

機関番号： 32620

研究種目： 基盤研究 (B)

研究期間： 2008 ~ 2010

課題番号： 20300125

研究課題名 (和文) 膜マイクロドメイン依存性新規アミロイド産生制御機構の解析

研究課題名 (英文) A novel microdomain-dependent regulatory mechanism of amyloid precursor protein processing

研究代表者

櫻井 隆 (SAKURAI TAKASHI)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号： 70225845

研究成果の概要 (和文)：

$\beta$  アミロイド ( $A\beta$ ) はアルツハイマー病の病理に中心的な役割を果たすとされる。膜マイクロドメインにおけるアミロイド前駆体蛋白質 (APP) の BACE1 による切断は、 $A\beta$  産生の重要な調節機序である。この分子機構を明らかにするため、APP を含むマウス脳由来の界面活性剤不溶性画分を得て解析した。APP は X11-Munc18-syntaxin 1 を含むマイクロドメインを形成して BACE1 を含むマイクロドメインを排除し、APP-BACE1 結合と切断を抑制していた。蛋白質相互作用に基づくマイクロドメイン分離が関与し、cdk5 リン酸化により制御される新しい APP 切断調節機構を見出した。

研究成果の概要 (英文)：

Beta-cleavage of amyloid precursor protein (APP) by  $\beta$ -secretase (BACE1) in a membrane microdomain is thought to be a critical regulatory event in generating  $\beta$ -amyloid which is central to the pathogenesis of Alzheimer's disease. To investigate the underlying molecular mechanisms of this process, we analyzed immunisolated, APP-containing, detergent-resistant membranes from mouse brains. APP was associated with cholesterol-dependent microdomains through a network of protein interactions involving X11, Munc18 and syntaxin 1, which largely excluded BACE1. APP-X11-Munc18 interaction mediated inhibitory effects on APP-BACE1 interaction and  $\beta$ -cleavage. We propose a novel regulatory mechanism of APP processing involving microdomain segregation that depends on protein-protein interactions and is controlled by cdk5 phosphorylation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	10,100,000	3,030,000	13,130,000
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野： 神経薬理学

科研費の分科・細目： 神経解剖学・神経病理学

キーワード： 神経変性疾患、痴呆、脂質

## 1. 研究開始当初の背景

65 歳以上の認知症の推定患者数は現在約 200 万人であるが、今後 20 年で倍増すると予測されている。認知症のうち約 50%はアルツ

ハイマー病が原因とされ、その治療法の開発・発症の遅延は急務となっている。現在、アミロイド仮説に基づいて開発された薬物の治験が行われている段階であるが、早期診

断・病態進展評価のためのバイオマーカーの確立や副作用少ない治療法の開発が重要課題とされている。

アミロイドβ (Aβ) の過剰蓄積・凝集はアルツハイマー病の病理に中心的な役割を果たすと考えられている。Aβは1回膜貫通蛋白質であるアミロイド前駆体蛋白質 (APP) がβ、γの2段階切断を受けることにより産生され、細胞外に放出される。β切断を行う膜結合型プロテアーゼ BACE1 はアルツハイマー病の治療標的として注目されているが、その生理的機能・調節機構の詳細は明らかになっていない。

BACE1 はパルミトイル化によりコレステロール・スフィンゴ脂質に富む膜マイクロドメインであるラフトに局在し、酸性化したオルガネラ、特にエンドソーム中で切断活性を持つとされる。BACE1 とその基質はともに膜貫通蛋白質であるため、マイクロドメイン局在によりその相互作用と切断が大きな影響を受ける。ラフトには APP の一部も局在し、その結合にコレステロール依存性が見られることから、ラフトは APP-BACE1 相互作用・β切断の場と考えられている。

電位依存性ナトリウムチャネルβサブユニット、ニューレグリン1 (NRG1) など複数のラフト局在蛋白質が APP と同様β、γ切断を受けることが知られている。APP 以外の基質の存在とその生理的機能は BACE1 阻害薬の副作用の可能性を示している。BACE1 及びその基質とともにラフトに集積する蛋白質群を比較解析し、ラフトにおける APP 特異的β切断調節蛋白質およびその制御機序を解明することは、より副作用の少ない治療戦略の開発につながると考えられる。

## 2. 研究の目的

ラフトは、その秩序だった脂質環境により低温下で界面活性剤による可溶性に耐性を示すとされている。細胞・組織を4℃、界面活性剤存在下でホモジェナイズ後ショ糖密度勾配超遠心を行うと不溶性の脂質-蛋白質複合体として浮遊し、detergent-resistant membranes (DRM) として回収される。生体内のラフトの構成蛋白質は個々のラフトにより異なり、ヘテロな集団であると考えられるが、これまでのラフト調製法では、界面活性剤による膜同士の融合のため、個々のラフトの解析は不可能であった。生体内の膜蛋白質集積状態を維持したラフト調製が可能となれば、APP または BACE1 が集積したラフトの単離精製、相互作用調節機序の解析が可能となる。本研究では、マウスの脳組織からの DRM 調製条件を検討して膜同士の融合が無視できる条件を見出し、BACE1 や APP などの基質が集積する DRM を免疫沈降により単離精製することを試みた。その DRM 中の構成蛋白質を

同定し、β切断の調節蛋白質を探索するために解析を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) DRM 調製法

すべての操作は4℃にて行った。凍結マウス脳を細切後、1%界面活性剤とプロテアーゼ阻害薬カクテルを含むMES緩衝生理食塩水 (MBS, pH 6.5) 中でダウンス型ホモジェナイザーにより素早く破碎した。30分間攪拌した後、2,000 x g 10分間遠心し、上清を得た。その上清と等量の80%ショ糖を含むMBSを混合して超遠心用チューブに入れ、30%, 20%, 10%, 5%ショ糖溶液を重層し260,000 x g 21時間遠心した。チューブの上から12フラクションを取り液体窒素にて凍結し-80℃にて保存した。

### (2) DRM の免疫沈降

Thy-1 に対する種特異的な抗体による DRM の免疫沈降は Madore らの方法に従って行った。抗 APP 抗体による DRM の免疫沈降には、ウサギで作製した APP C 末端の細胞内ドメインに対する抗血清を抗原でアフィニティー精製して使用した。Protein A 結合磁気ビーズに抗体を固定化後 TBS にて希釈した DRM と反応させた。界面活性剤を含む TBS にて洗浄後、抗体結合 DRM を SDS にて可溶化した。

### (3) 質量分析による蛋白質同定

抗 APP 抗体により沈降された DRM 中の蛋白質を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分離後染色した。切り出したバンド中の蛋白質をトリプシンにて in-gel digestion し、生じたペプチドを ESI-LC/MS/MS 法にて解析した。

### (4) β切断調節蛋白質候補の解析

同定した蛋白質の cDNA を PCR により得てベクターに挿入し、変異体を作製した。株化細胞に各種変異体の発現、RNA 干渉による内在性蛋白質の発現抑制を行い、γ切断阻害時にβ切断により生じる APP C 末端断片量の変化をウェスタンブロット法により解析した。また、免疫沈降法により APP との相互作用を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) DRM 調製の条件検討と APP 集積 DRM の免疫沈降

Thy-1 をマーカーとして解析したところ、DRM 調製に Triton X-100 を用いた場合には膜同士の融合を起こした。一方、Lubrol WX を用いた場合には膜同士の混合がほぼ無視できる程度であった。また、電子顕微鏡のグリッド上で抗 APP 抗体と金コロイド標識2次抗体を用いて Lubrol-DRM 上における分布を観察したところ、ランダムな分布ではなく数%程度の膜構造物上にクラスター状に金コロイドが結合するのが観察された。様々な構

成分を持つ Lubrol-DRM から APP の C 末端を認識する抗体を用いて免疫沈降を行い、APP 集積 DRM を単離精製して解析した。APP は特定の蛋白質構成の DRM に集積することが示された。

#### (2) syntaxin 1 マイクロドメインを介する APP 切断調節機構の解析

APP 集積 DRM 及び BACE1 集積 DRM を解析したところ、BACE1 の基質となる APP の約 25%、BACE1 の大部分が DRM に存在するにもかかわらず DRM 上での共存が見られなかった。これは DRM 中の APP の存在様式が BACE1 との相互作用を妨げるものであることを示唆している。APP 集積 DRM の構造を解析したところ、典型的な膜ラフトとは異なる性質を持ち、APP が足場蛋白質 X11-Munc 18 を介して syntaxin 1 により形成される膜マイクロドメインに結合したものであることが示された。syntaxin 1 マイクロドメインは、コレステロール依存性に BACE1 集積ラフトと分離する性質を持ち、膜マイクロドメイン上での APP と BACE1 の分離の分子基盤となっていることが示唆された。興味深いことに、加齢による酸化ストレス増大に伴い活性が上昇する cdk5 による Munc18 のリン酸化が APP-syntaxin 1 結合を解離させ、APP の BACE1 局在ラフトへの移行、 $\beta$ 切断増加を引き起こした。

#### (3) APP 集積マイクロドメインの構成蛋白質の同定と $\beta$ 切断調節蛋白質の探索

APP 集積 DRM の質量分析により 50 以上の構成蛋白質を同定した。APP は軸索輸送に関連する蛋白質とともにマイクロドメインに局在することが示唆された。上記同様の解析を行い、 $\beta$ 切断を調節する蛋白質の探索を行っている。

#### (4) まとめ

生体内の蛋白質集積状態を維持した DRM 調製法を用いてマウス脳組織から APP 集積 DRM を単離精製した。APP のマイクロドメイン結合を制御する蛋白質として X11, Munc18, syntaxin 1 を同定し、その調節機序について解析した。その結果、以下の現象を見出した。

- ① APP 結合蛋白質である X11 と Munc18 を介して、APP が典型的なラフトとは異なる syntaxin 1-マイクロドメインに存在する。
- ② syntaxin 1-マイクロドメインは BACE1 局在ラフトとは分離する性質を持ち、syntaxin 1-マイクロドメイン中の APP と BACE1 との相互作用・切断が抑制されている。
- ③ cdk5 による Munc18 リン酸化を介して X11-Munc18-syntaxin 1 結合が解離し、APP が BACE1 局在ラフトに移動する。この現象をマイクロドメインスイッチングと名付けた。cdk5 活性増大は、 $A\beta$  によっても惹起され

ることから、加齢やアルツハイマー病における  $A\beta$  産生亢進の機序となっている可能性も考えられる。今後、この APP および BACE1 集積 DRM の解析をさらに進め、新規の創薬標的の探索を行う。

BACE1 阻害はアルツハイマー病の期待される治療戦略であるが、BACE1 阻害がニューレグリンの BACE1 による切断阻害を介してミエリン形成に影響を与えることが示され、その副作用が懸念されている。マイクロドメインにおける APP 結合蛋白質を介した  $\beta$ 切断制御機構の解明は、APP 特異的で副作用の少ない薬物標的の発見につながると期待される。

#### 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 4 件)

- ① 櫻井 隆、樫山 拓、貫名 信行: マイクロドメインスイッチング: アミロイド前駆体蛋白質のマイクロドメイン依存性代謝調節とシンタキシン I. 生体の科学 61: 252-256, 2010 査読無
- ② Tateno M, Kato S, Sakurai T, Nukina N, Takahashi R, Araki T: Mutant SOD1 impairs axonal transport of choline acetyltransferase and acetylcholine release by sequestering KAP3. Hum Mol Genet 18: 942-955, 2009 査読有
- ③ Sakurai T, Kaneko K, Okuno M, Wada K, Kashiyama T, Shimizu H, Akagi T, Hashikawa T, Nukina N: Membrane microdomain switching: a regulatory mechanism of amyloid precursor protein processing. J Cell Biol 183: 339-352, 2008 査読有
- ④ Shimizu H, Tosaki A, Kaneko K, Hisano T, Sakurai T, Nukina N: Crystal structure of an active form of BACE1: an enzyme responsible for amyloid beta protein production. Mol Cell Biol 28: 3663-3671, 2008 査読有

[学会発表] (計 11 件)

- ① 樫山 拓、櫻井 隆: 切断端抗体を用いた BACE1 依存的 neuregulin 1 シグナル伝達機構の解析 第 84 回日本薬理学会年会 2011 年 3 月 (年会中止のため誌上発表)
- ② Kashiyama T, Sakurai T: Detection of BACE1-mediated activation of neuregulin 1-erbB signaling using a cleavage site specific antibody. Inaugural International Academy of Sportology 東京 2011 年 3 月
- ③ 樫山 拓、櫻井 隆: 切断端を特異的に認

識する抗体を用いたニューレグリン切断機構の解析 第 123 回日本薬理学会関東部会 栃木 2010 年 10 月

- ④ Sakurai T, Kashiyama T, Shimizu H, Nukina N; Membrane microdomain switching - a regulatory mechanism of amyloid precursor protein processing. 第 82 回日本生化学会大会 神戸 2009 年 10 月 (シンポジウム)
- ⑤ Sakurai T, Kaneko K, Okuno M, Wada K, Kashiyama T, Shimizu H, Nukina N; Membrane microdomain switching - a new regulatory mechanism of amyloid precursor protein processing. Neuroscience 2008, Washington DC, USA 2008 年 11 月
- ⑥ 櫻井 隆、金子 貢巳、奥野 弥佐子、和田 浩司、榎山 拓、清水 英明、貫名 信行; マイクロドメインスイッチング: 膜マイクロドメイン依存性の新規アミロイド前駆体蛋白質代謝制御機構. 第 27 回日本認知症学会 前橋 2008 年 10 月

[その他]

ホームページ等

<http://pharmacology.sakura.ne.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

櫻井 隆 (SAKURAI TAKASHI)  
順天堂大学・医学部・教授  
研究者番号: 70225845

### (2) 研究分担者

貫名 信行 (NUKINA NOBUYUKI)  
(独) 理化学研究所・構造神経病理研究チーム・チームリーダー  
研究者番号: 10134595

### (3) 連携研究者

榎山 拓 (KASHIYAMA TAKU)  
順天堂大学・医学部・助教  
研究者番号: 90338343

新家 瑠奈 (ARAYA RUNA)  
順天堂大学・医学部・助教  
研究者番号: 10391848

上窪 裕二 (KAMIKUBO YUJI)  
順天堂大学・医学部・助教  
研究者番号: 80509670