

A $\beta$ <sub>1-42</sub> 遺伝子を発現させたラット胎児海馬初代培養細胞の抗 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 抗体による免疫染色

日大生産工 (院) ○清水 武則  
産総研 落石 知世  
日大生産工 小森谷 友絵

## 【緒言】

アルツハイマー病の原因と考えられている物質の一つに Amyloid beta protein (A $\beta$ )がある。A $\beta$  は、脳内で生成されるタンパク質であり、凝集、蓄積することによりアルツハイマー病を引き起こす。A $\beta$  は、APP より切断される酵素の違いにより主にアミノ酸残基 40 (A $\beta$ <sub>1-40</sub>), アミノ酸残基 42 (A $\beta$ <sub>1-42</sub>)が存在する。このうち、A $\beta$ <sub>1-42</sub> は非常に細胞に対する毒性が高く、様々な凝集体が存在する。その凝集体をとられるために我々はこれまで 0.22  $\mu$ m 以上のサイズの large oval aggregates (LOA), 約 50 nm のサイズの可溶化 A $\beta$ <sub>1-42</sub> を作製し、それぞれに対するモノクローナル抗体を作製しその反応性を ELISA により検討してきた<sup>1)</sup>。我々が作製した各種凝集 A $\beta$ <sub>1-42</sub> は、ペプチド合成した A $\beta$ <sub>1-42</sub> を凝集させたものであり、実際に細胞内に存在する A $\beta$ <sub>1-42</sub> とは言えない。そこで、これまでに作製した各種凝集 A $\beta$ <sub>1-42</sub> に対するモノクローナル抗体の有用性を評価するため、細胞内の A $\beta$ <sub>1-42</sub> に対する反応性を免疫染色により観察し、それらのモノクローナル抗体の反応性の違いを比較検討した。

## 【実験方法】

## 1. Lipofection 法によるラット胎児海馬初代培養神経細胞へのトランスフェクション

myc 標識した A $\beta$ <sub>1-42</sub> 組換え DNA 3  $\mu$ g をチューブに入れ、150  $\mu$ l の Opti-MEM (GIBCO) を添加し軽く混合した。別のチューブに 150  $\mu$ l の Opti-MEM を入れ、3  $\mu$ l の Lipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen) を添加し、軽く混合し、それぞれを 5 分間インキュベートした。2 つの溶液を混合し、20 分間インキュベートした (DNA/Lipofectamine)。ラット胎児海馬初代培養細胞の培養液を 1.5 ml/well を残して除去し DNA/Lipofectamine 300  $\mu$ l/well を添加し、2~3 時

間 0.5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養した。その後、培地交換を行い、細胞観察を行った<sup>2)</sup>。

2. 多重染色による A $\beta$ <sub>1-42</sub> の細胞内動態観察

遺伝子を導入して 24 時間~27 時間後の培養神経細胞から培養液を除去し、PBS を 2 ml/well 添加し、洗浄した。細胞固定液 4% Paraformaldehyde/4% Sucrose solution を 2 ml/well 添加し、15 分間インキュベートした後、固定液を除去し、PBS で 2 回洗浄後、0.25% Triton X-100 を 2 ml/well 添加し、5 分間インキュベートした。その後、PBS で 5 分間インキュベートし、これを 3 回繰り返した。ブロッキング剤として、3% Normal Goat Serum/PBS (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA) を 2 ml/well 添加し、30 分間インキュベートした。1 次抗体として LOA に対する 31-2 モノクローナル抗体、可溶化 A $\beta$ <sub>1-42</sub> に対するモノクローナル抗体の中から一番反応性の高い 79-3 モノクローナル抗体、それ以外の 75-2 抗体を選びそれぞれ 3% Normal Goat Serum で 10000 倍希釈しさらにそれぞれの溶液に myc-Tag ポリクローナル抗体 (Cell Signaling Technology) を 400 倍希釈し混合した。パラフィルム上に抗体混合液を滴下し、カバーガラス上の細胞が下になるように抗体混合液の上にかぶせ、4  $^{\circ}$ C、16 時間反応させた。その後、細胞を PBS で 5 分間インキュベートし、3 回洗浄した。2 次抗体として、Alexa 568 標識 goat anti-mouse IgG 抗体 (Molecular Probes) を 3% NGS/PBS により希釈した溶液を調製し、1 次抗体反応時と同様にパラフィルム上で 2 時間、室温で反応させた。PBS で洗浄し、3 次抗体として、Alexa 488 標識 goat anti-Rabbit IgG 抗体 (Molecular Probes) を 3% NGS/PBS により希釈し、2 次抗体反応時と同様にパラフィルム上で反応させた。その後、再び PBS により 3 回洗浄し、細胞核を染色する蛍光色素 DAPI が添加されて

Immunostaining of A $\beta$ <sub>1-42</sub> gene expression rat fetus hippocampal neuron by A $\beta$ <sub>1-42</sub> antibodies

Takenori SHIMIZU, Tomoyo OCHIISHI, and Tomoe KOMORIYA

いる封入剤 VECTASHIELD Hard Set MOUNTING MEDIUM WITH DAPI H-1500 (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA)をスライドガラスに滴下し、染色したカバーガラスを固定化した。染色したラット胎児初代培養細胞を共焦点レーザー顕微鏡 FV-1000 (Olympus)により観察を行った<sup>3)</sup>。

#### 【結果および考察】

本研究では、作製したモノクローナル抗体の反応性を、 $A\beta_{1-42}$  遺伝子を発現させたラット胎児海馬初代培養細胞を用いて、免疫染色により確認した。

31-2 モノクローナル抗体の染色画像を Fig. 1 に示す。Fig. 1 b の緑は Alexa 488 で染色したものであり myc- $A\beta$  を、Fig. 1 c の赤は Alexa 568 で染色したものであり本研究で作製したそれぞれの抗体による  $A\beta_{1-42}$  の染色パターンを表している。Fig. 1 a は、DAPI で染色された核を青色で示し、Alexa 488, Alexa 568 を重ねた画像である。Fig. 2, Fig. 3 も抗体は異なるが、Fig. 1 と同様の染色画像である。myc- $A\beta$  の局在部位は細胞質と核内にみとめられるが、細胞質には比較的大きなドット状の塊が認められるのに対し、核内には大きな塊は認められない。

31-2 モノクローナル抗体の染色パターンは、核では薄く、核の外側の細胞質の部分で myc 陽性の大きなドット状の  $A\beta_{1-42}$  の局在部位とほぼ一致する。31-2 モノクローナル抗体は、LOA に特異的な抗体であることから、これらの結果は、LOA が神経細胞の核の外側に分布しやすい傾向を示している。次に、79-3 モノクローナル抗体の染色画像を Fig. 2 に示す。79-3 モノクローナル抗体は、31-2 モノクローナル抗体に比べ、全体的に蛍光が薄く myc 陽性のドット状の  $A\beta_{1-42}$  の局在部位と一部一致するほか、ドット状に凝集していない  $A\beta_{1-42}$  とも二重染色されている。また、核にも陽性部位が認められる。これらのことは 79-3 抗体が大きな凝集体と可溶性  $A\beta_{1-42}$  ともに反応する可能性を示唆している。75-2 モノクローナル抗体の染色画像を Fig. 3 に示す。75-2 モノクローナル抗体は、核、細胞質ともに全体的に反応していることがわかる。これは、可溶性  $A\beta_{1-42}$  に特異性が低く aggregate  $A\beta_{1-42}$  にも反応する抗体であることからこれら

の凝集体が、核を含む神経細胞全体に存在していることを示している。

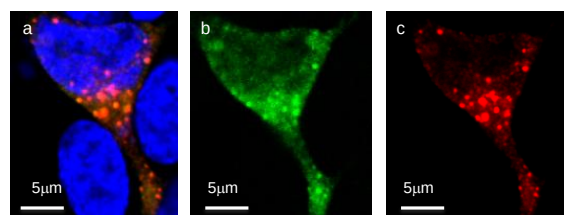


Fig. 1 Images of confocal laser microscope by 31-2 monoclonal antibody

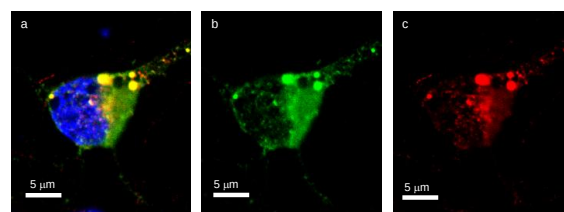


Fig. 2 Images of confocal laser microscope by 79-3 monoclonal antibody

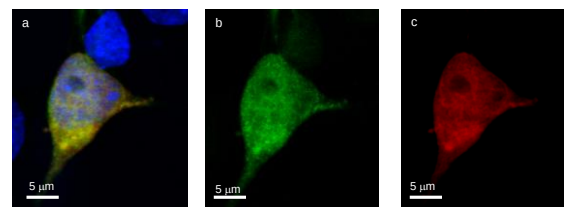


Fig. 3 Images of confocal laser microscope by 75-2 monoclonal antibody

#### 【結言】

本研究では、形状の異なる  $A\beta_{1-42}$  凝集体に対するモノクローナル抗体 31-2, 79-3, 75-2 を用いて免疫染色によりラット胎児海馬神経細胞内の  $A\beta_{1-42}$  との反応性を検討した。ラット胎児海馬神経細胞内での  $A\beta_{1-42}$  をモノクローナル抗体によりとらえることが確認でき、さらに細胞内での凝集の差異を観察することができた。これらの抗体を用いることにより、細胞内での  $A\beta_{1-42}$  の形状および構造の形態が明らかとなり、アルツハイマー病解明への貢献が期待される。

#### 【参考文献】

- 1) Takenori Shimizu, et al. (2012) *J. Biosci. Bioeng.*, 115, 216-220.
- 2) Tomoyo Ochiishi, et al. (2008) *Mol. Cell. Neurosci.*, 39, 499-507.
- 3) Kawther Abu-Elneel, et al. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 32781-32791.