

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500402

研究課題名(和文) APP代謝及びA β 産生機構におけるATBF1の機能解析研究課題名(英文) The role of ATBF1 in APP metabolism and A β production

研究代表者

鄭 且均 (Jung, Cha-Gyun)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00464579

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ATBF1(AT-motif binding factor1)がアルツハイマー病(AD)脳の神経細胞質において顕著に発現が上昇していることを発見した。また、ATBF1はAPP細胞質の681-690ドメイン部分と結合することでAPPを安定化させ、A β 産生を増加させることが分かった。しかし、ATBF1の過剰発現はADの分子病態に関連する分子群(及び、セクレターゼ)の発現には影響しなかった。HEK293-APP細胞にATBF1をノックダウンさせるとAPP及び可溶性APP、A β 量が有意的に減少した。ATBF1はAPP結合蛋白質であり、AD治療ターゲットの可能性があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：ATBF1 levels are increased in the cytoplasm of hippocampal neurons in Alzheimer's disease (AD) brains compared with non-AD brains. Furthermore, cotransfection of human embryonic kidney (HEK293T) and human neuroblastoma (SH-SY5Y) cells with ATBF1 and APP695 increased steady-state levels of APP via the binding of ATBF1 to the APP cytoplasmic domain (amino acids 681-690 domain), resulting in increased A β production and cellular and soluble APP (sAPP) levels without affecting the activity or levels of APP processing enzymes (-, - or -secretase). Conversely, knockdown of endogenous ATBF1 reduced levels of cellular APP, sAPP and A β in HEK293 cells overexpressing human APP695. Our findings provide insight into the dynamics of APP processing and A β production, and suggest that ATBF1 is a novel APP binding protein that may be a suitable therapeutic target for AD.

研究分野：アルツハイマー病、神経科学

キーワード：アルツハイマー病 ATBF1 APP代謝 A β 産生

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病病態を促進させる鍵分子である A は APP から 2 つのプロテアーゼ (及び セクレターゼ) で順次切断されることにより産生され、細胞外に蓄積し、引き続き、神経原繊維変化を引き起こすことで神経細胞死や認知機能障害が起こると考えられている。従って、A の産生を抑えることが AD の治療・予防に有効な手段の 1 つである。最近の研究では、AD の原因遺伝子である APP が代謝・運送の異常を起こすことで A 産生が制御され、AD の発症に深く関わっていることが報告されている。APP の細胞質ドメインは他の蛋白質と相互作用し APP の代謝・運送などに重要な役割を果たしている。従って、APP の代謝・機能及び運送を制御する結合タンパク質の発見やそのタンパク質の機能解析は、AD の発症機構の解明に重要であると考えられる。

2. 研究の目的

最近の研究では、アルツハイマー病 (AD) の原因遺伝子であるアミロイド前駆体タンパク質 (APP) が代謝・運送の異常を起こすことで、アミロイド 蛋白 (A) 産生の変化が起こり、AD の発症に深く関わっていることが報告されている。従って、APP の代謝機構を明らかにすることは AD の発症原因解明に重要である。最近、我々はホメオティック因子 ATBF1 (AT-motif binding factor1) が AD 脳の神経細胞の細胞質で過剰発現すること、APP と結合し APP を安定化することで、A の産生を増加させることを発見した。本研究では APP 代謝及び A 産生における ATBF1 の機能を分子・細胞・動物レベルで明らかにすることによって従来知られていなかった新たな APP 代謝、A 産生制御系の解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) APP 安定発現細胞 (HEK293-APP 細胞) へ ATBF1 のノックダウン (siRNA を利用) または ATBF1 cDNA を導入し、A 量 (ELISA 法)、AD の分子病態に関連する分子群の発現、ATBF1 及び APP の細胞内の局在変化などを調べた。

(2) HEK293T 細胞や SH-SY5Y 細胞に ATBF1 と APP を過剰発現させた後、ATBF1 及び APP の細胞内局在の変化をゴルジ体、エンドソーム、ライソゾーム特異的な抗体を用いて調べた。

(3) ATBF1 分子を部位別に 3 種類の発現ベクター (HA-tag 付き) を作成した。この 3 種類の ATBF1 発現ベクターと APP 発現ベクターを HEK293T 細胞に共発現させ、免疫沈降法や ELISA 法を用いて調べた。

(4) APP 細胞質ドメインの部分欠損発現ベクター (Flag-tag 付き) と ATBF1 発現ベク

ターを HEK293T 細胞に共発現させ、免疫沈降法や ELISA 法を用いて調べた。

4. 研究成果

(1) HEK293-APP 細胞に ATBF1 をノックダウンさせると A 量が有意的に減少した。また、その細胞に ATBF1 を過剰発現させると A の産生が促進された。しかし、ATBF1 の過剰発現は AD の分子病態に関連する分子群 (及び 、 セクレターゼ) の発現には影響しなかった。

(2) HEK293T 細胞や SH-SY5Y 細胞に ATBF1 と APP を過剰発現させた後、ATBF1 及び APP の細胞内局在の変化をゴルジ体、エンドソーム、ライソゾーム特異的な抗体を用いて調べた結果、導入された APP は ATBF1 と結合することでエンドソームに運送されることが分かった。

(3) APP は ATBF1 の 893-3288 ドメイン部分と結合することで A 産生を増加させることが分かった。

(4) ATBF1 は APP 細胞質の 681-690 ドメイン部分と結合することで A 産生を増加させることが分かった。

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 6 件)

Jung CG, Uhm KO, Horike H, Kim MJ, Misumi S, Ishida A, Ued Y, Choi EK, Kim YS, Michikawa M, Hida H. Auraptene increases the production of amyloid-beta via c-Jun N-terminal kinase-dependent activation of γ -secretase. *J Alzheimers Dis*, 43: 1215-28, 2015. 査読有。
DOI: 10.3233/JAD-141692

Uhm KO, Kim MJ, Kawaguchi M, Akatsu H, Miura Y, Misumi S, Hida H, Choi EK, Kim YS, Michikawa M, Jung CG. ATBF1 is a novel amyloid- protein precursor protein (A PP) binding protein that affects A PP expression. *J Alzheimers Dis*, 43: 243-257, 2015. 査読有。

DOI: 10.3233/JAD-140612

Que H, Miyamoto Y, Koretake K, Okada S, Doi K, Jung CG, Michikawa M and Akagawa Y. Tooth loss might not alter molecular pathogenesis in an aged transgenic Alzheimer's disease model mouse. *Gerodontology*, in press, 2015.

査読有。
DOI: 10.1111/ger.12153

Ueda Y, Masuda T, Ishida A, Misumi S, Shimizu Y, Jung CG, Hida H. Enhanced electrical responsiveness in the cerebral cortex with oral melatonin administration. *J Neurosci. Res.*, 92(11): 1499-1508, 2014. 査読有。
DOI: 10.1002/jnr.23434

Que H, Miyamoto Y, Okada S, Koretake K, Jung CG, Michikawa M, Akagawa Y. Tooth loss might not alter molecular pathogenesis in an aged transgenic Alzheimer's disease model mouse. *Behav Brain Res.*, 252 (1):318-25, 2013. 査読有。
DOI: 10.1016/j.bbr.2013.06.015

Misumi S, Nishigaki R, Ueda Y, Watanabe Y, Shimizu Y, Ishida A, Jung CG, Hida H. Differentiation of oligodendrocytes from mouse induced pluripotent stem cells without serum. *Transl Stroke Res.*, 4(2); 149-157, 2013. 査読有。
DOI: 10.1007/s12975-012-0250-1

[学会発表](計14件)

Hida H, Yokoyama Y, Marutomoto R, Shimizu Y, Ueda Y, Misumi S, Ishida A, Jung CG. Oral intake of monosodium glutamate during the period of development effects on social behavior mediated by gut-brain communication in an ADHD model rat. Society for Neuroscience, 2014年11月18日, Washington DC (USA).

Shimizu Y, Yokoyama Y, Misumi S, Ishida A, Jung CG, Hida H. Cocain-and amphetamine-regulated transcript in the central nucleus of amygdala is enhanced by environmental enriched in ADHD model rat. Society for Neuroscience, 2014年11月18日, Washington DC (USA).

Jung CG, Uhm KO, Kim MJ, Kawaguchi M, Akatsu H, Miura Y, Misumi S, Choi EK, Kim YS, Michikawa M, Hida H. ATBF1 is a novel amyloid- β precursor protein binding protein that affects amyloid- β production. Society for Neuroscience, 2014年11月17日, Washington DC (USA)

Misumi S, Ueda Y, Shimizu Y, Jung CG, Hida H. Cell death and arrest of

lineage progression to oligodendrocyte are followed by indirect damage of corticospinal neurons in the developing white matter injury model rat. Society for Neuroscience, 2014年11月17日, Washington DC (USA)

Ueda Y, Misumi S, Ishida A, Shimizu Y, Jung CG, Hida H. Response to intracortical microstimulation in the hindlimb area in the developmental white matter injury model rat. Society for Neuroscience, 2014年11月17日, Washington DC (USA).

三角 吉代、上田 佳朋、清水 由布子、石田 章真、鄭 且均、飛田 秀樹。脳室周囲白質障害モデルラットにおける皮質脊髄路ニューロンの軽微な傷害。第37回日本神経科学大会、2014年9月13日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)。

西野仁雄、鄭 且均、飛田秀樹、白木基之、山内将照、榊原和真。高反発力クッショングリップを握ると手、腕、顔の温度、筋活動及び前頭葉血流が上昇する。第91回日本生理学会、2014年3月17日、鹿児島大学郡元キャンパス(鹿児島県・鹿児島市)。

Jung CG, Kawaguchi M, Miura Y, Hida H, Michikawa M. Hypoplasia of the vascular smooth muscle cell in the ATBF1 KO mouse. 第91回日本生理学会、2014年3月17日、鹿児島大学郡元キャンパス(鹿児島県・鹿児島市)。

布目真梨、加藤玲子、榎本啓行、鄭 且均、龔 建生、山下 均、道川 誠。飼育環境温度変化によるAPP-Tgマウス脳内A β 代謝への影響。第32回日本認知症学会、2013年11月8日、キッセイ文化ホール、松本市総合体育館(長野県・松本市)。

鄭 且均、川口 誠、三浦 裕、飛田秀樹、道川 誠。ATBF1 KOマウスにおける血管平滑筋細胞の形成不全。第60回中部日本生理学会、2013年10月25日、岐阜大学医学部記念会館ホール(岐阜県・岐阜市)。

Jung CG, Horike H, Uhm KO, Misumi S, Hida H, Michikawa M. Aurapten increases the production of beta amyloid by increasing γ -secretase activity. Neuro2013, 2013年6月20日、国立京都国際会館(京都府・京都市)。

Jung CG, Uhm KO, Kim MJ, Kawaguchi M, Akatsu H, Hida H, Michikawa M. Effect of ATBF1 on APP processing and A production. 第90回日本生理学会、2013年3月27日、タワーホール船堀(東京都・江戸川区)。

Shiraki M, Yamauchi T, Urakawa S, Jung CG, Hida H, Nishijo H, Ono T and Nishino H. Blood flow of the prefrontal cortex was increased by stepping on 3-D high repulsion cushion (3-D HRC)。第90回日本生理学会、2013年3月27日、タワーホール船堀(東京都・江戸川区)。

Misumi S, Jung CG, Hida H. Induction of oligodendrocyte progenitors from mouse iPS cells for transplantation to neonatal white matter injury. 第90回日本生理学会、2013年3月27日、タワーホール船堀(東京都・江戸川区)。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ URL:

<http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/brain-physiol.dir/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鄭 且均 (Jung Cha-Gyun)

名古屋市立大学・医学研究科・准教授

研究者番号: 00464579

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし