

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890002

研究課題名（和文）

X11 ファミリータンパク質の生理機能解析

研究課題名（英文）

Analysis of X11 proteins functions *in vivo*

研究代表者

齋藤 有紀 (SAITO YUHKI)

北海道大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：70548180

研究成果の概要（和文）：X11 及び X11L 遺伝子欠損により過分極賦活型（HCN）チャネルの機能異常が起き、X11/X11L 二重遺伝子欠損マウスが脳波異常を伴う痙攣発作を起こすことを明らかにした。X11L 遺伝子欠損マウス脳内に形成されるアミロイド斑数が増加していることを明らかにした。X11 proteins が有するアミロイド前駆体蛋白質（APP）の代謝安定化にはカルボキシル基末端の2つのPDZドメインが重要な役割を担っていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：X11/X11L doubly-deficient mice suffered from spontaneous epileptic seizures and hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated (HCN) channels function were reduced in X11/X11L doubly-deficient mice brain. The number of amyloid deposits in X11L-KO/APP23 Tg mice brains were significantly increased. The functional domains of X11 proteins to suppress the metabolism of amyloid precursore protein (APP) were carboxy-terminal PDZ domains.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2010年度	970,000	291,000	1,261,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,040,000	612,000	2,652,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：アルツハイマー病，てんかん，X11

## 1. 研究開始当初の背景

(1) これまでに、X11/X11L 二重遺伝子欠損（X11/X11L-DKO）マウスを作製し、X11/X11L-DKO マウスが自発的な痙攣発作を起こすことを明らかにしていたが、痙攣発作発症の原因となる異常や発症機構は不明であった。

(2) X11 proteins が APP 代謝を安定化することは X11-KO マウスや X11L-KO マウス、X11/X11L-DKO マウスの解析により明らかにしていたが、アミロイド斑の形成が X11L-KO マウス脳内で亢進しているかどうかは不明であった。

(3) X11 proteins が APP 代謝を安定化することはこれまでに明らかにされていたが、代謝安定化に関わる機能ドメインは明らかにされていなかった。

## 2. 研究の目的

(1) X11/X11L-DKO マウスが自発的な痙攣発作を起こす分子機構の解明。

(2) X11L-KO マウス脳内でアミロイド斑の形成が亢進していることを明らかにする。

(3) X11 proteins が APP 代謝を安定化するのに必要な機能ドメインの同定。

### 3. 研究の方法

(1) 異常な神経細胞活動が起きている脳内領域を同定するために神経細胞の活動マーカーである c-fos の免疫染色を痙攣発作前後の X11/X11L-DKO マウスより脳切片を作製し検証した。同定した異常脳領域での神経細胞活動の異常を検証するために電気生理学的手法により解析を行った。生化学的な分画により各種蛋白質の局在を比較した。

(2) 脳内に形成されるアミロイド斑数の比較を行うために、X11L-KO/APPTg マウスおよび APPTg マウス脳より脳切片を作製し、免疫染色法により形成されるアミロイド斑を検出し比較した。同時に、それぞれのマウス脳内で産生されるアミロイドβ量を sELISA 法により定量し比較した。

(3) X11L の各種ドメイン欠失体を作製し、それぞれのドメイン欠失体存在下で産生される APP 代謝産物 sAPP, APP-CTF, アミロイドβ量を western blot 法, sELISA 法により検出・定量した

### 4. 研究成果

(1) X11/X11L-DKO マウスの歯状回において c-fos が痙攣発作後に高発現していることを明らかにした。また、歯状回に入力している脳内領域である嗅内野皮質第2層に X11 及び X11L が共発現していること、嗅内野皮質第2層神経細胞で検出される Ih current (HCN チャンネルが作り出す) が X11/X11L-DKO マウスで約半分程度に減少していることを明らかにした (図1)。

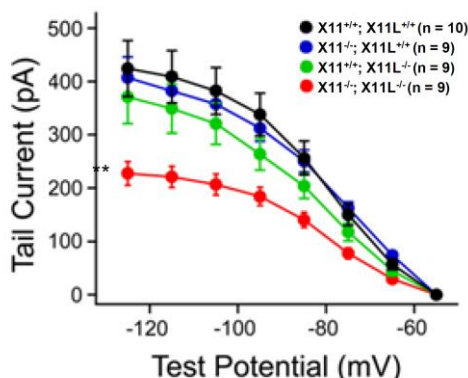


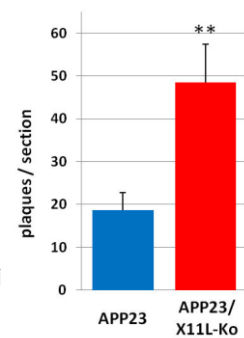
図1. X11<sup>+/+</sup>; X11L<sup>+/+</sup> (黒), X11<sup>-/-</sup>; X11L<sup>+/+</sup> (青), X11<sup>+/+</sup>; X11L<sup>-/-</sup> (緑), X11<sup>-/-</sup>; X11L<sup>-/-</sup> (赤) マウス嗅内野皮質第2層神経細胞の Ih current の定量結果。X11<sup>-/-</sup>; X11L<sup>-/-</sup> (赤)マウスの Ih current は他の遺伝子型マウスと比べ有意に 50%程度減少している。

さらに、HCN チャンネル分子の嗅内野皮質における局在が変化していることを免疫染色法により明らかにした。HCN チャンネルの局在変化を生化学的な分画でも検証し、細胞体に存在する HCN チャンネル量が野生型マウス脳と比較し X11/X11L-DKO

マウス脳で減少していることを明らかにした。以上の結果から、X11/X11L-DKO マウス脳内では HCN チャンネルの局在異常による Ih current の減少により自発的な痙攣発作が起きていることを明らかにした。これまで、痙攣発作発症の分子機構が明らかにされた例は少なく、痙攣発作発症の分子機構を解明した本成果は、世界に先駆けた独創的な成果である。また、X11 proteins はアルツハイマー病の原因因子 APP の代謝安定化分子である。HCN チャンネルとアルツハイマー病の関連を X11/X11L-DKO マウスで今後、解析することは、近年アルツハイマー病とてんかんの関連性が注目されていることから、両神経疾患の解明に繋がる研究である。

(2) X11L-KO/APP Tg マウスと APP Tg マウス脳内で形成されるアミロイド斑数を定量したところ、X11L-KO/APP Tg マウス脳内で形成されるアミロイド斑数が APP Tg マウスと比較し有意に増加していることを明らかにした (図2)。同時に、APP 代謝産物である sAPP, APP-CTF, アミロイドβ数が有意に増加していることも明らかにし、X11L がアミロイド斑形成や APP 代謝に対し抑制的に機能する分子であることを明らかにした。

図2. X11L-KO/APP Tg マウス脳及び APP Tg マウス脳内に形成されるアミロイド斑数の定量結果。赤で示す X11L-KO/APP Tg マウス脳内で形成されるアミロイド斑数は APP Tg マウスと比較し有意に増加していた。



(3) 図3に示す X11L の各種ドメイン欠失体を作製した。

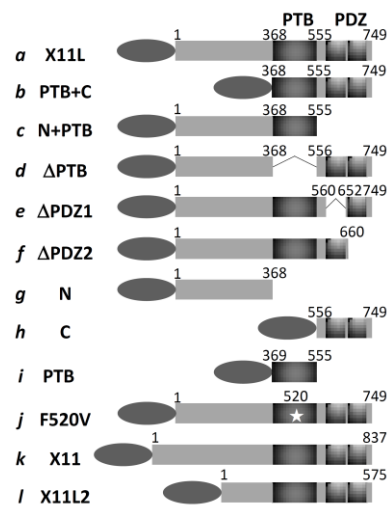


図3. 作製・使用した各種 X11L ドメイン欠失変異体の模式図。

各種ドメイン欠失変異体発現下で産生されるアミロイドβ (Aβ40, Aβ42)の量を定量し、C末端側の2つのPDZドメインを含む欠失変異体でAβ産生量が有意に減少していることを明らかにし(図4)、アミロイドβの産生抑制にはPDZドメインが重要な役割を担っていることを明らかにした。X11 proteinsのPDZドメインはX11 proteinsの最C末端と結合しAuto-inhibition構造をとっていることが明らかにされている。今後予定しているPDZドメインの構造変化と構造変化機構の解析は、さらなるX11 proteinsによるAPP代謝安定化機構の解析に繋がる。

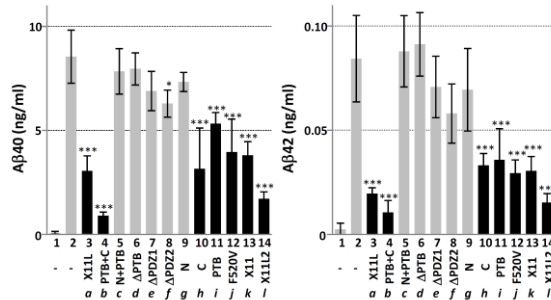


図4. X11L 各種ドメイン欠失体発現下におけるAβ40及びAβ42産生量の比較。C末端に存在する2つのPDZドメインを有するX11L変異体はAβ産生を有意に抑制する。

#### 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2件)

- Maho Kondo, Maki Shiono, Genzo Ito, Norio Takei, Takahide Matsushima, Masahiro Maeda, Hidenori Taru, Saori Hata, Tohru Yamamoto, Yuhki Saito and Toshiharu Suzuki (2010) Increased amyloidogenic processing of transgenic human APP in X11-like deficient mouse brain. *Mol. Neurodegener.* 5:35 査読有
- Chie Mizumaru, Yuhki Saito, Takao Ishikawa, Tomohiro Yoshida, Tohru Yamamoto, Tadashi Nakaya, Toshiharu Suzuki (2009) Suppression of APP-containing vesicle trafficking and production of β-amyloid by AID/DHHC-12 protein. *J. Neurochem.* 111, 1213-24 査読有

[学会発表] (計15件)

- Yuhki Saito and Toshiharu Suzuki 「A Novel secretory pathway of amyloid precursor protein mediated by X11-like」50<sup>th</sup> The American society for cell biology annual meeting Philadelphia

(PA) Dec 14, 2010 [2572/Poster]

- Maki Shiono, Yuhki Saito and Toshiharu Suzuki 「Functional region of X11-like in the regulation of APP intracellular metabolism and trafficking」50<sup>th</sup> The American society for cell biology annual meeting Philadelphia (PA) Dec 14, 2010 [2574/Poster]

- 齋藤有紀, 井上剛, 鈴木利治 アミロイド前駆体蛋白質 (APP) 結合分子X11 proteins欠損による痙攣発作発症の分子機構解明 第29回日本認知症学会学術集会 ウィンク愛知 (愛知県) [21-18] 2010年11月5-6日 [ポスター]

- Yuhki Saito, Tsuyoshi Inoue, Toshiharu Suzuki 「Neuronal Activity and APP Metabolism in The Brain of X11/X11L Doubly-Deficient mice」 Alzheimer's Association International Conference on Alzheimer's Disease 2010 (ICAD 2010) Honolulu, Hawaii [P1-112] July 11, 2010 [Poster]

- Yi Piao, Naoya Gotoh, Maho Kondo, Yuhki Saito, Saori Hata, Tohru Yamamoto, Toshiharu Suzuki 「Expression and localization of Alcadein Along with X11L and APP in mouse brain」 Alzheimer's Association International Conference on Alzheimer's Disease 2010 (ICAD 2010) Honolulu, Hawaii [P1-222] July 11, 2010 [Poster]

- Maki Shiono, Mayu Akiyama, Yuhki Saito, Toshiharu Suzuki 「Functional region of X11L in the regulation of APP metabolism and trafficking」 Alzheimer's Association International Conference on Alzheimer's Disease 2010 (ICAD 2010) Honolulu, Hawaii [P1-247] July 11, 2010 [Poster]

- 齋藤有紀, 塩野真紀, 鈴木利治 「脳内APP代謝におけるX11-like/X11Lの機能」第130年会 日本薬学会 ホテルグランヴィア岡山 (岡山県) [一般シンポジウム S22-1] 2010年3月30日

- 齋藤有紀, 井上剛, 井本敬二, 山本融, 鈴木利治 「X11 proteins欠損によるAb産生増加と痙攣発作発症の分子基盤解明」第28回日本認知症学会 東北大学百年記念会館 [1-P-3] 2009年11月20日 [ポスター]

- 近藤真帆, 佐久間めぐみ, 齋藤有紀, 伊藤原蔵, 前田雅弘, 鈴木利治 「X11L欠損マウスにおける脳内human APPのアミロイド産生的代謝」第28回日本認知症学会 東北大学百年記念会館 [1-P-13] 2009年11月20日 [ポスター]

10. **齋藤有紀**, 近藤真帆, 伊藤原蔵, 前田雅弘, 鈴木利治「脳特異的アダプター蛋白質X11およびX11LによるA $\beta$ 産生抑制の分子機構」第82回日本生化学大会 神戸ポートアイランド[4T9a-4, 4P552] 2009年10月24日[口頭&ポスター]

11. 塩野真希, 穂山麻由, 山本融, **齋藤有紀**, 鈴木利治「APP代謝と細胞内局在に果たすX11Lの機能ドメインの解析」第82回日本生化学大会 神戸ポートアイランド[4P553] 2009年10月24日[ポスター]

12. 近藤真帆, **齋藤有紀**, 前田雅弘, 鈴木利治「X11Lによるアルツハイマー病原因因子APPの脳内切断制御とアミロイド生成」第14回日本病態とプロテアーゼ学会 (J.S.P.P) 千里ライフサイエンスセンター(大阪) [G1] 2009年8月21日[ポスター]

13. Maki Shiono, Mayu Akiyama, **Yuhki Saito**, Tohru Yamamoto, Toshiharu Suzuki「Regulation of intracellular APP transport by X11L」12th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders (ICAD) [P4-183] July 15, 2009, Vienna, Austria [Poster]

14. **Yuhki Saito**, Tadashi Nakaya, Toshiharu Suzuki「Aberrant localization of amyloid precursor protein in X11- and X11L-deficient mice brain」12th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders (ICAD) [P1-007] July 12, 2009, Vienna, Austria [Poster]

15. Maho Kondo, Megumi Sakuma, **Yuhki Saito**, Tadashi Nakaya, Masahiro Maeda, Toshiharu Suzuki「Amyloidgenic Metabolism of human APP in X11-like deficient mice brain」12th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders (ICAD) [P1-158] July 12, 2009, Vienna, Austria [Poster]

[図書] (計1件)

1. Saori Hata, **Yuhki Saito**, and Toshiharu Suzuki. (2011) Alzheimer's Disease as a Membrane-Associated Enzymopathy of  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein (APP) Secretases: Lipids and Cellular Membranes in Amyloid Disease (Edited by Raz Jelinek), 177-194, WILEY-VCH, Weinheim

[その他]

ホームページ等

<http://www.pharm.hokudai.ac.jp/shinkei/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 有紀 (SAITO YUHKI)

北海道大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：70548180

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし