

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：14301
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2011～2013
課題番号：23591243
研究課題名(和文)ガンマセクレターゼのアロステリック構造変化を利用したアルツハイマー治療研究

研究課題名(英文) abc

研究代表者
植村 健吾 (Uemura, Kengo)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・その他

研究者番号：00378663
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では家族性アルツハイマー病の原因遺伝子であるプレセニリン1(PS1)の構造変化がアミロイド前駆体蛋白(APP)の細胞膜内への挿入状態を変化させ、アミロイド産生比に影響を与えるという仮説をたてた。APPの膜内挿入状態の変化要因として特にAPPのダイマー化に着目した。シナプス結合や、脳内の微量金属(銅)の変化は、APPのダイマー化の変化を介してアミロイドの産生量を変化させる事を示した。

研究成果の概要(英文)：Our group demonstrated that N-cadherin expression facilitates cis-dimerization of APP. Moreover, N-cadherin expression led to increased production of Abeta as well as soluble APP beta, indicating that beta secretase mediated cleavage of APP is enhanced. Then we investigated whether copper alters the state of APP dimerization and how it affects APP metabolism. We demonstrated that copper enhanced APP dimerization and increased extracellular release of Abeta. Taken together, our results suggest that modulation of APP dimerization state could be one of mechanisms, which alters Abeta production.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：神経科学 痴呆 脳・神経

1. 研究開始当初の背景

PS1 構造変化は A_{42/40} 比と密接な関係にある。PS1 には“開放”型と“閉鎖”型のふたつの構造があり、それぞれ A₄₀、A₄₂ の産生に関わると考えられる。これまでに、PS1 の構造を変化させる刺激は数多く知られている。例えば、家族性 AD に関連した変異は PS1 構造を“閉鎖”させ、A₄₂ 産生を上昇させる。一方、fluibiprofen 等の NSAIDs は PS1 構造を“開放”させて、A₄₀ の産生を促進する。

2. 研究の目的

PS1 の構造変化が APP の膜内への挿入状態を変化させ、A の産生比に影響を与えるという仮説のもとに、下記を明らかにする事を通じて、PS1 の分子構造及び APP の膜内挿入状態の是正を介したアルツハイマー病の治療 / 予防薬開発を最終的な目標とした。

- 1) PS1 構造変化と、APP 膜内挿入状態 (APPC 末端と膜の間の距離) の関係
- 2) APP 膜内挿入状態と、A_{42/40} 比の関係
- 3) APP 膜内挿入状態を簡便に定量化する方法の確立
- 4) APP 膜内挿入状態を是正し、A₄₀ 産生を促進する薬剤をスクリーニングするシステムの確立

3. 研究の方法

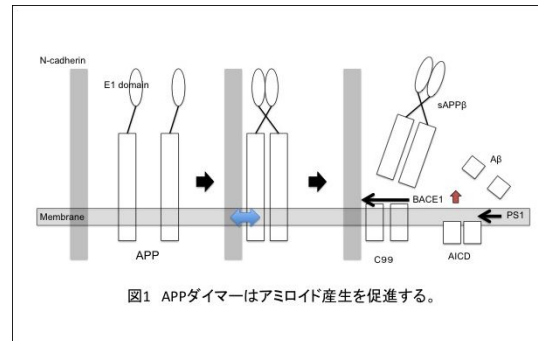
申請者らは、アミロイド前駆体蛋白質 (APP) の膜内への挿入状態を変化させ、アミロイドの切り出しに影響を与える因子として、APP のダイマー化に着目した。APP のダイマー化は、近年アミロイド蛋白の産生に影響を与える因子として注目されているが、生体内でどのようなシグナルが APP のダイマー化を変化させるかについては不明であるため、この点をまず明らかにしようと考えた。この目的で、APP のダイマー化の度合いを簡単に定量できる手法として、新たにスプリットシフェラーゼ法を利用したアッセイ系を確立した。この手法は APP のダイマー量をルシフェラーゼの発光量で半定量する手法であり、細胞系に簡単に応用し、ダイマー化を促進する因子を検討することが可能である。

以前よりシナプス活動がアミロイドの産生を促進する事が報告されているため、シ

ナプス結合と APP ダイマー化の関係について検討することとした。中でもシナプス結合に必須の細胞接着分子である N-カドヘリンは、APP の切断酵素の活性中心であるプレセニリンと結合し、その構造を変化させることを申請者は以前に報告している。この研究成果を踏まえ、N-カドヘリンによる細胞接着が APP のダイマー化に与える影響についてスプリットシフェラーゼ法を用いて解析した。

4. 研究成果

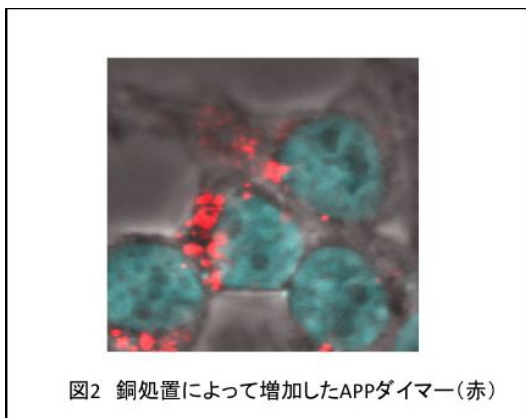
興味深い事に N-カドヘリンによって APP のダイマー化が促進され、特に 40 アミノ酸からなるアミロイドペプチドの産生が増加することが示された (図 1)。また、免疫沈降法などによる検討で、N-カドヘリンは APP の細胞外ドメインを介したダイマー化を促進する機能があることを示した。本研究は、APP のダイマー化を調整する細胞内因子を初めて示したものであり、成果を欧文誌 (Asada-Utsugi et al., J Neurochem. 2011 Oct;119(2):354-63) に報告した。



さらに申請者らは、APP のダイマー化に着目し、A の産生に影響を与える因子を検討した。アルツハイマー病の脳の病理組織では、アミロイド沈着部位に高濃度の銅も蓄積していることは、すでに知られている。APP は細胞外及び A 配列内に銅の結合モチーフを持っていることから、銅が APP のダイマー化を変化させた結果、A 産生に影響を与えるという仮説の下に実験を行った。APP を発現する細胞に銅を処置し、APP のダイマー化を免疫沈降法及び細胞免疫染色法で検討したところ、処置した銅の用量依存的に APP のダイマーが増加することが示された。その銅の効果は銅のキレート剤であるペニシラミン投与によって消失した。

また、ELISAによる測定の結果、銅処置は細胞外に放出されるA β の量を増大させることが示された。

これらの結果から、銅はAPPのダイマー化の促進を介して、細胞外に放出されるアミロイドを増加させる可能性が初めて示された。この成果は欧文誌(Noda et al., *Neurosci Lett*. 2013 Jun 28;547)報告した(図2)。



以上の成果から、APPはダイマー化などの膜内挿入状態の変化を介してPS1の構造変化と相互作用し、アミロイドの産生状態を変化させることや銅沈着などの脳内の微小環境の変化はAPPのダイマー化に影響を与えることなどが明らかとなった。これらの発見は、老化に伴い、APP代謝がアミロイド産生に傾くことを予防する方策を明らかにすると言う意味で有意義な研究成果であったと考えられる。

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) "Copper enhances APP dimerization and promotes A β production." Noda Y, Asada M, Kubota M, Maesako M, Watanabe K, Uemura M, Kihara T, Shimohama S, Takahashi R, Kinoshita A, Uemura K. *Neurosci Lett*. 2013 Jun 28;547:10-5.

2) "Gain of function by phosphorylation in Presenilin 1-mediated regulation of insulin signaling."

Maesako M, Uemura K, Kuzuya A, Sasaki K, Asada M, Watanabe K, Ando K, Kubota M, Akiyama H, Takahashi R, Kihara T, Shimohama S, Kinoshita A.

J Neurochem. 2012 Jun;121(6):964-73.

3) "Environmental enrichment ameliorated high-fat diet-induced A β deposition and memory deficit in APP transgenic mice." Maesako M, Uemura K, Kubota M, Kuzuya A, Sasaki K, Asada M, Watanabe K, Hayashida N, Ihara M, Ito H, Shimohama S, Kihara T, Kinoshita A.

Neurobiol Aging. 2012

May;33(5):1011.e11-23. doi:

10.1016/j.neurobiolaging.2011.10.028.

4) "N-cadherin enhances APP dimerization at the extracellular domain and modulates A β production."

Asada-Utsugi M, Uemura K, Noda Y, Kuzuya A, Maesako M, Ando K, Kubota M, Watanabe K, Takahashi M, Kihara T, Shimohama S, Takahashi R, Berezovska O, Kinoshita A.

J Neurochem. 2011 Oct;119(2):354-63.

[学会発表](計2件)

1)「銅はAPPダイマー化を促進し、アミロイド産生に影響する」

植村健吾 他

日本臨床神経学会ポスター発表、2012年

2)「N-カドヘリンはAPPの細胞外ドメインダイマー化を促進し、A β 産生を促進する」

浅田めぐみ、植村健吾、木下彩栄 他

神経科学会ポスター発表、2011年

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~neurology/> (京都大学医学研究科・臨床神経学)

<http://kinoshita-lab.hs.med.kyoto-u.ac.jp/index.html> (京都大学医学研究科人間健康科学系・在宅医療看護学分野)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植村 健吾 (UEMURA, Kengo)
京都大学・医学研究科・非常勤講師
研究者番号：00378663

(2) 研究分担者

木下 彩栄 (KINOSHITA, Aya)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号：80321610

(3) 連携研究者

()

研究者番号：