

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 17 日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500347

研究課題名（和文） β -アミロイドによるニューロン新生阻害機構の解明とその防衛研究課題名（英文） Mechanism of accelerating death of newborn neurons by β -amyloid

研究代表者

内田 洋子（UCHIDA YOKO）

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）

・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：60133633

研究成果の概要（和文）：「 β -アミロイドが胎児性蛋白を誘導するだけではなく、神経幹/前駆細胞の増殖や新生ニューロンの生存を阻害するため、ニューロン新生が抑制される」という作業仮説を証明するのが本研究の目的である。そこで、網羅的遺伝子解析から得られた、AB1-42によって誘導され、神経幹/前駆細胞や幼若ニューロンで発現する遺伝子（7種類）から、新生ニューロンの生存を阻害する遺伝子の同定を試みた。その結果、ただ一種類（Cas/HEF1-associated signal transducer, Chat）が幼若ニューロンの生存を阻害することがわかった。そこで、Chat (Sh2d3c)に的を絞りと、Chatがニューロンの生存を阻害する機序を解析し、以下の点が明らかとなった。（1）Chatの過剰発現がニューロンの生存を阻害するためには、ChatのC-末端が必要であった。（2）ChatのC-末端にはCAS family protein結合部位が存在する。しかし、CAS family protein（神経系に発現するp130CasとNEDD9）とChatを共発現させても、ニューロンの生存は阻害されなかった。また、CASと結合しないmutant constructを過剰発現させてもニューロンの生存は阻害された。これらのことから、幼若ニューロンの生存阻害には、ChatのC-末端でCas結合部位以外の部位に何らかの分子（未知）の結合が必要であることが示唆された。そこで、（3）ChatのC-末端（Chat-C）に結合し、Chatとの共発現が幼若ニューロンの生存を阻害する分子の同定を試みた。GST-Chat-C fusion proteinを調整し、大脳ニューロン抽出液を使って、pull-down assayし、結合した蛋白をnanoLC-MS/MSで解析した。しかし、GST-Chat-C fusion proteinへのpull-down assayで特異的に出現するバンド中から、十分量の蛋白は検出できなかった。これらのことから、Chat-C結合蛋白がnanoLC-MS/MSで同定しにくい性質であることが示唆されたが、Chat-Cのhomopolymer形成がニューロン生存阻害に関与している可能性も捨てきれないと考えた。

研究成果の概要（英文）：In Alzheimer's disease (AD), immature neuronal marker proteins increased in brain. However, the increased neurogenesis is not sufficient to repair the nervous system because progressive neuronal loss occurs in AD brain. Alteration of microenvironment in AD brain may affect the fate of immature neurons. β -amyloid (A β) plays an important role in the early pathogenesis of AD. It is reasonable to speculate A β alters the brain microenvironment to make it toxic to newborn neurons. To address these issues, we tried to identify the genes to inhibit survival of newborn neurons in A β -induced genes. Among 7 A β -induced genes, only Chat (Cas/HEF1-associated signal transducer) accelerated death of newborn neurons. Other 6 genes promoted neuronal survival or did not affect on neuronal survival. Next, we focused on Chat gene and tried to clarify toxic mechanism to newborn neurons. The results are follows: (1) C-terminal portion of Chat is necessary to induce toxicity in newborn neurons. (2) C-terminal portion of Chat have the binding domain to Cas protein family. However, co-transfection of Cas proteins (p130Cas and NEDD9) and Chat into newborn neurons did not accelerate neuronal death. The mutant Chat, which does not bind to Cas proteins, also accelerated neuronal death. These results suggests that the binding of unknown proteins to Chat C-terminal portion (Chat C)

other than Cas binding site might be necessary to induce toxicity in newborn neurons. Finally we tried to identify the proteins that bind to Chat C and accelerate death of newborn neurons. A GST-Chat C fusion protein was constructed and purified. The lysate from cultured cortical neurons was incubated with a GST-Chat C fusion protein. Pull-downed proteins were subjected to SDS-PAGE and analyzed with nanoLC-MS/MS. We could not identify any binding proteins to GST-Chat C fusion protein. It could not rule out that homopolymer formation of Chat C would induce neurotoxicity to newborn neurons.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経化学・神経薬理学

キーワード： β -アミロイド、神経新生

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) は、シナプスやニューロンが変性することによっておこる認知症で、 β -アロイド (A β) の蓄積がその原因と考えられている。AD 脳には、それら変性疾患としての特徴だけではなく、シナプスやニューロンが再生する際に出現する胎児性蛋白 (immature neuronal marker) の再発現も認められる。しかし、これらの蛋白が再発現しても、新生ニューロンによる補充は起らず、ニューロンの変性脱落は止まらない。

Immature neuronal marker は、AD 脳だけではなく、変異型 APP Tg マウス脳 (ニューロンの脱落が見られない) でも発現しており、ニューロンの脱落の代償よりも、A β の蓄積によって再発現している可能性が高い。

それでは、なぜ、immature neuronal marker の再発現にもかかわらず、ニューロン新生は抑制されているのか？ 一つの作業仮説、「A β が immature neuronal marker を誘導するだけではなく、新生ニューロンの生存維持を阻害しており、それが、結果としてニューロン新生を抑制している」という作業仮説を提唱する。この作業仮説を証明することが本研究の目的である。

私たちはこれまでに、A β によって、培養大脳皮質細胞 (幼若ニューロンと神経前駆細胞から成る) で誘導される遺伝子群の網羅的解析をおこなってきた。その結果、A β によって誘導される遺伝子は十数種類と意外に少なく、(1) その多くが機能不明な DNA 結合蛋白や RNA 結合蛋白をコードしているこ

と、(2) そのいずれも、成熟ニューロンよりも、神経前駆細胞や幼若ニューロンで発現していること、(3) それらの中には細胞の増殖・生存・分化に関与している転写因子が含まれていることを明らかにしてきた。このことから、同定された遺伝子群が、神経前駆細胞や幼若神経細胞の生存を負に制御している candidate 遺伝子であると考えてもおかしくはない。

2. 研究の目的

AD 脳では、immature neuronal marker が発現しているにもかかわらず、なぜ、脱落したニューロンを補充するほどにはニューロン新生がおこらないのか？ この疑問に答えるために、A β による神経再生の阻害メカニズムを、培養細胞とマウスモデルを使い、分子レベルで明らかにすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 変異型 APP Tg (Tg 2576) マウスにおける遺伝子発現変化の解析

24ヶ月令の Tg 2576 および wild-type マウスの大脳を摘出し、mRNA を調製した。培養大脳細胞で同定された、A β によって誘導される遺伝子 (7種類) が Tg 2576 マウスでも発現誘導されているか否かを Northern blotting によって調べた。

(2) A β によって発現誘導される遺伝子 (7種類) の全長クローニングとその発現ベクタ

一の構築

AB 投与した培養大脳細胞（幼若ニューロンと神経前駆細胞）より調整した mRNA より first-strand cDNA を合成した。PCR によって合成したそれぞれの cDNA 断片を pCR2.1 に挿入して clone 化し、全長 cDNA を得た。それぞれの全長 cDNA の N-末端または C-末端に myc-tag を付加した発現ベクターを構築した。

(3) 培養大脳細胞（幼若ニューロンと神経前駆細胞）への遺伝子導入とその影響の解析

E17 日令のラット大脳より細胞を調整し、gelatin-polylysine coat した dish 上で 4 日間培養した。発現ベクターに構築された 7 種類の遺伝子と EYFP ベクターを培養大脳細胞に共導入し、24 時間後に EYFP 蛍光を持つ細胞の生存率を調べた。細胞死は、Hoechst 33342 による核染色で、核の濃縮や断片化がおきていることで判定した。

(4) Pull-down assay による新規 Chat C binding protein の探索

大腸菌に発現させた GST-Chat-C fusion protein を GSH-Sepharose に吸着させ、大脳細胞抽出液を pull-down させた。GST-Chat-C に結合した蛋白を SDS-PAGE で分離し、nanoLC-MS/MS で解析した。

4. 研究成果

(1) 変異型 APP Tg (Tg 2576) マウスにおける遺伝子発現誘導

24 ヶ月令の Tg 2576 マウスを使い、AB によって発現誘導される遺伝子が in vivo でも誘導されているか否かを Northern blotting によって解析した。7 種類の遺伝子のうち、Northern blotting で検出できたのは、3 種類で、4 種類は発現量が少なく検出できなかった。Tg 2576 マウスで発現誘導されているのは、Chat (Cas/HEF1-associated signal transducer) を含め 2 遺伝子のみであった。

(2) AB による遺伝子発現誘導は培養大脳細胞の生存を阻害するのか？

AB によって発現誘導される遺伝子 (7 種類) をそれぞれ、EYFP と共に培養大脳細胞 (幼若ニューロンと神経前駆細胞) に導入し、EYFP (+)細胞について、核の濃縮や断片化を指標とし、死細胞数を数えた。その結果、Chat の過剰発現のみが幼若大脳ニューロンの生存を阻害した。残る 6 種類の遺伝子の過剰発現は、幼若ニューロンの生存を維持するか、生存に影響しないことがわかった。

(3) Chat による幼若ニューロンの生存阻害には C-末端 (Chat-C) が必要である。

Chat は novel SH2 containing proteins の

一つとして同定され、N-末側の SH2 domain の他、Pro/Ser rich region や C-末側に Cas association domain や Ras GEF-like domain が存在する (図 1)。Chat は Cas family protein との結合を介して、細胞の移動・接着などに関与すると言われているが、神経系での機能はほとんどわかっていない。

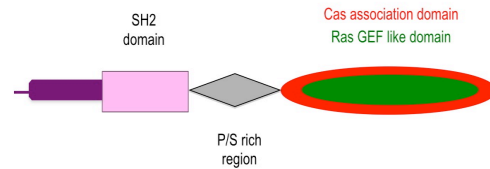


図 1. Chat 蛋白の構造

そこで、Chat 蛋白のどの domain を介して大脳細胞の生存を阻害しているのかを調べた。N-末端から SH2 domain までを含む construct や N-末端から SH2 domain までを欠いた construct を構築し、全長 Chat との生存阻害作用を比較した。全長 Chat や N-末端側を欠いた construct の導入では生存阻害が認められたが、N-末端から SH2 domain までを含む construct を導入した場合には生存阻害は認められなかった。これらの結果から、Chat の生存阻害作用には C-末端 (Chat-C) が必要であるが示唆された。

(4) Chat による幼若ニューロンの生存阻害は Chat-Cas interaction を介していない。

幼若ニューロンの生存阻害には C-末端 (Chat-C) が必要であることから、Chat-Cas interaction を介して生存が阻害されると考えられた。そこで、神経系に発現している p130Cas と NEDD9 の construct をそれぞれ作製し、Chat と共に幼若ニューロンに導入した。しかし、p130Cas および NEDD9 との共発現は幼若ニューロンの生存を阻害しなかった。Chat Y635E は Cas と相互作用できない変異体であるため、Chat Y635E を過剰発現させたところ、幼若ニューロンの生存は阻害された。これらのことから、Chat の生存阻害作用は Chat-Cas interaction を介していないことが示唆された。

(5) Pull-down assay による新規 Chat C binding protein の探索

Chat の C-末端 (Chat-C) に結合し、Chat との共発現が幼若ニューロンの生存を阻害する分子の同定を試みた。GST-Chat-C fusion protein を調整し、大脳ニューロン抽出液を使って、pull-down assay し、結合した蛋白を nanoLC-MS/MS で解析した。しかし、GST-Chat-C fusion protein への

pull-down assay で特異的に出現するバンド中から、十分量の蛋白は検出できなかった。これらのことから、Chat-C 結合蛋白が nanoLC-MS/MS で同定しにくい性質であることが示唆されたが、Chat-C の homopolymer 形成がニューロン生存阻害に関与している可能性も捨てきれないと考えた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Uchida Y, Molecular mechanisms of regeneration in Alzheimer's disease brain. *Geriatr Gerontol Int*, 10 Suppl 1, 2010, S158-168 (査読無)
- ② Uchida Y, Nakano S, Gomi F, Takahashi H. Up-regulation of calyntenin-3 by β -amyloid increases vulnerability of cortical neurons. *FEBS Lett*, 585, 2011, 651-656 (査読有)
- ③ Gomi F, Uchida Y. MAP1B 1-126 interacts with tubulin isoforms and induces neurite outgrowth and neuronal death of cultured cortical neurons. *Brain Res*, 1433, 2012, 1-8 (査読有)
- ④ Uchida Y, Gomi F, Murayama S, Takahashi H. Calyntenin-3 C-terminal fragment Accumulates in dystrophic neuritis surrounding abeta plaques in Tg2576 mouse and Alzheimer disease brains: its neurotoxic role in mediating dystrophic neurite formation. *Am J Pathol*, 182, 2013 (査読有) 1718-1726

[学会発表] (計 4 件)

- ① 五味不二也、内田洋子、Cas/HEF1 associated signal transducer による神経細胞死、第 33 回日本基礎老化学会、2010.6.17-18、名古屋
- ② 五味不二也、内田洋子、AB により誘導される Cas/HEF1 associated signal transducer の細胞死への効果、Neuro2010、2010.9.2-4、神戸
- ③ 五味不二也、内田洋子、Chat による神経細胞死における NEDD9 と p130Cas の効果、第 34 回日本神経科学大会、2011.9.17、横浜
- ④ 五味不二也、内田洋子、Chat 過剰発現による神経細胞死に関与する分子の検討 第 35 回日本神経科学大会、2012.9.18-23、名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内田 洋子 (UCHIDA YOKO)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号 : 60133633

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

五味 不二也 (GOMI FUJIYA)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号 : 40205620