

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591704

研究課題名(和文)アルツハイマー病に関連する新規 APLP2 由来脳脊髄液中ペプチドの解析

研究課題名(英文) Analysis of novel Alzheimer's disease-related peptides in human cerebrospinal fluid derived from APLP2

研究代表者

柳田 寛太 (Yanagida, Kanta)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：70467596

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000 円、(間接経費) 1,170,000 円

研究成果の概要(和文)：培養細胞を用いた実験から、脳脊髄液中に存在する APLP2 由来の A β 様ペプチド APL2 β 35、38、39 は A β と同様に β -及び γ -セクレターゼによって生成する事、また APL2 β 35 は APL2 β 38、39 が脳内の主な A β 分解酵素であるネプリライシンによって切断されて生成する事を明らかにした。APL2 β は A β と異なりアミロイド繊維を作らず脳に蓄積しない事、及びネプリライシンはアルツハイマー病患者の脳で減少するという報告があることから、脳脊髄液中の APL2 β は脳内のネプリライシンによる A β の分解マーカーとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Previously, we detected APLP2-derived A β like peptides APL2 β 35, 38 and 39 from human Cerebrospinal Fluid. To clarify generation mechanism of APL2 β , APLP2 transfected cells were treated with several secretase inhibitors. Secreted peptides were immunoprecipitated by anti-APL2 β antisera and detected by MALDI-TOF Ms. APL2 β peptides were abolished by β - and γ -secretase inhibitors. Conversely, APL2 β 38 and 39, but not APL2 β 35 were raised by α -secretase inhibitor. Interestingly, APL2 β 35 was increased, but APL2 β 38 and 39 were decreased by overexpression of Neprilysin, which is known as major A β degrading enzyme in brain. These results indicate that APL2 β 38 and 39 are generated by β - and γ -secretase, and cleaved by Neprilysin. Consequently, APL2 β 35 is produced. It is considered that Neprilysin is reduced in the brains of Alzheimer disease patients. Thus, APL2 β 35 may be a surrogate marker for A β degradation by Neprilysin in brain.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：アルツハイマー病 アミロイド セクレターゼ

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに APP ファミリーに属する APLP1 (Amyloid precursor-like protein 1) 由来の A 様ペプチド (APL1) を脳脊髄液中で発見した。APL1 は A と同様にアルツハイマー病患者の脳脊髄液中でペプチド鎖の長いものが増加する事から、毒性の強い A₄₂ ペプチドの産生マーカーとなり得る事を報告した (Yanagida et al. 2009 EMBO Mol. Med.)。また APL1 は、アルツハイマー病と診断される前の軽度認知障害患者の脳脊髄液中でも A₄₂ に相当するペプチドの産生が上昇していた事から、アルツハイマー病の早期診断マーカーとしても有効である事を示した。以上の結果から、同じ APP ファミリーである APLP2 (Amyloid precursor-like protein 2) 由来の A 様ペプチドも脳脊髄液中に存在し、アルツハイマー病で産生が変化するのはないかと考え、脳脊髄液から APLP2 由来の A 様ペプチドの検出を行った。APLP2 の膜貫通領域近傍に対する抗体を作製し、免疫沈降法と質量分析機により A に近い分子量の 35-39 アミノ酸からなる 3 種類のペプチド APL2₃₅、38、39 を検出した。これらのペプチドのアミノ酸配列を調べると、APLP2 の膜貫通領域には APP の切断部位と同じ配列が含まれているにも関わらず、APP よりも細胞外領域に近い所で切断されていた。-セクレターゼによる膜内切断機構については未だ不明な点が多いが、APLP2 の切断メカニズムを解明する事により、-セクレターゼの性質について詳しい知見が得られると考えられる。

2. 研究の目的

APP は、-及び -セクレターゼによって切断され、アルツハイマー病の原因と考えられている A ペプチドが生成する。我々は APP ファミリータンパクである APLP2 由来の A 様ペプチド (APL2) を脳脊髄液から発見したが、APP と APLP2 は -セクレターゼの切断を受ける膜貫通領域のアミノ酸配列に高い相同性があるにも関わらず、切断部位が異なっていた。この研究では、APL2 ペプチドの産生メカニズム及びその性質を解明し、他の APP ファミリータンパクと比較する事により -セクレターゼの膜内切断機構や A の凝集作用についての知見を得る事を目的とする。

3. 研究の方法

(1) APLP2 を過剰発現させた培養細胞を作製し、セクレターゼの阻害剤等を作用させて APL2 の産生メカニズムを解明する。
(2) APLP2 過剰発現細胞に家族性アルツハイマー病変異のプレセニリン 1 を発現させ、APL2 の中に A₄₂ に相当するペプチドが存在するのかを確かめる。

(3) APL2 の合成ペプチドを作製し、A が凝集する条件下で反応させて APL2 も凝集する性質を持つのかを調べる。
(4) アルツハイマー病患者の脳に沈着している不溶性物質の中に APL2 が含まれているのかをウエスタンブロット法で調べる。

4. 研究成果

(1) APL2 の産生メカニズムの解明
脳脊髄液中から発見した APL2 の産生メカニズムを解明するため、HEK293 細胞に APLP2 を過剰発現させた細胞を作製した。この細胞の培養上清を APLP2 の膜貫通領域近傍に対する抗体で免疫沈降し、質量分析装置により解析 (IP-MS) したところ、脳脊髄液中の APL2 と同じ質量のペプチドはほとんど検出されず、N 末端側が短い APL2 が検出された。これらのペプチドは -セクレターゼ阻害剤で検出されなくなり、-セクレターゼ阻害剤及び -セクレターゼを活性化させる薬剤で増加した。また、-セクレターゼ阻害剤や BACE1 (-セクレターゼ) の過剰発現により脳脊髄液中の APL2 と同じペプチドが増加したことから、脳内の APLP2 は APP や APLP1 と同様に -及び -セクレターゼによって切断されるが、培養細胞に APLP2 を過剰発現させると -セクレターゼによって切断されたペプチドが増加することが考えられる。
脳脊髄液中と同じ APL2 を産生する培養細胞を作製するため、-セクレターゼで切断された APLP2 断片 (APLP2_{-CTF}) の遺伝子を HEK293 細胞に導入した (APLP2_{-CTF}/HEK 細胞)。この細胞の培養上清を APL2 に対する抗体で IP-MS すると、APL2₃₈ や APL2₃₉ が多く検出されたが、脳脊髄液で最も多い APL2₃₅ はあまり検出されなかった。脳内で A はネプリライシン等のエンドペプチダーゼによって切断される事から、APL2₃₅ もペプチド鎖の長い APL2 がエンドペプチダーゼによって切断されて生成するのではないかと考え、ネプリライシンとインシュリン分解酵素 (IDE) の遺伝子を APLP2_{-CTF}/HEK 細胞に導入した。培養上清中の APL2 を IP-MS で測定すると、IDE を発現させた細胞では変化はなかったが、ネプリライシン発現細胞では APL2₃₅ が大幅に増加していた。APL2₃₅ は APL2₃₈、APL2₃₉ がネプリライシンによって切断されて生成するのではないかと考え、APL2₃₈、APL2₃₉ を化学合成し、recombinant のネプリライシンと 37 で 2 時間反応させた。その結果、APL2₃₈ と APL2₃₉ のどちらからも APL2₃₅ が生成した。しかし、ネプリライシン以外の A 分解酵素 (IDE、ACE、ECE-1) でも同様の実験を行ったが、APL2₃₅ は生成しなかった。この結果から、脳内の APLP2 は -及び -セクレターゼによって切断されて APL2₃₈、APL2₃₉ が生成し、さらにネプリライシンで切断されて APL2₃₅ が生成することが示唆される。

た。

(2) APL2 は家族性アルツハイマー病変異のプレセニン1によってA 42様ペプチドが増加するか

APLP2 -CTF を 10 種類の家族性アルツハイマー病変異のプレセニン1 (FAD PS1) 発現細胞に導入し、アミロイド と同様に正常よりもC末端側が長いA 42様のAPL2が増加するのかを調べた。FAD PS1 発現細胞はA 42の産生を増加させるが、APL2 はどの変異でもC末端側が長いペプチドは増加せず、むしろ短いものが増加した。APP以外の -セクレターゼの基質である APLP1 や Notch1 でも FAD PS1 発現細胞ではC末端側が長いペプチドが増加していたが、APL2 は長いペプチドが増加しないという興味深い結果が得られた。

(3) APL2 は凝集する性質を持つのか

A と同様に APL2 も脳に蓄積するのかを調べた。APL2 35、APL2 38、APL2 39 と A 40 を pH7.0 で 37、48 時間反応させ、生成した fibril を電子顕微鏡と Size-Exclusion Chromatography で検出した。A 40 は fibril を形成したが、全ての APL2 は fibril が検出されなかった。この結果から、APL2 は A とほぼ同じ分子量であるが、fibril を形成しない性質であることが明らかとなった。

(4) アルツハイマー病患者の脳に沈着している不溶性物質の中に APL2 が含まれているのか

AD 及び AD ではない患者の脳を Tris-Buffered Saline (TBS)、TritonX、SDS、ギ酸の順で homogenize 後遠心し、ギ酸可溶性画分を A 及び APL2 抗体で Western Blot した。その結果、AD 患者の脳ではスミアな A のバンドが確認されたが、APL2 は検出されなかった。また、ギ酸可溶性画分を中和して A 及び APL2 抗体で IP-Ms すると、A は検出されたが APL2 はやはり検出されなかった。以上の結果から APL2 は脳に蓄積していないと考えられる。

(5) APL2 35 の産生は A の分解を反映するのか

ネプリライシンは脳内で A を分解する主要なエンドペプチダーゼであると考えられており、加齢とともにネプリライシンが減少することにより A の分解が低下し、アルツハイマー病を発症するという報告もある。このことから APL2 35 の産生は A のネプリライシンによる分解活性を反映するのではないかと考え、APLP2 -CTF と A 産生が増加する家族性 AD 変異 (swedish 変異) を入れた APP を発現させた HEK 細胞 (APLP2 -CTF/swAPP HEK 細胞) を作製し、生成した APL2 と A を定量して相関を調べることにした。A は市販の ELISA キットで定量できるが APL2 を

定量する方法は無いので、LC-Ms での定量法を検討した。APLP2 -CTF/swAPP HEK 細胞にネプリライシン遺伝子の量を変えて transfect し、48 時間後培養上清を回収した。培養上清に安定同位体標識した APL2 35、APL2 38、APL2 39 ペプチドを混ぜ、C18 逆相樹脂と陽イオン交換樹脂をピペットチップに充填した簡易カラムで APL2 を精製し、LC-Ms で分析した。定量に適した娘イオンを 3 種類ずつ選択し、細胞が産生した APL2 と安定同位体標識した APL2 の娘イオンのピーク面積比から APL2 濃度を定量した。その結果、導入した遺伝子量依存的に APL2 35 が増加したが、APL2 38、APL2 39 及び total A は減少していた。APL2 35 の産生量と A の分解量をグラフにすると相関がみられたことから、APL2 35 の産生は A の分解を反映する事が示唆された。

今回の研究結果から、APL2 38、APL2 39 は A と同様に -及び -セクレターゼによって生成し、更に A 分解酵素であるネプリライシンによって切断されて APL2 35 ができるという APL2 の産生メカニズムが解明された。また、ネプリライシンによる APL2 35 の産生と A の分解には相関がみられた事、APL2 は脳に蓄積しない事から、CSF 中の APL2 35 は脳内のネプリライシンによる A 分解活性を反映し、AD の診断マーカーとなる可能性が示唆された。

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 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

柳田寛太

APP ファミリータンパクは脳内では主に BACE によって shedding を受けるが培養細胞に過剰発現させると -セクレターゼによる切断が増加する

第 30 回日本認知症学会学術集会

2011 年 11 月 11 日 タワーホール船堀

柳田寛太

APL2 の産生メカニズムの解析 (1) APLP2 はプレセニン1と2で異なる切断を受ける

第 30 回日本認知症学会学術集会

2012 年 10 月 26 日 つくば国際会議場

柳田寛太

APL2 の産生メカニズムの解析 (2) APL2 はネプリライシンで切断される

第 30 回日本認知症学会学術集会

2012 年 10 月 26 日 つくば国際会議場

柳田寛太

APLP2 は Presenilin1 FAD mutant によって APP や APLP1 と異なる切断を受ける。

Neuro2013

2013 年 6 月 21 日 国立京都国際会館

柳田寛太
Identification of APLP2-derived A_β-like
peptides from human Cerebrospinal fluid
WFSBP Congress 2013
2013年6月27日 国立京都国際会館

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 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 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳田 寛太 (Yanagida Kanta)

研究者番号：70467596

(2) 研究分担者

大河内 正康 (Okochi Masayasu)

研究者番号：90335357

(3) 研究分担者

田上 真次 (Tagami Shinji)

研究者番号：40362735

(4) 研究分担者

児玉 高志 (Kodama Takashi)

研究者番号：30512131