

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23300128

研究課題名(和文) エンドサイトーシス障害によるミクロドメイン依存性アミロイド産生亢進機構の解明

研究課題名(英文) Microdomain-dependent acceleration mechanisms for amyloidogenic processing of amyloid precursor protein induced by endocytic membrane traffic impairment

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,200,000円

研究成果の概要(和文)：アミロイド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おり、アミロイド前駆体蛋白質(APP)が、 $\beta$ -切断を受けることにより産生される。膜マイクロドメインはAPPのエンドソーム輸送に深く関与しており、アミロイド産生の場と考えられている。一方、APPの $\beta$ -切断産物であり、A $\beta$ の前駆体となるC末端断片(CTF)の蓄積は、アルツハイマー病初期のエンドソーム機能不全の原因と考えられている。分子機構を明らかにするためにAPPを含む膜マイクロドメイン中のエンドソーム関連蛋白質を解析したところ、CTFと相互作用し、エンドソーム輸送を障害する候補蛋白質を同定した。

研究成果の概要(英文)：Aggregation and deposition of amyloid peptide (A $\beta$ ) in the brain is considered central to the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD). A $\beta$  is produced through a sequential cleavage of the amyloid precursor protein (APP) by  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretases. Increasing evidence indicates that membrane microdomains play an important role as a platform for the vesicular transport of APP in the secretory and endocytic pathways and in the amyloidogenic processing of APP. Recently, accumulation of  $\beta$ -secretase-cleaved C-terminal fragment of APP (CTF), which is the direct precursor of A $\beta$ , was found to cause endosome dysfunction during the early phase of AD that could drive A $\beta$  overproduction. To gain insight into the underlying molecular mechanisms, we examined the functions of endosomal proteins in the APP-containing microdomains. We identified a candidate protein that causes impairment of endocytic membrane traffic through its interactions with CTF.

研究分野：神経薬理学

キーワード：脳神経疾患 認知症 脂質

### 1. 研究開始当初の背景

65 歳以上の高齢者について認知症の有病率は 15%、有病者数約 462 万人と推計(2012 年)されており、2025 年には 700 万人を超えると予想されている。認知症の人の医療・介護費と家族介護の負担を含む社会的コストは、2014 年で 14 兆 5 千億円とされるが、今後急増すると予想される。認知症の 50%以上はアルツハイマー病が原因とされており、その治療法の開発は急務となっている。

アミロイド (A $\beta$ ) の産生亢進・分解低下により生ずる凝集体が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。A $\beta$  は、膜貫通蛋白質であるアミロイド前駆体蛋白質 (APP) が、切断を順次受けることにより産生される。切断を行う BACE1 は、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の代表であるラフトに局在する膜貫通蛋白質であり、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。

神経細胞においては、APP は細胞体から主に軸索内を順行性に輸送され軸索末梢の細胞膜に到達する。その後、シナプス前終末で神経活動依存性にエンドサイトーシスを受け、エンドソーム内の膜マイクロドメインにおいて切断が起こると考えられている。我々は、APP が巨大な蛋白質複合体を介して BACE1 を排除した特殊な膜マイクロドメインを神経細胞のゴルジ体において形成する可能性を示した。軸索輸送後には、cdk5 依存性に蛋白質複合体が解離してマイクロドメインから APP が遊離し、BACE1 の存在するラフトに移行すること(マイクロドメインスイッチング)により、エンドソームにおける切断が引き起こされる可能性がある。

アルツハイマー病及び同様の神経病理の見られるダウン症脳において、A $\beta$  沈着に先立ってエンドソームの拡大などエンドサイトーシス輸送障害が見いだされ、孤発性アルツハイマー病最初期の病理変化とされている。これは、APP の切断の産物で切断の基質となる APP C 末端断片 (CTF) が原因であり、A $\beta$  は関与しないことが示されている。病態の進行によりこの輸送障害がエンドソームのラフトを場とするアミロイド産生の亢進を引き起こす可能性が考えられている。BACE1 活性上昇によるエンドソーム輸送障害は、ライソソームにおける APP・BACE1 分解の低下、エンドソームにおける A $\beta$  産生亢進・分解低下から凝集体形成促進への悪循環に陥る引き金となる重要なステップと考えられるが、そのメカニズムは明らかとなっていない。

また、ニューレグリン 1 (NRG1) や我々が報告した電位依存性ナトリウムチャネルサブユニットなど複数の膜マイクロドメイン局在蛋白質が APP と同様に、切断を受ける。BACE1 はアルツハイマー病の有力な治療標的とされているが、BACE1 阻害薬に

よる APP 以外の基質の切断抑制が有害反応を生じる可能性がある。BACE1 の基質とともに膜マイクロドメインに集積する蛋白質群を比較解析し、APP 特異的な切断調節蛋白質およびその制御機序を解明することは、副作用の少ない治療戦略開発につながると思われる。

### 2. 研究の目的

膜マイクロドメインは、秩序だった脂質環境により低温下では界面活性剤による可溶化に耐性を示すとされる。細胞・組織を 4 $^{\circ}$ C、界面活性剤存在下で破碎した際に得られる不溶性の脂質-蛋白質複合体 detergent-resistant membranes (DRM) が膜マイクロドメインに相当するものとして生化学的解析に用いられている。生体内の膜マイクロドメインは多様性に富み、構成蛋白質は個々のマイクロドメインにより異なると考えられるが、界面活性剤による膜同士のため、個々のマイクロドメインの解析は不可能であった。我々は Lubrol WX を用いた DRM 調製法により膜同士の融合を抑制することで、APP が集積する DRM を免疫沈降により単離精製し解析することが可能であることを示した。APP の細胞内輸送・切断の場である膜マイクロドメイン中に APP との相互作用しエンドサイトーシス障害に関与する蛋白質を見出すことを目的として研究を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 抗 APP 抗体による DRM の免疫沈降

凍結されたマウスまたはラット脳を 1% Lubrol WX を含む MES 緩衝生理食塩水 (MBS, pH 6.5) 中 4 $^{\circ}$ C で破碎した。ショ糖溶液と混合した上清を遠心管に入れ、ショ糖溶液を重層して超遠心し、Lubrol 不溶性の脂質-蛋白質複合体をショ糖密度勾配中で浮遊させて回収した。ウサギ抗 APP-C 末端抗体を Protein A 結合磁気ビーズに固定化後、回収した DRM 画分と反応させた。Lubrol WX を含む TBS にて洗浄後、ビーズに結合した DRM を DTT 存在下及び非存在下で SDS にて可溶化した。

#### (2) APP を含む DRM 中に共存する蛋白質の同定と切断への影響の解析

免疫沈降により得られた DRM 中に存在する蛋白質を電気泳動にて分離し、トリプシン消化により生じるペプチドの配列を質量分析法にて解析した。検出された蛋白質及びその結合蛋白質に対してペプチド抗体を作成し、ウェスタンブロット法により DRM 中の存在を確認した。同定された蛋白質の cDNA を発現ベクターに挿入し、株化細胞に発現させて APP の切断変化を解析した。変化が検出された蛋白質について、RNA 干渉による発現抑制及び変異体発現を行い、切断の変化を可溶性 APP や APP C 末端断片の解析により検討した。また、共免疫沈降法により APP との相互作用を解析した。

(3) 新規 APP 結合蛋白質のエンドサイトーシス障害への関与及び APP 特異性の解析

株化細胞に APP 及び新規 APP 結合蛋白質を発現させ、オルガネラマーカーの局在と比較し、細胞内輸送への影響を解析した。また、初代培養神経細胞に発現させ、その効果を検討した。さらに、各種の欠失変異体を細胞に発現させ、APP との結合を解析した。

(4) スライス培養系における 切断の神経活動依存性及びモデルマウスにおける局在の解析

生体内の神経回路及び組織構築を維持した海馬スライス培養系を用いて、APP のプロセッシング、APP 以外の BACE1 基質の解析を行った。新規 APP 結合蛋白質の関与を解析するために、修飾 siRNA による発現抑制を試みた。病態との関連を探るため、特異的抗体を用いた APP トランスジェニックマウスにおける局在、A プラークとの関連の解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) マイクロドメイン中で APP と共存する蛋白質の同定とエンドサイトーシス関連の APP 結合蛋白質の探索

抗 APP 抗体による免疫沈降で得られた DRM 蛋白質の質量分析により 50 以上の蛋白質を同定した。それらの多くは軸索輸送関連蛋白質やプレシナプスで機能する蛋白質であったが、エンドサイトーシスに関連する蛋白質も含まれていた。株化細胞において発現させた際の APP との共免疫沈降、細胞内局在の解析等から、APP と直接結合するエンドサイトーシス関連蛋白質を見出した。RNA 干渉による発現抑制及び変異体発現による APP プロセッシング変化の解析により、切断調節に関与し、CTF と結合する蛋白質であることが明らかとなった。

(2) エンドサイトーシス障害への関与及び APP 特異性の解析

APP とともに発現させたところ、エンドソーム輸送障害を引き起こした。CTF との結合を介した作用であり、APP に特異的であることが示唆された。

(3) スライス培養系における 切断解析及びアルツハイマー病モデルマウスにおける局在解析

ラット及びマウス海馬由来スライス培養系における APP プロセッシング解析法を確立した。スライス培養系において修飾 siRNA による発現抑制を試みたが、抑制効率が低いことが明らかとなった。アルツハイマー病モデルマウス脳における解析では、プラーク周辺に集積が見られた。

今後、スライス培養系において組換えウイルスによる発現系を用いて、他の BACE1 基質

と比較検討しながら、神経活動依存性や病態との関連解析を進めるとともに、モデルマウス等を用いて創薬標的としての可能性を検討していく予定である。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

Kurosawa M, Matsumoto G, Kino Y, Okuno M, Kurosawa-Yamada M, Washizu C, Taniguchi H, Nakaso K, Yanagawa T, Warabi E, Shimogori T, Sakurai T, Hattori N, Nukina N. Depletion of p62 reduces nuclear inclusions and paradoxically ameliorates disease phenotypes in Huntington 's model mice. *Hum Mol Genet*, 24: 1092-1105, 2015. 査読有  
doi: 10.1093/hmg/ddu522.

Kamikubo Y, Shimomura T, Fujita Y, Tabata T, Kashiyama T, Sakurai T, Fukurotani K, Kano M ; Functional cooperation of metabotropic adenosine and glutamate receptors regulates postsynaptic plasticity in the cerebellum. *J Neurosci*, 33: 18661-18671, 2013. 査読有  
doi: 10.1523/JNEUROSCI.5567-12.2013.

Kakizawa S, Yamazawa T, Chen Y, Ito A, Murayama T, Oyamada H, Kurebayashi N, Sato O, Watanabe M, Mori N, Oguchi K, Sakurai T, Takeshima H, Saito N, Iino M: Nitric oxide-induced calcium release via ryanodine receptors regulates neuronal function. *EMBO J*, 31: 417-428, 2012. 査読有  
doi: 10.1038/emboj.2011.386.

〔学会発表〕(計 18 件)

高杉展正、新家瑠奈、櫻井隆「APP- CTF に特異的に結合するエンドソームタンパク質の解析」第 88 回日本薬理学会年会、2015 年 3 月 19 日 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

上窪裕二、櫻井隆「海馬スライス培養系を用いた セクレターゼ活性の解析」第 35 回日本神経科学大会(Neuroscience2012)、2014 年 9 月 12 日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

高杉展正、新家瑠奈、上窪裕二、櫻井隆「APP- CTF に特異的に結合するエンドソーム蛋白質の解析」第 87 回日本薬理学会年会 2014 年 3 月 19 日 仙台国際センター(宮城県・仙台市)

櫻山拓、上窪裕二、櫻井隆「切断端認識抗体を用いたニューレグリン 1 の BACE1 切断依存的細胞間シグナル伝達の解析」第 86

回日本薬理学会年会 2013 年 3 月 21 日、福岡国際会議場（福岡県・福岡市）

〔産業財産権〕  
出願状況（計 1 件）

名称：アルツハイマー病予防治療薬のスクリーニング法  
発明者：高杉展正、櫻井隆、清水瑠奈  
権利者：学校法人順天堂  
種類：特許  
番号：特願 2014-132309  
出願年月日：平成 26 年 6 月 27 日  
国内外の別：国内

〔その他〕  
ホームページ  
[http://pharmacology.sakura.ne.jp/jp/research/microdomain\\_res/microdomain\\_res.html](http://pharmacology.sakura.ne.jp/jp/research/microdomain_res/microdomain_res.html) 膜マイクロドメイン依存性 アミロイド産生調節メカニズムの解明

## 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)  
順天堂大学・医学研究科・客員教授  
研究者番号：10134595

### (3) 連携研究者

村山 尚 (MURAYAMA, Takashi)  
順天堂大学・医学部・准教授  
研究者番号：10230012

櫻山 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

高杉 展正 (TAKASUGI, Nobumasa)  
順天堂大学・医学部・助教  
研究者番号：60436590