

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月24日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790069

研究課題名（和文） X11Lカルボキシル基末端の構造変化機構と生理的意義の解明

研究課題名（英文） Conformational change of X11L and its physiological functions

研究代表者

齋藤 有紀（SAITO YUHKI）

北海道大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：70548180

研究成果の概要（和文）：アルツハイマー病（AD）関連因子として同定されたX11LによるAD発症抑制機構の解明を目的に、X11Lタンパク質のカルボキシル基（C）末端の構造変化に着目し研究を行った。その結果、AD発症の原因と考えられているA β の産生がX11LのC末端構造変化とよく相関すること、またX11LのC末端構造変化がリン酸化により制御され、そのリン酸化を制御するリン酸化酵素の候補を数種類同定した。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this research is to reveal the mechanism of AD pathogenesis. X11-like (X11L) protein has been identified as a suppressor of AD pathogenesis. We revealed in this project that the conformational change of X11L was correlated to the amount of A β generation and that its conformational change was regulated by the phosphorylation of calboxyl-terminal of X11L protein. Moreover, we identified a few candidate kinases of X11L protein.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：アルツハイマー病、X11L、リン酸化

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまでに、X11/X11L二重遺伝子欠損マウスを作製し X11/X11L二重遺伝子欠損マウス脳内で内在性マウス APP代謝（A β 産生量）が亢進し、APP代謝安定化効果は X11よりも X11Lの方が強いことを *in vivo* において明らかにしてきた（*J. Biol. Chem.* [2008] 283 35763）。また同時に、X11ファミリー蛋白質は細胞内の A β 産生場である lipid raft への APP移行を抑制し APP代謝を安定化することを明らかにしてきた。さらに、ADモデルマウス（APP-Tgマウス）と X11L遺

伝子欠損マウス（X11L-KO）の交配により APP-Tg/X11L-KOマウスを作製し、APP-Tg/X11L-KOマウス脳内では APP-Tgマウスと比較し有意に A β 産生が亢進し、アミロイド斑数が増加していることを明らかにしてきた（*Mol. Neurodegener.* [2010] 15;5(1):35）。これらの解析より、X11ファミリー蛋白質は AD発症および進行過程に認められる A β 産生量亢進において重要な機能を担っていることが示されてきたが、APP代謝安定化に機能する X11Lのドメインおよびその制御機構は未解明であった。これまでの各

種ドメイン欠失体を用いた培養細胞系における予備的解析から、APP の代謝安定化には X11 ファミリー蛋白質のカルボキシル基 (C) 末端側に存在する 2 つの PDZ ドメインが重要であることを明らかにしている。X11 ファミリー蛋白質の最 C 末端には PDZ 結合モチーフが存在し、この C 末端の PDZ 結合モチーフは PDZ1 ドメインと結合し、定常状態では auto-inhibition 状態にある。X11L の 748 番目のアミノ酸であるチロシンのリン酸化体を模したグルタミン酸変異体 (Y748E) では、C 末端が PDZ1 ドメインに結合できず、auto-inhibition が解除された状態であることが報告された (*Nat. Struct. Mol. Biol.* [2005] 12 722)。また、予備的な解析から、この C 末端の構造変化が APP との結合を制御していることを明らかにしていた。

以上より、X11L は APP 代謝抑制分子として機能するが、C 末端の構造変化と APP 代謝の関連や、C 末端構造変化機構、C 末端のリン酸化を担う Kinase は不明であった。

2. 研究の目的

本申請研究は X11L の PDZ ドメイン構造変化機構、即ち X11L の C 末端と PDZ ドメインの結合・解離機構を明らかにし、PDZ ドメイン構造変化により APP 代謝がどのように変動するかを明らかにし、AD との関係性を解明することを目的とした。

(1) X11L PDZ ドメインの構造変化機構の解明：X11L Y748 のリン酸化により PDZ ドメインの構造が制御されていることを証明すると共に、その kinase の同定を行う。

(2) APP 代謝における X11L PDZ ドメイン構造変化の機能解明：PDZ ドメインの構造変化が APP 代謝に与える影響を、APP 代謝産物量の定量、APP 及び X11L の細胞内局在を検証することで解明し、X11L PDZ ドメイン構造変化により APP 代謝が制御されていることを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) X11L Y748 リン酸化の検出と kinase の同定：生体内での Y748 リン酸化修飾を検出するために野生型マウス脳および X11L-K0 マウス脳抽出液より抗 X11L 抗体を用いた免疫沈降により X11L を回収し、Western Blot 法にて抗リン酸化チロシン抗体により検出することで検証する。また、X11L の Y748 リン酸化を特異的に認識する抗体の作製を行う。Kinase の同定に関しては、kinase library を使用し、X11L と各 kinase を細胞内に発現させ、抗 Y748 リン酸化抗体又は抗チロシンリン酸化抗体を用い western blot を行うことで kinase の同定を試みる。

(2) X11L は PTB ドメインを介し APP と結合し代謝を安定化するが、PDZ ドメイン欠損変

異体は APP 代謝を安定化しない。よって、APP 代謝安定化には PDZ ドメインが重要であると考えられる。そこで、PDZ ドメインの構造変化が APP 代謝に与える影響を検証するために、野生型と Y748E 変異 X11L を培養細胞に発現させ、APP 代謝産物である sAPP, CTF β , A β 40 および A β 42 の産生量を Western Blot 法および sELISA により定量し野生型と Y748E 変異で比較する。以上の解析から PDZ ドメインの構造変化により APP 代謝が変動し、X11L による APP 代謝安定化が PDZ ドメイン構造により規定されていることを示す。

4. 研究成果

(1) マウス脳内に存在する kinase により X11L-C 末端のリン酸化が起きることを精製 X11L タンパク質と脳抽出液を反応させることで明らかにした。次に、kinase library 中の脳内に発現が確認されている kinase を用い、X11L タンパク質のリン酸化が亢進される kinase の同定を試み、数種類の kinase を同定することができた。

(2) X11L タンパク質の C 末端構造変化を模した変異 X11L を作製し、APP 代謝に与える影響を野生型 X11L と比較した。その結果、野生型 X11L で認められる APP 代謝安定化効果が、変異 X11L では認められなくなることを明らかにした。

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 5 件)

1. Yuhki Saito, Inoue T, Zhu G, Kimura N, Okada M, Nishimura M, Kimura N, Murayama S, Kaneko S, Shigemoto R, Imoto K, Suzuki T. (2012) Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated channels: a potential molecular link between epileptic seizures and A β generation in Alzheimer's disease. *Mol. Neurodegener.* 査読有、7:50. doi: 10.1186/1750-1326-7-50.
2. Maruta C, Yuhki Saito, Hata S, Gotoh N, Suzuki T, Yamamoto T. (2012) Constitutive cleavage of the single-pass transmembrane protein alcadein α prevents aberrant peripheral retention of Kinesin-1. *PLoS One.* 査読有、7(8):e43058. doi: 10.1371/journal.pone.0043058.

3. Takahide Matsushima, Yuhki Saito, James I. Elliott, Kanae Iijima-Ando, Masaki Nishimura, Nobuyuki Kimura, Saori Hata, Tohru Yamamoto, Tadashi Nakaya, and Toshiharu Suzuki (2012) Membrane-microdomain Localization of Amyloid β -Precursor Protein (APP) C-terminal Fragments is Regulated by Phosphorylation of the Cytoplasmic Thr668 Residue. *J. Biol. Chem.* 査読有、287, 19715-19724. doi: 10.1074/jbc.M111.334847.
 4. Tomoko Konno, Saori Hata, Yukiko Hamada, Yuko Horikoshi-Sakuraba, Tadashi Nakaya, Yuhki Saito, Tohru Yamamoto, Takayuki Yamamoto, Masahiro Maeda, Takeshi Ikeuchi, Sam Gandy, Hiroyasu Akatsu and Toshiharu Suzuki (2011) Coordinated increase of gamma-secretase products in the plasma of some female Japanese sporadic Alzheimer's disease patients. *Mol. Neurodegener.* 査読有、6: 76. doi: 10.1186/1750-1326-6-76.
 5. Yuhki Saito, Mayu Akiyama, Yoichi Araki, Akio Sumioka, Maki Shiono, Hidenori Taru, Tadashi Nakaya, Tohru Yamamoto, Toshiharu Suzuki (2011) Intracellular Trafficking of the Amyloid β -Protein Precursor (APP) Regulated by Novel Function of X11-Like. *PLoS ONE*, 査読有 6: e22108. doi: 10.1371/journal.pone.0022108.
- [学会発表] (計 12 件)
1. Kanada, Y., Saito, Y., Nishimura, M., Kimura, N. and Suzuki T. Involvement of X11/X11L in Alzheimer's-related beta-amyloid generation and epileptogenesis. Alzheimer's Association International Conference 2012 (July 14-19, 2012; Vancouver Convention Center, Vancouver, British Columbia, Canada)
 2. Matsushima, T., Saito, Y., Nishimura, M., Kimura, N., Hata, S. and Suzuki T. Membrane microdomain localization of APP C-terminal fragments regulated by the phosphorylation at cytoplasmic Thr668 residue. Alzheimer's Association International Conference 2012 (July 14-19, 2012; Vancouver Convention Center, Vancouver, British Columbia, Canada).
 3. 齋藤有紀「神経細胞活動とアルツハイマー病」第 132 年会 日本薬学会 北海道大学(北海道) [特別シンポジウム OS11-1] 2012 年 3 月 31 日
 4. 方家, 齋藤有紀, 鈴木利治「APP 代謝・輸送制御を担う X11-like (X11L) の機能ドメイン」第 132 年回 日本薬学会 北海道大学 (北海道) 2012 年 3 月 29 日
 5. Yuhki Saito and Toshiharu Suzuki. Intracellular Trafficking of the Amyloid β -Protein Precursor Regulated by PDZ domains of X11-Like. 51th The American society for cell biology annual meeting, The Colorado convention center, Denver (CO), USA, Dec 5, 2011.
 6. 山本融, 後藤直也, 齋藤有紀, 羽田沙緒里, 松崎文雄, 鈴木利治「Alcadein α の欠損により APP のアミロイド産生的代謝は亢進する」第 34 回日本神経科学大会 Neuroscience2011, パシフィコ横浜 (神奈川県), 2011 年 9 月 16 日
 7. 齋藤有紀, 井上剛, 鈴木利治「X11^{-/-}; X11L^{-/-}マウスとアルツハイマー病モデルマウスで認められる HCN チャネル機能異常」第 34 回日本神経科学大会 Neuroscience2011, パシフィコ横浜 (神奈川県), 2011 年 9 月 15 日
 8. Ayano Kimura, Norio Takei, Saori Hata, Yuhki Saito, Toshiharu Suzuki [APP metabolism in brain of alcadein α CTF transgenic mice] Alzheimer's Association International Conference 2011, Paris Porte de Versailles Convention and Exhibition Center, Paris, France, July 19, 2011.
 9. Jia Fang, Tomoko Konno, Yuko Horikoshi-Sakuraba, Saori Hata, Yuhki Saito, Masahiro Maeda, Hiroyasu Akatsu, Toshiharu Suzuki. [Quantification of plasma p3-Alc α level with s ELISA

- systems] Alzheimer's Association International Conference 2011, Paris Porte de Versailles Convention and Exhibition Center, Paris, France, July 19, 2011.
10. Naoya Gotoh, Yuhki Saito, Saori Hata, Tohru Yamamoto, Toshiharu Suzuki [Enhanced amyloidogenic processing of APP in Alcadein α -deficient mice] Alzheimer's Association International Conference 2011, Paris Porte de Versailles Convention and Exhibition Center, Paris, France, July 19, 2011.
11. Yuhki Saito, Tsuyoshi Inoue, Toshiharu Suzuki [Malfunction of HCN channels in X11/X11L doubly deficient mice] Alzheimer's Association International Conference 2011, Paris Porte de Versailles Convention and Exhibition Center, Paris, France, July 17, 2011.
12. Mikiko Yokokoji, Morihara Takeshi, Noriyuki Hayashi, Masayasu Okochi, Toshiharu Suzuki, Yuhki Saito, Nobuyuki Kimura, Masatoshi Takeda, Hiroaki Kazui, Hiroyasu Akatsu, Akitaka Takamura, Taiichi Katayama, Naohiro Ito, Shinichi Tatsumi, Kiyoko Kato, Kanta Yanagida, Takashi Kodama, Shinji Tagami, Norihisa Tanaka, Takashi Kudo, Takashi Morihara [Identification of a gene which controls abeta accumulation using APP Tg mice with mixed genetic background splicing variant specific effect of kinesin light chain 1 (KLC1)] Alzheimer's Association International Conference 2011, Paris Porte de Versailles Convention and Exhibition Center, Paris, France, July 17, 2011.

[図書] (計2件)

1. Yuhki Saito, Takahide Matsugima, Toshiharu Suzuki. (2013) Understanding Alzheimer's Disease: Mechanism of

Alzheimer amyloid β -protein precursor localization to membrane lipid rafts. (Edited by Inga Zerr), Chapter 2: p23-p37, INTECH (ISBN 978-953-51-1009-5)

2. 齋藤有紀, 鈴木利治 (Yuhki Saito, Toshiharu Suzuki) (2012) γ セクレターゼ研究と A β 産生を標的とした薬剤開発の現状 - APP および APP 切断産物の機能 (Functions of APP and APP derived-fragments). 日本認知症学会誌 (Dementia Japan) 26, 51-59.

[その他]

ホームページ等

<http://www.pharm.hokudai.ac.jp/org/shinkei01.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 有紀 (SAITO YUHKI)

北海道大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：70548180

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし