## 生命・生物工学に基づく健康と疾患の研究グループ

## アルツハイマー病における amyloid beta protein(A $\beta$ )と 危険因子 ApoE4 遺伝子の検出と診断法への応用

神野 英毅 (応用分子化学科)

### 1.緒言

アルツハイマー病(Alzheimer disease: AD)は、脳が次第に萎縮していくに従い、知能、身体全体の機能が衰えていき、ついには死に至る病である。初発症状は、いわゆる「物忘れ」や、意欲が乏しくなったり、周囲への興味や関心がなくなるといった人格変化であり、末期になると言語の疎通も日常生活も障害され、寝たきり状態となる。発病年齢によってその羅病期間も様々だが、約 10~15年の経過で、合併症が直接的な死因となる。

AD は、amyloid  $\beta$  protein (A $\beta$ )、タウ蛋白、アポリポ蛋白(ApoE)が関係している。

ApoE は主にコレステロールや他の脂質の輸送に関する血漿蛋白であり、その遺伝子は 19p13.2(Fig.1)にコードされている。ApoE 遺伝子には  $\epsilon$  2,  $\epsilon$  3,  $\epsilon$  4 の 3 つの対立遺伝子 (アリル)(蛋白質では E2,E3,E4 のアイソフォーム)があり、その中でも、  $\epsilon$  4 アリル(E4)がアルツハイマー型痴呆症の危険因子であることが明らかとなっている。この、ApoE4 は  $A\beta$  と結合することで AD 発症の原因の一つである  $A\beta$  の凝集性を増加させ、アミロイド 繊維化を促進させることがわかっている。

また、 $A\beta_{1-42}$ は、 $A\beta$  タンパク前駆体から  $\beta$  および  $\gamma$  セクレターゼが働くことにより脳内で生成され、42 のペプチドが会合したタンパクであり、毒性を惹起することが知られている。このタンパクが蓄積することにより脳内の神経細胞が破壊され、AD が発症すると考えられている。

AD 患者における Aβ<sub>1-42</sub> の構造は、毒性の 低い線維状のものが集合した凝集体である と考えられている。。

そこで本研究では、AD の危険因子である E4遺伝子と amyloid beta protein(Aβ)に注目した。E4 遺伝子においては、遺伝子検出薬を

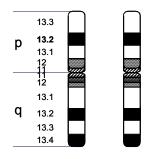


Fig. 1 Chromosome 19

開発し、AD の迅速診断を可能とさせ、早期に治療を開始できるようにすることを目的とし、本発表では、ApoE4 の遺伝子診断に用いるプライマーの特異性および PCR の条件検討と、Latex 試薬の作製について報告する。さらに、AD 患者における  $A\beta_{1-42}$  の構造は、毒性の低い線維状のものが集合した凝集体であると考えられている。本研究では、凝集体  $A\beta_{1-42}$  を検出することを目的とし、今回、その前段階として、凝集体  $A\beta_{1-42}$  を作製し、その毒性をラット胎児海馬神経細胞を用いて検討したので報告する。

## 2. 実験材料と方法

### 2-1. E4 遺伝子の検出

(1) PCR による Target 遺伝子の増幅とシークエンサーによる塩基配列の確認

血液から鋳型となる白血球 DNA の抽出を GFX Genomic Blood DNA Purification Kit(GE Healthcare)を用いて行った。抽出した DNA の吸光度を波長 260nm と 280nm で 測定し、純度を以下の式(1)で求めた。

純度=A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> (1)

この抽出 DNA より PCR を行い Target 遺 伝子の増幅を行った。

PCR を行うにあたって、設計したプライマーの塩基配列を Table.1 に示す。

反応は  $94^{\circ}$ :  $5\min \times 1 \text{cyc} \rightarrow (94^{\circ}\text{C}: 1.5 \text{min},$ 

 $62\,^\circ$ : 1.5min,  $72\,^\circ$ : 1.5min)  $\times$  30cyc  $\rightarrow$   $72\,^\circ$ : 10min  $\times$  1cyc の温度条件で PCR を行なった。得られた PCR 産物を 2.0%アガロースゲルで電気泳動を行った。 EtBr で染色した後、紫外照射用ポラロイドカメラを利用してゲルを撮影した。

得られたバンドには非特異的なバンドが見られたため、SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)を用いて精製した。精製前、と精製後の結果を Fig.3 に示す。その後、遺伝子解析システム CEQ8800 (BECKMAN COULTER)でサンプルの塩基配列を確認した。

## (2) GMA(Glycidyl methacrylate)修飾 Latex の作製

DNA 感作にあたって、GMA-Latex が必要となる。そのため文献に従い GMA-Latex を作製した。作製した Latex を KBr 錠剤法にて FT-IR(Bruker Optics)で測定した。測定条件を以下に示す。測定レンジ 400-4000cm<sup>-1</sup>、分解能 4cm<sup>-1</sup>、積算回数 200 回で測定した。測定後、非修飾 Latex と GMA 修飾 Latex の違いについて検討した。<sup>1)</sup>

### 2-2. Aβ 検出のための研究方法

### (1) 凝集体 Aβ<sub>1-42</sub> の作製<sup>2)</sup>

 $A\beta_{1.42}$  は、Fmoc 固相合成法により合成したアミノ酸残基 42 個のポリペプチドを用い

た。 $1.0 \, \mu M$  の  $A\beta_{1.42}$  溶液  $50 \, ml$  を 調製し、 $4 \, \mathbb{C}$ で  $30 \, \mathcal{O}$ 間インキュベートした。その後、溶液を  $2 \, \mathrm{G}$  希釈して  $0.5 \, \mu M$  に調製し、反応促進性を持つ  $A\beta_{16.20}$  を加え、ロータリーエバポレーターで  $8\sim 10$  時間( $4 \, \mathbb{C}$ )ゆっくりと回転させた。

反応後、混合物を $0.65~\mu$ mのフィルターでろ過し、ろ液を20-kDaの限外ろ過により分離し、さらに超遠心分離し、さらに超遠心分解離(4~C,  $86,000\times g$ , 16~h)を行い、凝集 $A~\beta$ の精製物を、 $\beta$ の精製物を、原

子間力顕微鏡(AFM)(日本電子㈱)により 観察した。 $A\beta_{1-42}$  凝集体の固定化は、雲母片 上に固定化を行った。精製後  $A\beta_{1-42}$  を雲母片 上に滴下し、乾燥後、純水で洗浄し、再び乾 燥させた。その固定化  $A\beta_{1-42}$  凝集体の表面形 状を捕えた。

# (2) ラット胎児海馬神経細胞を用いた毒性試験

ラットの胎児脳より海馬部分を取り出し、10% FCS を含んだ MEM 培地に入れ、メッシュ上で単細胞化し、ラット胎児海馬神経細胞の初代培養を行った。海馬神経細胞に対する毒性の変化を比較するため、ラット胎児海馬神経細胞培養の3 日後、その培地に0.5  $\mu$ M 凝集前  $A\beta_{1.42}$  および凝集させた  $A\beta_{1.42}$  をそれぞれ 50  $\mu$ l 加え、その変性状態を顕微鏡で観察した。

### 3. 結果および考察

### <u>3 -1. E4 遺伝子の検出</u>

#### (1) 血中からの E4 遺伝子の検出

測定した吸光度の結果を Table.2 に示す。 得られた吸光度の値から、DNA の純度を求めた。

### $A_{260}/A_{280} = 1.6$

純度の高いものは、 $A_{260}/A_{280} = 1.8 \sim 2.0$  であり、やや純度の低いものとなった。様々なプ

Table 1. Sequence of Primers for ditection ApoE gean

Primer	Sequence(5'-3')
PA1 PA2 PA3 PA4 PA5 NPE1	CGCGGACATGGAGGACGTG GCCCATCTCCTCCATCCGC GGCCTGCTCCTCCAGCTTG CACACTCGTCCTGGCTCTGTC GCGGTACTGCACCAGGCGGC ATCCCCATCTCGCCCCCCCCCC
NPE2	CGTGGGGTCGCATGGCTGCAGGCTTCGGCGTTC

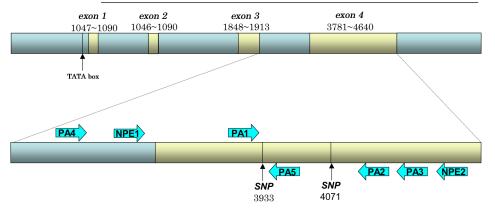


Fig. 2 The location of Primers on ApoE gene.

ライマーを用いて検討した結果、PA1,PA2 の組み合わせで目的部位と思われるバンドを検出した(Fig. 3)。しかし、非特異的なバンドも検出されたため、精製を行いシークエンス解析をおこなった。その結果を Fig. 5 にしめす。配列の比較をおこなったところ、目的部位ではなく5番染色体の一部が増幅していることがわかった。そのため、再度条件の検討見直しが必要である。

(2) 遺伝子検出のための Latex 試薬の作製 作製したエポキシ基を持つ Latex 粒子の FT-IR 測定結果を Fig. 4 に示す。文献 <sup>1)</sup>より オキシランの吸収は910cm<sup>-1</sup>に現れることが わかっている。測定の結果、907cm<sup>-1</sup> に吸収 が得られた。さらに、3300cm<sup>-1</sup>付近にブロー ドな吸収が見られることから-OH 基の存在 が考えられる。文献値よりわずかに低波数シ フトしていることから、オキシラン環が、こ の-OH 基の影響を受けていると考えられる。 また-OH 基の吸収が見られた原因として、反 応系に水が残っており、この水分子がオキシ ラン環の活性メチレンに求核攻撃を行うこ とで起こるオキシラン環の解裂に伴いジオ ールの形として現れたものだと考えた。 た、シフトの幅が僅かなことから、全てのオ キシラン環が解裂したわけではなく一部の ものが解裂してしまったと考えられる。

## 3-2. Aβ 検出のための凝集体作製とその細胞 毒性の検討

### (1) AFM による Aβ<sub>1-42</sub> の表面画像観察

713 CGGGCCCGNGNNNAANNNCNTT

リン酸緩衝液にて回転培養を行い凝集体を形成させた結果を AFM にて形態の観察を行った。AFM の画像測定では、雲母片上に精製後  $A\beta_{1-42}$  を滴下させることにより精製物を固定化し、その  $A\beta_{1-42}$  凝集体の表面形状を捕えた。その結果を Fig. 6 に示す。精製物は球状であることが観察された。また、その凝

集体の平均粒径は約 250 nm であった。凝集体が球状であること、また、凝集前  $A\beta_{1.42}$ は測定が不可能だったことから本実験操作により凝集体を形成することが確認できた。

(2) ラット胎児海馬神経細胞を用いた Aβ<sub>1-42</sub>の 毒性試験

ラット胎児海馬神経細胞に凝集後 Aβ<sub>1-42</sub> を

Table 2. Determination of absorbance

	260(nm)	280(nm)
Blank	0.056	0.044
Sample	0.12	0.075

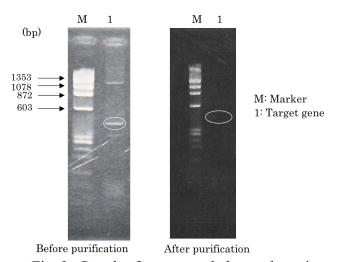


Fig. 3 Result of agarose gel electrophoresis and its purification

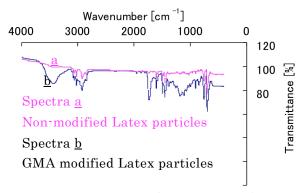


Fig. 4 FT-IR spectra pf Latex particles

Fig. 5 DNA sequence by CEQ8800

加えてから 3 日後の 神経細胞は、成長し ていないことが電子 顕微鏡により確認で きた。一方、凝集前 Aβ<sub>1-42</sub> を同様に加え た神経細胞は、成長 が促進されているこ とが確認された。し たがって、神経細胞 は、 $A\beta_{1-42}$ によって破 壊されたということ が考えられ、 $A\beta_{1-42}$ の 構造の変化を示すも のであると考えられ る。

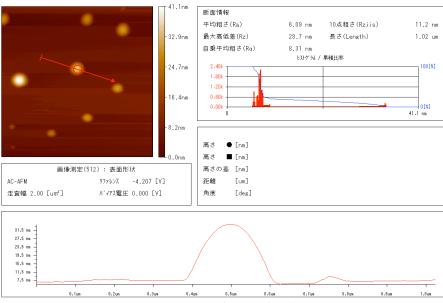


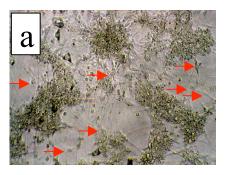
Fig. 6 Image of  $A\beta_{1-42}$  by AFM

### 4. 今後の展開

ApoE 遺伝子に関する研究では、迅速に診断を行うことを目的とし、遺伝子のハイブリダイゼーションを用いたラテックス試薬の凝集反応の検討を行っている。

 $A\beta_{1-42}$  に関する研究では、毒性ある凝集  $A\beta_{1-42}$  の作製が可能であることが確認できたため、その凝集  $A\beta_{1-42}$  の物性測定と凝集  $A\beta_{1-4}$  の抗体の作製を行う。

- 1) Evrim Banu Altintas *et al.*, International Journal of Biological Macromolecules 38 (2006) 99-106
- 2) Minako.H *et al.* PNAS. 100, 6370-6375, (2003)



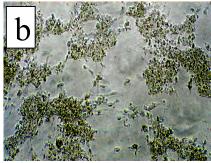


Fig. 7 Micrograph of cell.
a: before addition of Aβ<sub>1-42</sub> coagula,
b: after addition of Aβ<sub>1-42</sub> coagula