

審査の結果の要旨

氏名 顧 擁軍

本研究はAD脳における神経原線維変化 (neurofibrillary tangles, NFT) に結合する collapsin response mediator protein-2 (CRMP-2) の解析と CRMP-2 による細胞骨格の動態についての検討をしたものであり、下記の結果を得ている。

I. AD脳における神経原線維変化に結合する3F4抗原は過剰にリン酸化されたCRMP-2であることが明らかになった。

1. AD患者脳より部分精製したPHFを抗原として作製されたモノクローナル抗体であり 3F4 は、COS-7 細胞に強制発現させた 62 kDa のヒト CRMP-2 と反応せず、脳可溶性画分に存在する 66 kDa のバンドだけと反応した。CRMP-2 に対する特異的なモノクローナル抗体を用いてラット脳可溶性画分から免疫沈降した CRMP-2 画分中には 3F4 と反応する 66 kDa のバンドが存在した。一方、immunoaffinity法により精製した 3F4 抗原を、特異的なモノクローナル抗体で検出すると、66 kDa の強いシグナルおよび 62 kDa の弱いシグナルが観察された。これらの結果より、3F4 抗原はメジャーなアイソフォーム (62 kDa) と異なった CRMP-2 であることが考えられた。

2. AD脳より調製したNFTを 65 °C においてアルカリホスファターゼ (AP) 処理をしたところ、3F4 の免疫原性は著しく減弱した。さらに、ラット脳の可溶性画分を 37 °C でインキュベートすると、元来存在した3F4の反応性は消失した。プロテインホスファターゼ PP-1 と PP-2A に対する阻害剤のオカダ酸と microcystin-LR および非特異的なホスファターゼ阻害剤のリン酸塩とピロリン酸塩を添加すると、3F4の免疫原性は減少しなかった。これらのことから、3F4 抗原はリン酸化された CRMP-2 であると考えられた。

3. ラット脳から 62 kDa と 66 kDa の CRMP-2 をそれぞれ精製し、CNBr を用いて Met の部位で化学切断した。ウェスタンブロットの結果により、3F4 のエピトープは CRMP-2 の最C末端の135アミノ酸残基の領域に局在することがわかった。

この最C末端の135アミノ酸残基の断片をリシルエンドペプチダーゼで切断し、その断片を質量分析器で分析した。アミノ酸残基505-525において二箇所以上の部位がリン酸化されているらしいことがわかった。そこで、上記の領域を含むペプチド(アミノ酸残基486-528)とGSTの融合タンパク質を作製した。この融合タンパク質を基質として、*in vitro*でラット脳可溶性画分によるリン酸化を試みたところ、3F4のエピトープが形成された。

3F4の結合に必要なリン酸化残基を同定するために、486-528アミノ酸残基の領域における9つのSerとThr残基をそれぞれAlaに置換し、それぞれの変異体融合タンパク質を作製した。*In vitro*リン酸化により、全ての変異体で3F4エピトープが生じたが、Thr509、Ser518及びSer522三つの変異体では、3F4の結合活性は、野生型の1/6から1/4に過ぎなかった。以上の結果から、Thr509、Ser518およびSer522の3つの部位が同時にリン酸化されることが3F4の完全な抗体反応性に必要と推測した。さらに二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動(2D-PAGE)を用いてウェスタンブロットの結果はこの見解を支持した。

## II. CRMP-2 は微小管の動態を調節することが示唆された。

CRMP-2の作用機構を解明するために、神経細胞芽腫Neuro2a内にヒトCRMP-2を強制発現させた。CRMP-2強制発現によって、細胞質のblebbingが発生した。ときに核内封入体が形成され、それはCRMP-2とチューブリンに対する抗体で強く染色された。また分裂期における紡錘体とmidbodyはCRMP-2に対する抗体により染色され、CRMP-2は微小管束と密接に関係することが示唆された。封入体の形成はCRMP-2による微小管の安定化または脱重合不全に起因すると考えられた。これらの結果から、CRMP-2は微小管の動態を調節することが示唆された。

以上、本論文は、AD脳の神経原線維変化に結合する3F4抗原は、過剰にリン酸化されたCRMP-2であることを明らかにした。そして、CRMP-2は微小管の動態を調節することが示唆された。本研究は、AD脳における神経変性過程への理解につながると考えられる。さらに、CRMP-2のシグナル伝達を介する分子作用機序に関する新知見を与えるものであり、学位の授与に値するものと考えられる。