Dohmae S, Ohnishi T, Aoki R, Morinaga G, Okuhira K, Ikeda Y, Kano F, Matsuo M, Kioka N, Amachi T, Murata M, Yokoyama S and Ueda K. Effects of Mutations of ABCA1 in the First Extracellular Domain on Subcellular Trafficking and ATP binding/hydrolysis. J Biol Chem 2003 (in press)

Yokoyama S. Brief history of LDL apheresis. Therapeutic Apheresis. Invited review. 2002 (in press)

Ito J and Yokoyama S.
Roles of glia cells in cholesterol homeostasis in the brain. In Non-neuronal cells of the nervous system: function and dysfunction, Edited by Leif Hertz. Elsevier, Amsterdam 2003 (in press)

田中稔久、山森英長、和田健二、田中修二、鈴木英鷹、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研究 精神薬療研究年報 34:21-27,2002

Kamino K, Kida T, Tanaka T, Tanii H, Ohkochi M, Kudo T, Kobayashi T, Takeda M.
Apolipoproteins and β amyloid transport pathway Psychogeriatrics 2,149-155,2002.

田中稔久、武田雅俊 アルツハイマー病の診断の新機軸 臨床と研究 79,930-933,2002

田中稔久、武田雅俊 免疫療法の開発と問題点 老年精神医学雑誌 31,1177-1180,2002

田中稔久、武田雅俊 タウ蛋白の異常と痴呆症 神経変性メカニズムの理解 脳と神経 54,777-787,2002

紙野晃人、田中稔久、貴田智之、大河内正康、谷井久志、工藤喬、武田雅俊 アルツハイマー病における脂質代謝の役割 日本神経精神薬理雑誌 22,103-110,2002

2. 学会発表

柳澤勝彦 Cholesterol-dependent aggregation of amyloid β -protein
第3回アルツハイマー病関連血管因子に関する国際会議 2002年4月8-9日 京都

柳澤勝彦 アルツハイマー病中核病変とコレステロール
基礎老化学会 2002年5月16-17日 筑波

柳澤勝彦 アルツハイマー病とマイクロドメイン
第1回マイクロドメイン研究会 2002年6月6日 大府

澤村直哉、きょう建生、Chang TY、柳澤勝彦、道川 誠

Niemann-Pick type C deficiency reduces the levels of cholesterol in detergent insoluble, low-density membrane domains leading to activation of MAP kinase pathway and increased phosphorylation of tau.
第45回日本神経化学学会 2002年7月16-19日 札幌

ゾウクン、キョウ建生、柳澤勝彦、道川 誠
A novel function of monomeric amyloid β -protein serving as an antioxidant molecule against metal-induced oxidative damage.
第45回日本神経化学学会 2002年7月16-19日 札幌

キョウ建生、小林まり子、林 秀樹、ゾウクン、澤村直哉、藤田 忍、柳澤勝彦、道川 誠
Isoform-dependent lipid release from astrocytes prepared from human apolipoprotein E3- and E4-knock-in mice. 第45回日本神経化学学会 2002年7月16-19日 札幌

白石博久、川村勇樹、鈴木亮、蔡 曉蕊、柳澤勝彦、駒野宏人
small GTPase Rab1A の過剰発現による A β 産生の促進 第45回日本神経化学学会 2002年7月17日 札幌

蔡 曉蕊、小亀浩市、白石博久、鈴木亮、宮田敏行、柳澤勝彦、駒野宏人
Herp による A β 産生増加機構の解析
第45回日本神経化学学会 2002年7月17日 札幌

柳澤勝彦 コレステロールと A β カスケード
第25回日本痴呆学会 2002年10月3日 大阪

柳澤勝彦 アルツハイマー病におけるコレステロールの役割 第75回日本生化学会 2002年10月16日 京都

蔡 曉蕊、小亀浩市、白石博久、鈴木亮、宮田敏行、柳澤勝彦、駒野宏人
Herp による γ -セクレターゼ活性促進機構の解析 第75回日本生化学会 2002年10月16日 京都

白石博久、川村勇樹、鈴木亮、蔡 曉蕊、柳澤勝彦、駒野宏人
Rab1A による APP β 切断の促進 第75回日本生化学会 2002年10月16日 京都

奥平桂一郎、半田哲郎、山内祥生、堂前純子、横山信治 Lipid-free, Lipid-bound apoA-1 と細胞との相互作用 脂質搬出機構のメカニズムの解析 第66回日本循環器学会学術集会 2002年4月24-26日 札幌

山内祥生、堂前純子、横山信治
アポリポタンパク質依存的な High Density Lipoprotein 形成のカスケード反応 第44回日本脂質生化学研究会 2002年6月14-15日 東京

伊藤仁一、長安祐子、横山信治
Autocrine action of acidicFGF to stimulate cholesterol metabolism and apoE secretion of rat astrocytes.
第45回日本神経化学会大会 2002年7月17-19日

呉 成愛、辻田麻紀、野路久仁子、臼井真一、角内 創、岡崎三代、横山信治
LCAT による血中 CETP 量の調節 第34回日本動脈硬化学会 2002年6月18-19日 神戸

辻田麻紀、呉成愛、角内創、臼井真一、岡崎三代、Vance Dennis、横山信治
肝細胞における apoAI-HDL 産生の機構 第34回日本動脈硬化学会 2002年6月18-19日 神戸

堂前純子、青木綾、植田和光、横山信治
アポ AI 依存性 HDL 新生反応と ABCA1 遺伝子発現 堂前純子、青木綾、植田和光、横山信治 第34回日本動脈硬化学会 2002年6月18-19日 神戸

呉 成愛、辻田麻紀、野路久仁子、臼井真一、角内 創、岡崎三代、横山信治
HDL 濃度による 血中 CETP レベルの調節 第75回日本生化学会大会 10月14-17日 京都

辻田麻紀、呉成愛、臼井真一、角内創、岡崎三代、横山信治 ヒト肝株細胞における apoAI-ABCA1 経路による HDL 新生の機序 第75回日本生化学会大会 2002年10月14-17日 京都

伊藤仁一、長安祐子、横山信治
アストロサイト産生 acidicFGF によるアストロサイトのコレステロール代謝のオートクリン調節 第75回日本生化学会大会 2002年10月14-17日 京都

奥平桂一郎、半田哲郎、山内祥生、堂前純子、横山信治 脂質搬出における HDL 粒子と細胞との相互作用 第75回日本生化学会大会 2002年10月14-17日 京都

堂前純子、植田和光、横山信治
ABCA1 ならびに ABCA7 を介したアポリポタンパク質依存性 HDL 新生反応 第75回日本生化学会大会 2002年10月14-17日 京都

山内祥生、堂前純子、横山信治
Protein Kinase C による ATP binding cassette transporter (ABC) A1 のタンパク質レベルの調節 第75回日本生化学会大会 2002年10月14-17日 京都

武田雅俊、田中稔久、和田健二、山森英長 核酸の酸化にともなうタウ蛋白質リン酸化についての検討 第68回老化防止委員会 2002年1月12日 名古屋

田中稔久 シンポジウム II タウ・シヌクレイン・ニューロフィラメントと神経変性メカニズム タウ蛋白と神経変性メカニズム 第21回日本痴呆学会 2002年10月3-4日 大阪

田中稔久、山森英長、田中修二、和田健二、鈴木英雄、紙野晃人、工藤喬、大河内正康、谷井久志、小池裕子、以倉康充、貴田智之、松本均彦、福森亮雄、金山大祐、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研究 第35回精神神経系薬物治療研究報告会 2002年12月6日 大阪

Yanagisawa K. Cholesterol and A β aggregation.
The Satellite Symposium of 8th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders. July 26, 2002, Frankfurt, Germany

Komano K, Sai X, Kawamura Y, Kokame K, Yamaguchi H, Shiraishi H, Suzuki R, Kawaichi M, Miyata T, Kitamura T and Yanagisawa K.
A new function screening system identifies cDNAs that increase g-cleavage.
The 8th International Conference on

Alzheimer's disease and related disorders, July 22, 2002, Stockholm, Sweden

Gong JS, Kobayashi M, Hayashi H, Zou K, Sawamura N, Fujita SC, Yanagisawa K and Michikawa M.

Isoform-dependent lipid release from astrocytes prepared from human apolipoprotein E3-and E4knock-in mice. 32th Society for Neuroscience Annual Meeting. November 7, 2002, Orland, U.S.A.

Zou K, Gong JS, Yanagisawa K and Michikawa M. A novel function of nonnumeric amyloid β -protein serving as an antioxidant molecule against metal-induced oxidative damage. 32th Society for Neuroscience Annual Meeting. November 6, 2002, Orland, U.S.A.

Sawamura N, Gong JS, Chang TY, Yanagisawa K and Michikawa M.

Nimann-pick C1 deficiency reduces the levels of cholesterol in detergent insoluble, low-density membrane domains leading to activation of map kinase pathway and increased phosphorylation of tau.

32th Society for Neuroscience Annual Meeting. 2, November 6, 2002, Orland, U.S.A.

Ito J, Nagayasu Y and Yokoyama S.

Stimulation by acidicFGF of cholesterol metabolism of rat astrocytes.

The 14th Biennial Meeting of the Internatinal Society for Developmental Neuroscience . Jan.31-Feb.2, 2002

Suzuki S, Shigeyama J, Takeda Y, Suzumura H, Yamada Y, Horio T, Fukutomi T, Abe-Dohmae S, Itoh M, Yokoyama S. Verapamil enhances apolipoprotein A-I (apoa-I) mediated cellular lipid release and ATP-binding cassette transporter (ABC) A1 expression in RAW264cell-line cells. The 14th Biennial Meeting of the Internatinal Society for Developmental Neuroscience .2002, Jan.31- Feb. 2

Yamauchi Y, Arakawa R, Abe-Dohmae S and Yokoyama S.

Cascade reactions for cholesterol mobilization to assenbly of high density lipoprotein by the apolipoprotein/ATP binding cassette transporter A1pathway ordon Research. Conference on Lipoprotein Metabolism June 16 - 21, 2002 Madelene, NH

Yokoyama S.

Cellular responses to Apolipoprotein/ABCA1-mediated removal of cellular lipids. Australian

Atherosclerosis Society. October 1-3, 2002 sydney, Australia.

Yokoyama S.

Course on HDL, Atherosclerosis and The Metabolic Syndrome, sponsored by International Society of Atherosclerosis (October 1-3, 2002 sydney, Australia). Origins of HDL.

Tanaka T, Tanaka S, Yamamori H, Wada K, Takeda M. Phosphorylation of Tau Protein in Cultured Cells by Polyinosinic-Polycytidic Acid. The 8th international conference on Alzheimer disease and related disorders. Neurobiol Aging (Abst.) 2002 July 20-25, 2002, Stockholm, Sweden

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
特願 2001-235700

（駒野）

アルツハイマー病関連遺伝子のスクリーニング法 特願 2002-223200

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 特願 2002-353707

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 特願 2003-003733

（横山）

アポリポタンパク質 E の分泌促進剤
特願 2001-263547

プロテアーゼ阻害剤による低 HDL 血症改善
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をもつ内因性 seed 分子と考えられる GM1 ガングリオシド結合型 Aβ (GM1-Aβ) の形成基盤を AD モデル動物を対象に検討するとともに、脳内における GM1-Aβ形成の直接的検出し得る解析系を構築した。これらの結果、AD 発症危険因子である apolipoprotein E4 発現マウス脳内シナプトゾームを構成する脂質二重膜内においては GM1 ガングリオシドならびに GM1-Aβ形成の促進因子と考えられるコレステロールが増加していることが示唆された。また、脳内における GM1-Aβの検出プローブとして既に作製済みの抗 GM1-Aβ抗体の反応特性を詳細に検討した結果、同抗体は Aβが GM1 ガングリオシドを含む liposome に結合することで獲得する構造を特異的に認識し、可能性の単体 Aβおよびアミロイド線維に重合した Aβとは反応しないことが確認された。以上より、AD 発症においては神経細胞膜内の脂質分布様式の変化が Aβの細胞膜への結合を誘導し、その結果生じた同ペプチドの構造変化が可溶性 Aβ重合の開始点に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

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 および in vivo 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 A β 線維の構造を観察した。

(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。同抗体の反応特異性を(1)で作製した liposome 上で形成させた GM1-A β 、可溶性の単体 A β 、ならびにアミロイド線維化した重合 A β に対して評価した。

(3) AD モデル動物脳神経細胞膜の脂質化学的解析

ヒト型 apoE 遺伝子導入マウスを対象にシナプトゾームを調整し、TNBS 法でシナプス脂質二重膜内のコレステロール分布を評価するとともに、GM1 ガングリオシドに特異的に反応するコレラ毒素の結合を定量的に評価した。

(倫理面への配慮)

本研究においては実験動物を用いたが、その使用にあたっては動物愛護上の細心の注意を払うとともに、当研究機関の動物実験倫理委員会の承諾を得た。

C. 研究結果

SM/CH/GM1 liposome 上で形成された GM1-A β ならびに可溶性単体 A β に対する反応を dot blot で解析した結果、我々が作製した抗 GM1-A β 抗体は GM1-A β のみに反応することが確認された。さらに liposome 上での GM1-A β に対する反応を binding assay により定量的に検討した結果、本抗体の liposome への結合は反応させた A β 量

に依存して増加することが確認された。以上より、本抗体は GM1-A β を検出する有用なプローブとなりうることを確認された。

次に、GM1-A β 形成の背景を脂質化学的に解析することを目的にヒト型 apoE 遺伝子導入マウス脳シナプス膜の脂質化学的解析を行った結果、昨年度までの apoE4 発現マウスにおけるシナプス脂質二重膜外葉中のコレステロール含量の増加所見に加え、本年度は同マウス脳シナプトゾームにおける GM1 ガングリオシドの増加を示唆するコレラ毒素結合性の増加が認められた。

D. 考察

本研究における特異抗体を用いた解析により GM1-A β は可溶性 A β とは異なった構造をもっていることが確認された。AD をはじめとして多くの中枢神経系の変性疾患は脳内に蓄積する蛋白の構造変化を基盤とすると考えられているが、これまで実体として特異構造を獲得した蛋白が捉えられたことはなく、本研究が最初の事例となった。また、本研究は蛋白が重合する際にこの構造特異的な蛋白が seed として働くことを強く示唆している。以上の知見は seed 分子の捕捉することが AD 発症抑止の有効な治療法になり得ることを示唆しており、今後、AD 病態モデル動物を対象とした検討を行いたい。

また本研究は A β 蓄積開始機構、即ち GM1-A β 形成機序の生物学的背景についても新たな視点を提供した。昨年度までの研究成果をも総合すると、脳の老化および apoE 遺伝子型特異的作用により影響を受けた神経細胞膜の脂質構成、とりわけコレステロール組成の変化が A β の細胞膜結合の強力な促進因子となると考えられた。

E. 結論

脳内における A β 蓄積は特異な構造をもつ seed A β の形成ならびにその生物学的背景と考えられる神経細胞膜脂質組成の変化を基盤とすることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Hayashi H, Igbavboa 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* 13:383-386, 2002

Yanagisawa K.

Cholesterol and pathological processes in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 70:361-366, 2002

Gong JS, Kobayashi M, Hayashi H, Zou K, Sawamura N, Fujita SC, Yanagisawa K and Michikawa M. Apolipoprotein E (apoE) isoform-dependent lipid release from astrocytes prepared from human-apoE3- and apoE4-knock-in mice. *J Biol Chem* 277(33): 29919-29926, 2002

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

Zou K, Gong JS, Yanagisawa K and Michikawa M.

A Novel function of monomeric amyloid β -protein serving as an antioxidant molecule against metal-induced oxidative damage. *J Neurosci* 22:4833-4841, 2002

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

for pivotal role of cholesterol in the amyloid cascade.

J Neurosci Res 70:438-446, 2002

Komano H, Shiraishi H, Kawamura Y, Sai X, Suzuki R, Serneels L, Kawaichi M, Kitamura T and Yanagisawa K.

A new functional screening system for identification of regulators for the generation of amyloid β -protein. *J Biol Chem*. 277:39627-39633, 2002

Sai X, Kawamura Y, Kokame 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* 277:12915-12920, 2002

Kakio A, Nishimoto S, Yanagisawa K, Kozutsumi Y and Matsuzaki K.

Interactions of amyloid β -protein with various gangliosides in raft like membranes: Importance of GM1 ganglioside-bound form as an endogenous seed for Alzheimer amyloid. *Biochemistry* 23:7385-7390, 2002

Watarai M, Makino S, Michikawa M, Yanagisawa K, Murakami S and Shirahata T.

Macrophage plasma membrane cholesterol contributes *Brucella abortus* infection of mice. *Infection and Immunity* 70:4818-4825, 2002

Sawamura N, Gong JS, Chang TY, Yanagisawa K, and Michikawa M.

Promotion of Tau Phosphorylation by MAP Kinase Erk1/2 Is Accompanied by Reduced Cholesterol Level in Detergent-Insoluble Membrane Domains in Niemann-Pick C1-Deficient Cells. *J Neurochem* 84:1086-1096, 2003

2. 学会発表

柳澤勝彦 Cholesterol-dependent aggregation of amyloid β -protein
第3回アルツハイマー病関連血管因子に関する国際会議 2002年4月8-9日 京都

柳澤勝彦 アルツハイマー病中核病変とコレステロール
基礎老化学会 2002年5月16-17日 筑波

柳澤勝彦 アルツハイマー病とマイクロドメイン

第1回マイクロドメイン研究会 2002年6月6日 大府

澤村直哉、きょう建生、Chang TY、柳澤勝彦、道川 誠

Niemann-Pick type C deficiency reduces the levels of cholesterol in detergent insoluble, low-density membrane domains leading to activation of MAP kinase pathway and increased phosphorylation of tau.

第45回日本神経化学会 2002年7月16-19日 札幌

ゾウクン、キョウ建生、柳澤勝彦、道川 誠

A novel function of monomeric amyloid β -protein serving as an antioxidant molecule against metal-induced oxidative damage.

第45回日本神経化学会 2002年7月16-19日 札幌

キョウ建生、小林まり子、林 秀樹、ゾウクン、澤村直哉、藤田 忍、柳澤勝彦、道川 誠

Isoform-dependent lipid release from astrocytes prepared from human apolipoprotein E3- and E4-knock-in mice. 第45回 2002年日本神経化学会 7月16-19日 札幌

白石博久、川村勇樹、鈴木亮、蔡 曉蕊、柳澤勝彦、駒野宏人

small GTPase Rab1A の過剰発現による $A\beta$ 産生の促進

第45回日本神経化学会 2002年7月17日 札幌

蔡 曉蕊、小亀浩市、白石博久、鈴木亮、宮田敏行、柳澤勝彦、駒野宏人

Herp による $A\beta$ 産生増加機構の解析

第45回日本神経化学会 2002年7月17日 札幌

柳澤勝彦 コレステロールと $A\beta$ カスケード

第25回日本痴呆学会 2002年10月3日 大阪

柳澤勝彦 アルツハイマー病におけるコレステロールの役割

第75回日本生化学会 2002年10月16日 京都

蔡 曉蕊、小亀浩市、白石博久、鈴木亮、宮田敏行、柳澤勝彦、駒野宏人

Herp による γ -セクレターゼ活性促進機構の解析

第75回日本生化学会 2002年10月16日 京都

白石博久、川村勇樹、鈴木亮、蔡 曉蕊、柳澤勝彦、駒野宏人 Rab1A による APP_g 切断の促進

第75回 日本生化学会 2002年10月16日 京都

Yanagisawa K. Cholesterol and $A\beta$ aggregation.

The Satellite Symposium of 8th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders. July 26, 2002, Frankfurt, Germany

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

A new function screening system identifies cDNAs that increase γ -cleavage.

The 8th International Conference on Alzheimer's disease and related disorders, July 22, 2002, Stockholm, Sweden.

Gong JS, Kobayashi M, Hayashi H, Zou K, Sawamura N, Fujita SC, Yanagisawa K and Michikawa M.

Isoform-dependent lipid release from astrocytes prepared from human apolipoprotein E3- and E4-knock-in mice. 32th Society for Neuroscience Annual Meeting. November 7, 2002, Orland, U.S.A.

Zou K, Gong JS, Yanagisawa K and Michikawa M.

A novel function of nonnumeric amyloid β -protein serving as an antioxidant molecule against metal-induced oxidative damage.

32th Society for Neuroscience Annual Meeting, November 6, 2002, Orland, U.S.A.

Sawamura N, Gong JS, Chang TY, Yanagisawa K and Michikawa M.

Niemann-pick C1 deficiency reduces the levels of cholesterol in detergent insoluble, low-density membrane domains leading to activation of map kinase pathway and increased phosphorylation of tau.

32th Society for Neuroscience Annual Meeting, 2, November 6, 2002, Orland, U.S.A.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

柳澤勝彦 抗 GM1- $A\beta$ 抗体 (4396C) DNA 配列特願 2001-235700

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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。昨年度、 γ -セクレターゼ活性を促進するcDNAを同定するための独自のスクリーニング法(Komano et al., J. Biol. Chem. 277: 39627, 2002)を確立し、この方法によりERストレス誘導性の γ -セクレターゼ活性調節因子としてHerpという蛋白を同定した。今回、このスクリーニングにより新たな因子として、細胞内蛋白輸送経路に関与するRab1Aおよび細胞内のオートファジー経路に関連するGATE-16を同定し、これら因子によって調節される細胞内経路がA β 産生に関わっている可能性を見出した。また、線虫を用いた遺伝学的解析から同定されたプレセニリン複合体構成因子APH-1、PEN-2およびNicastrinについて、それぞれ γ -セクレターゼ活性への役割を解析した。その結果、これら構成因子のなかでPEN-2と呼ばれる因子が γ -セクレターゼ活性を調節する重要な因子であることを明らかにした。

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となっ

た。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かった。本実験は、 γ -セクレターゼ活性に必要な因子、および、その活性を調節する因子を明らかにすることを目的とした。

我々は、 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系を構築し、これを用いて γ -セクレターゼ活性を促進

する cDNA を同定するための独自のスクリーニング法を開発している (Komano et al., J. Biol. Chem. 277: 39627, 2002)。昨年度は、この方法により得られた cDNA のひとつが、ER ストレス誘導性の Herp という蛋白であることを同定している。平成 14 年度は、この方法により新たな同定された因子についての解析を行った。また、昨年度、他のグループにより、線虫を用いた遺伝学的解析から、プレセニリン複合体の構成因子が明らかにされた(Francis et al., Dev. Cell 3:85, 2002)。我々は、こららプレセニリン複合体構成因子についても着目し、これら因子の γ -セクレターゼ活性における役割を解析した。

B. 研究方法

γ -セクレターゼ活性を上げる cDNA の同定のためのスクリーニング法は、昨年度報告した。すなわち、独自に開発した細胞株を用いて、その細胞に 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 をセレクトし、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。

プレセニリン複合体の構成因子として、これまで、生化学的解析から Nicastrin という膜蛋白 (Yu G., et al, Nature 407:48, 2000) が、また、線虫を用いた遺伝学的解析から、新たな因子として、APH-1, PEN-2 と命名された膜蛋白が明らかにされた(Francis et al., Dev. Cell 3:85, 2002)。今回、これら因子の cDNA をレトロウイルスを用いた方法により細胞内で発現させ、 $A\beta$ 産生における影響を解析した。 $A\beta$ の検出は、ELISA 法を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究で行われる遺伝子工学的手法はすべて P1 あるいは P2 レベルの操作であり、実験操作は P1 および P2 施設で行った。

C. 研究結果

我々のスクリーニングにより得られた cDNA は、小胞体からゴルジ体に蛋白輸送する Rab1A、および、オートファジーに関与する GATE-16 をコードするものであった。そこで、Rab1A および GATE-16 の cDNA を、それぞれ、マウス繊維芽細胞に導入し、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、これら cDNA を遺伝子導入することにより、細胞の産生する $A\beta$ 量がほぼ二倍に増加することが明らかとなった。また、Rab1A および GATE -16 は、プレセニリン複合体の構成因子ではないことが明らかとなった。したがって、こららの因子は、プレセニリン複合体、あるいは、基質である APP の細胞内輸送を間接的に調節し、 $A\beta$ 産生を促進している可能性が考えられた。

一方、プレセニリン複合体の構成因子として線虫を用いた遺伝学的解析等で、他の研究グループによって、APH-1, Nicastrin, PEN-2 と命名された膜蛋白が同定された。我々は、これら因子の $A\beta$ 産生に及ぼす影響を詳細に解析した。その結果、PEN-2 が、 γ -セクレターゼ活性に極めて重要な役割を果たしていることが明らかとなった (Sai et al., Submitted)。すなわち、APH-1, Nicastrin, PEN-2 の共発現は、プレセニリンが細胞内でうける分子内切断 (エンドプロテオリシス) に必要であるが、 γ -セクレターゼ活性の促進には、PEN-2 だけが必要であることを見出した。

D. 考察

Rab1A および GATE-16 が $A\beta$ 産生のための細胞

内蛋白輸送経路に関与している可能性が考えられた。特に、GATE-16 は、細胞のオートファジーに関与する因子であると考えられている。オートファジーは、細胞が栄養不足になると、自らの細胞質分子やオルガネラをライソゾーム中に取り込み分解していく過程である。我々の結果は、細胞内のオートファジー経路の亢進が A β 産生上昇に引き起こす可能性を示唆している。また、プレセニリン複合体のなかで PEN-2 と呼ばれる因子が γ -セクレターゼ活性を調節する因子であることが明らかとなった。

今後は、前年度報告した Herp を含め、今年度、明らかにした Rab1A、GATE-16、および PEN-2 が、どのような機構で γ -セクレターゼ活性を亢進させるのか、その詳細な分子機構を明らかにするとともに、これら因子が AD 脳内で認められる A β 蓄積にどのように関与しているかを明らかにする必要がある。

E. 結論

本実験により、Rab1A および GATE-16 が A β 産生に必要なプレセニリン複合体、あるいは、基質である APP の細胞内輸送経路に関与している可能性が考えられた。また、プレセニリン複合体の構成因子のうち PEN-2 が、 γ -セクレターゼ活性に極めて重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Sai X, Kawamura Y, Kokam K, Yamaguchi H, Shiraishi H, Suzuki R, Suzuki T, Kawaichi M., Toshiyuki 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 277:12915-12920,2002

Komano H, Shiraishi H, Kawamura Y, Sai X, Suzuki R, Serneels L, Kawaichi M., Kitamura T and Yanagisawa K.

A new functional screening system for identification of regulators for the generation of amyloid β -protein

J Biol Chem 277: 39627-39633,2002

2. 学会発表

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、信州大学)

白石博久、川村勇樹、鈴木亮、蔡 曉蕊、柳澤勝彦、駒野宏人

small GTPase Rab1A の過剰発現による A β 産生の促進

第 45 回日本神経化学会 (2002 年、7 月 17 日 札幌)

蔡 曉蕊、小亀浩市、白石博久、鈴木亮、宮田敏行、柳澤勝彦、駒野宏人

Herp による A β 産生増加機構の解析

第 45 回日本神経化学会 2002 年、7 月 17 日 札幌

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

A new functional screening system identifies cDNAs that increase γ -cleavage.

The 8th International Conference on Alzheimer's disease and related disorders, July 22, 2002, Stockholm, Sweden.

蔡 曉蕊、小亀浩市、白石博久、鈴木亮、宮田敏行、柳澤勝彦、駒野宏人

Herp による γ -セクレターゼ活性促進機構の解析

第 75 回日本生化学会 2002 年 10 月 14 日 京都

白石博久、川村勇樹、鈴木亮、蔡 曉蕊、柳澤勝彦、駒野宏人

Rab1A による APP γ 切断の促進

第 75 回日本生化学会 2002 年 10 月 16 日 京都

Komano H, Sai X, Kawamura Y, Shiraishi H, Suzuki R, Kitamura T and Yanagisawa K.

A new function screening system identified ER-stress-inducible protein, Herp, as enhancer of amyloid β -protein

第25回日本分子生物学会年会 シンポジウム

2002年12月14日 横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

アルツハイマー病関連遺伝子のスクリーニング法 特願 2002-223200

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 特願 2002-353707

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 特願 2003-003733

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（こころの科学研究事業）

分担研究報告書

アルツハイマー病におけるアポリポプロテイン 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

一昨年度までに、amyloid β -蛋白(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 様粒子を形成し、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。同時に我々は、胞内コレステロール量の減少が、シナプス可塑性の低下と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あることを明らかにした。アポリポプロテイン E (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。しかし、本年度の研究で、apoE による脂質搬出(HDL 新生)作用の強さが apoE アイソフォームの違いによって異なることが明らかになった。すなわち apoE 分泌量は同じでありながら、apoE3 タイプのアストロサイトは、apoE4 タイプに比べ約 2 倍の粒子数の HDL 新生能を持つ。HDL 新生能は、すなわち HDL コレステロール供給能と考えられるため、加齢に伴って脳内で増加する A β 重合体による細胞内コレステロール代謝の破綻を正常に維持する能力は、apoE3 が apoE4 に比し優れていると考えられる。このため apoE4 タイプではアルツハイマー病発症が早まる可能性がある。

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。我々は apoE4 が如何にアルツハイマー病発症機構に関わるかを

明らかにすることを目的に、apoE のコレステロール代謝調節作用、apoE によって代謝調節されるコレステロールそのものの神経細胞における役割、さらに Amyloid β -蛋白(A β)とコレステロールとの関連について検討を重ねてきた。その結果、(1)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、(2)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こと、(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。このような重合した