

低分子量 A β オリゴマーの神経細胞内代謝メカニズムの解明と、新規創薬ターゲットの同定
(25-27)

主任研究者 飯島 浩一 国立長寿医療研究センター 室長

研究要旨

老年性認知症の最大の原因であるアルツハイマー病 (AD) には、根本的な予防、治療法が確立されておらず、その発症機序は不明な点が多い。老化に伴う β -アミロイドペプチド (A β) の脳内での蓄積は、AD 発症の引き金となることが強く示唆されており、脳内 A β 量を減少させることが AD の根本的な予防、治療法に繋がると考えられている。

A β はその前駆体タンパク質 APP が、分泌経路内で切断されて産生される。APP や APP 切断酵素である β -セクレターゼ、 γ -セクレターゼなど、分泌経路を通過する全てのタンパク質は小胞体において品質管理を受け、異常・欠陥のあるタンパク質は修復されるか分解除去される。興味深いことに、老化に伴い、このタンパク質品質管理機能が低下することが示唆されており、それが加齢に伴う脳内 A β 量の増加に関与している可能性がある。

我々は最近、小胞体で働き、神経細胞の分泌経路内のタンパク質品質管理能力を向上させる新規タンパク質を同定した (論文投稿中)。さらに予備実験により、この新規タンパク質の発現を上昇させたマウス培養神経細胞内では、APP から産生される A β の中でも神経毒性の高い、低分子量 A β オリゴマーの量が特異的に減少しているということも見いだした (論文準備中)。

これらの結果に基づき、本研究では、1) 新規タンパク質が 低分子量 A β オリゴマーの量を減少させる分子メカニズム、また、2) 新規タンパク質が脳内で A β の沈着を減少させるかを β -アミロイド-シスモデルマウスを用い調べる。3年計画の1年目にあたる平成25年度は、9月に室長・飯島浩一、研究員・関谷倫子が米国より着任し、発症機序解析研究室のセットアップを開始した。また、本研究の遂行に必須となる新たな博士研究員、研究補助員の募集を行い、11月中旬には 研究補助員が、また目的2の動物実験を担当する予定である博士研究員が平成26年4月より着任することが内定した。現在までに、目的1の実験の一部と、平成26年度から開始する目的2の実験で用いるウイルスベクターの構築を行った。また、本研究計画を発案する背景となった結果を論文としてまとめ、平成25年11月に投稿し、現在は再投稿準備中である。また、平成26年1月には **Keystone Conference** で飯島浩一が投稿中の論文の内容を口頭発表した。

主任研究者

飯島 浩一 国立長寿医療研究センター
アルツハイマー病研究部・発症機序解析研究室 室長

分担研究者

住岡 暁夫 国立長寿医療研究センター
分子基盤研究部・標的治療開発室 室長

A. 研究目的

目的 1 新規タンパク質が培養神経細胞内で β -アミロイド前駆体タンパク質 (APP) 由来の低分子量 β -アミロイド ($A\beta$) オリゴマーの量を特異的に減少させるメカニズムを明らかにする。

目的 2 新規タンパク質が、アルツハイマー病 β -アミロイド-シスモデルマウス脳内において低分子量 $A\beta$ オリゴマー量と $A\beta$ の沈着を減少させるかを、ウイルスベクターを用いた遺伝子導入法により調べる。

B. 研究結果

(目的 1) 新規タンパク質が培養神経細胞内で β -アミロイド前駆体タンパク質 (APP) 由来の低分子量 β -アミロイド ($A\beta$) オリゴマーの量を特異的に減少させるメカニズムを明らかにする。

(目的 1-1) 新規タンパク質の発現により凝集能の低い $A\beta$ 種の量が増加している、または凝集能の高い $A\beta$ 種の量が減少している可能性を ELISA 法と免疫沈降・質量分析法を用いて網羅的に調べる。

APP からは凝集能の高い $A\beta_{42}$ と、 $A\beta_{40}$ をはじめとする凝集能が比較的低い $A\beta$ 種が産生される。ELISA 法による予備検討により、新規タンパク質の共発現が、APP から産生される $A\beta_{40}$ 量を増加させる可能性が示唆されている。平成 25 年度は、研究協力者である Rong Wang 博士との共同研究により、免疫沈降・質量分析法を用いて、新規タンパク質の発現が、APP から産生される各 $A\beta$ 種の量的変化を引き起こすか、網羅的な解析を行った。

神経細胞由来の N2A 細胞に APP 単独 (APP)、あるいは APP と新規タンパク質を共発現させ、5M GuHCl 溶液で細胞を可溶化後、細胞内に存在する $A\beta$ を免疫沈降法により回収し、質量分析法で単量体 $A\beta$ の種類と割合を比較検討した。その結果、新規タンパク質の発現により、1) 凝集能の低い $A\beta_{38}$ や $A\beta_{40}$ の量が増加している、2) 一方で、凝集能の高い

A β 42 の量は減少していない、ことが示唆された。この結果は、予備実験の ELISA の結果と一致するものとなった。以上の結果は、新規タンパク質の発現により、凝集能の低い A β 種の量が上昇することで、細胞内で形成される低分子オリゴマーの量が減少している可能性を示唆する。今後は、質量分析法による各 A β 種の網羅的な解析を繰り返し、結果の再現性の確認を行う。また ELISA 法による A β 40 と A β 42 の測定に関しても、これまで使用していた Invitrogen 製のキットに加え、さらに感度の良い Wako 製のものを用い再現性の確認を行う。

(目的 1-2) 細胞内で新規タンパク質が A β に作用し低分子量オリゴマーの形成を阻害している可能性を検討する。

細胞内で新規タンパク質が A β モノマー、または低分子量 A β オリゴマーと複合体を形成するかどうかを、共役免疫沈降法を用いて検討した。神経細胞由来の N2A 細胞に APP と HA タグを付加した新規タンパク質を共発現させ、抗 HA タグ抗体を用いて新規タンパク質複合体を免疫沈降した。回収した新規タンパク質複合体を SDS-PAGE 後、抗 A β 抗体 (6E10) を用いウエスタンブロット法を行ったが、A β モノマー、また低分子量 A β オリゴマーのバンドは検出されなかった。以上の結果から、細胞内で新規タンパク質が A β に相互作用することで、低分子量オリゴマーの形成を阻害している可能性は低いと考えられる。一方で興味深いことには、上記の実験より新規タンパク質と全長の APP が共役免疫沈降されたことから、両者が細胞内で複合体を形成している可能性が示された。この新たに見いだした新規タンパク質と全長の APP の相互作用が、目的 1-1 で示唆された結果 (新規タンパク質の発現により、凝集能の低い A β 種の産生量が上昇する) にどのように関与しているのかについては今後検討していきたい。

(目的 1-3) 新規タンパク質の発現が膜脂質組成を変化させることで細胞内低分子量 A β オリゴマーの量を減少させる可能性を検討する。

新規タンパク質の発現により、細胞内で形成される低分子オリゴマーの量が減少する原因の一つとして、凝集能の高い A β 種の産生量の上昇が関与している可能性が示唆された (目的 1)。一方で、小胞体は脂質合成の主要オルガネラであることから、新規タンパク質の発現上昇が細胞内の膜脂質組成に何らかの影響を与え、A β の重合を抑制、または APP から A β の切断様式を変化させることで、細胞内低分子量 A β オリゴマー量を減少させている可能性も考えられる。平成 26 年度は、分担研究者である住岡暁夫 室長とともに、N2A 細胞内で、新規タンパク質の発現により細胞内の膜脂質の組成変化が引き起こされるかを、質量分析法で比較・検討する。

(目的 2) 新規タンパク質が、アルツハイマー病 β -アミロイド-シスモデルマウス脳で低分子量 A β オリゴマー量と A β の沈着を減少させるかを、ウイルスベクターを用いた遺伝子

導入法により調べる。

平成26年度からこれらの動物実験を開始する準備として、平成25年度は、新規タンパク質発現ウイルスベクターの構築を行った。レンチウイルスベクターの pLJM1 を入手し、HA タグを付加したマウス新規タンパク質を導入した。コントロール用には、EGFP の他に、新規タンパク質と同じく分泌経路に分布するタンパク質として CD8-GFP 発現コンストラクトを作製した。今後、これらのコンストラクトから新規タンパク質または CD8-GFP が発現されることを HEK293 細胞で確認後、ヘルパープラスミドによってウイルス粒子を生成させる予定である。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え生物等の使用については、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律（平成15年法律第97号 平成19年3月30日改正）」に従って行なう。マウスを用いた実験は、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針（基本指針（平成18年6月1日施行））」に従って行なう。

C. 考察と結論

今年度に行った目的1の1-1（神経細胞内で新規タンパク質が低分子量 A β オリゴマーの量を特異的に減少させるメカニズムを明らかにする）の結果から、新規タンパク質の発現によって、凝集能の低い A β 種の産生が増加し、A β オリゴマーの形成を特異的に減少させている可能性が示唆された。また目的1-2の実験により、新規タンパク質が A β ではなく APP と複合体を形成していることも見いだした。今後は、さらにこの研究を発展させ、新規タンパク質が APP の細胞内代謝に与える影響と背後にあるメカニズムの詳細を明らかにし、目的2で計画しているように生体脳内でも新規タンパク質が低分子量 A β オリゴマーの量を特異的に減少させるかを調べる。これらの結果は、分泌経路内でのタンパク質品質管理能力の向上という新しい概念・方法論に基づいた、新規創薬ターゲットの同定につながる可能性があり、アルツハイマー病の予防、治療法の創出にまで繋がると期待される。アルツハイマー病は、医療、保険、福祉問題にとどまらず、深刻な経済問題となりつつあるため、その予防、治療法の確立によって大きな社会的成果が期待される。

D. 健康危険情報

なし

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mendoza J, Sekiya M, Taniguchi T, Iijima MK, Wang R, and Ando K :
Global Analysis of Phosphorylation of Tau by the Checkpoint Kinases Chk1 and Chk2
in vitro. **Journal of Proteome Research**, 12(6): 2654-65, 2013.

- 2) Ichiyanagi T, Kashiwada Y, Shida Y, Sekiya M, Hatano Y, Takaishi Y, Ikeshiro Y:
Structural elucidation and biological fate of two glucuronyl metabolites of
pelargonidin 3-O- β -D-glucopyranoside in rats. **Journal of Agricultural and Food
Chemistry**, 61(3): 569-78, 2013.

2. 学会発表

シンポジウム、特別講演

- 1) Iijima MK, Sekiya M, Maruko-Otake A, Chin J, and Ando K.
Epigenetic Modifications Reveal the Minimal Unit of UPR that Promotes ERAD and
Protects against Age-Related Chronic Proteinopathy in the Brain.
Keystone conference; Aging - Pushing the Limits of Cellular Quality Control, 平成
26年1月12-17, 2014, Steamboat Springs, Colorado, USA

国際学会発表

(一般口演)

- 2) Sekiya M, Maruko-Otake A, Suzuki E, Ando K & Iijima KM
A novel mechanism by which A β 42 initiates mitochondrial abnormality in the synapse.
The Alzheimer's Association International Conference 2013, 平成25年7月13-1
8日, Boston, USA

- 3) Iijima KM*, Sekiya M, Maruko-Otake A, Chin J, & Ando K (*Session Chair)
Epigenetic modifications reveal an effective use of the protein quality control system
to suppress accumulation and toxicity of A β 42 in the secretory pathway in neurons.
The Alzheimer's Association International Conference 2013, 平成25年7月13-1
8日, Boston, USA

(ポスター)

- 4) Sekiya M, Maruko-Otake A, Suzuki E, Ando K & Iijima KM
NAD synthase NMNAT is protective against reductions in mitochondrial protein levels
and suppresses neurodegeneration in a *Drosophila* model of Alzheimer's disease.
Cell Symposia Mitochondria: from Signaling to Disease, 平成25年5月5-7日, Lisbon,
Portugal

5) Sekiya M, Maruko-Otake A, Ando K, Suzuki E, Iijima MK

A novel mechanism initiating mitochondrial abnormality in the synapses in a Drosophila model of Alzheimer' s disease.

Keystone conference; Mitochondrial Dynamics and Physiology, 平成26年2月18-23, Santa Fe, USA

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし