

200401258A

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

アルミニウムなど金属とアルツハイマー病発症機構との

因果関係に関する研究

総括研究報告書

主任研究者 武田 雅俊

平成17年(2005年)3月

目 次

I. 総括研究報告書

- アルミニウムなど金属とアルツハイマー病発症機構との因果関係に関する研究……………1
武田雅俊

II. 分担研究報告書

1. 神経可塑性に対するアルミニウムの影響に関する研究……………14
武田雅俊
2. アルミニウムなどの金属による神経毒性およびプロトフィブリル形成に及ぼす効果の研究……………17
大河内正康
3. アストロサイトによるアルミニウムのアミノ酸錯体の取り込みと毒性の研究……………23
飯塚舜介
4. コリナージックニューロンのアセチルコリン分泌におけるアルミニウムの影響……………27
橋本亮太
5. 金属イオンのアミロイド凝集とその毒性発現における役割……………33
高島明彦
6. アルミニウムが誘導するプレセニリン2スプライシング変種と孤発性アルツハイマー病発症に関する研究……………36
遠山正彌

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表……………39

- IV. 研究成果の刊行物・別刷り……………41

研究課題名：アルミニウムなど金属とアルツハイマー病発症機構との因果関係に関する研究

主任研究者 武田雅俊 大阪大学大学院・ポストゲノム疾患解析学講座・精神医学

研究要旨

アルツハイマー病発症には遺伝的因子と環境因子の両方が関与するが、その環境因の一つとしてアルミニウムが挙げられることについては世界中から多くの研究結果が蓄積されている。しかしながら、アルミニウムのアルツハイマー病発症への効果の程度について評価するような系統立てた試みは報告がなく、我々が健康な生活を続けていく上で科学的に精査検討すべき問題であった。

いくつかのアルツハイマー病発症メカニズム仮説が提起されているが、本研究計画ではアルミニウムのそれらのアルツハイマー病発症メカニズムへの影響について分子レベルで系統立てた詳細な検討を行った。前半3年間の研究に引き続き我々は(1)アルミニウムの摂取・吸収・代謝への影響、(2)アルミニウムの神経機能・発達へも影響、(3)アルミニウムの神経細胞死への影響、(4)アルミニウムのアミロイドβ蛋白の産生・凝集・蓄積・代謝への影響、(5)アルミニウムのタウ蛋白のリン酸化・蓄積への影響、(6)アルミニウムのPS2Vを介したアルツハイマー病発症機構への影響について分子レベルで検討を深めた。

多くの実験事実はアルミニウムが神経毒性・神経機能障害・神経発達障害の原因となることを示唆した。一方、アルツハイマー病の病理過程仮説に基づいた検討では以下のような結果が得られた。

(1)世界的に最も流布している「Aβ仮説」に基づいた病理過程への効果を検討したところ、Aβやタウなどの関連蛋白質の産生や凝集にアルミニウムなどの金属は確かに影響を及ぼしているが、その影響の仕方は「アルツハイマー病を引き起こすそれとは微妙に異なる」点で共通していた。

(2)ERストレス仮説に基づいた病理過程に対して同様に検討したところアルミニウムはPS2V産生を増大させた。この結果はアルミニウムがアルツハイマー病発症に促進的に働く可能性を示唆し注目に値する。

(3)アルツハイマー病の器質的異常として注目されているシナプス障害について検討したところアルミニウムは強いシナプス障害の原因となった。

キーワード：アルツハイマー病、アルミニウム、金属、神経細胞死、シナプス毒性、アミロイド、老人斑、神経原線維変化

A. 研究目的

アルミニウムとシナプス毒性との間の関連について、近年痴呆の前駆状態としてのMild Cognitive Impairment(MCI)という概念が構築され、神経変性が明らかでない時点における症状発現に注目が集まっている。本年度はアルミニウムが神経変性に至る前段階の神経細胞の生理的機能特に可塑

性に対し如何なる影響をもたらすのかを電気生理学のおよび生化学的に明らかにし、MCI段階でアルミニウムの関与について検討した。

アルミニウムとアミロイドβ蛋白産生について、アルツハイマー病老人斑の形成にアルミニウムなどの金属が影響を及ぼすことが知られている。アルミニウムなどの

金属が、A β を最終的に切り出す酵素であるプレセニリン γ secretase やさらに上流の酵素である BACE に対して影響を及ぼすかどうかを検討した。

アルミニウムとタウ蓄積に関して動物モデルを用いて検討した。今回我々は神経原線維変化を呈するマウスモデルおよび試験管内タウ凝集系を用いてアルミニウム服用と神経原線維変化形成について検討した。

アルミニウムと ER ストレス反応に関して今年度は、PS2V 発現細胞及び A1 長期負荷細胞を用いて caspase4 の発現の促進が起きているのかどうかを検討した。また、A1 が発現誘導する PS2V が実際の脳サンプルで神経細胞死と関連性を示すのか、免疫染色法を用いて検討した。

アルミニウムの神経毒性に関して、アルツハイマー病では前脳基底核を中心とするコリン作動性ニューロンの障害・脱落が重要であると考えられている。そこで、神経細胞へのアルミニウムなど金属の影響を神経細胞の新生という側面にて検討した。さらに、低濃度のアルミニウムアミノ酸錯体がアストロサイトの初代培養に細胞核の分散、クロマチンの凝縮といった特徴をもつアポトーシスを引き起こすことを示した。今回アポトーシスに関係する蛋白質の遺伝子発現に対するアルミニウムの影響を明らかにすることを目的とした実験を初代アストロサイトを用いて行った。

B. 研究方法

シナプス可塑性に関する電気生理学的実験

アルミニウム曝露はマウス海馬スライスを用いて 100 μ M アルミニウム含人工脳脊髄液 (ACSF) にて灌流することにより、高頻度刺激 (HFS: 3 train、100Hz で 1 秒、train

間隔 5 秒) 直前の 10 分間行った。HFS にて LTP を誘導した。誘導後は再び 0.2Hz にて継続して刺激を行い、field EPSP (fEPSP) の変化を記録した。また、LTD の機序としてグルタミン酸刺激に伴うグルタミン酸受容体 2 の細胞内移行が示されている。細胞表面にあるグルタミン酸受容体に細胞外部位を認識する抗体を結合させた。培養液に AMPA (100 μ M) を加え、15 分間反応させた後固定し、FITC 標識の 2 次抗体を反応させ、0.1% の Triton X-100 で細胞膜を処理した。細胞内にあるグルタミン酸受容体 2 を受容体 2 に対する抗体および Cy3 標識の 2 次抗体で検出した。この受容体の細胞内移行をアルミニウム存在下で比較検討した。

BACE アッセイ

次にアルミニウム負荷による BACE 活性の変化を消光性蛍光基質を用いた系で検討したが、BACE を過剰発現しなければ測定不可能であった。内在性の BACE の活性がアルミニウム負荷により変化を受けるかどうか検討するために、 β APP 全長を基質とした in vitro BACE assay 系を新たに確立した。

試験管内・生体内タウ凝集実験

試験管内タウ凝集実験; ヒト 4 リピート、リコンビナントタウは高速液体クロマトグラフにより単離精製されたものを実験に用いた。タウ蛋白はヘパリンまたは AICl と 37 $^{\circ}$ C でインキュベーションしチオフラビン蛍光で β 凝集を測定し、さらに原子感力顕微鏡にて凝集体の形態を観察した。動物モデル; V337M 変異を持つヒト 4 リピートタウを PDGF プロモーターによって脳で特異的に発現するマウス及び野生型 B 6 マウ

スを用いて実験を行った。Al マルトースは皮下注入によってマウスに投与された。アルミニウム定量；脳サンプルは加熱分解し、偏光ゼーマン原子吸光にて定量した。

アルミニウムと PS2V 産生との関連

今年度は、PS2V 発現細胞及び AI 長期負荷細胞を用いて caspase4 の発現の促進が起きているのかどうかを検討した。また、AI が発現誘導する PS2V が実際の脳サンプルで神経細胞死と関連性を示すのか、免疫染色法を用いて検討した。

アルミニウムによる神経新生への効果

アルミニウム長期投与による海馬の神経新生への影響を調べるために、成体マウスに 25mM アルミニウム/マルトール溶液 200ul を一日一回、2 週間連続で腹腔投与を行った。神経新生を評価するために、2 週間アルミニウム/マルトール溶液投与したマウスに対し、細胞周期の S 期にチミジン類似物質として DNA に取り込まれる 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) (75mg/kg) を腹腔投与した。BrdU 投与 24 時間後に灌流固定を行い、BrdU 抗体を用いた免疫染色法により新生した細胞を標識、可視化し、顕微鏡下で陽性細胞をカウントした。

アルミニウムによる神経毒性

今回アポトーシスに関係する蛋白質の遺伝子発現に対するアルミニウムの影響を明らかにすることを目的とした実験を初代アストロサイトを用いて行った。アルミニウム錯体はアルミニウムグリシンを用いた。(倫理面への配慮) 本研究ではアルミニウム投与を必要とする動物実験が予定されているが、これは十分な訓練と教育を受けた

ものが担当し動物愛護上の配慮もなされている。

C. 研究結果

最初にアルミニウムがシナプス障害をもたらすかどうかの検討では、海馬スライスでアルミニウムによる灌流を行った。アルミニウムフリー環境下と同様に fEPSP に差はみられなかったが、STP・LTP には著明な低下が観察され、灌流後 50 分でアルミニウムフリーと比較して fEPSP の振幅は約 50% まで低下がみられた。100 μ M アルミニウムマルトールを培養液中に添加し、24 時間後に AMPA で刺激した。アルミニウム非添加細胞ではグルタミン酸受容体 2 の細胞内移行が観察されたが、アルミニウム存在下では細胞内移行が減少していることが示された。

アミロイド産生へのアルミニウムの効果について検討した。まず BACE の mRNA 量及び総タンパク量は、アルミニウム負荷によって変化しなかった。この系を用いて実験したところ、アルミニウム負荷による BACE 活性の変化は認められなかった。以上の結果よりアルミニウムなどの金属は、アミロイドカスケードの最上流に位置する BACE の mRNA 量や総タンパク量に変化は来さないこと、また BACE の活性やプレセニリン γ secretase 活性には直接影響を及ぼさないことが明らかになった。アルミニウムなどの金属は生成された A β の凝集過程に変化を来すことで、老人斑形成に影響を及ぼしていると考えられた。

タウ重合におけるアルミニウムの影響について検討した。タウ蛋白をポリアニオンなどとともにインキュベーションするとタウは β シート構造を持つ凝集線維を形成するこれはアルツハイマー病等で見られる

PHF と同様のものである。この条件下で 0.2 mM から 20 mM までの濃度範囲で Al をインキュベーション溶液に加えチオフラビンの蛍光測定を行った。0.2 mM アルミニウム添加ではチオフラビン蛍光の立ち上がりまた最大値は 400 時間後に計測されコントロール（何も入れなかった場合）の半分であった。1mM 以上のアルミニウムの添加はチオフラビン蛍光増大を完全に阻害した。原子間顕微鏡観察では明らかなタウ線維の減少が観察された。次にアルミニウムそのものがポリアニオンのようにタウの繊維化を促進するかどうかをヘパリンなしでタウを 0.2 mM から 20 mM までの濃度範囲の Al インキュベートしチオフラビン蛍光を測定したが全く増大を示さなかったが原子間力顕微鏡ではタウの構造物を観察することが出来た。これらの構造物は一定の形態を示さずむしろアモルファス凝集体を形成すると考えられた。すなわち、アルミニウムはタウの β 結合による繊維化を阻害しアモルファス凝集を増大させることが示された。次に細胞モデルにおけるアルミニウムの効果を調べた。タウを発現する細胞では 50 μ M アルミニウムで不溶性タウの出現が観察された。CHIP を同時に発現する細胞ではアルミニウム濃度の増大とともに SDS 不溶性タウの量が減少した。これは、アルミニウムによってアモルファスタウ凝集体が SDS 不溶性タウとして生じるが、CHIP、プロテアソーム分解系で容易に分解されるためアルミ濃度の増大とともに生じるアモルファス凝集が分解されるため SDS 不溶性タウが減少すると解釈される。さらに個体でのアルミニウムの効果について検討した。まず、脳内アルミニウム濃度増大を調べるため 3 日間 10, 25, 50 mM アルミニウムマルトール腹腔

内に 200 μ l 連続投与した。マウスでは通常 5 μ M のアルミニウムが存在していることが判った。それぞれの濃度のアルミニウム 3 日連続投与後直線的に増大し、それぞれ 9.6, 11, 16 μ M となった。50mM 投与群は肝臓に障害が見られた。脳では神経原線維変化の増大は見られなかった。25mM を選択し 2 週間のアルミニウム連続投与を行った。ここでは最終的に約 20 μ M のアルミニウム脳内濃度となった。しかし、肝臓にやはり異常が見られ脳では何ら異常所見は得られなかった。

アルミニウムによる PS2V 発現機序の検討を行った。Al 刺激でも PS2V 発現に先立ち N-myc、HMGA1a が誘導され、Al 刺激における PS2V 機序は低酸素負荷による PS2V 発現機序と同様である事が明らかとなった。また低濃度 Al 長期負荷群では、低酸素時に起こる PS2V 発現が促進しており、さらに小胞体ストレスによる細胞死は促進していた。

神経細胞新生に対するアルミニウムの効果の検討では BrdU 陽性細胞の数は、コントロール群に対して、アルミニウム/マルトール群で減少傾向を示していたが、有意な差は見られなかった。2 週間の投与終了時点において、アルミニウム/マルトール溶液投与群では、投与開始前と比べて有意に体重が減少しており、BrdU 陽性細胞数と体重の変化に正の相関がみられた。これらの結果から、新生細胞の減少傾向は慢性的なアルミニウム投与による体重の減少と同様に二次的な影響によるものであると考えられた。これらの結果により、アルミニウム投与は神経新生に直接的な影響を及ぼさない可能性が示唆された。

アストロサイトの細胞死とアルミニウムの関連について検討した。アストロサイ

トは神経細胞に比べて、はるかに ER ストレスに対して強いことが知られている。その機構は、新たに発見された ER ストレスに対するセンサーである OASIS 蛋白質の過剰発現が、CRE、および ERSE の活性化を經由して、シャペロンの BiP/GRP78 を誘導しているためであることが示された。ところが、アルミニウム刺激ではアストロサイトは OASIS 蛋白質を誘導しないことが示された。このように、アルミニウム刺激に対して、アストロサイトはアポトーシスに対する抵抗性を発揮できないため、細胞死に至ることが分った。

D. 考察

神経細胞はグルタミン酸刺激により細胞表面のグルタミン酸受容体の量を調節することにより、神経可塑性即ち LTP や LTD を発現するとされる。AMPA の刺激によりグルタミン酸受容体 2 は細胞内に取り込まれ、LTD が形成されるが、それにはユビキチン・プロテアソーム系の活性化が必要とされている。アルミニウムの添加が AMPA によるグルタミン酸受容体 2 の細胞内移行を阻害することが、今回の検討で明らかになったが、同時に行った、プロテアソーム活性の測定によれば、アルミニウムはプロテアソーム活性そのものを減弱することが明らかになり、それが受容体代謝に影響を及ぼすことが示唆された。また、アルミニウムは ER ストレスによる eIF2 α のリン酸化を阻害し、ER ストレス反応を減弱することが示された。

ER ストレスによって生じた unfolded 蛋白はプロテアソームによる小胞体ストレス関連分解(ERAD)機構により分解代謝を受けるが、ER ストレス反応の減弱はこの分解機構に負荷をかけ、プロテアソーム活性を減弱する可能性がある。従って、アルミニ

ウムは ER ストレス反応を減弱せしめ、その結果プロテアソーム活性を低下させ、グルタミン酸受容体の代謝に影響を及ぼす可能性も考えられる。

近年、アミロイドカスケードの上流に位置する BACE 活性や mRNA 量が酸化ストレスや TNF- α などのサイトカインにより増加することが報告されている。また孤発性 AD において BACE 活性が上昇していることも明らかになりつつある。BACE 活性が上昇すると CTF- β 産生が増大し、引き続いて起こるプレセニリン/ γ -secretase による膜内タンパク分解によって産生される A β の量が増加すると考えられている。またアルミニウム負荷により TNF- α などのサイトカインが上昇することが報告されている。従ってアルミニウムにより何らかの炎症性変化が生じ、サイトカインが上昇し、BACE 活性が増加することが予想される。つまりアミロイドカスケードの上流にもアルミニウムが関与している可能性がある。そこで我々はアルミニウム負荷による BACE の mRNA 量、総タンパク量を調べたが、両者とも変化を認めなかった。しかし、アルミニウム負荷によりパルス実験で immature BACE の 2 量体の分子量に相当するバンドの増加を認めた。これが BACE 活性を上昇させているかどうかを調べるため、内在性の BACE 活性を測定できる系を確立し検討したが、有意な変化は認められなかった。よってアルミニウム負荷は BACE の代謝に影響を及ぼしている可能性はあるものの、mRNA 量や総タンパク量、および今回用いた系では活性に変化は及ぼしていないことが示唆された。

アルミニウムの効果を個体、細胞、分子のレベルでタウ重合に関して検討をおこなった。脳内アルミニウムはアルミニウム摂

取により蓄積を示すが、脳内の濃度がタウ凝集を細胞で示す濃度 $50 \mu\text{M}$ になる前に内臓の障害が顕著に表れる。これは脳よりも他の臓器にアルミニウムの蓄積が起りやすいことを示している。細胞及び試験管内タウ凝集の実験からはアルミニウムによるタウ凝集は NFT で見られるタウ線維とは異なりアモルファスであり細胞内分解系によって速やかに分解されることが示唆された。

AI は低酸素負荷と同様の機序で PS2V の発現野発現を誘導すること、PS2V 質小胞体センサー機能を障害し小胞体ストレスに対し神経細胞を脆弱化する事、それにより神経細胞に小胞体ストレスが吹かされると神経細胞死が惹起される事を明らかとした。さらに AI は AD の病理の特徴である老人斑形成と NFT 形成にも重要な関与を果たしている事が明らかとされた。老人斑形成については、AI・PS2V とともに凝集体形成には促進的であった。PS2V は $A\beta$ の分泌を促進する事が確認されていることから、AI は β -sheet 形成には抑制的ではあるものの、老人斑形成に関与している可能性は否定できない。また PS2V がタウの凝集体形成に促進的に働く事実は AI 及び PS2V が NFT 形成にも重要な関与を果たしている可能性が高い。

アルツハイマー病脳にて、神経新生が増加するとの報告があり、アルツハイマー病モデルマウスでは逆に神経新生が減少していることが報告されている。これらの結果は、一見、相反するものであるが、アルツハイマー病における神経新生の増加は、神経細胞死に対する代償的な作用によるものと考えられる。また、モデルマウスでは、変異型 APP やプレセニン 1 の作用による病態プロセスが顕著にあらわれており、代

償的に増加する神経新生をうわまわる神経新生の抑制効果がある可能性が考えられる。

アストロサイトは神経細胞に比べて、はるかに ER ストレスに対して強いことが知られている。最近、このアストロサイトが ER ストレスに強い特徴が解明された。その機構は、新たに発見された ER ストレスに対するセンサーである OASIS 蛋白質の過剰発現が、CRE、および ERSE の活性化を経由して、シャペロンの BiP/GRP78 を誘導しているためであることが示された。ところが、アルミニウム刺激ではアストロサイトは OASIS 蛋白質を誘導しないことが今回分ったわけである。従って、ER ストレスによって引き起こされるアポトーシスに対する抵抗性を発揮できないため、細胞死に至ると説明される。このようにアストロサイトの特異な性質を分子機構の解析から明らかにすることができた。

E. 結論

アルツハイマー病発症メカニズム仮説に基づき、アルミニウムのそれらへの影響について分子レベルで系統立てた詳細な検討を3年計画の最終年度として行った行った。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Okochi, M., Fukumori, A., Satoh, Y., Aidaraliev, N., Tanii, H., Kamino, K., Tanaka, T., Kudo, T., Takeda M. Alzheimer's β -secretase mechanism produces Amyloid- β -protein like peptides simultaneously with release of intracellular signaling fragments

Molecular Neurobiology of Alzheimer Disease and Related Disorders, Karger Press, 2004, pp31-41.

Okochi, M., Takeda, M.

Possible assessment of Alzheimer's β -secretase activity by level of A β -like peptides
Psychogeriatrics (2004), 4: 23-27

Tohyama, M., Possible involvement of the expression and phosphorylation of N-Myc in the Novel induction of HMGAla by hypoxia in the human neuroblastoma cell line. *Neurosci. Lett. in press*

Tohyama, M

Novel function of PS2V: change in conformation of tau proteins. *Biochem Biophys Res Commun. 2004 May 28;318(2):435-8.*

Tohyama, M

Role of ARF4L in recycling between endosomes and the plasma membrane. *Cell Mol Neurobiol. 2004 Feb;24(1):137-47.*
Metals accelerate production of the aberrant splicing isoform of the presenilin-2. *J Neurochem. 2004 Mar;88(6):1345-51*

Tohyama, M

Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death.
J Cell Biol. 2004 May 10;165(3):347-56

Tohyama, M

Apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress depends on activation of caspase-3 via caspase-12.
Neurosci Lett. 2004 Mar 4;357(2):127-30.

Takashima A: The role of GSK-3 β in the formation of neurofibrillary tangles.
Psychogeriatrics 4: 17-22(2004)

Shigetsugu H, Matsumoto M, Kamura T, Murayama M, Chui D-H, Planel E, Takahashi R, Nakayama K-I, and Takashima A: U-box protein carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein (CHIP) mediates poly-ubiquitylation preferentially on four-repeat Tau and is involved in neurodegeneration of tauopathy. *J. Neurochem* 91: 299-307 (2004)

Planel E, Miyasaka T, Launey T, Chui D-H, Tanemura K, Sato S, Murayama O, Ishiguro K, Tatebayashi Y, Takashima A: Alterations in glucose metabolism induce hypothermia leading to tau hyperphosphorylation: mechanism and implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci* 24: 2401-2411(2004)

Hashimoto Y, Tsukamoto E, Niikura T, Yamagishi Y, Ishizaka M, Aiso S, Takashima A, Nishimoto I: Amino- and carboxyl-terminal mutants of presenilin 1 cause neuronal cell death through distinct toxic mechanisms: Study of 27 different presenilin 1 mutants. *J Neurosci Res* 75 (3): 417-428 (2004)

Aremu DA., Sakurai A, Meshitsuka S.

Uptake of aluminum amino acid complexes in cultured astrocytes. *Biomedical Research on Trace Elements*. (2004) 15(1), 66-68.

Matsuzaki S, Manabe T, Katayama T, Nishikawa A, Yanagita T, Okuda H, Yasuda Y, Miyata S, Meshitsuka S. and Tohyama M. Metals accelerate production of the aberrant splicing isoform of the Presenilin-2. *Journal of Neurochemistry*. (2004) 88, 1345-1351.

Aremu DA, Meshitsuka S. Accumulation of aluminum by primary cultured astrocytes from aluminum amino acid complex and its apoptotic effect. *Brain Research* (2005) 1031, 284-296.

Hashimoto R, Okada T, Kato T, Kosuga A, Tatsumi M, Kamijima K, Kunugi H. The breakpoint cluster region (BCR) gene on chromosome 22q11 is associated with bipolar disorder. *Biological Psychiatry* (in press)

Miki R, Hattori K, Taguchi Y, Tada M, Isosaka T, Hidaka Y, Hirabayashi T, Hashimoto R, Fukuzako H, Yagi T. Identification and characterization of coding single-nucleotide polymorphisms within human protocadherin-alpha and beta gene clusters. *Gene* (in press)

Hashimoto R, Yoshida M, Ozaki N, Yamanouchi Y, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Tatsumi M, Kamijima K, Kunugi H. A missense polymorphism (H204R) of a Rho

GTPase-activating protein, the chimerin 2 gene, is associated with schizophrenia in men. *Schizophr Res*, 73(2-3): 383-385, 2005.

Hashimoto R, Suzuki T, Iwata N, Yamanouchi Y, Kitajima T, Kosuga A, Tatsumi M, Ozaki N, Kamijima K, Kunugi H. Association study of the frizzled-3 (FZD3) gene with schizophrenia and mood disorders. *J Neural Transm*, 112(2):303-307, 2005.

Numakawa T, Yagasaki Y, Ishimoto T, Okada T, Suzuki T, Iwata N, Ozaki N, Taguchi T, Tatsumi M, Kamijima K, Straub RE, Weinberger DR, Kunugi H, Hashimoto R. Evidence of novel neuronal functions of dysbindin, a susceptibility gene for schizophrenia. *Hum Mol Genet*, 13(21):2699-2708, 2004.

Hashimoto R, Straub RE, Weickert CS, Hyde TM, Kleinman JE, Weinberger DR. Expression Analysis of Neuregulin-1 in the Dorsolateral Prefrontal Cortex in Schizophrenia, *Mol Psychiatry*, 9(3):299-307, 2004.

Hashimoto R, Yoshida M, Ozaki N, Yamanouchi Y, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Tatsumi M, Kamijima K, Kunugi H. Association analysis of the -308G>A promoter polymorphism of the tumor necrosis factor alpha (TNF- α) gene in Japanese patients with schizophrenia, *J Neural Transm*, 111(2):217-21, 2004.

Kunugi H, Hashimoto R, Yoshida M, Tatsumi M, Kamijima K. A missense polymorphism (S205L) of the low-affinity neurotrophin receptor p75^{NTR} gene is associated with depressive disorder and attempted suicide. *Am J Med Genet*, 129B:44-46, 2004.

Tadokoro K, Hashimoto R, Tatsumi M, Kamijima K, Kunugi H. Analysis on enhancer activity of a dinucleotide repeat polymorphism in the neurotrophin-3 gene and its association with bipolar disorder. *Neuropsychobiology*, 50(3):206-10, 2004.

Weickert CS, Straub RE, McClintock BW, Matsumoto M, Hashimoto R, Hyde, TM, Herman MM, Weinberger DR, Kleinman JE. Human dysbindin (DTNBP1) gene expression in normal brain and in schizophrenic prefrontal cortex and midbrain, *Arch Gen Psychiatry*, 61:544-555, 2004.

Kusumi I, Masui T, Kakiuchi C, Suzuki K, Akimoto T, Hashimoto R, Kunugi H, Kato T, Koyama T. Lack of association between XBPI genotype and calcium signaling in the platelets of healthy subjects. *Neurosci Lett*. 369(1):1-3, 2004.

Kunugi H, Iijima Y, Tatsumi M, Yoshida M, Hashimoto R, Kato T, Sakamoto K, Inada T, Suzuki T, Iwata N, Ozaki N, Yamada K, Yoshikawa T. No association between the Val66Met polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene and bipolar disorder in

Japanese: a multi-center study. *Biol Psychiatry*. 56(5):376-8, 2004.

Numakawa T, Ishimoto T, Suzuki S, Numakawa Y, Adachi N, Matsumoto T, Yokomaku D, Koshimizu H, Fujimori KE, Hashimoto R, Taguchi T, Kunugi H. Neuronal roles of integrin-associated protein (IAP/ CD47) in developing cortical neurons. *J Biol Chem*, 279(41):43245-53, 2004

2. 学会発表

アミロイドβ蛋白産生に対するアルミニウムの影響

田上 真次 大河内 正康

厚生労働科学研究費補助金・生活安全総合研究事業・アルミニウムなどの金属とアルツハイマー病発症機構との因果関係に関する研究

平成16年度研究発表会、大阪大学医学系研究科、2004.3.9

Fukumori, A., Tagami, S., Okochi, M., Kimura, R., Jiang, J., Tanii, H., Kudo, T., Takeda, M.

γ-secretase cleavage of βAPP on intracellular membrane.

第19回日本老年精神医学会大会、松本、2004.6.26

BACEによるAβの切断について

田上 真次 福森 亮雄 大河内 正康 武田 雅俊

第2回γセクレターゼ研究会、大阪大学、2004.6.26

Tagami, S., Okochi, M., Fukumori, A.,

Kimura, R., Jiang, J., Takeda, M.
The mechanism of intracellular amyloid
beta degradation

9th International Conference on
Alzheimer's Disease and Related
Disorders, Philadelphia, 2004.7.18

Fukumori, A., Okochi, M., Tagami, S.,
Tanii, H., Kimura, R., Jiang, J., Steiner,
H., Haass, C., Kudo, T., Takeda, M.

Biochemical separation of γ -cleavage of
 β APP on the plasma membrane from that on
the intracellular membrane

9th International Conference on
Alzheimer's Disease and Related
Disorders, Philadelphia, 2004.7.21

Fukumori, A., Okochi, M., Jiang, J.,
Kimura, R., Tanii, H., Kudo, T., Tagami,
S., Takeda, M.

Subcellular localization of γ -cleavage
of β APP.

第 47 回 日本神経化学学会大会、大阪、
2004.9.21

プレセニリン γ セクレターゼによるデュアル
膜内蛋白分解機構は基質間で共通だが基
質内では異なる

大河内正康、福森亮雄、田上真次、木村亮、
姜経緯、武田雅俊

第 23 回日本痴呆学会 2004/09/29、タワー
ホール船堀

福森亮雄、大河内正康、谷井久志、姜経緯、
工藤喬、田上真次、武田雅俊

γ -secretase による β APP の細胞内切断部
位についての検討

第 23 回日本痴呆学会 2004/09/29、タワー

ホール船堀

Fukumori, A., Okochi, M., Tagami, S.,
Tanii, H., Jiang, J., Steiner, H., Iwase,
M., Kudo, T., Haass, C., Takeda, M.

γ -secretase cleavage of β APP on
intracellular membrane.

34th Neuroscience Meeting USA, San Diego,
2004.10.23

CREST 終了報告会・蛋白の一生・プラザ研
究報告会など

2. 学会発表

Akihiko Takashima: Tau protein
hyperphosphorylation and Alzheimer's
Disease. 中国 Alzheimer 病学会
July1-3, 2004, Changsha, CHINA

Akihiko Takashima: The 9th International
Conference on Alzheimer's Disease and
Related Disorders. July17-22, 2004.
Pennsylvania Convention Center, USA.

Maeda S., Murayama M., Takashima, A.
Mechanism of neurofibrillary tangle
formation: tau accumulation and fibril
formation. The 5th Neurobiology of Aging
Conference 2004 October 21-22, 2004.
San Diego, USA.

NMR analysis of activating domain C of
the rat Hex with GST tag

Akihiro Sakurai¹, David A. Aremu¹, Tamio
Noguchi² Shunsuke Meshitsuka¹

日本生化学大会 (2004, 10 横浜).

Sakurai A, Aremu DA, Kurita J, Noguchi T,

Meshitsuka S, NMR studies of activating domain of transcription factor Hex with GST. XXI International conference on magnetic resonance in biological systems. Abstract p146 (Hyderabad India, 2005).

Hashimoto R, Numakawa T, Yagasaki Y, Ishimoto T, Okada T, Suzuki T, Iwata N, Ozaki N, Taguchi T, Tatsumi M, Kamijima K, Straub RE, Weinberger DR, Kunugi H. Evidence of novel neuronal functions of dysbindin, a susceptibility gene for schizophrenia. Society for neuroscience annual meeting, San Diego, USA, October 23-27(23), 2004.

Masui T, Kusumi I, Kakiuchi C, Suzuki K, Akimoto T, Tanaka T, Hashimoto R, Kunugi H, Kato T, Koyama T. Relationship between XBP1 gene polymorphism and intraplatelet calcium signaling or personality traits. Society for neuroscience annual meeting, San Diego, USA, October 23-27(23), 2004.

Hattori S, Hashimoto R, Miyakawa T, Maeno H, Wada K, Kunugi H. Enriched environment influences depression-related behaviors and hippocampal neurogenesis in mice. Society for neuroscience annual meeting, San Diego, USA, October 23-27(24), 2004.

Numakawa T, Yagasaki Y, Hashimoto R, Kunugi H. Glucocorticoid depress brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-induced glutamate release in cultured neurons. Society for neuroscience annual meeting, San Diego, USA, October 23-27(26), 2004.

Law AJ, Lipska B, Weickert CS, Hyde TM, Hashimoto R, Harrison PJ, Weinberger DR, Kleinman JE. Splice variant - specific alterations of Neuregulin-1 gene expression in the hippocampus in schizophrenia. Society for neuroscience annual meeting, San Diego, USA, October 23-27(23), 2004.

Hashimoto R, Numakawa T, Yagasaki Y, Ishimoto T, Okada T, Suzuki T, Iwata N, Ozaki N, Taguchi T, Tatsumi M, Kamijima K, Straub RE, Weinberger DR, Kunugi H. Evidence of novel neuronal functions of dysbindin, a susceptibility gene for schizophrenia. IPA / Asia Pacific Regional Meeting, Seoul, Korea, September 8-11(9), 2004.

Hashimoto R, Yoshida M, Ozaki N, Yamanouchi Y, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Tatsumi M, Kamijima K, Kunugi H. Association analysis of the -308G>A promoter polymorphism of the tumor necrosis factor alpha (TNF- α) gene in Japanese patients with schizophrenia, International Congress of Biological Psychiatry, Sydney, Australia, February 9-13(11), 2004.

統合失調症脆弱性遺伝子ディスバインジンの関連解析と神経細胞における機能解析
センリライフサイエンスセミナー、ブレイクサイエンスシリーズ第17回、大阪、10.19, 2004.

橋本亮太、田所 和幸、岡田武也、鈴木竜世、

岩田仲生、山之内芳雄、北島剛司、尾崎紀夫、加藤忠史、巽雅彦、上島国利、功刀浩
低分子量 G タンパク質 Rho 関連遺伝子と精神疾患

第 12 回日本精神・行動遺伝医学会、東京、10.16, 2004.

橋本亮太、沼川忠広、矢ヶ崎有希、石本哲也、鈴木竜世、岩田仲生、尾崎紀夫、田口隆久、巽雅彦、上島国利、Richard E. Straub, Daniel R. Weinberger、功刀浩

シンポジウム：こころの病の遺伝学
統合失調症脆弱性遺伝子ディスバインジンの関連解析と神経細胞における機能解析
第 49 回日本人類遺伝学会、東京、10.12-15(13), 2004.

橋本亮太、尾崎紀夫、岩田仲生、山之内芳雄、鈴木竜世、北島剛司、巽雅彦、上島国利、功刀浩

Chimerin2 遺伝子の H204R ミスセンス多型は男性において統合失調症と関連する
第 49 回日本人類遺伝学会、東京、10.12-15(13), 2004.

橋本亮太、沼川忠広、矢ヶ崎有希、石本哲也、鈴木竜世、岩田仲生、尾崎紀夫、田口隆久、巽雅彦、上島国利、Richard E. Straub, Daniel R. Weinberger、功刀浩

統合失調症脆弱性遺伝子ディスバインジンの関連解析と神経細胞における機能解析
第 27 回日本神経科学学会・第 47 回日本神経化学合同年会、大阪、9.21-23(21), 2004.

服部聡子、橋本亮太、宮川剛、前野浩巳、和田圭二、功刀浩

豊かな飼育環境と抗うつ効果：マウスにおける検討

第 27 回日本神経科学学会・第 47 回日本神経化学合同年会、大阪、9.21-23(22), 2004.

橋本亮太、沼川忠広、矢ヶ崎有希、石本哲也、鈴木竜世、岩田仲生、尾崎紀夫、田口隆久、巽雅彦、上島国利、Richard E. Straub, Daniel R. Weinberger、功刀浩

統合失調症脆弱性遺伝子ディスバインジンの関連解析と神経細胞における機能解析
第 34 回日本神経精神薬理学会・第 26 回日本生物学的精神医学会合同年会、東京、7.21-23(23), 2004.

橋本亮太、尾崎紀夫、岩田仲生、山之内芳雄、鈴木竜世、北島剛司、巽雅彦、上島国利、功刀浩

Chimerin2 遺伝子の H204R ミスセンス多型は男性において統合失調症と関連する
第 34 回日本神経精神薬理学会・第 26 回日本生物学的精神医学会合同年会、東京、7.21-23(22), 2004.

服部聡子、橋本亮太、宮川剛、前野浩巳、和田圭二、功刀浩

豊かな飼育環境と抗うつ効果：マウスにおける検討

第 34 回日本神経精神薬理学会・第 26 回日本生物学的精神医学会合同年会、東京、7.21-23(23), 2004.

野口広子、橋本亮太、中林哲夫、岩瀬真生、梶本修身、堀弘明、森健之、根本清貴、原田誠一、平林直次、有馬邦正、渡辺剛、穴見公隆、武田雅俊、斉藤治、功刀浩

統合失調症における認知機能障害の検討：統合失調症の包括的遺伝子解析研究に向けて

第 34 回日本神経精神薬理学会・第 26 回日

本生物学的精神医学会合同年会、東京、
7.21-23(22), 2004.

橋本亮太、沼川忠広、矢ヶ崎有希、石本哲也、岡田武也、鈴木竜世、岩田仲生、尾崎紀夫、田口隆久、巽雅彦、上島国利、Richard E. Straub, Daniel R. Weinberger、功刀浩
統合失調症脆弱性遺伝子ディスバインジンの関連解析と神経細胞における機能解析
「疲労および疲労感の分子・神経メカニズムとその防御に関する研究」平成16年度第1回全体班会議、福岡、7.15-16(16), 2004.

Ryota Hashimoto,

Evidence of novel neuronal functions of dysbindin, a susceptibility gene for schizophrenia
FES Tutorial Session Friday Evening Seminar, Brain Science Institute, RIKEN, Wako, 7.2, 2004.

野口広子、橋本亮太、中林哲夫、岩瀬真生、梶本修身、堀弘明、森健之、渡辺剛、穴見公隆、武田雅俊、斉藤治、功刀浩
統合失調症における認知機能障害の検討：
統合失調症の包括的遺伝子解析研究に向けて
第100回日本精神神経学会総会、札幌、
5.22-24(23), 2004.

橋本亮太、藤巻康一郎、功刀浩、荘徳茂
リチウムの神経保護効果とそのメカニズム：
臨床的作用機序への可能性
第24回リチウム研究会、東京、4.24, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

橋本亮太、功刀浩：躁うつ病の発病しや

すさに影響する遺伝的素因を有するか否かを検査するための方法。特願 2004-246447
(2004年8月26日)

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

研究課題名：アルミニウムなど金属とアルツハイマー病発症機構との因果関係に関する研究
(分担研究課題名：神経可塑性に対するアルミニウムの影響に関する研究)

分担研究者 武田雅俊 大阪大学大学院医学系研究科・精神医学・教授

研究要旨

アルミニウムの神経可塑性への影響を検討する目的で長期減少現象(LTD)における AMPA 受容体の代謝について検討した。LTD で取り込まれた AMPA 受容体は、アルミニウム非存在下では、速やかに分解されるが、プロテアソーム阻害薬あるいはアルミニウム存在下では、AMPA 受容体の代謝が低下しており、LTD 形成に支障を来すことが推測される。GFPu 導入神経芽細胞腫でプロテアソーム機能をモニターすると、アルミニウムによりプロテアソーム機能が低下することが観察された。合成基質を用いたプロテアソーム活性測定でも、アルミニウムによる活性の低下が観測された。以上のように、アルミニウムは LTP および LTD に影響を及ぼし、特に LTD においてはアルミニウムによるプロテアソーム機能低下が AMPA 受容体の代謝を阻害することが明らかとなった。

A. 研究目的

アルツハイマー病(AD)の発症機構とアルミニウムの因果関係については、否定的な意見が多いものの、結論が得られているわけではない。一方、近年 Mild Cognitive Impairment (MCI) 芽、痴呆前駆状態として注目されている。神経細胞脱落が顕著でない MCI だが、AD の病理過程は既に進行しているとされ、MCI の診断治療が注目されている。本研究は、この神経細胞が明らかではなく神経機能に変調をきたしている MCI を想定し、分子レベルでの神経可塑性発現に、アルミニウムが如何に関与するかを検討する。昨年度までは、シナプスの長期増強現象(LTP)に対するアルミニウムの影響に関し、電気生理学的に検討した。本年は、長期減少現象(LTD)の分子機構とアルミニウムの関係について検討した。

B. 研究方法

・ビオチン化でのグルタミン酸レセプター(GluR)の免疫組織

AMPA 刺激により GluR は神経細胞内に取り込まれ、プロテアソームにて代謝されることで、LTD は行われることが知られている。アルミニウム添加 (100、500 μ M) 及びプロテアソーム阻害薬添加培養細胞を 4°C の PBS++ (PBS, MgCl₂ 1mM, CaCl₂ 2.5mM) で洗浄し、Sulfo-NHS-SS-biotin 1.5mg/ml / PBS++を加えて 4°C・20 分間静置し細胞表面をビオチン化させた。

その後 Glycine 50mM / PBS++ に置き換えてビオチン化反応を止め、通常の培地に戻して 37°C・5 分間培養した。その後 37°C の PBS で細胞を一度洗った後、AMPA 100 μ M、Tetrodotoxin 1 μ M、D-APV 50 μ M を加えた培地で 37°C・15 分間培養した。これを 4°C に冷却したグルタチオン溶液 (Glutathione 50mM、NaCl 75mM、EDTA 10mM、1% BSA、NaOH 0.075N) で 2 度洗浄することで細胞表面のビオチンを除去し、更に Iodoacetamide 5mg/mL / PBS++ で 2 度洗浄し脱ビオチン化反応も停止させた。この細胞を Zamboni 液 (ピクリン酸 0.21g、パラホルムアルデヒド 4% / PBS) で固定した後 PBS で洗浄し、streptavidin-FITC / PBS を加えて 37°C・30 分間静置し、洗浄した上で位相差蛍光顕微鏡にて観察した。

・プロテアソーム活性の測定

アルミニウムを含んだ培地で細胞を 24 時間培養し、PBS で一度洗ったのち Lysis Buffer (Tris-HCl (pH 7.5) 50 m M、NaCl 100mM、CHAPS 0.2%、EDTA 5mM、EGTA 1mM、NaN₃ 3mM、Protease Inhibitor Cocktail) で細胞を集め、45000rpm で 30 分間遠心して上清を回収した。プロテアソーム活性に対する蛍光基質はそれぞれ、トリプシン様活性に対しては Boc-LRR-AMC、キモトリプシン様活性に対しては Suc-LLVY-AMC、カスパーゼ様活性に対しては Z-LLE-AMC を使い、これらが 50 μ M になるように反応液 (Tris-HCl (pH 7.3) 50 m M、NaCl 100mM、

EDTA 5mM、EGTA 1mM、NaN₃ 3mM、DTT 2mM)で調整した。この反応液 100 μ L と細胞抽出液 80 μ L を混合し、遮光して 15 分間 37°C で反応させた後、380nm で励起し 440nm で発光させてその蛍光強度を測定した。この測定値をそれぞれの抽出液の蛋白質濃度で標準化し、それぞれの基質についてコントロール群を 1 とした際の相対的な蛍光強度を算出した。

・プロテアソームのサブユニットの RT-PCR

アルミニウムで 24 時間刺激した細胞を回収し、QIAGEN RNeasy kit を用いて RNA を抽出した。RNA の濃度を測定してそれぞれの濃度を 100ng/ μ L に調整したのち、ABI cDNA Archive kit を用いて cDNA を合成した。この cDNA を鋳型として、Taqman PCR kit と ABI より購入したプライマーセットを用いて RealTime PCR を行い、その増幅率からそれぞれの遺伝子の発現量を算出した。

C. 研究結果

AMPA により刺激すると、ビオチン化された GluR は神経細胞内に取り込まれ、速やかに代謝されるが、プロテアソーム阻害薬で処理しておく、GluR は代謝されずに神経細胞内に残存しており、LTD が障害されることが示唆された。アルミニウム添加では、プロテアソーム阻害薬まではいかなくとも、GluR の細胞内残存がみられ、LTD 障害されることが示された。

アルミニウムの LTD に対する効果は、プロテアソーム阻害によると予想されるため、アルミニウム存在下のプロテアソームについて測定した。3 種類の基質 Boc-LRR-AMC (トリプシン様活性)、Suc-LLVY-AMC (キモトリプシン様活性)、Z-LLE-AMC (カスパーゼ様活性) を用いてアッセイしたところ、全ての基質に対し、アルミニウム濃度依存的に活性低下が認められた。

アルミニウムのプロテアソームへの直接的影響をみる目的で、プロテアソームサブユニット PA28、Rpn10、b1、b6 の発現レベルについて RT-PCR で検討した。プロテアソーム阻害薬ではそれぞれのサブユニットの誘導が認められたが、アルミニウムにはそれが認められなかった。

D. 考察

近年、AD の前駆状態とも言うべき MCI が注目されてい

る。即ち、神経変成に至る前でのシナプス機能の変化や神経可塑性の変化は、AD の病理過程を考える上でも、極めて重要であると考えられる。神経細胞はグルタミン酸刺激により細胞表面の GluR の量を調節することにより、神経可塑性即ち LTP や LTD を発現するとされる。AMPA の刺激により GluR は細胞内に取り込まれ、LTD が形成されるが、それにはユビキチン・プロテアソーム系の活性化が必要とされている。アルミニウムの添加が AMPA による細胞内に移行された GluR の代謝を阻害することが、今回の検討で明らかになったが、同時に行った、プロテアソーム活性の測定によれば、アルミニウムはプロテアソーム活性そのものを減弱することが明らかになり、それが受容体代謝に影響を及ぼすことが示唆された。しかし、プロテアソームのサブユニットの刺激誘導は通常のプロテアソーム阻害剤では起こるが、アルミニウムではそれが観察されず、アルミニウムによるプロテアソームの阻害形式は一般の阻害剤とは違う可能性を示唆した。

E. 結論

アルミニウムの神経可塑性への影響を検討する目的で長期減少現象(LTD)における AMPA 受容体の代謝について検討した。LTD で取り込まれた AMPA 受容体は、アルミニウム非存在下では、速やかに分解されるが、プロテアソーム阻害薬あるいはアルミニウム存在下では、AMPA 受容体の代謝が低下しており、LTD 形成に支障を来すことが推測される。GFP μ 導入神経芽細胞腫でプロテアソーム機能をモニターすると、アルミニウムによりプロテアソーム機能が低下することが観察された。合成基質を用いたプロテアソーム活性測定でも、アルミニウムによる活性の低下が観測された。以上のように、アルミニウムは LTP および LTD に影響を及ぼし、特に LTD においてはアルミニウムによるプロテアソーム機能低下が AMPA 受容体の代謝を阻害することが明らかとなった

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

C677T polymorphism of methylenetetrahydrofolate

reductase gene affects plasma homocysteine level
and is a genetic factor of late-Onset Alzheimer's
disease

Tomoyuki Kida, Kouzin Kamino, Mitsuko
Yamamoto, Daisuke Kanayama, Toshihisa Tanaka,
Takashi Kudo, and Masatoshi Takeda

Psychogeriatrics, 4(1):4-10, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし。

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（化学物質リスク研究事業）

分担研究報告書

研究課題名：アルミニウムなど金属とアルツハイマー病発症機構との因果関係に関する研究
（分担研究課題名：アルミニウムなどの金属のアミロイドプロトフィブリル形成に及ぼす効果の研究）

分担研究者 大河内正康 大阪大学大学院・ポストゲノム疾患解析学講座・精神医学

研究要旨

アルツハイマー病老人斑の形成にアルミニウムなどの金属が影響を及ぼすことが知られている。ベータアミロイド仮説では“可溶性のアミロイドベータ蛋白(A β)の凝集過程にアルツハイマー病の本体がある”と考えられているため、アルミニウムなどの金属がこの凝集過程にどのように関与しているか検討することは重要である。同様にアルミニウムなどの金属が、A β を最終的に切り出す酵素であるプレセニリン/ γ -secretase やさらに上流の酵素である BACE に対して影響を及ぼすかどうかを検討することも重要である。我々は A β フィブリル形成およびその中間段階であるアミロイド・プロトフィブリル形成について検討を重ねた結果、アルミニウムなどの金属イオンが試験管内では、A β のベータ重合を阻害すること、またフィブリル形成やその中間段階であるプロトフィブリル形成の遅延に関与していることを明らかにした。培養細胞系を用いた実験結果もこれを支持した。さらにアルミニウムなどの金属はプレセニリン/ γ -secretase 活性に対する直接的な影響は及ぼさないことを *de novo* A β 定量・定性システムを用いて明らかにした。最終年度では、アミロイドカスケードの最上流に位置する BACE がアルミニウム負荷による影響を受けるかどうかを検討した。まず BACE の mRNA 量及び総タンパク量は、アルミニウム負荷によって変化しなかった。次にアルミニウム負荷による BACE 活性の変化を消光性蛍光基質を用いた系で検討したが、BACE を過剰発現しなければ測定不可能であった。内在性の BACE の活性がアルミニウム負荷により変化を受けるかどうか検討するために、 β APP 全長を基質とした *in vitro* BACE assay 系を新たに確立した。この系を用いて実験したところ、アルミニウム負荷による BACE 活性の変化は認められなかった。以上の結果よりアルミニウムなどの金属は、アミロイドカスケードの最上流に位置する BACE の mRNA 量や総タンパク量に変化は来たさないこと、また BACE の活性やプレセニリン/ γ -secretase 活性には直接影響を及ぼさないことが明らかになった。アルミニウムなどの金属は生成された A β の凝集過程に変化を来たすことで、老人斑形成に影響を及ぼしていると考えられた。

A. 研究目的

アルツハイマー病に特徴的な老人斑の主要構成成分はアミロイドベータ蛋白 (A β)

であり、この A β はベータアミロイド前駆体蛋白(β APP)がまず β -セクレターゼ(BACE)により切断され、続いてプレセニリン(PS)

ガンマセクレターゼによる膜内切断を受けて産生される。家族性アルツハイマー病患者より同定された PS、APP の分子機構を詳細に調べることで、その発症メカニズムは徐々に明らかになりつつある。一方で痴呆症の大半を占める孤発性アルツハイマー病に関する分子生物学的知見は非常に乏しいが、疫学的報告は数多く、以前よりアルミニウムを始めとする環境因子がその発症に関連する可能性を示す報告が蓄積している。そこで我々はアルツハイマー病の本体である老人斑の形成過程にアルミニウムなどの金属がどのように関与しているかを詳細に検討してきた。その結果アルミニウムなどの金属イオンが試験管内では、 $A\beta$ のベータ重合を阻害すること、またフィブリル形成やその中間段階であるプロトフィブリル形成の遅延に関与していることを明らかにした。またアルミニウムなどの金属はプレセニン/ γ -secretase 活性に対する直接的な影響は及ぼさないことを *de novo* $A\beta$ 定量・定性システムを用いて明らかにした。最終年度では、アミロイドカスケードの最上流に位置する BACE がアルミニウム負荷による影響を受けるかどうかを検討した。

B. 研究方法

1) 細胞培養

HEK293 細胞にスウェーデン変異型ベータアミロイド蛋白前駆体を恒常的に発現させ、定法により培養した。

2) BACE の mRNA 定量

培養液にアルミニウムマルトールを 0, 10, 100 μ M の濃度で添加し、培養 24 時間及び 48 時間後、細胞をそれぞれ回収した。回収した細胞から mRNA を定法で抽出、RT-PCR 法を用いて BACE mRNA を定量した。

3) BACE の総タンパク量定量

培養液にアルミニウムマルトールを 0, 10, 100 μ M の濃度で添加し、培養 24 時間及び 48 時間後の細胞をそれぞれ回収した。回収した細胞を RIPA で溶き、可溶分画をタンパク定量の後 SDS-PAGE を行い、抗 BACE 抗体 (CHEMICON; MAB5308) でウェスタンブロットティング解析を行った。

4) BACE の発現量定量

培養液にアルミニウムマルトールを 0, 10, 100 μ M の濃度で添加し、培養 24 時間及び 48 時間後の細胞をそれぞれ S^{35} で 20 分ラベルした。その後回収した細胞を RIPA で溶き、可溶分画を抗 BACE 抗体 (R&D MAB9311) で免疫沈降の後 SDS-PAGE を行い autoradiography 解析をした。

5) in vitro BACE assay

スウェーデン変異型ベータアミロイド蛋白前駆体を恒常的に発現した細胞をアルミニウムマルトール、0, 10, 100 μ M の濃度で 24 時間及び 48 時間処理した。その後 S^{35} で 20 分ラベルの後回収し、定法により粗膜分画を抽出した。37 $^{\circ}$ C, 40 分間インキュベートした後、RIPA で可溶化し、抗 APP 抗体で免疫沈降の後 SDS-PAGE を行い autoradiography 解析をした。産生された CTF- β の量を BAS を用いて測定した。

C. 研究結果

まず swAPP 発現細胞をアルミニウムマルトール 0, 10, 100 μ M の濃度で 24 時間及び 48 時間処理した際の mRNA 量を測定した結果、対照と比べて有意な差は認められなかった。次に同様の処理を行った細胞の内在性 BACE の発現量をパルス実験で検討したところ、mature BACE の量は全く変化がなかった。さらにウェスタンブロットティング法による BACE 総タンパク量は対照と比較して差が認められなかった。しかしパルス実験で