

氏 名（本籍）	近 藤 威 史 <small>こん どう たけ ふみ</small>
学位の種類	博 士（医 学）
学位記番号	医 博 第 1 2 9 4 号
学位授与年月日	平 成 8 年 3 月 26 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）内科学系専攻
学位論文題目	胎児脳に発現しているアルツハイマー病関連遺伝子に関する研究

（主 査）

論文審査委員 教授 糸 山 泰 人 教授 佐々木 英 忠
教授 北 本 哲 之

論 文 内 容 要 旨

これまでに胎児型チュブリン、胎児型微小管結合タンパク質、胎児型ガングリオンド等の胎児性分子がアルツハイマー病脳の変性部位で発現増強されていることが報告されてる。これらの分子は、老人斑、変性軸索、変性ニューロン等に局在する事から、アルツハイマー病の神経変性の分子機構に神経の発生分子機構と同様の機構が存在することが示唆される。本研究ではアルツハイマー病で発現増強する胎児性遺伝子を分子生物学的手法を用い検索・同定し、アルツハイマー病での発現様式を解析する事により、神経変性と神経発生の共通分子機構を明らかとし、アルツハイマー病における胎児性分子の発現の病的意義を明らかにする事を研究の目的とした。

アルツハイマー病脳由来の cDNA ライブラリーを使用すると、グリア線維性酸性タンパク質 (GFAP) 遺伝子、およびチュブリン遺伝子がディファレンシャル・スクリーニングの過程で優先的に陽性クローンとして選択されるために 1 次性の神経変性に関連した遺伝子発現を検索できないことが報告されている。従って、本研究では、胎生 15 日のラット胎児脳より作製した cDNA ライブラリーを更にサイズ分画し、GFAP 遺伝子およびチュブリン遺伝子を含まない、ニューロン由来の遺伝子が高率に含まれている cDNA ライブラリーを作製した。この cDNA ライブラリーを使用しアルツハイマー病脳および対照脳より抽出した mRNA より ^{32}P 標識 cDNA プローブを調製しディファレンシャル・スクリーニングを行った。対照脳に比べ発現増強を示す 17 個の遺伝子をディファレンシャル・スクリーニングし、これらの遺伝子の部分塩基配列を決定した。その結果、これらの遺伝子を胎児型 α -チュブリン遺伝子、胎児型 β -チュブリン遺伝子、hnRNP 遺伝子、L-イソアスパラギン酸メチル基転移酵素 (Protein L-isoaspartyl methyltransferase ; PIMT) 遺伝子、フェリチン重鎖遺伝子、タイプ IV コラーゲン遺伝子、アクチン結合タンパク・コフィリン遺伝子、アクチン結合タンパク・プロフィリン遺伝子、および 9 個の新規遺伝子であると同定した。これらの分子の中から特に老化に関連すると言われている PIMT のアルツハイマー病での発現を、特異抗体を用いた免疫組織化学法、あるいは特異的遺伝子プローブを用いた RNA プロテクション・アッセイ法およびノザン法で解析した。

まずアルツハイマー病 7 例、正常対照症例 8 例、ダウン症候群幼児症例 1 例の剖検脳における PIMT の遺伝子発現をリボヌクレアーゼプロテクションアッセイ法で解析した。リボプロテクションアッセイで得られた PIMT の相対的発現量を平均化すると、アルツハイマー病脳では、正常対照群に比べて 1.5 倍に増加していることが明らかとなった。またダウン症の幼児の剖検脳においても PIMT の遺伝子発現は増加していた。ダウン症候群では、老人斑・神経原線維変化等のアルツハイマー病と同様の病理所見が早期に発生することが知られている。本症例では幼児例で

アルツハイマー病の病理変化は認められないが、そのような極めて早期のステージにおいても PIMT の発現が上昇していることは興味深い事実であった。

次に PIMT の細胞レベルでの局在を探る目的で、特異的抗体を作成し、アルツハイマー病剖検脳を用いた免疫組織学的検索を行った。抗 PIMT 抗体はアルツハイマー神経原線維を含む神経細胞体内封入体と老人斑内変性神経突起を濃染した。更に共焦点レーザー顕微鏡観察法を用いて PHF 成分との分子レベルでの関係を検索した。抗 PIMT 抗体がウサギポリクローン抗体であるので、対となる抗 PHF 抗体として単クローン抗体である抗ユビキチン抗体や抗 MAP5 抗体を用いた。その結果 PHF 構成成分と PIMT とが一致した分布を示していることがわかった。更に注意深く観察したところ、PIMT は PHF の周辺に局在していることが示された。これらのことより、アルツハイマー神経原線維は PIMT の標的として、あるいは基質として存在していると考えられる。PIMT の酵素活性がラセミ化した異常タンパク修復にあることを考慮すると、アルツハイマー神経原線維が高度にラセミ化した細胞内異常蓄積構造物であることが示唆される。つまり、ラセミ化反応はアルツハイマー神経原線維の形成後に生じる変化であると考えられる。アルツハイマー病の脳内異常蓄積物質に関する研究は数多くの文献的考察があるが、アルツハイマー神経原線維の異常性についてユビキチン化共有結合とラセミ化反応はこれまで知られてきた翻訳後修飾である異常リン酸化とタウ断片化に加えて新たに確立した知見であると結論される。

審査結果の要旨

これまでに胎児型チュブリン、胎児型微小管結合タンパク質、胎児型ガングリオシド等の胎児性分子がアルツハイマー病脳の変性部位で発現増強されていることが報告されている。これらの分子は、老人斑、変性軸索、変性ニューロン等に局在する事から、アルツハイマー病の神経変性の分子機構に神経の発生分子機構と同様の機構が存在することが示唆される。本研究はアルツハイマー病で発現増強する胎児性遺伝子を分子生物学的手法を用い検索・同定し、アルツハイマー病での発現様式を解析する事により、神経変性と神経発生の共通分子機構を明らかとし、アルツハイマー病における胎児性分子の発現の病的意義を明らかにする事を研究の目的としたものである。胎生 15 日のラット胎児脳より作製した cDNA ライブラリーを作製、アルツハイマー病脳より抽出した mRNA より ³²P 標識 cDNA プローブを調製し、ディファレンシャル・スクリーニングを行った。そして、対照脳に比べ発現増強を示す 17 個の遺伝子をディファレンシャル・スクリーニングしこれらの遺伝子の部分塩基配列を決定した。その結果、これらの遺伝子を胎児型 α -チュブリン遺伝子、胎児型 β -チュブリン遺伝子、hnRNP, L-イソアスパラギン酸メチル基転移酵素 (Protein L-isospartyl methyl transferrase ; PIMT) 遺伝子、フェリチン重鎖遺伝子、タイプIVコラーゲン遺伝子、アクチン結合タンパク・コフィリン遺伝子、アクチン結合タンパク・プロフィリン遺伝子、および 9 個の新規遺伝子であると同定した。これらの分子の中から特に老化に関連すると言われている RIMT のアルツハイマー病での発現を、特異抗体を用いた免疫組織化学法、あるいは特異的遺伝子プローブを用いた RNA プロテクション・アッセイ法およびノザン法で解析した。その結果、アルツハイマー病脳では、正常対照群に比べて 1.5 倍に増加していることが明らかとなった。またダウン症の幼児の剖検脳においても PIMT の遺伝子発現は増加していた。次に PIMT の細胞レベルでの局在では抗 PIMT 抗体はアルツハイマー神経原線維を含む神経細胞体内封入体と老人斑内変性神経突起を濃染したことより、アルツハイマー神経原線維は PIMT の標的として、あるいは基質として存在していると考えられる。

本研究によりアルツハイマー神経原線維の異常性についてユビキチン化共有結合とラセミ化反応はこれまで知られてきた翻訳後修飾である異常リン酸化であるとの新たな知見であると結論され、学位に値するものとする。