

200821075A

厚生労働科学研究費補助金
長寿科学総合研究事業

孤発性アルツハイマー病の病態機序解明を目的とする、
神経系軸索輸送の加齢性変化および障害メカニズムの解明

平成20年度 総括研究報告書

研究代表者 木村展之

平成21(2009)年3月

目次

I. 総括研究報告

- 孤発性アルツハイマー病の病態機序解明を目的とする、神経系軸索輸送の
加齢性変化および障害メカニズムの解明 ----- 1
木村 展之 (医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター)

II. 分担研究報告

1. 軸索輸送障害とエンドサイトーシス障害に関する研究 ----- 7
木村 展之 (医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター)
2. shRNA発現ウイルスベクターの開発に関する研究 ----- 17
井上 誠 (ディナベック株式会社)
3. リン酸化・脱リン酸化バランスに注目した、軸索輸送の
障害メカニズムに関する研究 ----- 19
根岸 隆之 (青山学院大学)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 27

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 31

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

総括研究報告書

孤発性アルツハイマー病の病態機序解明を目的とする、神経系軸索輸送の加齢性変化および障害メカニズムの解明

研究代表者 木村 展之 医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター

研究要旨：

認知症の代表格であるアルツハイマー病（AD）は、原因遺伝子の変異に起因する家族性アルツハイマー病（FAD）と、加齢性に発症する孤発性アルツハイマー病（SAD）の2つに大別され、実に8割以上もの患者が後者に属する。しかしながら、SAD発症メカニズムの全容は未だ解明されておらず、加齢との関係性についても不明な部分が多い。

カニクイザルはヒトに近縁な霊長類であり、AD主病変の1つである老人斑が加齢性に再現されることから、加齢とAD発症メカニズムとの関係を検索するモデル動物として非常に高いポテンシャルを有している。そして我々は、カニクイザル脳組織を用いた過去の検索において、老人斑が確認される老齢カニクイザルの脳組織では、軸索輸送と呼ばれる細胞内輸送機能が加齢性に低下または障害を受けている可能性を示唆する研究成果を得た。

そこで本研究では、SAD発症メカニズムの全容解明とその病態に応じた治療法の開発を目指し、軸索輸送の低下・障害がもたらす神経細胞への影響とAD病態との関係を検索するとともに、その障害メカニズムを明らかにすることを目的とする。

分担研究者

井上 誠 ディナベック株式会社 部長

根岸 隆之 青山学院大学理工学部 助教

A. 研究目的：

医科学研究の発展に伴い、今後ますます社会の高齢化が加速するであろう我が国において、アルツハイマー病（AD）を代表とする認知症の克服は重要命題の1つである。ADは原因遺伝子の変異によって発症する家族性アルツハイマー病（FAD）と、加齢性に発症する孤発性アルツハイマー病

（SAD）の2つに大別され、現在世界的規模でFAD関連原因遺伝子の解析が行われている。しかしながら、実際のAD患者の実に8割以上がSADに属することや、FADでみられるような病因蛋白の過剰産生がSADでは確認されていないという事実から、この両者の発症メカニズムには何らかの差異が存在する可能性が指摘されている。また現時点において、SAD発症に関与する最大の危険因子は「加齢」であると考えられていることから、加齢によって神経系にどのような変化が生じているのかを明らかにすることは、SAD発症メカニズムの全容

解明には必須のアプローチであると考えられる。

我々はこれまで、ヒトに近縁な霊長類であり、AD 主病変の1つである老人斑が加齢性に再現されるカニクイザルの脳組織を用いて、AD 病変形成メカニズムの解明を目的とした様々な加齢性変化の検索を行ってきた。その結果、老人斑の主要構成蛋白であり、AD 発症メカニズムにおける重要病因蛋白の1つであるアミロイド β 蛋白 ($A\beta$) は、老人斑が形成される時期よりも早期に細胞内での蓄積が顕著に生じており、さらにその蓄積部位は細胞内膜画分と神経終末画分であることを明らかにした。

この結果を受け、引き続き細胞内輸送系に関する検索を行ったところ、カニクイザル脳組織では加齢に伴い、軸索輸送と呼ばれる細胞内輸送機能が低下している可能性を示唆する結果が得られた。

軸索輸送は神経細胞の細胞体-シナプス間の輸送のみならず、細胞内の様々な輸送機能を担当していることが知られている。そして近年、細胞内輸送機能の障害と AD 病態との関係に非常に注目が高まってきており、FAD 関連遺伝子変異もまた、細胞内輸送機能の障害に関与しているという可能性を示唆する報告も寄せられている。

そこで本研究では SAD 発症メカニズムの全容解明を目指し、軸索輸送の低下・障害が SAD 発症メカニズムにどのように関与しているのか、また、何故加齢によって軸索輸送が低下・障害を受けるのかを明らかにすることを目的とする。

B. 研究対象および方法

①軸索輸送障害と AD 病態との関係

AD 患者脳組織では、エンドソームと呼ばれる輸送小胞の肥大化と同所におけるアミロイド前駆体蛋白 (APP) の蓄積が確認されており、エンドサイトーシスと AD 発症メカニズムとの関連性が示唆されている。そこで若齢から老齢までのカニクイザル脳組織を用いて、加齢に伴うエンドサイトーシス関連蛋白群の変化を免疫組織科学および生化学的手法を用いて検索する。さらに、RNA 干渉法を応用して軸索輸送障害の *in vitro* モデルを作成し、軸索輸送障害とエンドサイトーシス障害との関連性を明らかにする。(木村)

②shRNA 発現ベクターの開発

軸索輸送障害による神経系への影響を *in vivo* レベルで検索を行うため、脳内で shRNA を持続的に発現可能なベクターの開発に着手する。(井上)

③軸索輸送障害のメカニズム検索

AD 患者の脳組織では脱リン酸化酵素の活性が顕著に低下していることが知られており、老人斑と並ぶ AD 主病変である神経原線維変化の形成にもリン酸化の亢進が大きく関与していることが広く知られている。

そこで本研究では、加齢に伴うリン酸化・脱リン酸化バランスの異常が軸索輸送の障害を引き起こすのではないかと仮定し、神経系培養細胞を用いてリン酸化亢進による軸索輸送の障害を検索した。(根岸)

C. 研究結果：

①軸索輸送障害と AD 病態との関係

各種エンドソーム認識抗体を用いた検索の結果、老齢カニクイザルの脳組織では AD

患者と同様に各種エンドソームの肥大化が確認された。

In vitro 軸索輸送障害モデルを用いた検索の結果、dynein のノックダウンによって各種エンドソームの肥大化も再現された。

さらに、神経系培養細胞である Neuro2a を用いたところ、APP および sAPP β の顕著な蓄積が確認され、肥大化したエンドソームに APP が蓄積しているという結果が得られた。

②shRNA 発現ベクターの開発

VSVG シュードタイプ shRNA(ヒトダイニン)搭載 SIV ベクターをリン酸カルシウム法により作製した。

③軸索輸送障害のメカニズム検索

オキサ酸処理によって脱リン酸化酵素の活性が阻害された細胞では、dynein および dynactin に大きな変化はみられなかったが、late endosome のマーカーでもある Rab7 GTPase のタンパク量が有意に増加しており、Rab7 陽性エンドソームの肥大化が確認された。

D. 考察:

①軸索輸送障害と AD 病態との関係

カニクイザル脳組織でも AD 初期病変であると考えられている各種エンドソームの肥大化病変が確認されたことから、カニクイザルが老人斑の形成という「結果」のみならず、同病変形性へ至る「経路」を検索する上でも非常に有用なモデル動物であることが実証された。

In vivo 軸索輸送障害モデルを用いた検索の結果、APP の細胞内蓄積のみならず、A β

産生が促進されていることを示唆する結果も得られたことから、軸索輸送の低下・障害が AD 発症メカニズムに関与している可能性もまた示唆された。

②shRNA 発現ベクターの開発

VSVG シュードタイプ shRNA(ヒトダイニン)搭載 SIV ベクターの生産は、問題なく実施可能であった。

③軸索輸送障害のメカニズム検索

加齢によって生じると考えられているリン酸化・脱リン酸化バランスの障害との関係を検索したところ、リン酸化の亢進によって Rab7 GTPase タンパク量の増加とともにエンドソームの肥大化が確認され、エンドサイトーシス障害、即ち軸索輸送の障害が生じていることが示唆された。

E. 結論:

本研究によって、加齢性神経変性疾患の研究対象としてのカニクイザルの信頼性が再確認されたと同時に、軸索輸送障害がエンドサイトーシス障害を通じて AD 発症メカニズムに関与しているという可能性が示唆された。

今後さらに本研究系を発展させ、in vivo での軸索輸送障害モデルを確立し、AD 発症メカニズムの解明に向けた更なる検索とともに、診断・治療法の開発に向けた予研究を目指したい。

F. 健康危険情報なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Okabayashi S and Kimura N. Leucine-rich glioma inactivated 3 is involved in amyloid β peptide uptake by astrocytes and endocytosis itself. *Neuroreport*. 19(12): 1175-1179. 2008.

Kimura N. Nonhuman Primates as the Animal Model for Age-Dependent Diseases. *Women and Aging: New Research (Book)*. In Press.

Takahashi M, Negishi T, Imamura M, Sawano E, Kuroda Y, Yoshikawa Y, Tashiro T. Alterations in gene expression of glutamate receptors and exocytosis-related factors by a hydroxylated-polychlorinated biphenyl in the developing rat brain. *Toxicology*. 257(1-2): 17-24. 2009.

Kobayashi Y, Negishi T, Mizumura A, Watanaabe T, Hirano S. Distribution and excretion of arsenic in cynomolgus monkey following repeated administration of diphenylarsinic acid. *Arch Toxicol*. 82(8): 553-61. 2008

2. 学会発表

Kimura N, Imamura O, Ono F, Terao K. Age-related changes of axonal transport motor proteins: siRNA-induced down-regulation causes accumulation of tau and APP. International Conference of Alzheimer's Disease and Related Disorders 2008. Chicago (U.S.A.). July 26th -Aug 1st, 2008.

木村展之, 柳澤勝彦. カニクイザル脳組織を用いた GM1 ガングリオシド結合型

A β (GAB)の免疫組織化学的検索. 第27回日本認知症学会. 群馬県前橋市. 2008年10月9日~11日.

及川尚人, 木村展之, 柳澤勝彦. カニクイザル脳におけるアルツハイマー病関連蛋白(A β , タウ)の解析. 第27回日本認知症学会. 群馬県前橋市. 2008年10月9日~11日.

小柳 洸志, 高橋 理貴, 根岸 隆之, 田代 朋子. 初代培養ラット小脳顆粒細胞における低カリウム誘発細胞死に対する内因性グルタミン酸の役割. 第51回日本神経化学学会大会. 富山県. 2008年9月11-13日

若佐 美佳, 今村 誠, 吉岡 良祐, 高橋理貴, 根岸 隆之, 角田 正史, 相澤 好治, 田代 英夫, 田代 朋子. トリブチルスズ経世代曝露による発達期脳の遺伝子発現変化. 第51回日本神経化学学会大会. 富山県. 2008年9月11-13日

高橋 理貴, 根岸 隆之, 澤野 恵梨香, 田代 朋子. LPS 誘導末梢性炎症による脳内甲状腺ホルモンシステムの変化. 第51回日本神経化学学会大会. 富山県. 2008年9月11-13日

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

II. 分担研究報告

軸索輸送障害とエンドサイトーシス障害に関する研究

研究分担者 木村 展之 医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター

研究要旨：

軸索輸送は、神経細胞の細胞体とシナプス間を往復するのみならず、細胞内の様々な輸送機能に必須の普遍的輸送システムであり、エンドサイトーシスもまた軸索輸送によって支えられている細胞内輸送機能である。近年、アルツハイマー病（AD）の発症メカニズムとエンドサイトーシス障害の関連性が注目度を増しているが、何故加齢によってエンドサイトーシスの障害が生じるのかは不明な点が多い。

そこで本研究では、老人斑病変が再現されるカニクイザルの脳組織を用いてエンドサイトーシス関連蛋白群の加齢性変化を検索するとともに、軸索輸送障害とエンドサイトーシス障害との関係を明らかにするために *in vitro* 軸索輸送障害モデルを確立して検索を行った。この結果、老齢カニクイザル脳組織では AD 患者と同様にエンドサイトーシス肥大化病変が確認され、加齢によってエンドサイトーシスが何らかの障害を受けていることが明らかとなった。さらに *in vitro* 軸索輸送障害モデルを用いた検索により、軸索輸送の障害がエンドサイトーシス障害を引き起こし、その結果として AD 原因蛋白の細胞内蓄積が誘導されるという可能性を示唆する結果が得られた。

A. 研究目的：

我々はこれまで、ヒトに近縁な霊長類であり、アルツハイマー病（AD）主病変の1つである老人斑が加齢性に再現されるカニクイザルの脳組織を用いて、AD 病変形成メカニズムの解明を目的とした様々な加齢性変化の検索を行ってきた。その結果、カニクイザル脳組織では加齢に伴い、軸索輸送と呼ばれる細胞内輸送機能が低下している可能性を示唆する結果が得られた。

軸索輸送は神経細胞の細胞体-シナプス間の輸送のみならず、細胞内の様々な輸送

機能を担当していることが知られている。そして近年、エンドサイトーシスと呼ばれる細胞内輸送機能の障害と AD 病態との関係に非常に注目が高まってきているが、エンドサイトーシスもまた軸索輸送によって支配を受けている。

そこで本研究ではエンドサイトーシス関連蛋白群の加齢性変化を検索するとともに、軸索輸送の障害がエンドサイトーシスにどのような影響を与えるのか、そして AD 病態とはどのような関係があるのかを明らかにすることを目的とする。

B. 研究対象および方法

AD患者脳組織では、エンドソームと呼ばれる輸送小胞の肥大化と同所におけるアミロイド前駆体蛋白 (APP) の蓄積が確認されており、エンドサイトーシスとAD発症メカニズムとの関連性が示唆されている。そこで若齢から老齢までのカニクイザル脳組織を用いて、加齢に伴うエンドサイトーシス関連蛋白群の変化を免疫組織化学的および生化学的手法を用いて検索した。さらに、RNA干渉法を応用して軸索輸送障害の *in vitro* モデルを作成し、軸索輸送障害とエンドサイトーシス障害との関連性を明らかにするとともに、AD病態との関連性を検索した。

<免疫組織化学的検索>

若齢群 (6歳齢 (N=2)・7歳齢 (N=2))、および老齢群 (25歳齢 (N=2)・26歳齢 (N=2)・32歳齢 (N=2)・36歳齢 (N=2)) からなる、合計12個体のカニクイザル脳組織切片を用いて、各種エンドソームを認識する抗体群を用いて免疫組織化学的検索を行った。

脳組織はPFA固定後、定法に従いパラフィン包埋ブロックを作成し、4 μ mに薄切したものをを用いた。組織切片は脱パラフィン後、1%過ヨウ素酸処理によって内因性ペルオキシダーゼを不活化し、続いてオートクレーブ法 (121 $^{\circ}$ C5分) によって抗原賦活化処理を行った後に5%スキムミルク Bufferにてブロッキングを行い、各種エンドソーム特異的抗体を用いて免疫染色を行った。

本実験系におけるカニクイザル年齢群の分類根拠は、過去の検索によって明らかとなった老人斑形成 (加齢性に形成されるAD

主病変の1つ) の再現性年齢をもとにしている。即ち、25歳以上のカニクイザル脳組織ではほぼ例外なく老人斑の形成が確認されることから「老齢群」と分類した。

<生化学的検索>

若齢群 (4歳齢 (N=4))、および老齢群 (25歳齢 (N=2)・26歳齢 (N=2)) からなる、合計8個体の凍結保存カニクイザル側頭葉皮質を用いた。脳組織片 (約0.2g) を抽出 Buffer (25mM Tris-HCl, 0.32M Sucrose, Proteinase Inhibitor Cocktail, pH7.4) 内にてホモジナイズし、超遠心分離によって膜画分を回収し、各種エンドソームに対する特異的抗体を用いて Westernblot 法による生化学的検索を行った。

<In vitro 軸索輸送モデルの作成と検索>

まず軸索輸送障害とエンドサイトーシス障害との関連性を明らかにするため、細胞内輸送機能の検索系として幅広く用いられているCOS-7細胞 (アフリカミドリザル由来) を用いて検索を行い、次いで神経系細胞での再評価とAD病態関連蛋白との関連性を検索するために、Neuro2a細胞 (マウス由来) を用いて検索を行った。

具体的には、軸索輸送モーター蛋白である dynein とその関連因子である dynactin に対する siRNA を細胞内へ導入し、72時間後の細胞を用いて免疫細胞化学的および生化学的手法を用いて検索を行った。

C. 研究結果:

<カニクイザル脳組織を用いた検索結果>

各種エンドソーム認識抗体を用いた検索の結果、老齢カニクイザルの脳組織ではAD

患者と同様に各種エンドソームの肥大化が確認された (Fig.1)。さらに Westernblot の結果から、老齡カニクイザルの脳組織では各種エンドソームマーカーであり輸送に必須の GTPase でもある Rab5・Rab7・Rab4・Rab11 の蛋白量が増加していることが明らかとなった (Fig.1)。

<In vitro 軸索輸送障害モデルの検索結果>

COS-7 細胞を用いた検索の結果、dynein のノックダウンによって各種 Rab 蛋白の有意な蛋白量上昇が誘導され、各種エンドソームの肥大化も再現された (Fig.2)。さらに、モーター蛋白である dynein そのものではなく、dynein と結合することで輸送機能の発現に関与している dynactin のノックダウンを行ったところ、ほぼ同様の結果を得ることが出来た (Fig.3)。

次に、これらのような障害メカニズムが神経系細胞でも生じるのか否か、そして AD 病態との関連性があるのか否かを明らかにするため、神経系培養細胞である Neuro2a を用いて dynein ノックダウンの効果を検索したところ、Neuro2a 細胞でも各種 Rab 蛋白の顕著な増加を確認することが出来た (Fig.4)。さらに、APP および sAPP β の顕著な蓄積が確認され、肥大化したエンドソームに APP が蓄積しているという結果が得られた (Fig.4)。

D. 考察：

カニクイザル脳組織でも AD 初期病変であると考えられている各種エンドソームの肥大化病変が確認されたことから、カニクイザルが老人斑の形成という「結果」のみならず、同病変形性へ至る「経路」を検索

する上でも非常に有用なモデル動物であることが実証された。

Westernblot の結果から、老齡カニクイザル脳組織では各種エンドソームの GTPase である Rab5・Rab7・Rab11 の蛋白量が増加していることが明らかとなったが、これら Rab 蛋白の増加は各種エンドソームの輸送活性が上昇している (またはさせられている) ことを示唆しており、加齢に伴ってエンドサイトーシスに何らかの障害が生じていることを裏付けている結果でもあると考えられる。そして、エンドソームの輸送活性上昇はエンドソーム同士の融合を促進し、その結果として小胞の肥大化ならびに輸送速度の更なる低下を引き起こしている可能性が高い。

In vivo 軸索輸送障害モデルを用いた検索の結果、dynein および dynactin のノックダウンによって各種 Rab 蛋白の上昇ならびに各種エンドソームの肥大化を再現することができた。このことから、加齢に伴うエンドソームの肥大化病変形成と Rab 蛋白の増加、即ちエンドサイトーシス障害は、dynein が司る軸索輸送 (=retrograde) の低下・障害によって引き起こされているという可能性が大いに示唆された。

神経系細胞を用いた検索では APP の細胞内蓄積のみならず、 $A\beta$ 産生が促進されていることを示唆する結果も得られたことから、軸索輸送の低下・障害が AD 発症メカニズムに関与している可能性もまた示唆された。即ち、加齢に伴う軸索輸送の低下・障害はエンドサイトーシス障害を引き起こし、AD 発症に繋がるメカニズムの一端を握っているという可能性が考えられる。

E. 結論：

本研究によって、加齢性神経変性疾患の研究対象としてのカニクイザルの信頼性が再確認されたと同時に、軸索輸送障害がエンドサイトーシス障害を通じて AD 発症メカニズムに関与しているという可能性が示唆された。また本研究で確立した *in vitro* 軸索輸送障害モデルは、AD のみならず他の神経変性疾患の病態と細胞内輸送機能の関係を検索する上では非常に有用なモデルであると考えられる。

今後さらに本研究系を進展させ、*in vivo* での軸索輸送障害モデルを確立し、AD 発症メカニズムの解明に向けた更なる検索とともに、診断・治療法の開発に向けた予研究を目指したい。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Okabayashi S and Kimura N. Leucine-rich glioma inactivated 3 is involved in amyloid β peptide uptake by astrocytes and endocytosis itself. *Neuroreport*. 19(12): 1175-1179. 2008.

Kimura N. Nonhuman Primates as the Animal Model for Age-Dependent Diseases. *Women and Aging: New Research (Book)*. In Press.

2. 学会発表

Kimura N, Imamura O, Ono F, Terao K. Age-related changes of axonal transport motor proteins: siRNA-induced down-regulation causes accumulation of tau and APP.

International Conference of Alzheimer's Disease and Related Disorders 2008. Chicago (U.S.A.). July 26th -Aug 1st, 2008.

木村展之, 柳澤勝彦. カニクイザル脳組織

を用いた GM1 ガングリオシド結合型

A β (GAB)の免疫組織化学的検索. 第 27 回日

本認知症学会. 群馬県前橋市. 2008 年 10 月

9 日~11 日.

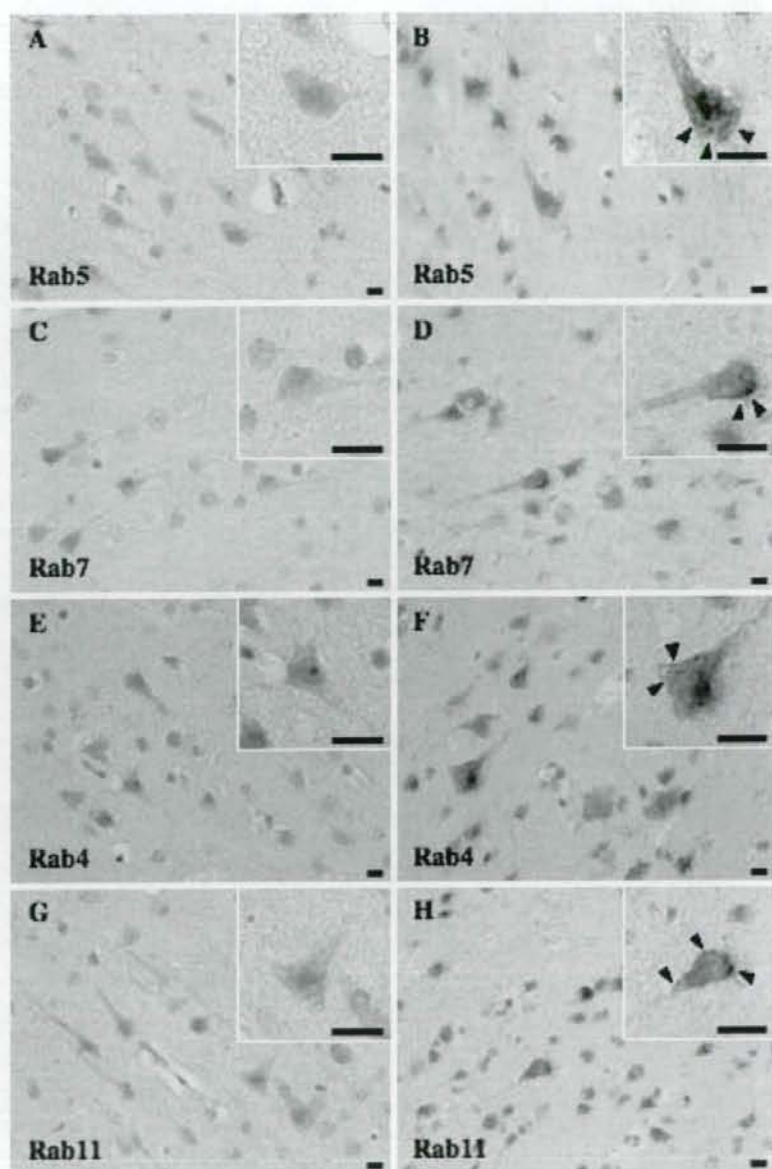
及川尚人, 木村展之, 柳澤勝彦. カニクイザル脳におけるアルツハイマー病関連蛋白

(A β , タウ)の解析. 第 27 回日本認知症学会. 群馬県前橋市. 2008 年 10 月 9 日~11 日.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

Fig. 1

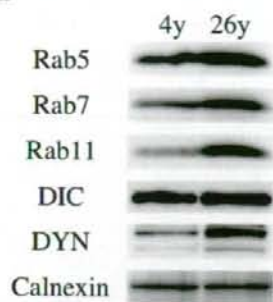
A



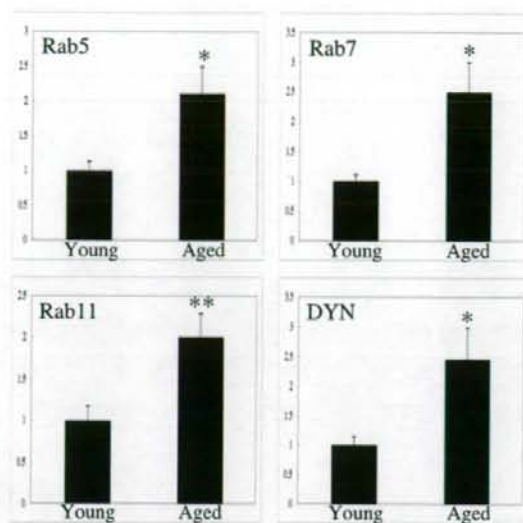
Arrowheads: enlarged endosomes; Scale Bar: 10 μ m

Fig. 1

B



C



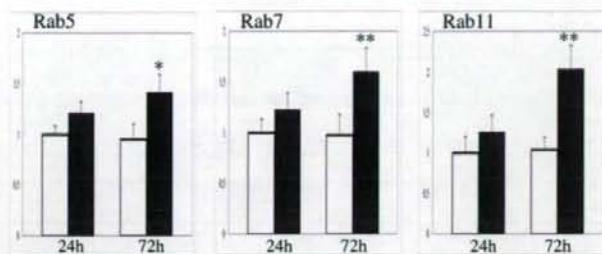
DIC: dynein intermediate chain; DYN: P150dynactin

Fig. 2

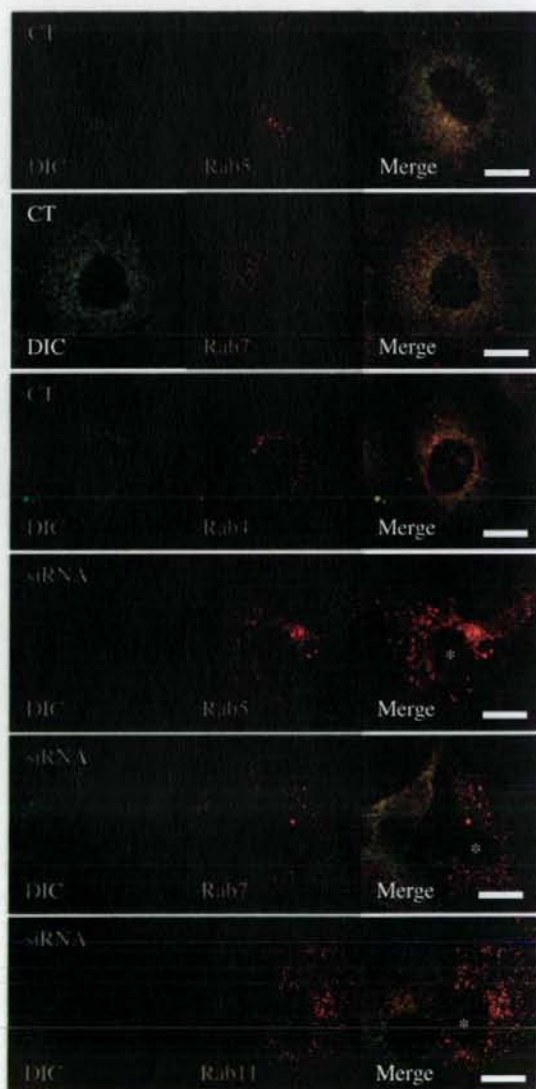
A



B



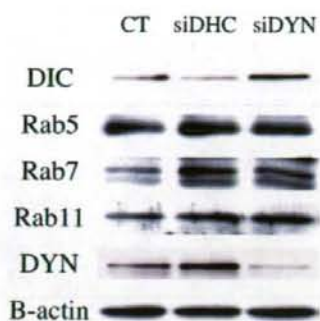
C



Astarisk: siRNA-transfected cell
Scale Bar: 10 μ m

Fig. 3

A



B

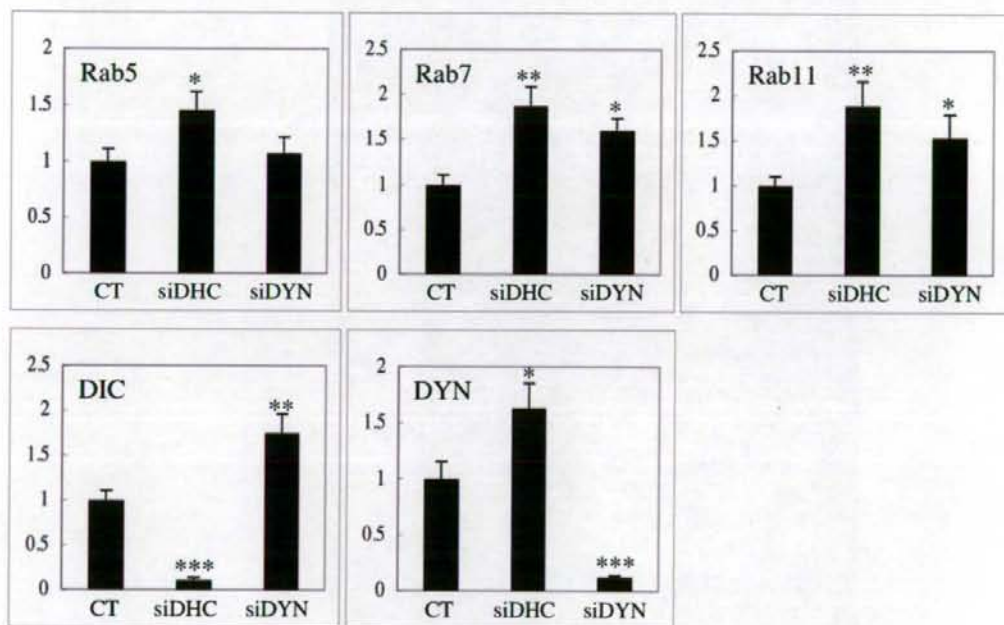
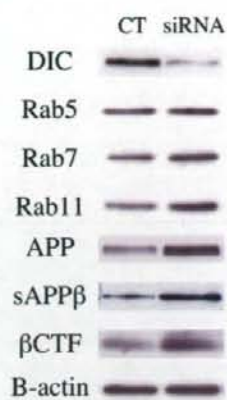
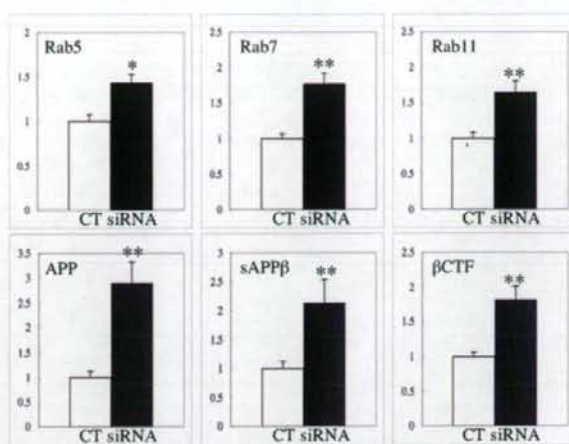


Fig. 4

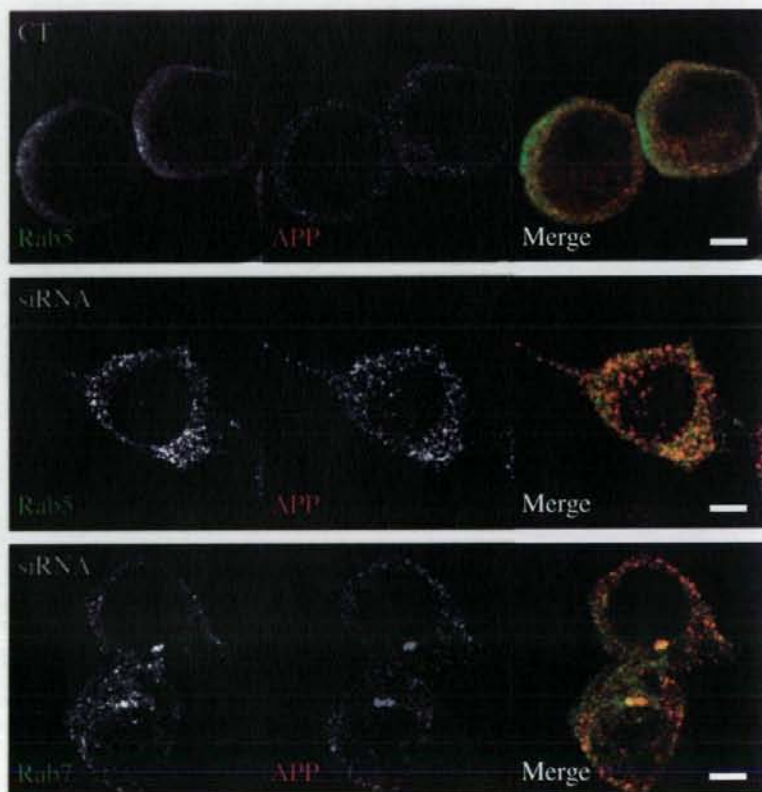
A



B



C



shRNA 発現ウイルスベクターの開発に関する研究

研究分担者 井上 誠

研究要旨：

モーター蛋白質ダイニンを標的とした shRNA 搭載 SIV ベクターの構築と生産を実施した。ヒト U6 プロモーターを Gene Transfer Vector に組み込み、ヒトダイニンに対する shRNA を発現するプラスミドベクターを構築した。このプラスミドベクターを用い、リン酸カルシウム法により SIV ベクターの生産を行った。培養上清を回収し、高速遠心により濃縮した後、リアルタイム PCR 法により SIV ベクターの RNA 力価の測定を行った。その結果、高力価の SIV ベクターを調製することができた。

A. 研究目的：

サル免疫不全ウイルス (SIV) ベクターを含むレンチウイルスベクターは、レトロウイルスベクターとは異なり、非分裂細胞に効率よく遺伝子導入できる。そのため、神経系細胞への遺伝子導入にも広く使用されている。また、導入遺伝子は宿主染色体に組み込まれ遺伝子発現が持続することから、長期にわたる shRNA や siRNA の発現にも適している。

本研究では、in vivo での軸索輸送障害メカニズムを検索するため、モーター蛋白質であるヒトダイニンを標的とした shRNA 搭載 SIV ベクターの構築と生産を実施した。

B. 研究対象および方法

(1) プラスミドの構築

ヒトダイニンを標的とした shRNA を搭載した Gene transfer vector は、pGTV-MCS のバックボーンを使用し構築した。ヒト U6 遺伝

子のプロモーター領域は、テンプレートとして 293T 細胞のゲノム DNA を使用し、PCR 法により増幅した。プライマーとして F1; 5'-TGGAATTCAAGGTCGGGCAGGAAGAGGGCCTA-3', R1; 5'-GGGTAAGCTTGGTGTTTCGTCCTTTCCACAAG-3 を使用した。PCR 産物を EcoRI および HindIII で消化し、pBluescriptII SK+ (Clontech) に挿入した。DNA シークエンスにより塩基配列の確認を行った結果、その配列は、Genbank accession number M14486 と一致した。このプラスミドをテンプレートとし、プライマー F1; 5'-TGGAATTCAAGGTCGGGCAGGAAGAGGGCCTA-3', R2; 5'-GGGTAAGCTTAAAAAGGGCCATTCGCGAATACCAGATTCGTCTGGTATTCGCGAATGGCCCGGTGTTTCGTCCTTTCCACAAG-3' を用い PCR により U6

プロモーター shRNA発現カセットを増幅した。PCR産物をEcoRIおよびHindIIIで消化した後、pGTV-MCSに挿入してpGTV/hU6-shRNA(dynein)を構築した。DNAシークエンスにより塩基配列の確認を行い、ベクター生産に使用した。

(2) ベクター生産およびRNA力価の測定

SIV ベクターは、リン酸カルシウム法により一過性に作製した。293T/17 細胞に 4 種類 の プ ラ ス ミ ド (pGTV/hU6-shRNA(dynein), PV 3rd, pVSVG, pCI-rev) をトランスフェクションし、2日後に培養上清を回収した。回収した培養上清は、0.45 μm のフィルターでろ過した後、遠心濃縮を行い、RNA 力価 (viral genomes/ml) を測定した。RNA 力価の測定は、濃縮した SIV ベクターから RNA ゲノムの抽出を行い、SYBR Green 検出によるリアルタイム PCR 法を用い分析した。

(倫理面への配慮)

本研究で使用している SIV ベクターは、アフリカミドリザルから単離した免疫不全ウイルス (SIVagm TY0-1 株) を基本骨格とし開発されたベクターである。SIVagm TY0-1 株は、サル免疫不全ウイルスの一種であるが、サルやヒトに対する病原性の報告はない。この点で HIV ベクターに比べて安全性が高く、環境に与える影響は少ない。さらに安全性を高めるために SIV で複製に関与する可能性のある遺伝子領域を欠失させている。レンチウイルスベクターの取り扱い扱いは P2 レベルでの取り扱いが認可されており、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法

律」に従って、「組換え DNA 実験指針」(平成4年1月31日付け文部科学省告示第5号)を遵守した実験操作法を行った。

C. 研究結果:

VSVG シュードタイプ shRNA(ヒトダイニン)搭載 SIV ベクターをリン酸カルシウム法により作製した。高速遠心により濃縮した SIV ベクターの RNA 力価は、 1.7×10^{11} viral genomes/ml であった。

D. 考察:

VSVG シュードタイプ shRNA(ヒトダイニン)搭載 SIV ベクターの生産は、問題なく実施可能であった。

E. 結論:

モーター蛋白質ヒトダイニンを標的にした shRNA 搭載 SIV ベクターの構築と生産を実施した。リン酸カルシウム法により SIV ベクターの生産を行った結果、高力価のベクターを調製することができた。

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

リン酸化・脱リン酸化バランスに注目した、軸索輸送の障害メカニズムに関する研究

研究分担者 根岸 隆之

研究要旨：

軸索輸送の障害は、アルツハイマー病（AD）のみならず筋萎縮性側索硬化症などの他の神経変性疾患においても確認されており、病態メカニズムとの関連性は少なくないと考えられている。これら疾患の大部分は加齢によって発症する孤発性タイプであり、正常動物においても加齢によって軸索輸送が低下することが知られているが、その障害メカニズムについては未だ不明な点が多い。そこで本研究では脳内加齢性変化の1つであるリン酸化・脱リン酸化バランスの障害に注目し、軸索輸送障害との関係について検索を行った。その結果、リン酸化亢進処理によって軸索輸送障害の指標でもある Rab7 GTPase の蛋白量増加とエンドソームの肥大化が再現された。このことから、加齢に伴うリン酸化・脱リン酸化バランスの障害が、軸索輸送障害を引き起こす原因の1つとなっ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）のみならず、ハンチントン舞蹈病や筋萎縮性側索硬化症など、他の神経変性疾患においても軸索輸送の障害が確認されている。また過去の検索において、加齢に伴い軸索輸送が低下していることを示唆する研究成果が多数報告されているが、何故加齢によって軸索輸送が低下するのかについては不明のままである。

我々はカニクイザル脳組織を用いた過去の検索において、軸索輸送の1つである retrograde を司る dynein と dynactin の機能的複合体の形成が加齢に伴い低下していることを発見した。Dynein と dynactin は、それぞれのサブユニット（dynein intermediate chain と P150dynactin）が結合することによ

り、dynein の持つモーター蛋白としての機能が発現することが明らかとなっているが、この両者の結合はリン酸化によって調節されている可能性が示唆されており、dynein intermediate chain (DIC) がリン酸化されることで dynactin との複合体形成が乖離すると考えられている。また、モーター駆動部としての機能を担当している dynein heavy chain (DHC) の ATPase 活性は、リン酸化を受けることでその活性が低下することが確認されており、dynein が有するモーター蛋白としての機能はリン酸化・脱リン酸化のバランスによって調節されている可能性が示唆されている。一方、AD 患者の脳組織では脱リン酸化酵素の1つである protein phosphatase 2a (PP2A) の活性が顕著に低下