

論文の内容の要旨

論文題目 老人斑アミロイド結合蛋白質 CLAC が A β の蓄積と毒性に及ぼす影響

氏名 長田 祥秀

アルツハイマー病 (AD) の脳には、神経細胞脱落に加えて、老人斑、神経原線維変化という2種類の病理学的変化が出現する。老人斑はアミロイド β ペプチド (A β) からなるアミロイド線維の細胞外蓄積がその本態であり、老人斑の形成はADの最初期病変であること、家族性ADに連鎖した病因遺伝子変異は A β の産生もしくは凝集を亢進させること、線維化した A β は神経細胞毒性を示すことなどの知見から、A β を AD 発症の原因と考える「アミロイド仮説」が支持されている。

CLAC (collagenous Alzheimer amyloid plaque component) は老人斑に蓄積する主要な非 A β 成分の1つである。CLAC は神経細胞特異膜結合コラーゲンである CLAC 前駆体蛋白 (CLAC-P) が furin により切断を受け、分泌された細胞外部分 (sCLAC) がアミロイドに結合・蓄積したものである (図 1)。CLAC は AD 脳に豊富な原始老人斑に多量に蓄積するが、初期のびまん性老人斑や進行期に出現する典型的アミロイドには少ないという特異な性質を示す。これらの観察結果から、CLAC は A β の蓄積過程に作用し、老人斑アミロイドの蓄積や AD の発症に影響を及ぼす可能性が考えられてきた。

私はこれまでに sCLAC と A β の *in vitro* 結合実験系を確立し、sCLAC と線維化 A β が静電的な

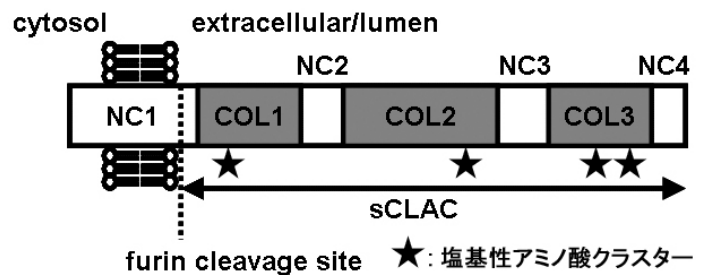


図1. CLAC-Pの構造

相互作用により結合することを明らかにした。そこで CLAC と A β の関係をさらに解明するため sCLAC と A β の結合にかかわるサブドメインの同定、sCLAC が A β の細胞毒性に与える影響の解析を行い、さらに CLAC が A β の蓄積に及ぼす影響を *in vivo* で検討するために、複眼に A β を蓄積するトランスジェニックショウジョウバエを作成し、組織学的解析を行った。

1. sCLAC と A β の結合領域の同定

これまでの検討で、CLAC-P 恒常発現 HEK293 細胞の培養上清中に分泌された sCLAC が線維化 A β と結合することを *in vitro* A β 結合アッセイにより確認した。CLAC-A β の結合は塩濃度依存的な解離を示すことから、静電的相互作用によるものと考えられた。そこで sCLAC の A β 結合領域として、CLAC-P のコラーゲン様 Gly-X-Y 配列内に存在する塩基性アミノ酸クラスターに注目した。CLAC-P には COL1 領域、COL2 領域に各 1 ヶ所、COL3 領域に 2 ヶ所塩基性アミノ酸クラスター領域が存在する (図 1)。そこでそれぞれの領域のリジン及びアルギニン残基をプロリンに置換した CLAC-P 変異体を作成し、*in vitro* A β 結合アッセイにより NaCl 添加による結合阻害のパターンを解析した。その結果 COL2、COL3 変異体では、NaCl 添加による結合阻害曲線は野生型と変わらなかったのに対し、COL1 領域 (126 GKRGRGRR 134) の変異体では、低濃度の NaCl 添加により両者の結合が阻害され、A β との結合能が消失した (図 2)。この結果から COL1 領域の塩基性アミノ酸クラスターが A β との結合に重要な役割を果たすことがわかった。

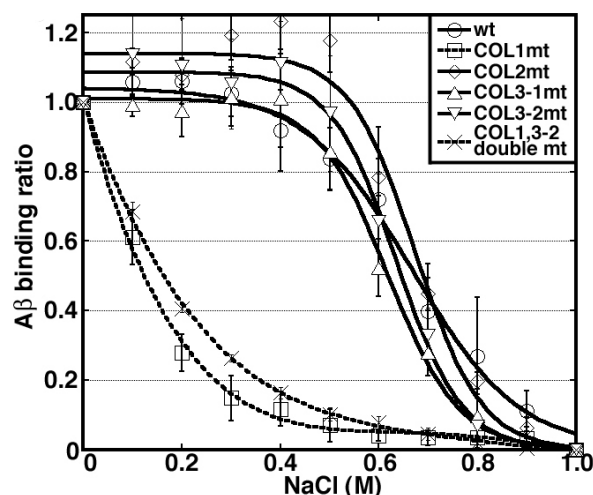


図 2. 変異型 sCLAC と A β の結合の塩濃度感受性

次に様々な長さの A β 部分ペプチドを用いて、A β 配列内に存在する sCLAC との結合領域の同定を試みた。sCLAC を予め線維化した A β (1-42) ペプチドとプレインキュベートした後に *in vitro* A β 結合アッセイを行うと、フリーの sCLAC は減少し、固相上に固定した線維化 A β との結合は減少した。しかし A β (17-42) ペプチドは線維形成するにもかかわらず sCLAC と結合しなかった。この結果から、酸性アミノ酸が豊富な A β のアミノ末端側 (1-16) が sCLAC との結合に重要であることが示唆された。

2. sCLAC の結合が線維化 A β の細胞毒性に及ぼす影響

線維化した A β は神経細胞ならびに各種の非神経細胞に対し毒性を発揮することが示されている。sCLAC は線維化した A β と特異的に結合することから、A β の細胞毒性に何らかの影響を与える可能性を想定した。そこで精製 sCLAC が、HEK293 細胞に対する A β の毒性に及ぼす影響を検討した。

予め線維化させた 1 μ M の A β に 10 nM の精製 sCLAC を結合させた後、HEK293 細胞に添加し、24 時間後の細胞生存率を MTT アッセイ法で解析した。その結果、細胞生存率は線維化 A β 単独投与の場合には約 60% に減少したが、sCLAC の添加により約 80% まで回復した (図 3)。sCLAC による細胞生存の改善は、1 mM の過酸化水素添加による細胞毒性に対しては見られなかった。さらに A β との結合能を持たない COL1 変異体ではこの効果は約 70% に減弱した (図 3)。これらの結果から、sCLAC の抗 A β 毒性効果は、sCLAC と A β の結合を介するものと考えられた。

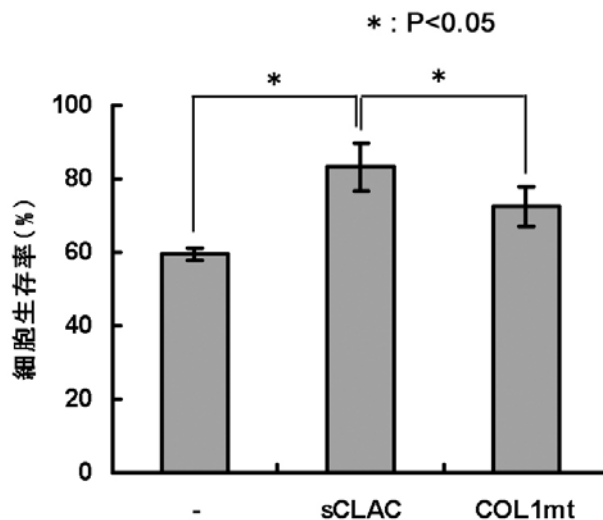


図 3. sCLAC が A β 毒性に及ぼす影響

3. 複眼に β アミロイド蓄積を生じるトランスジェニックショウジョウバエの作出と CLAC がアミロイド斑形成に及ぼす影響の検討

CLAC をはじめとする非 A β 老人斑構成成分がアミロイド蓄積に及ぼす影響を *in vivo* で評価することを目的に、複眼に β アミロイド蓄積を生じるトランスジェニックショウジョウバエ (Tg fly) を作出して検討した。

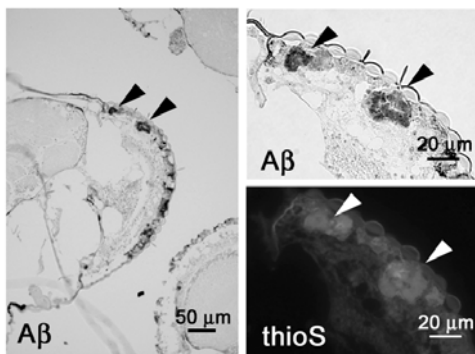


図 4. Tg fly 複眼における β アミロイド斑形成

ショウジョウバエは A β 前駆体蛋白 APP および A β のアミノ末端切り出し酵素 BACE を内因性に持たない。そこで Gal4-UAS システムを用いてヒト APP、ヒト BACE、さらに A β 蓄積を促進するために家族性 AD 変異型ショウジョウバエ presenilin (Psn) の 3 遺伝子を複眼特異的に発現する Tg fly を作出した。48 日齢の Tg fly 複眼を抗 A β 抗体で免疫染色すると、陽性を示す斑状構造物の出現が認められた (図 4)。この構造物は β シート構造を認識する蛍光色素 thioflavin S に陽性を示すことから、 β アミロイドと考えられた (図 4)。次に CLAC-P、または代表的な老人斑非 A β 成分であり、*in vivo* でアミロイド形成の促進効果が知られる apolipoprotein E (apoE) を複眼に過剰発現する Tg fly を作出し、APP, BACE,

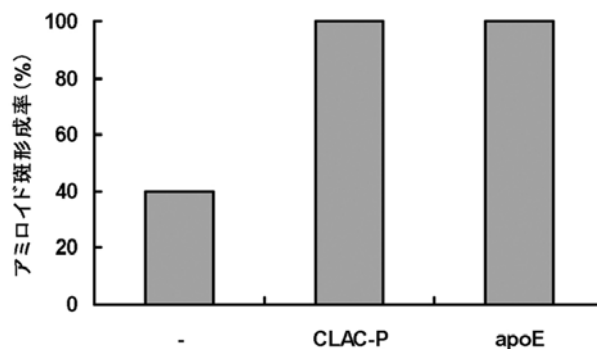


図 5. β アミロイド斑形成個体の比率 (40 日齢)

Psn3 重発現 Tg fly と交配した。得られた 4 重 Tg fly の複眼を 40 日齢で観察すると、CLAC または apoE の共発現により β アミロイド斑の出現個体の頻度は上昇した(図 5)。このとき APP、BACE、Psn の蛋白発現量は変化しておらず、CLAC あるいは apoE の発現が $A\beta$ の蓄積を促進したものと考えられた。

本研究において私は、sCLAC と線維化 $A\beta$ が、sCLAC の COL1 領域に存在する塩基性アミノ酸クラスターと $A\beta$ のアミノ末端を介して静電的に結合することを *in vitro* の結合実験から実証した。そして sCLAC は $A\beta$ 線維との結合を介して、 $A\beta$ の細胞毒性を阻害することを明らかにした。さらに Tg fly を用いた *in vivo* の検討により、CLAC あるいは apoE が β アミロイド斑形成を促進することを示した。

これらの結果から、AD 脳の老人斑において β アミロイドと共存する CLAC は、線維化した $A\beta$ に結合することにより、その毒性を緩和すると同時に、 $A\beta$ の老人斑への隔離 (sequestration) を促す因子である可能性が示唆される。今後 Tg fly を用いた遺伝学・病理学的検討により、 $A\beta$ 細胞毒性のメカニズム、ならびに CLAC の病的機能を明らかにしてゆきたい。