

機関番号：83903

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2010

課題番号：21680032

研究課題名（和文） A $\beta$ のN末端構造に着目した新規分泌型APP及び変異型A $\beta$ の解析研究課題名（英文） Biochemical analysis of new secreted APP and mutant A $\beta$ 

研究代表者

武田 和也 (TAKEDA KAZUYA)

独立行政法人国立長寿医療研究センター・加齢健康脳科学研究部・流動研究員

研究者番号：40393160

研究成果の概要（和文）：アルツハイマー病（AD）脳に蓄積するアミロイド $\beta$ タンパク質（A $\beta$ ）には、N末端やC末端の形状が異なる、様々な分子種が存在する。本研究ではAD患者脳の、主に血管壁での蓄積が見られたN末端の短い分子種であるA $\beta$ 5-40/42に着目し、その生成機構と物性、AD発症への寄与について明らかにすることを目的とした。そこで新しく抗体を作製し、新規の分泌型APPを同定した。また変異型A $\beta$ を合成し、その物性解析を行った。

研究成果の概要（英文）：Deposition of Amyloid beta protein (A $\beta$ ) is the hallmark of Alzheimer's disease (AD) brain. Heterogeneity is observed in the N- and C-termini of A $\beta$  species. We have previously reported that N-terminally truncated A $\beta$ , A $\beta$ 5-40/42, is deposited in pathological regions of AD brain. To elucidate the mechanisms of generation of and the effect on amyloid formation of A $\beta$ 5-40/42, we generated a novel monoclonal antibody specific to C-terminal end of secreted APP (sAPP) and identified a new form of sAPP. In addition, we analyzed biochemical and physical property of mutant A $\beta$  peptides.

交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計         |
|--------|-----------|-----------|------------|
| 2009年度 | 7,600,000 | 2,280,000 | 9,880,000  |
| 2010年度 | 1,900,000 | 570,000   | 2,470,000  |
| 年度     |           |           |            |
| 年度     |           |           |            |
| 年度     |           |           |            |
| 総計     | 9,500,000 | 2,850,000 | 12,350,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：老化性痴呆疾患、アルツハイマー病、アミロイド

## 1. 研究開始当初の背景

(1) A $\beta$ の変異によるアミロイド沈着部位や病態の変化

いくつかの変異型A $\beta$ が家族性AD (FAD) などで見つかっているが、A $\beta$ はその変異の種類により、異なる病理像、とりわけ脳実質と脳血管との間におけるアミロイド沈着に

違いを示す。その典型例は、A $\beta$ の中程（22位）の変異、E22G変異が主に脳実質へのアミロイド沈着によりADを発症する一方で、E22Q変異が著しい脳血管アミロイド沈着により、ADとは異なる病態になることである。

(2) A $\beta$ のC末端の形状はAD発症やアミロイド沈着部位に大きく影響する

A $\beta$ は均一な構造ではなく、N末端およびC末端で、それぞれ形状の異なる分子種が存在する。特に、C末端の形状の異なるA $\beta$ 40とA $\beta$ 42とでは、より不溶性が高く凝集しやすい後者がAD発症に密接に関与している。また、脳血管アミロイドを再現するE22Q変異を導入したトランスジェニック(Tg)マウスを変異型プレセニリン1Tgマウスと交配し、A $\beta$ 42の生成を亢進させることで、そのアミロイド沈着部位が脳実質へと変化することから、C末端の形状もアミロイド蓄積部位に影響する。

### (3) A $\beta$ のN末端の形状とその蓄積部位

以上のように、A $\beta$ の構造は、その蓄積部位と病態に影響するが、N末端の形状の違いについての検討は少ない。一例として、N末端の2アミノ酸を欠き、3位のEがピログルタミル化された分子、A $\beta$ pE3-40/42の蓄積が脳実質の老人斑において見出されている。筆者らはA $\beta$ 1-40/42とは選択的に生成される、N末端の4アミノ酸を欠いたA $\beta$ 5-40/42がAD脳において、主に血管壁に蓄積していることを見出した。筆者は、A $\beta$ のN末端の形状の違いによるアミロイド蓄積部位への影響を明らかにするため、このA $\beta$ 5-40/42に着目し、当該分子種を過剰に生成するTgマウスを作製し、解析を行っている。これにより*in vivo*におけるA $\beta$ 5-40/42の動態と、AD発症における役割について明らかにすることを試みている。

### (4) A $\beta$ のN末端部の変異によるA $\beta$ 5-40/42生成の変化

近年、A $\beta$ のN末端部に英国型(H6R)および鳥取型(D7N)変異が見出されている。筆者は、これらの変異がA $\beta$ 5-40/42生成に影響を与える事を予測し、培養細胞を用いた系で解析してきた。その結果、これらの変異がA $\beta$ 5-40/42生成に異なる効果を持つ結果が得られ、これらの変異は、異なる機序でAD発症に寄与している可能性がある。これら変異によるA $\beta$ の5位での切断への影響について直接検出、定量するためには、その際に生成すると予測される分泌型APP(以下、Longer sAPP- $\beta$ と呼ぶ。A $\beta$ 1-40/42の生成に伴って生じるsAPP- $\beta$ のC末端に、A $\beta$ のN末端4残基、DAEFが付加している。)に特異的な抗体の作製が効果的であろうと考えている。

### (5) 変異によるAD発症において、より重要な分子はA $\beta$ 1-40/42か?それともA $\beta$ 5-40/42か?

英国型、鳥取型変異によるA $\beta$ の物性変化については、プロトフィブリル形成ではなく、線維形成が促進されることが報告されている。しかしながら、これらはN末端が完全に

保持されたA $\beta$ についての解析であり、筆者は自身の研究結果から、この変異を伴うA $\beta$ 5-40/42の物性について検討を加える必要があると考えている。

## 2. 研究の目的

(1) N末端の短いA $\beta$ 5-40/42の生成に伴って細胞外に分泌されると予測されるLonger sAPP- $\beta$ の定量を行うことで、特に、A $\beta$ のN末端部に見いだされたFAD変異である、英国型および鳥取型によるA $\beta$ 5-40/42の生成への影響と、AD発症との関係を明らかにする。

(2) 変異型A $\beta$ 5-40/42の物性を解析し、AD発症における当該分子種の寄与について明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) Longer sAPP- $\beta$ 特異抗体の作製

A $\beta$ の5位での切断により生成する分泌型APP、Longer sAPP- $\beta$ を特異的に認識するモノクローナル抗体を作製する。

A $\beta$ の4位と5位の間での切断を特異的に検出するため、A $\beta$ の4位までの合成ペプチドを抗原にしてマウスに免疫し、抗体産生の見られたマウスの脾臓よりハイブリドーマを作成する。得られたハイブリドーマより分泌される抗体についてELISAで検討し、抗原ペプチドに反応し、A $\beta$ の5位以降を含むペプチドに反応しないものを選別する。

一方、Longer sAPP- $\beta$ やsAPP- $\beta$ 、sAPP- $\alpha$ などを直接発現し、分泌する遺伝子の構築を同時に行い、これを培養細胞で発現させて、その細胞溶解液などを試料として用い、ELISA法で候補として上がってきたハイブリドーマに対してLonger sAPP- $\beta$ にのみ反応する抗体を産生するものを選別する。

以上のような方法でLonger sAPP- $\beta$ のC末端断端特異的な抗体を作製する。

### (2) 変異型A $\beta$ 5-40/42の物性解析

変異を伴うA $\beta$ 5-40/42の物性を解析するため、同ペプチドを合成する。同時に、同変異型A $\beta$ 1-40/42、野生型A $\beta$ 5-40/42を合成して、比較対照とする。野生型A $\beta$ 1-40/42は既に製品が存在するため、これを購入して使用する。

合成したペプチドの凝集能や細胞毒性について*in vitro*で解析を行い、野生型および変異型A $\beta$ 5-40/42のAD発症への寄与について検討する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 新規分泌型 APP に対する抗体の作製

検出目的タンパク質である Longer sAPP- $\beta$  の C 末端領域に相当するペプチドを合成し、これを抗原としてマウスに免疫した。その後、ELISA 法にて抗原ペプチドに対する抗体価が上昇した事を確認して、抗血清を採取した。

一方、Longer sAPP- $\beta$  に加えて、sAPP- $\beta$  および sAPP- $\alpha$  の各分泌型 APP を培養細胞で直接発現させる遺伝子を構築した。これらを培養細胞で発現させ、その細胞溶解液や培養上清などを試料として、先に免疫したマウスより得られた抗血清についてウェスタンブロット法 (WB) で検討した。その結果から Longer sAPP- $\beta$  を認識する抗体の産生が確認されたマウスを選別し、その脾臓よりハイブリドーマを作製した。

得られたハイブリドーマの培養上清について、抗原ペプチドおよび関連ペプチド ( $A\beta$  ペプチドなど) を用いて ELISA を行い、抗原ペプチドのみと反応する抗体を産生しているハイブリドーマを選別した。さらに上記の培養細胞由来の試料を用いた WB、さらには免疫沈降法 (IP) にて目的タンパク質のみと反応する抗体を産生するハイブリドーマを選別した。

上記のようにしてスクリーニングを重ねて目的抗体を産生するハイブリドーマのクローン化を進め、一次スクリーニング、二次スクリーニングを経て、最終的に 3 クローンを選別した。図 1 に、本研究において得られたハイブリドーマの培養上清 (モノクローナル抗体を含む) を用いて、各種分泌型 APP に対する反応特異性を検討した結果を示す。HEK293 細胞に発現させた各種 sAPP を WB で解析した結果、作製した 32A 抗体は Longer sAPP- $\beta$  (sAPP+DAEF) のみを検出した (一方、APP の N 末端に対する 22C11 抗体は、全ての sAPP を検出した)。また 32A 抗体は、IP によって Longer sAPP- $\beta$  のみを回収した。

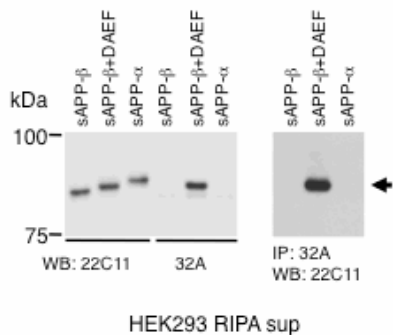


図1 新規分泌型 APP に対する特異抗体の作成

##### (2) 新規モノクローナル抗体を用いた新規分泌型 APP の解析

本研究で得られた抗体を用いて、筆者らが過去に作製した、神経系の培養細胞である SH-SY5Y に APP を過剰に発現させたクローン、SH-APP について解析した。その結果を図 2 に示す。培養上清について IP-WB 解析を行った結果、本研究において存在を予測した Longer sAPP- $\beta$  を検出した。また Caspase 切断型である APP  $\Delta$  C31 を発現させた SH-APP  $\Delta$  C では、そのバンドは増強した。この結果は SH-APP  $\Delta$  C で  $A\beta$  5-40/42 の生成が亢進する事と一致している。またこのバンドは sAPP- $\alpha$  を認識する抗体では検出されなかった。

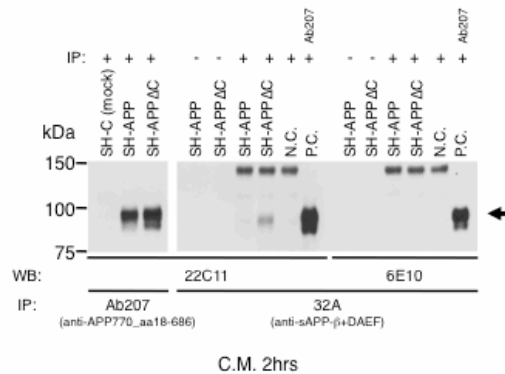


図2 新規モノクローナル抗体による新規分泌型 APP の検出

以上の事から、新規の分泌型 APP、Longer sAPP- $\beta$  が APP より実際に生成している事が明らかとなった。

そこでハイブリドーマを大量培養し、抗原カラムを作製して特異抗体の大量調製を行い、現在、さらに試料の解析を進め、また定量システムの構築を試みている。 $A\beta$  の N 末端付近にはいくつかの変異が見つかっており、これら変異がこの新規の分泌型 APP の生成に与える影響を明らかにすることは、 $A\beta$  5-40/42 生成への影響に加えて、この分子種と AD や脳アミロイド血管症の発症との関連を明らかにする事に繋がると期待される。

##### (3) $A\beta$ 5-40/42 生成機構の解析

上記の結果に加えて、 $A\beta$  5-40/42 生成においては、N 末端の短い APP の C 末端断片、C95 が生成し、これが前駆体となっていることを明らかにするため、この N 末端を特異的に認識する抗体、 $A\beta$  5-x 抗体を用いて SH-APP の細胞溶解液を解析した。その結果を図 3 に示す。APP の C 末端領域に対する抗体との IP-WB の結果、C95 に相当するバンドを検出した事から、APP より C95 が直接生成し、引き続いて  $A\beta$  5-40/42 が生成する事が明らかとなった。

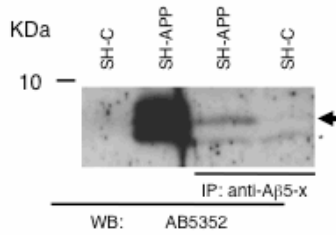


図3 Aβ5-x特異抗体によるC95の検出

#### (4) 変異型 Aβ の物性解析

Aβ5-40/42 の物性と、FAD 変異が与える影響について解析を行うため、これらペプチドを合成した。同時に、同変異型 Aβ1-40/42、野生型 Aβ5-40/42 を合成して、比較対照とした。野生型 Aβ1-40/42 は既製品を購入して使用した。現在、その凝集・線維化能についてチオフラビンTや電気泳動法などを用いて検討中である。その結果、線維化能については、Aβ5-40/42 は Aβ1-40/42 よりも弱い傾向が観察されているが、FAD 変異はこれを増強する効果が見られている。

#### (5) 最後に

本研究で作製した抗体は、Aβ5-40/42 生成に伴って分泌される、これまでに検出されていなかった Longer sAPP-β の定量を可能にする。これにより、これまで困難であった英国型および鳥取型変異による、この部位の切断活性への影響を直接、明らかにすることが出来る。また、これまでの研究結果についての検証も含めて、Aβ5-40/42 について、より多角的な解析が可能となる。

また AD 研究における新たなツールの獲得でもあり、供給の途絶えることのないモノクローナル抗体の開発は、他の研究者への抗体、定量システムの提供を容易にし、Aβ5-40/42 についての研究がさらに発展する可能性がある。

これまでの多くの研究は、N 末端が完全に保持された Aβ についてのみ解析がなされており、N 末端の異なる Aβ について、Aβ40 や Aβ42 のように、その分子種をきちんと特定したうえで行った比較、検討はほとんどない。筆者が現在解析している、Aβ5-40/42 を過剰に生成する Tg マウスによって、当該分子種の *in vivo* における脳アミロイド形成への寄与が明らかになる。そして本研究計画で、英国型および鳥取型変異による Aβ5-40/42 生成への影響と、その物性変化を明らかにすることで、少なくとも両 FAD 変異による AD 発症機序について、これまでにない Aβ5-40/42 の視点から、一つの結論が得られるものと期

待できる。

現在試みられている AD の免疫療法においては、血管性脳浮腫や脳出血が問題になっており、血管アミロイドに対する理解の重要性が増している。Aβ5-40/42 の動態の解析は、この分子種を治療標的とするなど、現在の免疫療法の改善、改良にも大きく貢献することが期待される。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

① 武田和也、松本信英、田平武

「アミロイド前駆体タンパク質の新しい切断部位の同定」

第 34 回日本基礎老化学会大会

平成 23 年 6 月 15 日

東京都新宿区西新宿

② 武田和也、國本正子、足立香代、渡邊淳、脇田英明、高橋慶吉、田平武

「N 末端構造に着目した野生型および変異型 Aβ の物性解析」

第 28 回日本認知症学会大会

平成 21 年 11 月 20 日

東北大学

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://web.me.com/kzytkd/Research/Welco me.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

武田 和也 (TAKEDA KAZUYA)

独立行政法人国立長寿医療研究センター・加齢健康脳科学研究部・流動研究員

研究者番号：40393160

##### (2) 研究分担者

無し

##### (3) 連携研究者

無し