

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：32203

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17045

研究課題名(和文) アミロイド 産生に関わる切断酵素BACE1の細胞内動態の解析と活性制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of intracellular dynamics of BACE1 and its regulatory mechanism

研究代表者

東 覚 (Higashi, Satoru)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：20813702

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題の目的は、アルツハイマー病の原因物質とされるアミロイド (A β) 産生に関わる切断酵素BACE1の細胞内輸送機構と活性機構を明らかにすることである。生化学・分子生物学的実験を行い検討した結果、BACE1は、クラスリン非依存性エンドサイトーシス経路のカーゴ分子であることが示唆された。またBACE1は小胞輸送関連分子である Taxilinによるチューブ様リサイクリングエンドソーム(Tubular recycling endosome: TRE)への輸送制御を受けていることが示唆され、その輸送制御がA β 産生に影響を及ぼす可能性が見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化社会である日本には約100万人以上もの認知症の高齢者がいると考えられ、その約半分がアルツハイマー病患者であるとされている。そのため、有効な治療薬の早期開発が求められている。そのような状況下でBACE1が標的分子として着目され、BACE1阻害剤の開発が進められている。一方で、BACE1の細胞内動態についての詳細は不明であった。本研究はそのBACE1の細胞内動態と制御候補分子を見出すとともにA β 産生との関係性などの基礎的な知見を提供することができたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to elucidate the intracellular vesicle transport of BACE1 (Beta-site Amyloid precursor protein Cleaving Enzyme 1) and its regulatory mechanism. We performed biochemical and molecular biological experiments and found that BACE1 may be a cargo protein regulated by the Clathrin-independent endocytosis pathway. We also found that BACE1 may be sorted to tubular recycling endosomes (TREs) by Taxilin, a vesicular transport-related protein and that the regulation of sorting to TRE may affect A β production.

研究分野：細胞内小胞輸送

キーワード：アルツハイマー アミロイド BACE1 クラスリン非依存性エンドサイトーシス Taxilin 細胞内小胞輸送

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢化人口の増大によってアルツハイマー病患者が急激に増加しているが、根本的な治療法は未だ開発されていない。その原因として発症までに非常に長い年数を要し、発病メカニズムが複雑である点が挙げられている。特にアルツハイマー病の原因とされるアミロイドβ (Aβ) の蓄積はアルツハイマー病発症の 20 年以上前から起きていることから、発症後の対応では遅く、Aβ の蓄積が始まる初期段階での治療への介入が重要であると考えられている。そのため、アルツハイマー病発症前の診断・治療を実現する上で、アルツハイマー病の初期段階に関わる Aβ 産生のメカニズムの解明は重要な課題となっている。Aβ 産生は、細胞膜上の前駆体である APP (Amyloid β precursor protein) がクラスリン依存性エンドサイトーシス (CME: Clathrin Mediated Endocytosis) により細胞内に取り込まれたのちに、β サイト切断酵素である BACE1 による切断を受け、さらに γ-secretase による切断によって生じる (図 1)。近年、BACE1 がクラスリン非依存性エンドサイトーシス (CIE: Clathrin Independent Endocytosis) によって細胞内に取り込まれることが報告された (図 2)。しかしながら、取り込み後の細胞内動態については不明な点が多い。BACE1 は、Aβ 産生を直接的に制御している律速酵素であるため、BACE1 阻害剤がアルツハイマー病治療薬として着目されている。そのため、BACE1 の細胞内小胞輸送と Aβ 産生の詳細な機構の解明が望まれている。

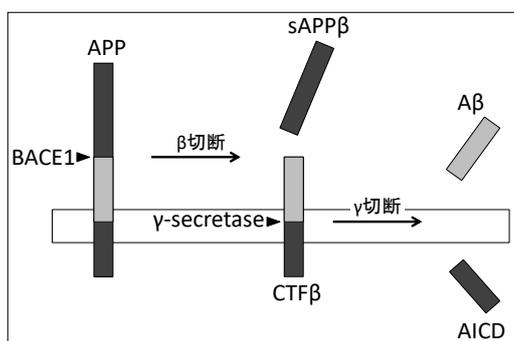


図1. APP切断機構

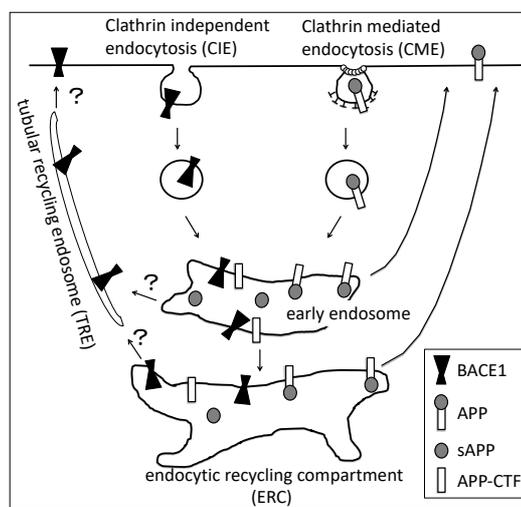


図2. APPとBACE1の細胞内輸送経路

2. 研究の目的

本研究では、Aβ 産生機構における細胞内小胞輸送に焦点をあて、Aβ 産生を直接的に制御している律速酵素である BACE1 の細胞内輸送機構の解明を目指す。前述の通り、BACE1 は CIE カargo 分子であることが報告されているが、近年、CIE カargo 分子は CME とは異なる Tubular recycling endosome (TRE) を介した独自のリサイクリング機構が存在することが明らかとなっている。しかし、BACE1 については CIE 独自の機構によって細胞膜上にリサイクリングされるかについては明らかにされていない。申請者は、小胞輸送関連分子である γ-Taxilin がこの TRE 形成に関与していることや Aβ 産生に関与していることを見出している。そこで、本研究では、これらの知見に基づき、γ-Taxilin が制御している CIE カargo 分子のリサイクリング経路によって BACE1 が輸送されるという仮説の検証を目的とした。

3. 研究の方法

ヒト子宮頸がん細胞株 HeLa 細胞やマウス神経芽腫細胞株 Neuro2A 細胞を用いて γ-Taxilin の遺伝子抑制 (knock-down:KD) 細胞や遺伝子欠損 (knock-out:KO) 細胞等を作製し、以下の解析を行った。

(1) γ-Taxilin と Aβ 産生の関係

APP を過剰発現させた HeLa 細胞および Neuro2A 細胞に対して γ-Taxilin KD および KO を行い、培養上清中の Aβ 40 と Aβ 42 量を ELISA 法によって測定した。

(2) γ-Taxilin と APP 切断の関係

APP を過剰発現させた HeLa 細胞に対して γ-Taxilin KD を行い、sAPPβ、CTFβ 量を Western blotting 法によって測定した。

- (3) BACE1 の Tubular recycling endosome (TRE) への局在化
HeLa 細胞を用いて下記の方法で検証を行った。
- ① 細胞外ドメインにエピトープを持つ BACE1 抗体を培地に添加し細胞膜上の BACE をラベルし、一定時間培養することで細胞内に抗体ラベル化 BACE1 を取り込ませる。細胞表面の抗体ラベル化 BACE1 を Low pH solution (0.5% acetic acid, 0.5 M NaCl) で洗浄することで BACE1 から抗体を外し、免疫蛍光細胞染色法によって細胞内に取り込まれた BACE1 のみを染色し TRE 形成を観察する。
 - ② 細胞に GFP 融合 BACE1 plasmid を遺伝子導入し、Time-lapse imaging 法により、BACE1 の局在を観察する。
 - ③ GFP 融合 BACE1 plasmid と既知の CIE カーゴ分子である CD98 および CD147 抗体を用いた免疫蛍光細胞染色法によって BACE1 と CIE カーゴ分子の TRE での共局在を観察する。
- (4) γ -Taxilin による CIE カーゴ分子の制御
HeLa 細胞を用い、既知の CIE カーゴ分子である CD98 や CD147 に対して下記の方法で検証を行った。
- ① TRE 形成実験
CD98 および CD147 抗体を用いて (3) ① と同様の手法で測定した。
 - ② リサイクリング実験
 γ -Taxilin KD およびコントロール KD HeLa 細胞を用いて、CD98 抗体を用いて (3) ① と同様の方法で細胞内に取り込まれた CD98 をラベル化し、一定時間ごとに細胞内の CD98 と細胞膜上の CD98 を免疫蛍光細胞染色法によって検出することで、細胞膜上へのリサイクリング効率を測定した。
 - ③ cell spreading 実験
 γ -Taxilin KD、CD147 KD およびコントロール KD HeLa 細胞をそれぞれ培養 dish から回収し、再度培養 dish 上に播種し、免疫蛍光細胞染色法を用いて接着細胞を経時的に測定した。
 - ④ Time-lapse imaging 法を用いた TRE 形成実験
 γ -Taxilin KD およびコントロール KD HeLa 細胞に蛍光ラベルした CD98 抗体を細胞内に取り込ませた後に、形成される TRE を経時的に観察した。
- (5) γ -Taxilin による BACE1 の TRE 形成の制御
 γ -Taxilin KD およびコントロール KD HeLa 細胞にそれぞれ GFP-BACE1 を遺伝子導入し、GFP-BACE1 陽性の TRE を Time-lapse imaging 法により観察した。

4. 研究成果

(1) γ -Taxilin と A β 産生の関係

これまでに、A β の前駆体タンパク質である APP を過剰発現させた γ -Taxilin KD HeLa 細胞において培養上清中の A β 40、42 量がコントロール KD 細胞と比較して減少することを ELISA 測定によって見出している。Neuro2A 細胞において γ -Taxilin KD を行い同様の実験を行った結果、培養上清中の A β 40、42 量がコントロール KD 細胞と比較して減少していた。さらに APP を過剰発現させた γ -Taxilin KO HeLa 細胞を作製し同様の実験を行った結果、培養上清中の A β 40、42 量が親株細胞と比較して減少していた。これらの結果から、 γ -Taxilin が A β 産生に関与していることが示唆された。

(2) γ -Taxilin と APP 切断の関係

(1) において観察された γ -Taxilin KD/KO 細胞での A β 産生の減少が γ -Taxilin による BACE1 制御を介して引き起こされているのかを検証するために BACE1 切断産物である sAPP β 、CTF β (図 1 参照) の量を測定した。その結果、 γ -Taxilin KD 細胞ではコントロール KD 細胞と比較して sAPP β 、CTF β がともに減少していた。これらの結果から、 γ -Taxilin は BACE1 を介した A β 産生に関与していることが示唆された。

(3) BACE1 の Tubular recycling endosome (TRE) への局在化

細胞内に取り込まれた CIE カーゴ分子は初期エンドソームから特徴的な細長いチューブ様構造である TRE へ輸送されることが知られている。そこで、BACE1 抗体を用いて BACE1 の TRE への局在を調べたが、明確なチューブ構造を観察することができなかった。その理由として、BACE1 は主に後期 Golgi/TGN に局在し、一部が細胞膜表面とエンドソーム間を循環しているため、TRE への局在が少なく観察が困難であると考えられた。そこで GFP 融合 BACE1 plasmid を作製し HeLa 細胞に発現させて、新たに生細胞イメージングシステムを構築し観察した結果、GFP-BACE1 のチューブ構造への局在が観察された (図 3)。この Tube 構造が TRE かどうかを検証するために、既知の CIE カーゴ分子で TRE に局在することが報告されている CD98 が BACE1 と共局在するかを検証した結果、TRE において BACE1 と CD98 の共局在が確認された (図 4)。また、CD98 と同じ経路で TRE に輸送されるカーゴ分子である CD147 においても同様の結果が得られた。

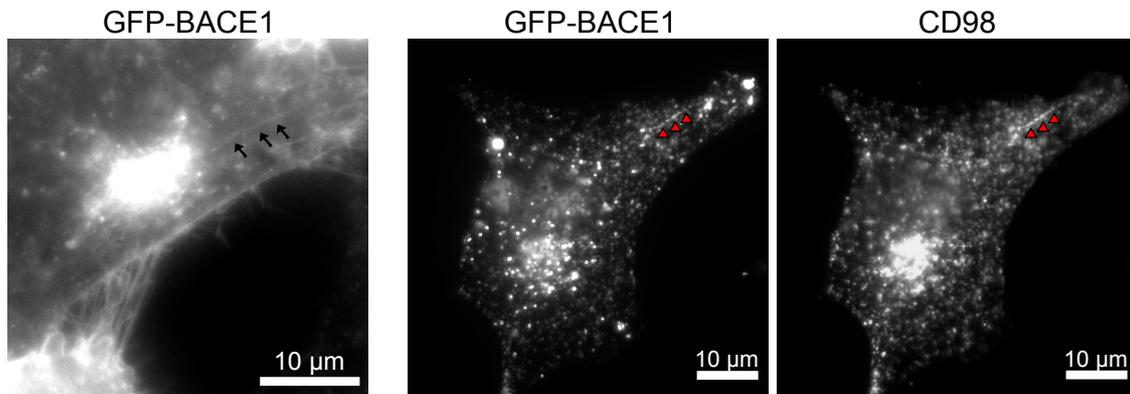


図3. GFP-BACE1のtube構造

図4. GFP-BACE1とCD98の共局在

(4) γ -TaxilinによるCIEカーゴ分子の制御

CIEカーゴ分子の解析に使用可能なBACE1抗体が入手できなかったため、代替的にTREにおいてBACE1と共局在を示したCD98およびCD147を用いて、 γ -TaxilinによるCIEカーゴ分子の制御機構について解析を行った。CD98抗体およびCD147抗体を用いて、免疫蛍光細胞染色を応用したTRE形成実験、リサイクリング実験および細胞接着実験を行った。その結果、 γ -Taxilin KD細胞では、CD98およびCD147陽性のTREの形成が亢進していた。またCD98の細胞膜上へのリサイクリングおよびCD147のリサイクリングを介した細胞接着が亢進していた。さらに、 γ -Taxilin KD細胞で確認されたTRE形成の亢進についてはTime-lapse imaging法によりTREへのソーティングが亢進した結果であることが確認できた。これらの結果から、 γ -TaxilinはCD98およびCD147のTREへのソーティングを負に制御することによって細胞膜上へのリサイクリングを制御していることが明らかになった。解析可能なBACE1抗体の取得が可能になった場合は同様の実験を行い、 γ -TaxilinによるBACE1の輸送制御の検証を行いたい。

(5) γ -TaxilinによるBACE1のTRE形成の制御

(4)の結果において γ -Taxilin KD細胞でみられたCD98やCD147陽性TRE形成の亢進は、これら分子のTREへのソーティングが亢進した結果であるが、BACE1においても同様の結果が得られるかを、(3)で用いたGFP-BACE1を使用した実験系において検証を行った。その結果、 γ -Taxilin KD細胞ではコントロール細胞と比較してGFP-BACE1陽性のTRE形成の亢進が確認された。このことから、BACE1は、CD98やCD147と同様に γ -TaxilinによってTREへの輸送が制御されている可能性が考えられるとともに、BACE1の細胞内輸送制御がA β 産生に影響を及ぼす可能性も示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|---|--------------------|
| 1. 著者名 Yamaguchi Yoshiyuki, Kamai Takao, Higashi Satoru, Murakami Satoshi, Arai Kyoko, Shirataki Hiromichi, Yoshida Ken-Ichiro | 4. 巻 19 |
| 2. 論文標題 Nrf2 gene mutation and single nucleotide polymorphism rs6721961 of the Nrf2 promoter region in renal cell cancer | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 BMC Cancer | 6. 最初と最後の頁 1137 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-019-6347-0 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Kamai Takao, Higashi Satoru, Murakami Satoshi, Arai Kyoko, Namatame Takashi, Kijima Toshiki, Abe Hideyuki, Jamiyan Tsengelmaa, Ishida Kazuyuki, Shirataki Hiromichi, Yoshida Ken Ichiro | 4. 巻 112 |
| 2. 論文標題 Single nucleotide variants of succinate dehydrogenase A gene in renal cell carcinoma | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Science | 6. 最初と最後の頁 3375 ~ 3387 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14977 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Higashi Satoru, Makiyama Tomohiko, Sakane Hiroshi, Nogami Satoru, Shirataki Hiromichi | 4. 巻 135 |
| 2. 論文標題 Regulation of Hook1-mediated endosomal sorting of clathrin-independent cargo by -taxilin | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Cell Science | 6. 最初と最後の頁 jcs258849 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.258849 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Shirataki H, Higashi S, Sakane H |
| 2. 発表標題 Cell proliferation related expression of -taxilin, a candidate tumor marker, in the murine gastrointestinal tract. |
| 3. 学会等名 The 44rd FEBS Congress（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|