

平成21年 5月 7日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590048
 研究課題名（和文） アルツハイマー病危険因子アポEアイソフォームの高次構造異常と機能異常
 研究課題名（英文） Role of Apolipoprotein E Structure in Disorders of Lipid Metabolism in Brain
 研究代表者
 齋藤 博幸（SAITO HIROYUKI）
 神戸薬科大学・薬学部・教授
 研究者番号：60300919

研究成果の概要：アポEは、神経細胞でのコレステロール代謝恒常性維持に中心的役割を果たしているタンパク質である。本研究では、アポEの遺伝子多型（アイソフォーム）の一つであるアポE4がアルツハイマー病発症を引き起こす分子機構の解明を目的として、アポEアイソフォームによる脳内コレステロール代謝調節機能の異常を、アイソフォーム間での高次構造変化とそれによる細胞膜脂質や細胞表面糖鎖との相互作用変化などの機能異常に基づいて解析を行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：生物物理化学、脂質代謝異常、アルツハイマー病、アポリポタンパク質、脂質膜、グリコサミノグリカン

1. 研究開始当初の背景

アポEは、血中や脳内でのコレステロール輸送を担うアミノ酸299残基からなるタンパク質であり、そのアイソフォームであるアポE4は老化について強力なアルツハイマー病発症危険因子として知られている。近年、アルツハイマー病発症と高コレステロール血症との相関が報告され、脳内におけるアポEのコレステロール輸送機能とアルツハイマー病発症との関連が注目されていた。さらに

最近、アポE4が神経細胞内でC末端の切断を受け、生成したC末端欠損アポE4フラグメントが蓄積することで神経細胞毒性を示すことが相次いで報告され、フラグメント化したアポE自身が神経細胞毒性を示す可能性も示唆されていた。

2. 研究の目的

アポEアイソフォームがアルツハイマー病発症を引き起こす分子機構の解明を目的と

して、アポEアイソフォームによる脳内コレステロール代謝調節異常を、アイソフォーム間でのコンフォメーション変化（構造異常）とそれによる機能異常（細胞膜脂質や細胞表面グリコサミノグリカン(GAG)との相互作用変化）に基づいて解析を行う。特に、アポE4におけるアミノ酸変異（C112R）による構造変化と機能異常の相関を明らかにすることで、アポEの構造異常を阻害するという、新たな観点からのアルツハイマー病の予防・治療法の可能性を探る。

3. 研究の方法

大腸菌 BL21(DE3)株を用いて発現・精製した各種アポEアイソフォームや変異体の構造及び機能評価として、

- (1) アミノ酸変異によるN末及びC末ドメインのコンフォメーション変化
- (2) 神経細胞毒性を引き起こすC末端欠損アポEフラグメントの構造活性相関
- (3) アポE変異体の神経細胞ならびに細胞膜脂質・細胞表面GAGとの相互作用変化などの項目について、特に野生型であるアポE3とアポE4（C112R）との比較に焦点を絞り詳細な解析を行った。

4. 研究成果

(1) C末端欠損によるアポE高次構造変化と神経細胞毒性のメカニズム

神経細胞毒性を示すことが報告されているC末端欠損アポE4変異体 apoE4 1-272、1-260、1-250などを作製し、それらの立体構造や水溶液中での会合構造、人工細胞膜に対する結合親和性等を野生型であるアポE3と比較評価した。その結果、C末端ヘリックス部位を段階的に欠損することで、水溶液中でのアポE分子の会合構造が破壊され、脂質膜結合が促進されることが明らかとなった。特にアポE4では、C末端アミノ酸273-299残基を削除することで完全に単量体化し、疎水性ヘリックス部位（アミノ酸261-272残基）の露出に伴って非常に強い脂質結合性を示した（Fig. 1）。

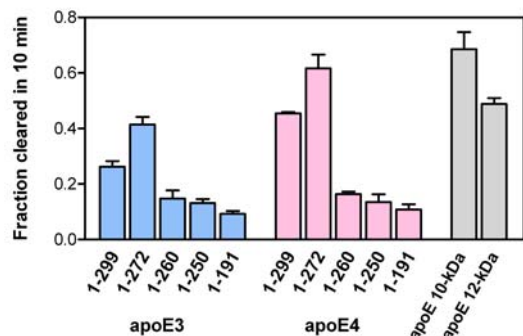


Fig. 1. Comparison of solubilization efficiency of dimyristoylphosphatidylcholine multilamellar vesicles

by the apoE C-terminal- truncated mutants.

さらに、アポE4に特異的なN末-C末ドメイン間の塩橋形成による相互作用（ドメイン間相互作用）がC末ドメイン構造に与える影響を調査するため、C末ドメインのみにトリプトファンを有する単一トリプトファン変異体 W@264 を作製し、トリプトファン蛍光の環境依存性やダイナミクスを詳細に解析した。その結果、アポE4のC末ドメインは、アポE3に比べてより水相に露出した環境にあることが明らかとなり、その会合構造との関連が示唆された（Fig. 2）。

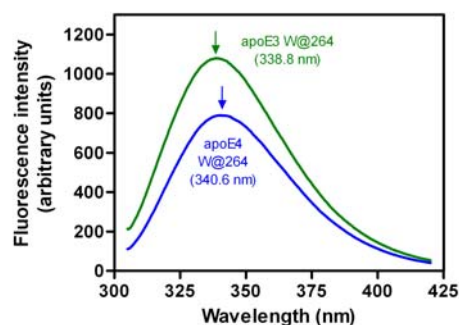


Fig. 2. Fluorescence spectra of single tryptophan mutants of apoE3 and apoE4 isoforms.

以上の結果から、アポE4のC末ドメインはN末-C末ドメイン間相互作用によってC末端が切断を受けやすい環境にあり、疎水性の高いヘリックス部位（アミノ酸261-272残基）が露出することで細胞膜破壊作用などの神経細胞毒性を示す可能性が明らかとなった。

(2) アポE N末及びC末ドメインの構造変化と神経細胞コレステロール搬出作用

マウス初代培養ニューロン及びアストロサイト細胞を用いたコレステロール搬出実験から、野生型のアポE3に比べてアポE4はコレステロール搬出作用が非常に低く、さらにN末及びC末ドメインフラグメント間の比較から、分子内N末-C末ドメイン間の静電的相互作用並びに分子間N末ドメインS-S結合を介した二量体化が、アポEアイソフォーム間でのコレステロール搬出能の違いに重要であることが示唆された（Fig. 3）。

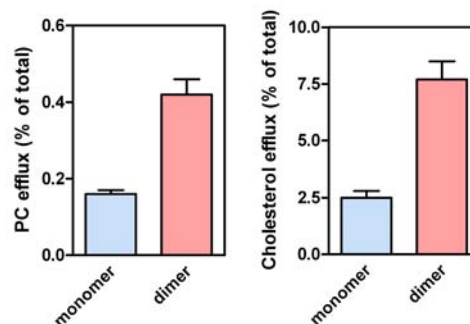


Fig. 3. Lipid efflux by dimeric and monomeric apoE3 N-terminal domain fragments from neurons.

そこで、C 末ドメイン長を段階的に変化させた C 末端欠損アポ E や二量体化アポ E3 などを作製し、それらの立体構造や水溶液中での会合構造、人工細胞膜やチップ上に固定化したヘパラン硫酸に対する結合親和性等を評価した。その結果、二量体化などの会合体形成によって、アポ E3 はアポ E4 に比べて多数の N 末ドメイン作用部位による協同的相互作用が可能であり、細胞表面膜脂質や GAG などの細胞表面糖鎖に対する結合における N 末ドメインを介した協同性効果が、アポ E の脳内コレステロール輸送機能に重要であることが示唆された。

以上の結果から、アポ E4 アイソフォームによる脳内脂質輸送機能の異常は、N 末ドメイン多量体化能の欠損並びに C 末ドメイン会合性の低下による細胞表面 GAG との相互作用異常などが原因であることが示唆された。

本研究成果による脳内コレステロール代謝異常を引き起こすアポ E4 の構造特異性に関する解析結果は、アポ E をターゲットとしたアルツハイマー病発症の予防・治療法の開発において基盤的知見となるものと期待される。

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 11 件)

- ① Minagawa, H., Gong, J.-S., Jung, C.-G., Watanabe, A., Lund-Katz, S., Phillips, M. C., Saito, H., Michikawa, M., Mechanism Underlying Apolipoprotein E (ApoE) Isoform-Dependent Lipid Efflux from Neural Cells in Culture. *J. Neurosci. Res.* (2009) in press, 査読有
- ② Koyama, M., Tanaka, M., Dhanasekaran, P., Lund-Katz, S., Phillips, M. C., Saito, H. Interaction between the N- and C-Terminal Domains Modulates the Stability and Lipid Binding of Apolipoprotein A-I. *Biochemistry* **48**, 2529-2537 (2009), 査読有
- ③ Tanaka, M., Tanaka, T., Ohta, S., Kawakami, T., Konno, H., Akaji, K., Aimoto, S., and Saito, H. Evaluation of Lipid-Binding Properties of the N-Terminal Helical Segments in Human Apolipoprotein A-I Using Fragment Peptides. *J. Peptide Sci.* **15**, 36-42 (2009), 査読有
- ④ Akaji, K., Konno, H., Onozuka, M., Makino, A., Saito, H., Nosaka, K. Evaluation of Peptide-Aldehyde Inhibitors Using R188I

Mutant of SARS 3CL Protease as a Proteolysis-Resistant Mutant. *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 9400-9408 (2008), 査読有

- ⑤ Kono, M., Okumura, Y., Tanaka, M., Nguyen, D., Dhanasekaran, P., Lund-Katz, S., Phillips, M. C., Saito, H. Conformational Flexibility of the N-terminal Domain of Apolipoprotein A-I Bound to Spherical Lipid Particles. *Biochemistry* **47**, 11340-11347 (2008), 査読有
- ⑥ Fukuda, M., Nakano, M., Miyazaki, M., Tanaka, M., Saito, H., Kobayashi, S., Ueno, M., Handa, T. Conformational Change of Apolipoprotein A-I and HDL Formation from Model Membranes under Intercellular Acidic Conditions. *J. Lipid Res.* **49**, 2419-2426 (2008), 査読有
- ⑦ Yamauchi, Y., Deguchi, N., Takagi, C., Tanaka, M., Dhanasekaran, P., Nakano, M., Handa, T., Phillips, M. C., Lund-Katz, S., Saito, H. Role of the N- and C-Terminal Domains in Binding of Apolipoprotein E Isoforms to Heparan Sulfate and Dermatan Sulfate: A Surface Plasmon Study. *Biochemistry* **47**, 6702-6710 (2008), 査読有
- ⑧ Sakamoto, T., Tanaka, M., Vedhachalam, C., Nickel, M., Nguyen, D., Dhanasekaran, P., Phillips, M. C., Lund-Katz, S., Saito, H. Contributions of the Carboxyl-Terminal Helical Segment to the Self-Association and Lipoprotein Preferences of Human Apolipoprotein E3 and E4 Isoforms. *Biochemistry* **47**, 2968-2977 (2008), 査読有
- ⑨ Tanaka, M., Koyama, M., Dhanasekaran, P., Nguyen, D., Nickel, M., Lund-Katz, S., Saito, H., Phillips, M. C. Influence of Tertiary Structure Domain Properties on the Functionality of Apolipoprotein A-I. *Biochemistry* **47**, 2127-2180 (2008), 査読有
- ⑩ Shimada, M., Niida, H., Zineldeen, D. H., Tagami, H., Tanaka, M., Saito, H., Nakanishi, M. Chk1 Is a Histone H3 Threonine 11 Kinase that Regulates DNA Damage-Induced Transcriptional Repression. *Cell* **132**, 221-232 (2008), 査読有
- ⑪ Vedhachalam, C., Duong, P.T., Nickel, M., Nguyen, D., Dhanasekaran, P., Saito, H., Rothblat, G.H., Lund-Katz, S., Phillips, M. C. Mechanism of ATP-Binding Cassette Transporter A1 (ABCA1)-mediated Cellular Lipid Efflux to Apolipoprotein A-I and Formation of High Density Lipoprotein Particles. *J. Biol. Chem.* **282**, 25123-25130 (2007), 査読有

[学会発表] (計 18 件)

- ① 高木千佳, 源川博久, Lund-Katz, S.,

- Phillips, M.C., 道川誠, 齋藤博幸. アポ E3 N 末ドメインの構造と脂質搬出機能に及ぼすダイマー化の影響. 日本薬学会第 129 年会(2009.3.27 京都)
- ② 小山真央, 田中将史, Lund-Katz, S., Phillips, M.C., 齋藤博幸. 環境感受性蛍光プローブ標識によるアポ A-I の C 末端ヘリックス領域の構造評価. 日本薬学会第 129 年会(2009.3.27 京都)
- ③ 河野百恵, 田中将史, Lund-Katz, S., Phillips, M.C., 齋藤博幸. C 末端ヘリックス変異体 apoA-I Nichinan の構造と脂質結合性の評価. 日本薬学会第 129 年会(2009.3.27 京都)
- ④ 田中俊充, 岩田真季, 河野百恵, 田中将史, Lund-Katz, S., 齋藤博幸. ApoA-I Nichinan 脂質搬出機能部位ペプチドの脂質膜との相互作用. 日本薬学会第 129 年会(2009.3.27 京都)
- ⑤ 田中将史, 澤井治子, 坂倉広大, 北川英俊, 奥村優介, 齋藤博幸. アポ A-I-脂質複合ナノ粒子の創製とその物性・機能評価. 膜シンポジウム 2008(2008.11.14 豊中)
- ⑥ 大田慎也 田中将史, 川上徹, 相本三郎, 齋藤博幸. ヒト Serum Amyloid A の N 末端領域は脂質結合に重要な役割を果たす. 第 45 回ペプチド討論会(2008.10.29 東京)
- ⑦ 田中俊充, 中寺麻理子, 岩田真季, 田中将史, Lund-Katz, S., 齋藤博幸. ヒト apoA-I C 末端ペプチドの脂質結合におけるアミノ酸欠失の影響. 第 45 回ペプチド討論会(2008.10.29 東京)
- ⑧ 大田慎也 田中将史, 川上徹, 相本三郎, 齋藤博幸. 急性期タンパク質血清アミロイド A (SAA) の脂質結合部位の特定. 第 58 回日本薬学会近畿支部大会(2008.10.25 神戸)
- ⑨ 田中俊充, 中寺麻理子, 岩田真季, 田中将史, 杉浦真喜子, Lund-Katz, S., 齋藤博幸. 低 HDL 血症 apoA-I 変異体の脂質結合部位ペプチドの構造と機能評価. 第 58 回日本薬学会近畿支部大会(2008.10.25 神戸)
- ⑩ 高木千佳, 岡田愛弓, 奥村優介, 田中将史, Lund-Katz, S., Phillips, M.C., 齋藤博幸. 単一トリプトファン変異体を用いたアポ E アイソフォーム C 末ドメインの構造評価. 第 30 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(2008.8.7 札幌)
- ⑪ 河野百恵, 坂倉広大, 田中将史, Lund-Katz, S., Phillips, M.C., 齋藤博幸. 低 HDL 血症変異体 apoA-I Milano (R173C) の水溶液構造と脂質結合性. 第 30 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(2008.8.7 札幌)
- ⑫ 小山真央, 木澤愛実, 田中将史, Lund-Katz, S., Phillips, M.C., 齋藤博幸. ヒト/マウスキメラ型アポ A-I を用いた N 末-C 末ドメイン間相互作用の解析. 第 30 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(2008.8.7 札幌)
- ⑬ 齋藤博幸, 小山真央, 田中将史, Lund-Katz, S., Phillips, M.C. アポ A-I の脂質結合性に及ぼす N 末及び C 末ドメイン構造の影響. 日本膜学会第 30 年会(2008.5.16 東京)
- ⑭ 出口敬子, 山内悠子, 中野実, 半田哲郎, 齋藤博幸. アポリポ蛋白質 E の N 末, C 末ドメインのグリコサミノグリカン結合性への寄与. 日本薬学会第 128 年会(2008.3.28 横浜)
- ⑮ 奥村優介, 高木千佳, 田中将史, Lund-Katz, S., 齋藤博幸. C 末端単一トリプトファン変異体を用いたアポ E-脂質複合体の構造評価. 日本薬学会第 128 年会(2008.3.28 横浜)
- ⑯ 大田慎也 田中将史, 川上徹, 相本三郎, 齋藤博幸. フラグメントペプチドを用いた血清アミロイド A (SAA) 各領域の脂質結合性の比較. 日本薬学会第 128 年会(2008.3.28 横浜)
- ⑰ 田中俊充, 久留島祐未, 田中将史, 杉浦真喜子, Lund-Katz, S., 齋藤博幸. C 末端フラグメントペプチドによる apoA-I Nichinan 変異体の構造と脂質結合性の評価. 日本薬学会第 128 年会(2008.3.28 横浜)
- ⑱ 齋藤博幸, 小山真央, 田中将史, Lund-Katz, S., Phillips, M.C. マウスアポ A-I におけるドメイン構造と脂質結合性. 第 29 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(2007.11.26 仙台)

〔その他〕

研究室ホームページ

<http://www.kobepharma-u.ac.jp/~biophys/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 博幸 (SAITO HIROYUKI)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：60300919

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

田中 将史 (TANAKA MASAFUMI)

神戸薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：40411904