

ラット神経細胞内のアミロイドβタンパク質凝集体の検出 —マウスモノクローナル抗体による免疫染色—

日大生産工(院) ○板倉 暁 日大生産工 吉宗 一晃
産総研 落石 知世

1 【緒言】

Alzheimer's Disease (AD)は認知症の半数以上を占める神経変性疾患である。ADの病変として脳内に老人斑と神経原線維変化が認められる。老人斑はβシート構造を形成して不溶性となった線維状のアミロイドβタンパク質(Aβ)からなる。Aβはアミロイド前駆体タンパク質(APP)から限定分解によって切り出され分泌される。この中で特にアミノ酸残基42個型のAβ₁₋₄₂は疎水性残基が多いため自己凝集性が高い。家族性のADに関するこれまでの研究から、Aβの総産量の増加やAβ₁₋₄₂の産生比率の増加をもたらす変異がADを早期に発症させることが分かり¹⁾、Aβの蓄積がAD発症の発端と考えられるようになった。

AD患者の脳内には老人斑の沈着が認められることから、線維状Aβの蓄積がADの原因と考えられてきた。一方で、AD患者の脳内には線維状以外の形態のAβも存在しており、それらの毒性に注目した研究も行われている²⁾³⁾。したがって、線維を形成して不溶性となる以前の形態のAβにも着目する必要がある。

我々はAβ凝集体を抗原として複数のマウスモノクローナル抗体を作製した。これらの抗体はモノマーや線維状Aβと反応しない一方、抗体75-2は直径50nm以上の凝集体を認識し、抗体31-2は直径220nm以上の大きさの非晶質のAβ凝集体のみを認識することがELISAによる分析で認められた⁴⁾。本研究では、初代培養したラット海馬神経細胞にAβ₁₋₄₂を強制発現させ、これらの抗体による免疫染色で神経

細胞中のAβ凝集体を検出した。強制発現させるAβはN末端側にmycタグを連結させており、抗myc抗体でAβの発現が確認できる。本研究では野生型のAβ₁₋₄₂のほかに凝集速度が遅くなる変異を導入したF19S,L34P変異型Aβ₁₋₄₂⁵⁾も発現させ、それぞれの抗体による染色の違いを評価した。また、遺伝子の導入後から6時間おきに免疫染色を行うことでAβの凝集が進行することによる特異性の変化も同時に評価した。

2 【実験方法】

1. ラット胎児海馬神経細胞の初代培養とAβの強制発現

胎生17-18日目のラットから海馬領域を切り出し、B27、1% Penicillin、Streptomycin、L-glutamineを含むNeurobasal® Mediumで培養を行った。培養4日目にLipofectamine™ 2000を用いて、Aβを発現するプラスミドDNAを神経細胞に導入した。

2. Aβ₁₋₄₂の免疫染色と観察

Transfectionから6時間おきに4%のParaformaldehydeを含むPBSで細胞を固定した。固定後は0.25%のTritonによる透過処理、4%のNormal Goat Serumによるブロッキング、その後我々の作製したマウスモノクローナル抗体とMyc-Tag Antibodyで一晩染色を行った。一次抗体染色後、Alexa Fluor 568 Goat anti-Mouse IgGとAlexa Fluor 488 Goat anti-Rabbit IgGによる二次抗体染色を行い、Mounting Medium With DAPIによっ

Detection of amyloid beta aggregates in rat neuron

Akira ITAKURA, Kazuaki YOSHIMUNE and Tomovo OCHIISHI

て封入した。観察は共焦点蛍光顕微鏡を用いて行った。

3 【実験結果】

蛍光顕微鏡で観察した抗体染色像を Fig. 1 に示す。全体の染色像は Merge で示され、抗 myc 抗体による染色は緑色、それぞれの抗 A β 抗体(75-2,31-2)による染色は赤色で示されている。抗 myc 抗体による染色でトランスフェクションから 12 時間経過後の細胞において mycA β および変異 mycA β の発現が確認された(Fig. 1 myc 抗体)。抗体 75-2 は myc 抗体と同じく 12 時間経過後より免疫陽性反応が認められたが(Fig. 1 抗体 75-2)、抗体 31-2 を用いた染色像では 12 時間時点でほとんど反応を示さなかった。一方、24 時間経過時点では抗体 31-2 による陽性反応が認められるようになった(Fig. 1 抗体 31-2)。また、抗体 75-2 と異なり抗体 31-2 は変異型 A β_{1-42} に対して 24 時間経過時点であってもほとんど反応性を示さなかった。

4 【考察】

A β 発現遺伝子導入からの経過時間によって染色像に差が生じた。ELISA において抗体 75-2 は比較的小さな A β 凝集体を認識することから、神経細胞中の凝集初期の A β を特異的に認識していることが予想される。一方、また、凝集を抑えられた変異型 A β に対して抗体 31-2 の反応性が低かったことは、抗体 75-2 と比べてより大きいサイズの凝集体のみを認識するという前研究の結果と一致している。この結果からこれらの抗体は神経細胞中の A β の凝集過程を認識できていると示唆され、A β 凝集体の形成過程や局在の把握が AD の病因解明に役立つと考えられる。

5 【参考文献】

1) Robert Siman *et al.*, *Neurosci* 2000, 20,

8717-8726.

2) Takami Tomiyama *et al.*, *Ann Neurol* 2008, 63, 377-387.

3) Sachiko Nomura *et al.*, *J. Neurosci* 2013, 91, 1541-1550

4) Shimizu T *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, 2012 115, 216-220

5) Christine Wurth, *et al.*, *Biol. Chem* 2002, 319, 1279-1290

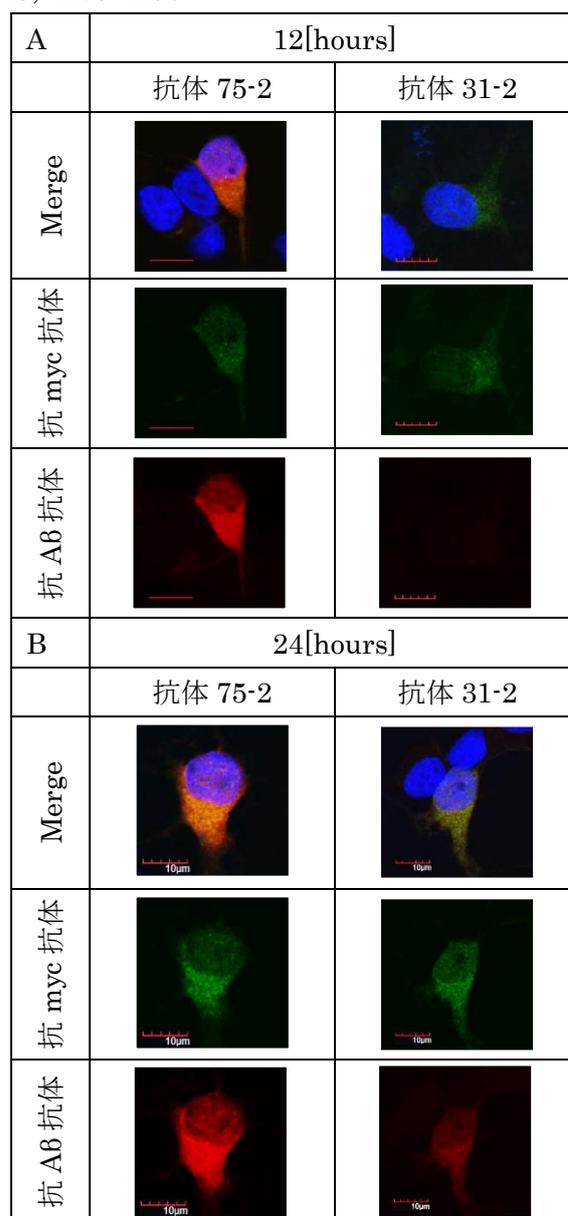


Fig.1 神経細胞に発現させた A β_{1-42} 凝集体の多重染色。A:遺伝子の導入から 12 時間後、B:24 時間後。