

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293010

研究課題名(和文) アルツハイマー病発症機構の解明と新規創薬標的の開発

研究課題名(英文) Understanding for Alzheimer's disease pathogenesis and the development of novel target for therapy

研究代表者

鈴木 利治 (SUZUKI, Toshiharu)

北海道大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：80179233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：多様な孤発性アルツハイマー病の発症原因として、(1) X11およびX11Lの機能制御失調、および(2) セクレターゼの基質切断機能の変化に着目して解析した。X11は非リン酸化状態でX11Lはリン酸化状態で標的分子に結合することが示唆された。X11Lのリン酸化酵素としてSrcファミリーを同定した。X11/X11L-KOマウスでは、神経伝達物質受容体のスパインでの局在が変化した。これは、X11/X11KがAPPの代謝を制御するだけでなく、Abが作用する標的タンパク質の局在を変化させる事を示唆する。APPやAlcadein等の切断は膜脂質の組成変化によって変化した。

研究成果の概要(英文)：Pathogenesis of sporadic Alzheimer's disease (AD) is various. To reveal these, this research focused on (1) the function of X11 and/or X11L, and (2) mechanism to cleave substrate proteins by gamma-secretase. X11 binds to a target protein in non-phosphorylated state, while X11L associate same target in phosphorylation-mimicked state. We identified Src protein kinase as a potential kinase to phosphorylate X11L. In X11 and X11L genes double-KO mice, a micro-localization of some of neurotransmitter receptors was disturbed, which may be a cause of amyloid-beta dependent aberrant signal transduction inducing neuronal cell death. Furthermore, this research found that changes of lipid composition within cell membrane can induce altered gamma-cleavages of substrates such as APP and Alcadein. Taken together, these findings suggest a novel pathogenic way of AD and target of drug development.

研究分野：生化学

キーワード：アルツハイマー病 老化 認知症 APP

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病(AD)は、超高齢者社会を迎えた我が国で患者数が増加している最大の認知症である。ADの原因遺伝子としてアミロイドβタンパク質(Aβ)の前駆体タンパク質 APP 遺伝子とプレセニリン(PS)遺伝子が同定され、PSはAPPの膜内切断を行いAβを生成するγセクレターゼの触媒ユニットであることが明らかになった。Aβの可溶性オリゴマーが神経毒性を発現する。家族性ADの解析は、基質(APP)または酵素(PS)の遺伝子変異によるAβの量的増加と質的变化(凝集性の高い分子種Aβ42の生成増)が発症に関わるが、原因遺伝子に変異がない孤発性ADでは、Aβ生成の質的・量的変化が起こる仕組みは未解明であった。また、Aβの生成変化以外に主発症原因を持つ患者も考えられている。

2. 研究の目的

研究代表者が実行してきたこれまでの研究成果を踏まえ、(1) APPの細胞内輸送と膜局在を制御するX11Lの機能調節機構を解析し、孤発性ADの発症機構の解明と新規創薬標的の開発に貢献する。また(2) APPと協調的代謝を受けるAlcadeinのγセクレターゼ切断産物p3-Alcの生体内動態を解析する事で、シナプス障害に先立つγセクレターゼ活性変化を検出する方法の開発に取り組み、PS遺伝子変異に依存しない基質のγ切断変化を引き起こす分子機構の解明を行う。

3. 研究の方法

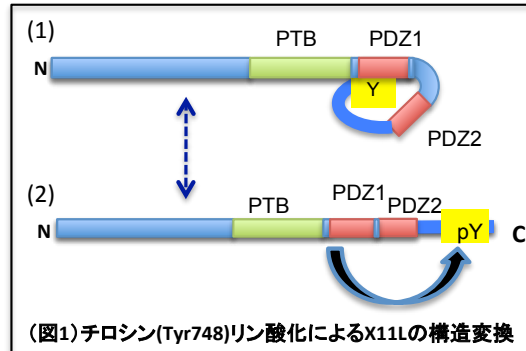
(1) X11Lの機能解析: Human kinase libraryを用いてX11/X11Lリン酸化酵素を同定する。X11/X11Lの機能変化モデルであるX11/X11L-KOマウスを用いてシナプスタンパクの変化を細胞生物学的・生化学的に解析する。(2) PS遺伝子変異に依存しないγ切断変化の仕組みを解明: Alcを基質としてγセクレターゼによる膜内切断機構を解明し、どのような細胞状態の変化がγ切断を変化させるか解析する。

4. 研究成果

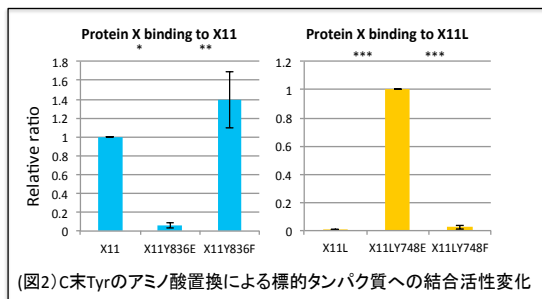
(1) X11/X11Lの機能制御機構: X11の構造解析報告(Nat. Struct. Mol. Biol.[2005] 12, 722)から、X11およびX11LはC末端のTyr残基の電荷の変化で構造変換を起こす。構造解析ではTyr残基の酸性アミノ酸への置換が構造変換を誘引している。X11ではTyr836, X11LではTyr748が相当する(図1)。

細胞にX11Y836EまたはX11LY748Eを発現させて、X11sの標的タンパク質として同定したProtein X(論文未発表のため名前は伏せる)への結合状態は、X11とX11Lでは正反対の結果を示した。X11Y836FまたはX11LY748Fを発現させた場合は、野生型と

同様の結果を示した(図2)。一般的にGlu(E)への置換はリン酸化体を模倣し、Phe(F)への置換は非リン酸化体を模倣する事から、X11およびX11LはTyr残基のリン酸化によって、逆の活性を表す事が示唆された。図2から明らかのように、X11は非リン酸化型が活性を示しX11Lはリン酸化型が標的タンパク質への結合に活性を示す事が示唆された。

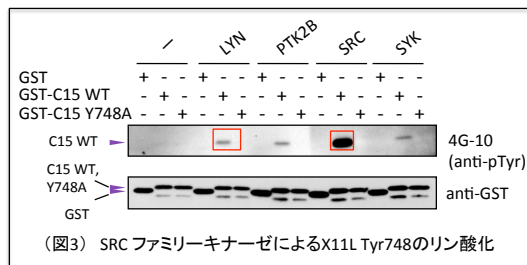


(図1)チロシン(Tyr748)リン酸化によるX11Lの構造変換



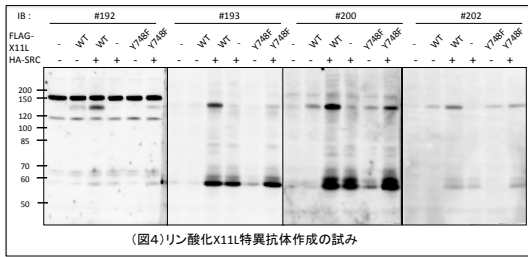
(図2)C末Tyrのアミノ酸置換による標的タンパク質への結合活性変化

そこで、研究申請書に従い Human kinase libraryを用いて、X11LのTyr748をリン酸化する酵素の同定を行った。チロシンキナーゼcDNAをNeuro2a細胞に発現させ、X11LのTyr748をリン酸化する酵素の同定を行った。リン酸化はpTyr抗体(4G10)で検出した。結果、31種の細胞質Tyr kinaseおよび41種の受容体Tyrキナーゼのスクリーニングを行い、複数のSrcファミリーkinaseがX11LのTyr748をリン酸化する事を見いだした(図3)。次に研究計画に沿って、内在性のリン酸化X11Lの検出を目的として、X11LpY748特異抗体



(図3) SRCファミリーキナーゼによるX11L Tyr748のリン酸化

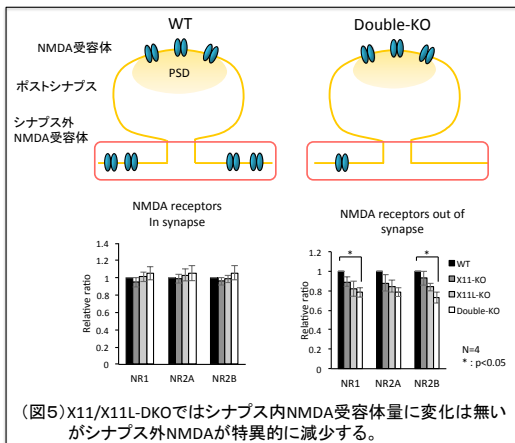
の作成を試みた。4羽のウサギにpTyr748を含みペプチドを抗原として免疫し、抗原カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーでIgGを生成した。細胞にX11Lとリン酸化酵素Srcを発現しリン酸化X11Lを検出出来るか検討した(図4)



(図4)リン酸化X11L特異抗体作成の試み

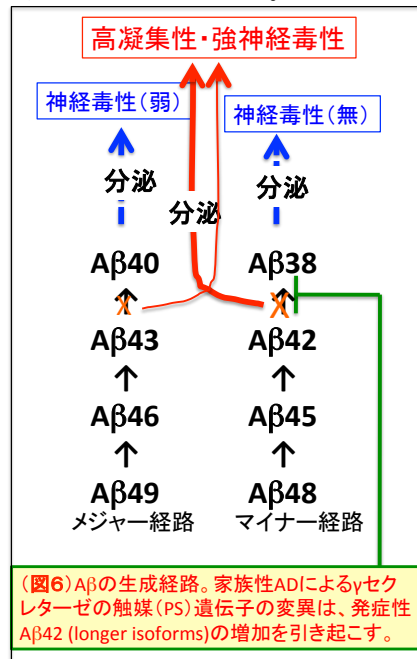
その結果、193抗体はリン酸化 X11L を特異的認識したが、60kDa 付近の自己リン酸化した Src も認識したため、Tyr748 をリン酸化した X11L だけを認識するという特異性には課題を残した。この後、精製を改良し特異性を高める努力を行ったが、*in vivo* でリン酸化 X11L を検出出来る抗体は得られなかった。これは、図 2 の結果から想定されたように、細胞内のリン酸化状態はそもそも極めて低く時空間的にリン酸化が制御されている事などが原因と考えられた。

図 2 で示した X11/X11L の標的タンパク質 protein X は、神経細胞のシナプスにおける受容体タンパク質の制御に重要な働きをする事が示唆されており、X11/X11L の機能解析を進めるために、X11/X11L-二重遺伝子 KO(X11/X11L-DKO)マウスのシナプスにおける変化の解析に取り組んだ。X11/X11L-DKO マウスでは、シナプス形成部位に存在している NMDA 受容体の数は野生型と変わらないが、シナプス外受容体の数が有意に減少していた (図 5)。X11 および X11L は APP を始めとする膜タンパク質の細胞内局在を制御する機能があるため、NMDA 受容体のスパイン内の微局在に機能している可能性が示唆された。アルツハイマー病は、シナプス外受容体を Aβオリゴマー(AβO)が非特異的に刺激をする事で、神経の恒常的活性化を引き起こし神経細胞死を誘発すると考えられている。本研究で、初めて AβO の標的受容体のシナプス外局在を制御する仕組みに X11/X11L が関わっている事が明らかになり、新たなアルツハイマー病の発症機構の解明と X11s およびそのリン酸化が治療の標的となり得る可能性が示唆された。現在この分子機構の詳細を解明中である。



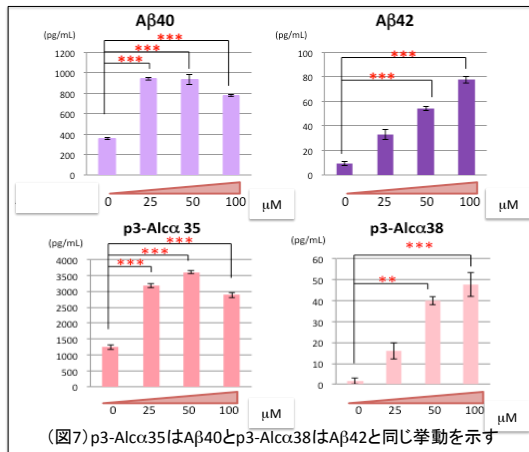
(図5) X11/X11L-DKOではシナプス内NMDA受容体量に変化は無いがシナプス外NMDAが特異的に減少する。

(2) Alcadein(Alc)の γ 切断分子機構の解明と膜内切断変化の仕組み: AD 患者脳脊髄液の Alc 代謝産物解析から、一定数の孤発性 AD 患者で γ セクレターゼ切断変化が認められる(Ann. Neurol. [2011] 69, 1026)。Alc の γ セクレターゼ切断産物 p3-Alc は凝集性が無く、 γ 切断の質的・量的変化を正確に解析できる(J. Biol. Chem. [2009] 284, 36024)。従って p3-Alc の生体内動態の解析は、PS 遺伝子の変異に依存しない基質の γ 切断変化を引き起こす分子機構の解明を行う上で重要である。図 6 に Aβの酸性経路を示す。PS 遺伝子に変異をがない孤発性 AD で神経毒性を示す分子種を生み出す仕組みはわかっていない。



(図6) Aβの生成経路。家族性ADによる γ セクレターゼの触媒 (PS) 遺伝子の変異は、発症性 Aβ42 (longer isoforms) の増加を引き起こす。

本研究では、Alcを用いて γ セクレターゼの切断変化の分子機構の解明に取り組んだ。Aβ40 に相当する Alc由来の主要分子種は p3-Alcα35 であることは明らかにしているが Aβ42 に相当する分子種は不明であった。今回、 γ セクレターゼモジュレーター(GSM)を用いて Aβ42 に相等する分子種 p3-Alcα38 を同定した (図 7)。



(図7) p3-Alcα35はAβ40とp3-Alcα38はAβ42と同じ挙動を示す

GSMを用いた解析から、Alc α の切断もAPPと同様に ϵ 切断後のペプチダーゼの抑制によって変化する事が明らかになった。そこでAPPとAlc α を基質として、細胞を用いてPS遺伝子に変異が無くても γ 切断が変化する仕組みの解明を行った。その結果、細胞内脂質含量の変化が基質切断に変化を与えることが示唆された。現在、膜脂質組成の変化が γ セクレターゼの機能変化を引き起こす分子機構の解明に取り組んでいる。

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 14 件)

①Kimura A, Hata S, Suzuki T. (2016) Enhanced BACE1 activity serves amyloidolytic cleavage of APP by cleaving amyloidogenic CTF β at an alternative β' -site -Mechanisms of the alternative selectivity of BACE1 cleaving sites and the protective mutation on APP gene- *J. Biol. Chem.* 291, 24041-24053 査読有 DOI:10.1074/jbc.M116.744722

②Connor SA, Ammendrup-Johnsen I, Chan AW, Kishimoto Y, Murayama C, Kurinara N, Tada A, Ge Y, Yan R, LeDue JM, Matsumoto H, Kiyonari H, Kirino Y, Matsuzaki F, Suzuki T, Murphy TH, Wang YT, Yamamoto T, Craig AM. (2016) Altered Cortical Dynamics and Cognitive Function upon Haploinsufficiency of the Autism Linked Excitatory Synaptic Suppressor MDGA2 *Neuron* 91, 1052-1068. 査読有 DOI: 10.1016/j.neuron.2016.08.016.

③Portlious E, Durieu E, Bodin M, Cam M, Pannee J, Leuxe C, Mabondzo A, Oumata N, Galons H, Lee J-Y, Chang Y-T, Stuber K, Koch P, Fontanine G, Potier M, Manouspoulou A, Garbis S, Covaci A, VanDam D, De Deyn P, Karg F, Flajolet M, Omori C, Hata S, Suzuki T, Blennow K, Zetteberg H, and Meijer L. (2016) Specific triazine herbicides induce amyloid β 42 production.

J. Alzheimers. Dis. 54, 1593-1605. 査読有 DOI:10.3233/JAD-160310

④Omori C, Motodate R, Shiraki Y, Chiba K, Sobu Y, Kimura A, Nakaya T, Kondo H, Kurumiya S, Tanaka T, Yamamoto K, Nakajima M, Suzuki T, Hata S. (2016) Facilitation of brain mitochondrial activity by 5-aminolevulinic acid in a mouse model of Alzheimer's disease *Nutr. Neurosci* Jun 22:1-9. 査読有 DOI: 10.1080/1028415X.2016.1199114.

⑤Motodate R, Saito Y, Hata S, Suzuki T. (2016) Expression and localization of X11 family proteins in neurons. *Brain Res.* 1646, 227-234. 査読有 DOI:

10.1016/j.brainres.2016.05.054

⑥Kimura A, Hata S, Suzuki T. (2015) Stabilization of intracellular trafficking and metabolism of amyloid β -protein precursor and Alcadein beta by Apolipoprotein E. *FEBS Lett.* 589, 2394-2400. 査読有 DOI: 10.1016/j.febslet.2015.07.017.

⑦Hosono T, Mouri A, Nishitsuji K, Jung C-G, Kontani M, Tokuda H, Kawashima H, Shibata H, Suzuki T, Nabeshima T, Michikawa M. (2015) Arachidonic or Docosahexaenoic acid diet prevents memory impairment in Tg2576 mice. *J. Alzheimers. Dis.* 48, 149-162. 査読有 DOI: 10.3233/JAD-150341.

⑧Hosono, T, Nishitsuji K, Nakamura T, Jung C-G, Kontani M, Tokuda H, Kawashima H, Kiso Y, Suzuki T, Michikawa M. (2015) Arachidonic acid diet attenuates A deposition in TG2576 mice. *Brain Res.* 1613, 92-99. 査読有 DOI: 10.1016/j.brainres.2015.04.005.

⑨Takei N, Sobu Y, Kimura A, Urano S, Piao Y, Araki Y, Taru H, Yamamoto T, Hata S, Nakaya T, Suzuki T. (2015) Cytoplasmic fragment of Alcadein α generated by regulated intramembrane proteolysis enhances APP transport into the late-secretory pathway and facilitates APP cleavage. *J. Biol. Chem.* 290, 987-995. 査読有 DOI:10.1074/jbc.M114.599852

⑩Chiba K, Araseki M, Nozawa K, Furukori K, Araki Y, Matsushima T, Nakaya T, Hata S, Saito Y, Uchida S, Okada Y, Nairn AC, Davis RJ, Yamamoto T, Kinjo M, Taru H, Suzuki T. (2014) Quantitative analysis of APP axonal transport in neurons - Role of JIP1 in APP anterograde transport - *Mol. Biol. Cell* 25, 3569-3580. 査読有 DOI:10.1091/mbc.E14-06-1111

⑪Waragai M, Hata S, Suzuki T, Ishi R, Fujii C, Tokuda T, Arai H, Ohru T, Higuchi S, Yoshida M, Igarashi K, Moriya M, Iwai N, Uemura K. (2014) Utility of SPM8 plus DARTEL (VSRAD) combined with magnetic resonance spectroscopy as adjunct techniques for screening and predicting dementia due to Alzheimer's disease in clinical practice. *J. Alzheimers Dis.* 41 1207-1222. 査読有 DOI 10.3233/JAD-132786

⑫Tajes M, Eraso-Pichot A, Rubio-Moscardo, F, Guivernau B, Ramos-Fernandez E, Bosch-Morato, M, Guix FX, Clarimon J, Miscione GP, Boada M, Gil-Gomez G, Suzuki T, Molina H, Villa-Freixa J, Vicente R, Munoz, FJ. (2014) Methylglyoxal produced by amyloid β -peptide-induced nitrotyrosination of triosephosphate isomerase triggers neuronal death in

Alzheimer disease. *J. Alzheimers Dis.* 41, 273-288. 査読有 DOI 10.3233/JAD-131685

⑬Moriyama T, Hayashi N, Yokokoji M, Akatsu H, Silverman MA, Kimura N, Saito Y, Suzuki T, Yanagida K, Tanaka T, Kazui H, Kudo, T, Kodama, TS, Sato M, Hashimoto R, Tagami S, Okochi M, Ytoh N, Nishitomi K, Takamura, Katayama T, Hashizumi Y, Kimura, Kamino K, Takeda M. (2014) Transcriptome analysis of distinct mouse strains reveals kinesin light chain-1 splicing as amyloid β accumulation modifier. *Proc. Acad. Natl. Sci. USA.* 111, 2638-2643. 査読有 DOI: 10.1073/pnas.1307345111

⑭Omori C, Kaneko M, Nakajima E, Akatsu H, Waragai M, Maeda M, Moroshima-Kawashima M, Saito Y, Nakaya T, Taru H, Yamamoto T, Asada T, Hata S, Suzuki T. (2014) Increased levels of plasma p3-Alc α 35, a major fragment of Alcadein α by γ -secretase cleavage, in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 39, 861-870. 査読有 DOI: 10.3233/JAD-131610

[学会発表] (計 21 件)

①Toshiharu Suzuki.

Function of Alcadein in neurons and the utilization of its γ -secretase product peptide p3-Alc in diagnosis and therapy of Alzheimer's disease.

The 7th BRI International Symposium 2017 March 10-11, 2017. Center for Integrated Human Brain Science, Brain Research Institute, Niigata University, Niigata, Japan. Invited Speaker.

②Toshiharu Suzuki, Ayano Kimura, Saori Hata. Mechanism that BACE1 alternates the cleaving sites of human APP.

Neuroscience 2016 November 12-16, 2016. San Diego Convention Center, San Diego USA

③Taisuke Sato, Rika Motodate, Yoshitake Sano, Seina Kamada Seiichi Uchida, Toshiharu Suzuki. Adaptor protein, X11 and X11L have distinct roles in exploratory activity. Neuroscience 2016 November 12-16, 2016. San Diego Convention Center, San Diego USA

④Rika Motodate, Yuhki Saito, Toshiharu Suzuki. X11 and X11L regulate the non-synaptic NMDA receptor localization. Neuroscience 2016 November 12-16, 2016. San Diego Convention Center, San Diego USA

⑤Hu Anqi, Yi Piao, Saori Hata, Toshiharu Suzuki. Aberrant micro-membrane localization of γ -secretase components by changes in cellular cholesterol level alters ϵ - and/or γ -cleavage of APP and Alcadein. AAIC 2016 July 24-28, 2016. Toronto Convention Center, Toronto Canada

⑥Chiotti Omori, Saori Hata, Masaaki Waragai, Kazuo Yamamoto, Toshiharu Suzuki. Increase of p3-Alc α 38 to p3-Alc α 35, products of alcadein α by γ -secretase cleavage, in CSF of AD patients AAIC 2016

July 24-28, 2016. Toronto Convention Center, Toronto Canada

⑦Toshiharu Suzuki, Ayano Kimura, Saori Hata. Alternative cleavage mechanism of human BACE1. AAIC 2016 July 24-28, 2016. Toronto Convention Center, Toronto, Canada.

⑧Yuriko Sobu, Saori Hata, Toshiharu Suzuki. Association of Alcadein α with kinesin light chain is regulated by phosphorylations at cytoplasmic acidic region. Neuroscience 2015 October 17-21, 2015. McComick Place, Chicago USA

⑨Yuzuha Shiraki, Kyoko Chiba, Saori Hata, Toshiharu Suzuki. Function and regulation of APP and Alcadein α cargoes transported by kinesin-1 in neuron. Neuroscience 2015 October 17-21, 2015. McComick Place, Chicago USA

⑩Rika Motodate, Yuhki Saito, Toshiharu Suzuki. Novel role of X11 and X11L in the regulation of NMDA receptor localization Neuroscience 2015. October 17-21, 2015. McComick Place, Chicago USA

⑪Toshiharu Suzuki, Kyoko Chiba, Saori Hata. Regulation of axonal transport of APP cargos by kinesin-1. 25th Meeting of the International Society for Neurochemistry August 23-27, 2015. Cairns Convention Center, Cairns Australia.

⑫Yuriko Sobu, Saori Hata, Toshiharu Suzuki. Regulation of Alc α association with kinesin-1 by phosphorylation of Alc α cytoplasmic region. 25th Meeting of the International Society for Neurochemistry August 23-27, 2015. Cairns Convention Center, Cairns Australia.

⑬Yuzuha Shiraki, Kyoko Chiba, Saori Hata, Toshiharu Suzuki. Kinesin-1 Cargo Receptor APP and Alcadein α transport different type of vesicular cargo to the axonal terminal. 25th Meeting of the International Society for Neurochemistry August 23-27, 2015. Cairns Convention Center, Cairns Australia.

⑭Ayano Kimura, Toshiharu Suzuki. Molecular mechanism of shifting the cleavage site of APP by BACE1. 25th Meeting of the International Society for Neurochemistry August 23-27, 2015. Cairns Convention Center, Cairns, Australia. Travel Award.

⑮Rika Motodate, Yuhki Saito, Suzuki Toshiharu. Analysis of the localization

of glutamate receptors in X11/X11L double-deficient mice. 25th Meeting of the International Society for Neurochemistry August 23-27, 2015. Cairns Convention Center, Cairns, Australia.

⑯ Toshiharu Suzuki. Altered cleavages of amyloid β -protein precursor and Alcadin by γ -secretase by changing membrane lipid composition: A possible cause of sporadic Alzheimer's disease by aging. Asian Aging Core for Longevity "2006-2015, 10 years and beyond" AACL Conference March 10-13, 2015. Osaka University Nakanoshima Center, Osaka Japan. Invited Speaker.

⑰ Kyoko Chiba, Toshiharu Suzuki. Regulatory Mechanism of APP axonal transport. International Symposium in the Forefront of Biomedical Sciences -Understanding and care of neurodegenerative diseases- supported by Top-collaboration support program. January 6, 2015. Sapporo Hokkaido University, Sapporo, Japan.

⑱ Chiori Omori, Saori Hata, Toshiharu Suzuki. Levels of CSF and plasma p3-Alc α 35, a major product of alcadeina by γ -secretase cleavages, in elder subjects with or without dementia Society for Neuroscience annual meeting, Neuroscience 2014 November 15-19, 2014. Washington DC Convention Center, Washington DC, USA

⑲ Yuka Okumura, Kyoko Chiba, Angus C. Nairn, Roger J. Davis, Masataka Kinjo, Toshiharu Suzuki. JIP1 is required for the efficient anterograde transport of APP in neuronal axon driven by kinesin-1. Society for Neuroscience annual meeting, Neuroscience 2014 November 15-19, 2014. Washington DC Convention Center, Washington DC, USA

⑳ Toshiharu Suzuki. Brain aging as an etiology of Alzheimer's disease Asian Aging Core for Longevity Research (AACL) 2014 Conference September 21-22, 2014. Haevichi Hotel Conference Room, Jeju, Korea. Invited Speaker

㉑ Toshiharu Suzuki, Kyoko Chiba, Yuka Okumura, Yuzuha Shiraki, Masataka Kinjo, Saori Hata, Hidenori Taru. Regulated axonal transport of APP and alcadin by kinesin-1. American Society for Biochemistry and Molecular Biology annual meeting 2014 (Experimental Biology 2014) April 26-30, 2014. San Diego Convention Center, San Diego, USA

[図書] (計 1 件)

① Suzuki T, Kimura A, Chiba K, Nakaya T, Hata S. (2015) Brain aging as a cause of

Alzheimer's disease. in "Aging Mechanism -Longevity, Metabolism, and Brain Aging" (Edits by Nozomu Mori and Inhee Mook-Jung) Chapter 18 pp303-318 (ISBN 978-4-431-55762-3) Springer. DOI 10.1007/978-4-431-55763-0_18

[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.pharm.hokudai.ac.jp/shinkei/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木利治 (SUZUKI Toshiharu)
北海道大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号: 80179233

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()