

phospholipids phosphatidylcholine and sphingomyelin. Furthermore, choline provides methyl groups for methionine and S-adenosylmethionine synthesis, which serves as a substrate for DNA and histone methyltransferases, and is thus required for the establishment and maintenance of the epigenome. In the brain, choline plays an additional role as a precursor for the synthesis of the neurotransmitter acetylcholine (ACh). Therefore, transport of choline from blood to brain through the blood-brain barrier is a physiologically important process. In this study, we examined the molecular and functional characterization of choline transport into cultured human brain microvascular endothelial cells (hBMECs). Choline uptake into hBMECs was a saturable process that was mediated by a single Na⁺-independent, membrane potential and pH-dependent transport system. Various organic cations interacted with the choline transport system. Choline transporter-like protein 1 (CTL1) and CTL2 mRNA were highly expressed, while mRNA for high-affinity choline transporter 1 and organic cation transporters were not expressed in hBMECs. CTL1 and CTL2 proteins were localized to brain microvascular endothelial cells in human brain cortical sections. CTL1 protein was recognized in plasma membrane, and was co-localized with the plasma membrane marker pan Cadherin. On the other hand, CTL2 protein was localized in intracellular compartments, and was co-localized with the mitochondrial marker MitoTracker.

We conclude that the choline uptake system in hBMECs involves CTL1 and is responsible for the uptake of extracellular choline and organic cations. CTL2 participates in choline transport in mitochondria, and may be the major site for the control of choline oxidation.

P1-3.

An Alzheimer's disease-linked mutant T835M-UNC5C causes neuronal cell death by activating an intracellular death signal cascade

(薬理学)

○橋本 祐一、松岡 正明

A previous study showed that a missense mutation (T835M) in the UNC5C gene appears to increase the risk for late-onset Alzheimer's disease and that various insults lead to increased death in neurons expressing T835M-UNC5C. In this study, we found that overexpression of T835M-UNC5C itself causes prominent death while overexpression of wild-type UNC5C causes minimal death in F11 neurohybrid cells. Recombinant netrin-1 protein, the UNC5C ligand, inhibits this death. By various experiments using pharmacological inhibitors and dominant negative kinase plasmids, neuronal death by T835M-UNC5C is mediated by an intracellular death signal pathway consisting of DAPK1/PKD/ASK1/JNK/caspases in this order. In addition, mouse calmodulin-like skin protein-1 protein also inhibited neuronal death by T835M-UNC5C as same as early-onset Alzheimer's disease causable gene V642I-APP. These results may provide a new insight on the pathomechanism of Alzheimer's disease.

P1-4.

タンパク質輸送制御の破綻によるミトコンドリア異常凝集機構の解析

(大学院修士課程2年病態生理学)

○福島 実紀

(病態生理学)

宮下 佳奈、八谷 如美

【目的・背景】 孤発性および本邦の一家系におけるプリオン病では、神経変性の進行に伴ってミトコンドリアの機能低下と異常凝集が見られている。さらに、パーキンソン病やハンチントン病においても同様のミトコンドリア凝集は観察されており、神経変性疾患に共通なオルガネラのダメージ機構であることが考えられる。しかしながら本凝集の分子機構は

わかっておらず、これらの疾患において神経変性を抑制することは、現状では難しい。

そこで、我々がこれまでに構築した培養細胞によるモデル系を用いて、今回、高感度免疫沈降系により、ミトコンドリア凝集のみを精製し、その後ナノ LC を行って構成成分を同定した。

【方法】 高感度免疫沈降のための MEF タグを付した GFP 融合トランケートプリオンタンパク質発現プラスミドをマウス神経芽細胞腫由来 N2a 細胞にトランスフェクションし、48 時間後に蛍光顕微鏡にてミトコンドリア凝集形成を確認した。その後、免疫沈降を行ってミトコンドリア凝集成分のみを回収しゲルにかけ、質量分析用の銀染色ののちバンドを切り出した。切り出したゲルからのタンパク質溶出を行い、ナノ LC のショットガン法により構成成分を同定した。

【結果・考察】 ミトコンドリア異常凝集体のおもな構成成分として、ミトコンドリア輸送に関与する細胞質成分の 14-3-3 タンパク質、およびミトコンドリア内膜成分の Prohibitin-2 に加え、分泌タンパク質の輸送系である小胞体-ゴルジ間の輸送に関与する Sec23ip が同定された。また、これらのタンパク質に対する抗体を使って蛍光抗体法により確認したところ、確かにミトコンドリア凝集体との共染色が認められた。

以上の結果より、プリオン病に見られる異常ミトコンドリア凝集過程には、ミトコンドリア輸送過程と分泌タンパク質の輸送過程の制御の破綻が示唆された。

P1-5.

プリオン病における神経変性阻害効果を有する薬剤の同定

(医学部医学科 2 年)

○太田 行紀

(病態生理学)

宮下 佳奈、八谷 如美

【目的・背景】 プリオン病における神経変性を防ぐ手段を検討することは、病気の進行を遅らせる手法に繋がるものである。本件分子機構の詳細は長らく不明であったが、我々はこれまでに、関連分子として 14-3-3 タンパク質アイソフォーム η および、

Tom70、Miro1 の 4 分子を、さらに最近の成果から分泌輸送に関わる分子の関与を見いだした。本疾患で、神経変性に抗する医薬品の探索は、これまでに見当たらないことから、本研究では、上述分子のなかでもとりわけ早期に関与する 14-3-3 タンパク質を標的とし、その阻害する医薬品を見いだすことでプリオン病の進行を遅らせることを目的として研究を行った。

【方法】 マウス神経芽細胞腫由来 Neuro2a (N2a) 細胞に PrP^{Sc} を発現させ、プリオンタンパク質の局在異常から生じる神経細胞死経路を再構成した。この系に 14-3-3 タンパク質阻害薬 Fusicoccum および BV02 を添加し、14-3-3/PrP^{Sc} 複合体の形成阻害効果による細胞死遅延あるいは阻害効果を検討した。効果の判定には、MTT アッセイ法および蛍光顕微鏡によるイメージング解析を行った。

【結果・考察】 14-3-3 阻害薬である Fusicoccum および BV02 のいずれにも細胞死遅延効果が観察された。また、Fusicoccum および BV02 は、神経変性時に見られるプリオンタンパク質のミトコンドリアへの異常局在やミトコンドリアの異常凝集も抑制した。

Fusicoccum および BV02 は、14-3-3 タンパク質に対して mode III で結合する基質に対し結合阻害活性を呈するが、mode I あるいは II においてはその活性を示さないことが既にわかっている。プリオン病に対する治療薬はほとんどなく、急速な神経変性を遅らせる手段も現状では見当たらない。したがって、本研究で同定したこれら既存の薬剤によるプリオン病神経変性阻害効果は、今後、有効な治療薬となりうることが示唆された。

P1-6.

当院における急性脳症疑いにて入院した 127 例の臨床的検討

(小児科)

○加藤 幸子、森下那月美、山中 岳
竹下 美佳、森地振一郎、石田 悠
小穴 信吾、柏木 保代、河島 尚志

【背景・目的】 急性脳症とは、感染症などを契機に急激に生じる脳機能の全般的な障害であり、非炎症性脳浮腫を病理学的特徴とする症候群である。発熱