



Title	実験的神経原線維変化を生じた家兔脳およびアルツハイマー病脳におけるライソゾーム蛋白分解酵素に関する研究
Author(s)	鈴木, 英夫
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/36056">https://hdl.handle.net/11094/36056</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="#"></a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## 【40】

氏名・(本籍)	すず	き	ひで	お
	鈴	木	英	夫
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	8610	号	
学位授与の日付	平成元年	3月	24日	
学位授与の要件	医学研究科内科系専攻 学位規則第5条第1項該当			
学位論文題目	実験的神経原線維変化を生じた家兎脳およびアルツハイマー病 脳におけるライソゾーム蛋白分解酵素に関する研究			
論文審査委員	(主査) 教授	西村	健	
	(副査) 教授	祖父江憲治	教授	白石 純三

## 論文内容の要旨

## 〔目的〕

アルツハイマー病の主要な神経病理学的所見の一つとして神経原線維変化があげられ、アルミニウム注入により実験的神経原線維変化(ENFC)を生じた家兎脳はアルツハイマー病のモデルの一つとして使用されている。アルミニウム注入家兎脳では、神経細胞核周囲に異常な線維性構造物の蓄積が多量に観察され、実験的神経原線維変化と呼ばれている。本研究は、そのような線維性蛋白の蓄積の原因が蛋白分解酵素の異常にあるのではないかと推測し、アルミニウム注入家兎脳およびアルツハイマー病脳のライソゾーム酵素の変化を検討することにより、神経原線維変化の形成におけるライソゾーム蛋白分解酵素の関与を明らかにしようとするものである。

## 〔方法〕

## 1. 実験的神経原線維変化の作製とライソゾーム酵素活性の測定

成熟家兎の大脳皮質内にアルミニウム塩を注入してENFCを作製し、11日後に大脳皮質・海馬・頸髄を摘出し、ホモジェネイト中のライソゾーム酵素(cathepsin D,  $\beta$ -glucuronidase, acid phosphatase, acid DNase, alkaline DNase)の活性をそれぞれ、山本ら, Fishman, Kind-King, Sungの方法に従い測定した。

## 2. 人脳における cathepsin D活性の測定

剖検にて確認されたアルツハイマー病脳、対照脳の前頭葉における cathepsin D活性を前述の方法で測定した。

### 3. cathepsin Dによるニューロフィラメント蛋白の分解

牛の脳から cathepsin Dを、脊髄からニューロフィラメント蛋白を、それぞれBenuck, 徳武の方法にて分離精製した。cathepsin Dのニューロフィラメント蛋白に対する作用を pH 2.7 から pH 7.2 の範囲で検討した。また、in vitro で再構成したニューロフィラメント線維に対する cathepsin D の作用を形態学的に検討した。

### 4. cathepsin D酵素蛋白の精製と酵素学的検討

ENFC 脳, アルツハイマー病脳から cathepsin Dを硫酸分画およびペプスタチンをリガンドとするアフィニティクロマトグラフィーにより精製した。ENFC 脳から精製した cathepsin Dについては、その分子量・至適 pH・Km 値・熱安定性・等電点・アミノ酸組成を検討した。

[成 績]

1. ENFC 脳のライソゾーム酵素活性： $\beta$  glucuronidase 活性は大脳皮質・海馬・頸髄で増加した（それぞれ39%, 54%, 86%）。acid phosphatase 活性は有意の変化を認めず、alkaline DNase 活性は大脳皮質・海馬で減少し、acid DNase 活性は3部位全てで上昇していた（大脳皮質28%, 海馬36%, 頸髄122%）。cathepsin D活性は大脳皮質・海馬で増加しており、特に頸髄での増加が顕著であった（それぞれ54%, 28%, 103%）。アルツハイマー病脳においても cathepsin D活性は、対照脳と比較して有意に上昇していた（それぞれ13.7 U/mg protein, 9.5 U/mg protein）。
2. cathepsin Dの細胞骨格蛋白に対する作用：cathepsin Dはニューロフィラメント蛋白を中性領域（pH 6.2）においても分解し、68K サブユニットが最もよく分解された。また、再構成線維に対する cathepsin Dの作用については、68K サブユニットのみからなる線維は、トリプレット全体から再構成された線維よりもよく分解された。
3. ENFC脳・アルツハイマー病脳の cathepsin Dの酵素学的特性：精製酵素蛋白あたりの活性は低下していた（ENFC脳で14%, アルツハイマー病脳で12%の減少）。ENFC 脳から精製した cathepsin Dでは、等電点電気泳動で $\alpha$ バンドが酸性側に偏位しており、また熱安定性にも変化が認められた。分子量・至適 pH・Km 値・アミノ酸組成については変化を認めなかった。

[総 括]

1. アルミニウム注入家兎脳およびアルツハイマー病脳におけるライソゾーム酵素の活性を調べ、cathepsin Dの活性上昇を認めた。
2. cathepsin Dはニューロフィラメント蛋白を中性領域で分解し、その構成サブユニットの中でも68 Kサブユニットが最も作用を受け易いことを示した。
3. アルミニウム注入家兎脳における cathepsin D活性の上昇は酵素蛋白量の増加によるものであり、精製酵素蛋白あたりの酵素活性は低下していることを示した。
4. 実験的神経原線維変化およびアルツハイマー病脳の神経原線維変化の形成にライソゾーム蛋白分解酵素の異常が関与している可能性が示唆された。

## 論文の審査結果の要旨

アルツハイマー病に認められる神経原線維変化の構成蛋白の一部は明らかにされているが、その形成機序に関しては未だ不明なところが多い。本研究は、家兎脳内にアルミニウム塩を注入して実験的神経原線維変化（ENFC）を作製し、細胞骨格蛋白の代謝異常という観点から神経原線維変化の形成機序を解明しようとしたものである。

まず、ENFC作製家兎の脳内ライソゾーム酵素活性の変動を調べ、特に、ライソゾーム内蛋白分解酵素のひとつであるカテプシンD活性が上昇していることを明らかにした。カテプシンD酵素の脳内細胞骨格蛋白の代謝における役割に関しては、実験的神経原線維変化を構成しているニューロフィラメント蛋白のいずれのサブユニットもカテプシンDにより中性領域で分解されることを証明した。本研究では、さらに、アルミニウム注入家兎脳からカテプシンD酵素を精製し、その酵素分子について酵素活性の差異、酵素分子の熱安定性の変化、一つのアイソマーの等電点の差異を明らかにし、アルミニウムの作用により正常とは性質の異なるカテプシンD酵素分子が合成されていることを示した。

以上の成績は、実験的神経原線維変化の形成時にはライソゾーム酵素の異常が関与していることを示唆するものであり、アルツハイマー病における神経原線維変化の形成機序の解明に手掛かりを与えた点で意義が大である。