

20010222

厚生科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

老化に伴うアミロイド蛋白代謝変化の機構解析

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 駒野宏人

平成14 (2002) 年 3 月

## 目次

I. 総括研究報告書	
老化に伴うアミロイド蛋白代謝変化の機構解析	1
駒野宏人	
II. 分担研究報告書	
1. アミロイド $\beta$ 蛋白 (A $\beta$ ) 産生酵素の解析	6
駒野宏人	
2. $\beta$ アミロイド分解に関与するネプリライシンの解析	9
西道隆臣	
3. アミロイド $\beta$ 蛋白前駆体結合蛋白の解析に関する研究	12
鈴木利治	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	15
IV. 研究成果の刊行物・別刷	17

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

総括研究報告書

老化に伴うアミロイド蛋白代謝変化の機構解析

主任研究者 駒野宏人 国立療養所中部病院・長寿医療研究センター 痴呆疾患研究部 室長

研究要旨 老化に伴い、脳内に生じるアミロイド蛋白(A $\beta$ )がほぼ指数関数的に急激に増加していることが明らかになっている。本研究は、老化に伴いある年齢を境に脳内に生じる A $\beta$ の急激な増加する分子機構を明らかにすることを目的とし、A $\beta$ 産生系分解系に関与する分子について解析を行った。その結果、A $\beta$ 分解酵素としては、neprilysin 遺伝子ノックアウトマウスを用いた解析から neprilysin と呼ばれるペプチターゼの関与が示され、また、その細胞内作用部位が明らかとなった。A $\beta$ 産生については、 $\gamma$ -セクレターゼ活性を高めることによって A $\beta$ 産生を促進する因子として小胞体ストレスによって誘導される Herp という蛋白が同定された。また、APP 結合蛋白として同定された Fe65 蛋白が、APP のリン酸化を介して A $\beta$ の産生を制御することが明らかとなった。

分担研究者

西道隆臣	理化学研究所 脳科学総合研究センター チームリーダー
鈴木利治	北海道大学 大学院薬学系研究科 教授

し、その増加機構を明らかにすることを目的とする。生体内の A $\beta$ 量は、A $\beta$ の産生量と分解量によって決まるが、老化に伴う A $\beta$ の変動が、生体内で産生系分解系のどちらの変動によっておきているのかは明らかとなっていない。老化に伴う A $\beta$ 量の急激な増加について、その原因を分子レベルで解析するため、初年度は、A $\beta$ の産生系および分解系に関与する分子の同定を目的としたが、本年度は、これら分子についての詳細な解析を目的とした。

#### A. 研究目的

老化に伴い、50歳代からヒトの脳内に A $\beta$ がほぼ指数関数的に急激に増加していることが明らかになっている。A $\beta$ は細胞毒性があり、A $\beta$ の増加は老化に伴う脳機能の低下の要因の一つと思われる。また、老人斑として知られる A $\beta$ の異常蓄積は、アルツハイマー病の要因と考えられている。本研究は、老化に伴いある年齢を境に脳内に生じる A $\beta$ の急激な増加に着目

#### B. 研究方法

##### (1) A $\beta$ 産生に関与する因子の同定

A $\beta$ の N 末端と C 末端は、APP が、それぞれ、 $\beta$ -セクレターゼと $\gamma$ -セクレターゼと呼ばれるプロテアーゼによって切断を受けて産生される。

$\beta$ -セクレターゼは、新規のアスパラギン酸プロテアーゼであることが明らかとなったが、 $\gamma$ -セクレターゼについてはこれまでにない新しいタイプのプロテアーゼであることが明らかとなっている。すなわち、 $\gamma$ -セクレターゼ活性は、家族性アルツハイマー病原因遺伝子産物であるプレセニリンを含む複数の因子による複合体が担っていることが明らかとなった。主任研究者らは  $A\beta$  産生に関与する因子として、 $\gamma$ -セクレターゼ活性を制御する因子の cDNA をスクリーニングする方法を独自に開発（特許出願済）し、この方法により、複数の cDNA を同定することに成功した（主任研究者 駒野 平成 12 年度分担研究報告書参照）。その結果、得られた cDNA のひとつは、Herp をコードしていることが明らかとなった。Herp が  $A\beta$  産生に関与するか否かの確認実験は、Herp cDNA を HEK293 細胞に導入し、この細胞の産生する  $A\beta$  量が増加するか否かで解析した。また、Herp とプレセニリンとの結合性は、Herp に対する抗体、および、プレセニリンに対する抗体を用いて、免疫沈降実験により解析した。

#### (2) $A\beta$ 分解酵素の同定

分担研究者（西道）により、脳内における  $A\beta$  の分解は、ペプチダーゼ、neprilysin が関与していることが強く示唆されていた。そこで、実際に生体内で  $A\beta$  分解に直接関与しているか否かをしるため、neprilysin 遺伝子ノックアウトマウスを用いて  $A\beta$  の定量を行った。また、neprilysin の作用部位を明らかにするため、neprilysin の抗体を用いて、細胞内局在を解析した。

#### (3) APP 結合蛋白の解析

Fe65 蛋白が、APP 細胞質ドメインに結合するし、

$A\beta$  産生に抑制的に作用することがすでに報告されている。今回、その分子機構を解析するため、Fe65 蛋白と APP との結合能および Fe65 蛋白の持つ  $A\beta$  産生抑制能に対する APP 細胞質ドメインのリン酸化の影響を解析した。

#### （倫理面への配慮）

本研究で行われる遺伝子工学的手法はすべて P1 あるいは P2 レベルの操作であり、実験操作は P1 および P2 施設で行った。また、実験材料としてマウスを用いる場合は麻酔を用い、動物に苦痛を与えないよう配慮した。

### C. 研究結果

#### $\gamma$ -セクレターゼ活性を促進する遺伝子の同定

主任研究者（駒野）により確立したスクリーニングによって同定された cDNA のひとつを解析した結果、小胞体ストレスによって誘導される Herp と命名された機能不明な膜蛋白をコードしていることが明らかとなった。Herp cDNA を細胞に強制発現することにより、細胞の産生する  $A\beta$  レベルの増加が確認され、また、Herp 蛋白がプレセニリン（家族性アルツハイマー病原因遺伝子翻訳産物）と結合していることを見いだした。以上の結果より、Herp は、プレセニリンに作用し、 $\gamma$ -セクレターゼ活性を上昇させる  $\gamma$ -セクレターゼ活性調節因子としての機能をもつことが考えられた（Sai et al., J. Biol. Chem. in press. 2002）。

#### $A\beta$ の分解酵素 neprilysin の解析

neprilysin 遺伝子ノックアウトマウスでは、脳内の  $A\beta$  量が増加していたことから、neprilysin が、実際に生体内で脳内の  $A\beta$  の分解に関与していることが示された（Iwata et al., Science, 292, 1550-1552, 2001）。また、免疫組織化学的

解析により、neprilysin がインターニューロンに強く発現することが判明し、neprilysin の発現あるいは活性は、神経ペプチドによる制御を受けている可能性が考えられた。

#### Aβ産生に影響を与える APP 結合蛋白の解析

Fe65 は APP の細胞質ドメインに結合するが、結合部位より 14 アミノ酸アミノ末端側の Thr668 がリン酸化されると、Fe65 は APP から解離したすることが明らかとなった。その結果、Fe65 による Aβ 産生の抑制効果も解除されることを見出した (Ando et al., J. Biol. Chem. 276,40353-40361, 2002)。

#### D. 考察

以上の結果から、Aβレベルの増加は、(i)小胞体ストレスによる Herp の誘導、(ii) Aβ分解酵素 neprilysin の発現や活性の低下、(iii)APP のリン酸化亢進による Fe65 の APP からの解離によって生じることが明らかとなった。従って、老化に伴う Aβレベルの増加は、これらのいずれか、あるいは、これらの現象が複合して引き起こされる可能性が考えられた。今後は、これらの要因が、実際に、老化に伴い、起きているか否かを解析する必要がある。

#### E. 結論

Aβ産生を調節する因子として、小胞体ストレスによって誘導される Herp が同定された。Aβ分解酵素としては、neprilysin の関与が直接示され、この発現、活性が神経ペプチドによる制御を受けている可能性が指摘された。また、Aβ産生に抑制的にはたらく APP 結合蛋白 FE65 が APP のリン酸化によって、その抑制能が低下することが明らかとなった。

以上の結果から、老化における Aβレベルの増加は、(i)小胞体ストレスによる Herp の誘導、(ii) Aβ分解酵素 neprilysin の発現や活性の低下、(iii)APP のリン酸化亢進のいずれかか、あるいは、これらの現象が複合しておこる可能性が考えられる。

#### F. 健康危険情報

細胞へのストレスが、Aβ沈着と関連している可能性がある (分担研究者、鈴木)

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kawamura Y, Kikuchi A, Takada R, Takada S, Sudoh S, Shibamoto S, Yanagisawa K and Komano H.

Inhibitory effect of a presenilin 1 mutation on the Wnt signalling pathway by enhancement of β-catenin phosphorylation.

Eur J Biochem 268:3036-3041,2001

Shirotani K, Tsubuki S, Iwata N, Takaki Y, Harigaya W, Maruyama K, Kiryu-Seo S, Kiyama H, Iwata H, Tomita T, Iwatsubo T and Saido TC.

Neprilysin degrades both amyloid β peptides 1-40 and 1-42 most rapidly and efficiently among thiorphan- and phosphoramidon-sensitive endopeptidases.

J Biol Chem 276: 21895-21901,2001

Choi W-S, Lee E-H, Chung C-W, Jung Y-K, Jin B K, Kim SU, Oh T H, Saido TC and Oh YJ. Cleavage of Bax is mediated by caspase-dependent or -independent calpain activation in dopaminergic neuronal cells: Protective role of Bcl-2. J Neurochem 77: 1531-1541,2001

Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Shirotani K, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Hama E, Lee H-J and Saido TC. Metabolic regulation of brain Aβ by neprilysin. Science 292: 1550-1552,2001

Kaneko T, Yamashita T, Tohma Y, Nomura M, Imajoh-Ohmi S, Saido TC, Nakao M, Saya H, Yamamoto H and Yamashita J.

Calpain-dependent proteolysis of merlin occurs by oxidative stress in meningiomas: a novel hypothesis for tumorigenesis.

Cancer 92: 2662-2672,2001

Hama E, Shirotani K, Masumoto H, Sekine-Aizawa, Y, Aizawa H and Saido TC. Clearance of extracellular and cell-associated amyloid  $\beta$  peptide through viral expression of neprilysin in primary neurons. *J Biochem* 130:721-726,2001

Russo C, Schettini G, Saido TC, Gambetti P, Tabaton M and Teller JT. N-Terminally truncated amyloid  $\beta$  peptides and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 22:345,2001

Kitazume S, Tachida Y, Oka R, Shirotani K, Saido TC and Hashimoto Y. Alzheimer's  $\beta$ -secretase,  $\beta$ -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme, is responsible for cleavage secretion of a golgi-resident sialyltransferase. *Proc Natl Acad Science USA* 98: 13554-13559,2001

Kim JE, Han BS, Choi WS, Eom DS, Lee EH, Oh TH, Markelonis GJ, Saido TC, Lee GE, Chung IK and Oh YJ. Temporospatial sequence of cellular events associated with etoposide-induced neuronal cell death : role of antiapoptotic protein Bcl-X<sub>L</sub>. *J Neurosci Res* 66: 1074-1082,2001

Hase M, Yagi Y, Taru H, Tomita S, Sumioka A, Hori K, Miyamoto K, Sasamura T, Nakamura M, Matsuno K and Suzuki T. Expression and characterization of the *Drosophila* X11-like/Mint protein during neural development. *J Neurochem* (in press)

Nakaya T, Kawahara S, Watanabe S, Lee D-S, Suzuki T and Kirino Y. Identification and expression of a novel gene in odour-taste associative learning in the terrestrial slug. *Genes Cells* 6: 43-56,2001

Satoh Y, Hirakura Y, Shibayama S, Hirashima, N, Suzuki T and Kirino Y.  $\beta$ -amyloid peptides inhibit acetylcholine release from cholinergic presynaptic nerve endings isolated from an electric ray. *Neurosci Lett* 302:97-100,2001

Ando K, Iijima K, Elliott JI, Kirino Y and Suzuki T. Phosphorylation-dependent regulation of the interaction of amyloid precursor protein with Fe65 affects the production of  $\beta$ -amyloid. *J Biol Chem* 276:40353-40361,2001

Sai X, Kawamura Y, Kokam K, Yamaguchi H, Shiraishi H, Suzuki R, Suzuki T, Kawaichi M,

Miyata T, Kitamura T, De Strooper B, Yanagisawa K and Komano H. Endoplasmic reticulum stress-inducible protein, Herp, enhances presenilin-mediated generation of amyloid  $\beta$ -protein. *J Biol Chem* (in press)

Fukami S, Watanabe K, Iwata N, Haraoka J, Lu B, Gerard NP, Gerard C, St. George-Hyslop P. and Saido TC. A $\beta$ -degrading endopeptidase, neprilysin, in mouse brain: Synaptic and axonal localization inversely correlating with A $\beta$  pathology. *Neurosci Res* (in press)

中矢正、鈴木利治、新井平伊  
アミロイド蛋白とアルツハイマー病  
分子精神医学 1(3):242-250,2001

中矢正、浅海真、鈴木利治  
長期記憶形成と遺伝子発現  
*Bio industry* 18(7):24-31,2001

多留偉功、馳桃子、鈴木利治  
Rel ホモロジドメイン  
*生体の科学* 52(5):386-387,2001

富田進、鈴木利治  
PDZ ドメイン  
*生体の科学* 52(5):496-497,2001

## 2. 学会発表

駒野宏人、川村勇樹、蔡 曉蕊、川市正史、北村俊雄、柳澤勝彦  
ガンマーセクレターゼ活性調節因子 cDNA 同定のための新しいスクリーニング法  
第 44 回 日本神経化学・第 24 回日本神経科学合同大会 2001 年 9 月 26-28 日 京都

蔡曉蕊、川村勇樹、小亀浩市、宮田俊行、柳澤勝彦、駒野宏人  
 $\gamma$ -セクレターゼ活性を促進する因子  
第 44 回 日本神経化学・第 24 回日本神経科学合同大会 2001 年 9 月 26-28 日 京都

駒野宏人、川村勇樹、蔡 曉蕊、川市正史、北村俊雄、柳澤勝彦  
新しいスクリーニング系を用いたガンマーセクレターゼ活性調節因子の同定について  
第 74 回 日本生化学会 2001 年 10 月 28 日 京都

蔡曉蕊、川村勇樹、小亀浩市、宮田俊行、柳澤勝彦、駒野宏人  
 $\gamma$ -セクレターゼ活性におよぼす Herp の影響  
第 74 回 日本生化学会 2001 年 10 月 28 日 京都

駒野宏人  
γ-セクレターゼ活性を調節する因子について  
第 37 回 脳のシンポジウム 2002 年 3 月 15 日  
長野

鈴木利治  
アミロイド前駆体タンパク質 APP のリン酸化  
—APP の機能および代謝、β-アミロイド生成に  
おける役割— 第 38 回日本生化学会北海道支部  
例会特別講演 2001 年 7 月 17 日 札幌

安藤香奈絵、飯島浩一、鈴木利治  
APP リン酸化による APP-Fe65 相互作用とβ-ア  
ミロイド生成の制御機構 第 74 回日本生化学会  
大会 2001 年 10 月 25-28 日 京都

荒木陽一、富田進、鈴木利治  
X11-like と結合する新規膜蛋白質の構造と機能  
解析 第 74 回日本生化学会大会 2001 年 10 月  
25-28 日 京都

住岡暁夫、李東錫、富田進、鈴木利治  
X11L 結合タンパク質 XB51 の Alternative  
splicing による結合の制御 第 24 回日本分子生  
物学会年会 2001 年 12 月 9-12 日 横浜

Ando K, Iijima K, Kirino Y and Suzuki T.  
Phosphorylation-dependent regulation on the  
interaction of amyloid precursor protein with  
Fe65 and the production of beta amyloid.  
第 24 回日本分子生物学会年会  
2001 年 12 月 9-12 日横浜

多留偉功、飯島浩一、馳桃子、八木克将、桐野豊、  
鈴木利治  
アミロイド前駆体タンパク質の細胞質ドメイン  
結合分子による代謝調節 第 24 回日本分子生  
物学会年会 2001 年 12 月 9-12 日 横浜

荒木陽一、富田進、鈴木利治  
X11-like を介した Golgi 体非依存的な APP 輸送  
経路の解析 第 24 回日本分子生物学会年会  
2001 年 12 月 9-12 日 横浜

Iijima K, Asaumi M, Ando K, Kirino Y and  
Suzuki T. hARD1, human homologue of ARD1  
N-terminal acetyltransferase, binds to  
Alzheimer's Amyloid Precursor Protein and  
reduces Aβ40 secretion.  
第 24 回日本分子生物学会年会 2001 年 12 月 9-  
12 日 横浜

佐野良威、武田志津、高島愛子、富田進、石龍徳、  
糸原重美、鈴木利治  
マウス脳における X11-like タンパク質の発現解  
析 第 24 回日本分子生物学会年会 2001 年 12  
月 9-12 日 横浜

Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Shirotani K,  
Lee H-J, Watanabe K, Sekiguchi M, Hosoki E,  
Lu B, Gerard NP, Gerard C and Saido TC.  
The role of neprilysin in the metabolism of Aβ in  
brain. Society for Neuroscience 31th annual  
meeting, Nov.10-17, 2001, San Diego, USA

Takaki Y, Tsubuki S, Iwata N, Shirotani K,  
Yano L, Okamoto T, Gerard NP, Lu B, Gerard C  
and Saido TC.  
Association of Aβ-metabolizing neutral  
endopeptidases with lipid raft in the brain.  
Society for Neuroscience 31th annual meeting,  
Nov.10-17, 2001, San Diego, USA

Tomioaka M, Lee H-J, Fujii K, Tsubuki S,  
Watanabe K, Iwata N and Saido TC.  
Transgenic generation of N-truncated Aβ bearing  
pyroglutamate induces calpain activation in the  
brain. Society for Neuroscience 31th annual  
meeting, Nov.10-17, 2001, San Diego, USA

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

##### 1. 特許取得

- 1) アルツハイマー病関連遺伝子のスクリーニ  
ング法（出願済）
- 2) アルツハイマー病関連遺伝子、タンパク質  
およびそれらの用途（出願済）

##### 2. 実用新案登録 なし

##### 3. その他 なし

アミロイドβ蛋白 (Aβ) 産生酵素の解析

主任研究者 駒野 宏人 国立療養所中部病院 長寿医療研究センター 痴呆疾患研究部 室長

研究要旨

アミロイド蛋白 (Aβ) はアミロイド前駆体蛋白 APP からγ-セクレターゼとβ-セクレターゼと呼ばれるプロテアーゼによってそれぞれ生成される。γ-セクレターゼは、家族性アルツハイマー病原因遺伝子プレセニリンを含む複合体がになっていることが示唆されているが、その複合体の実体は不明である。平成 11,12 年度において、主任研究者らはγ-セクレターゼ活性を調節する因子を解明するため、これら因子の cDNA を同定するための新しいスクリーニング方法を確立した。平成 13 年度は、この方法により得られた cDNA のひとつを解析した結果、小胞体ストレスによって誘導される Herp と命名された機能不明な膜蛋白をコードしていることが明らかとなった。Herp cDNA を細胞に強制発現することにより、細胞の産生する Aβレベルの増加が確認され、また、Herp 蛋白がプレセニリンと結合していることを見いだした。以上の結果より、Herp は、プレセニリンに作用し、γ-セクレターゼ活性を上昇させるγ-セクレターゼ活性調節因子としての機能をもつことが考えられた。

A. 研究目的

老化に伴い、脳内に生じるアミロイド蛋白 (Aβ) がほぼ指数関数的に急激に増加していることが明らかになっている。本研究は、老化に伴いある年齢を境に脳内に生じる Aβの急激な増加に着目し、その増加機構を明らかにするため、本分担研究は、Aβ産生に関与する分子について同定し、その解析を行うことを目的とするものである。

Aβの N 末端と C 末端は、アミロイド蛋白前駆体 (APP) が、それぞれ、β-セクレターゼとγ-セクレターゼと呼ばれるプロテアーゼによって切断を受けて産生される。β-セクレターゼは、新規のアスパラギン酸プロテアーゼであること

が同定され、γ-セクレターゼについてはこれまでにない新しいタイプのプロテアーゼであることが明らかとなった。すなわち、γ-セクレターゼ活性は、家族性アルツハイマー病原因遺伝子産物であるプレセニリンを含む複数の因子による複合体が担っていることが明らかとなった。しかしながら、この複合体がプレセニリン以外にどのような分子よりなっているのか、その実体は明らかにされていない。

我々は、これらγ-セクレターゼ活性複合体の実体を明らかにするため、平成 11,12 年度に、γ-セクレターゼ活性を上げる因子の cDNA を同定するための独自のスクリーニング方法を確立した (特許出願済)。平成 13 年度は、この方法によ



り得られた cDNA のひとつがどのような蛋白をコードし、この蛋白が $\gamma$ -セクレターゼ活性複合体をになっているのか否かを明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

$\gamma$ -セクレターゼ活性を上げる cDNA の同定には、次の様な独自に開発したスクリーニング系を用いた。まず、A $\beta$ の N 末端から $\gamma$ -セクレターゼ切断部位を含む APP 領域 (C53) と Notch (Schroeter et al., Nature 393:382-386 1998) の C 端側転写因子領域との fusion gene を安定に遺伝子導入した細胞株を得る。また、この細胞は、Notch の転写活性により、ピューロマイシン耐性遺伝子がオンとなるように作製する。すなわち、細胞内で C53-Notch キメラ蛋白が $\gamma$ -セクレターゼによって切断を受け、Notch が遊離すると、細胞がピューロマイシン耐性になるという系を構築した。また、cDNA library をヒトの脳の mRNA より調製した。この細胞株に cDNA library をトランスフェクトし、ピューロマイシン耐性を与える cDNA をセレクションし、この cDNA が A $\beta$ 産生活性をもつかどうかを確認することにより、 $\gamma$ -セクレターゼ活性を促進する cDNA を単離した。その結果、得られた cDNA のひとつは、Herp をコードしていることが明らかとなった (C. 研究結果 参照)。Herp が A $\beta$ 産生に関与するか否かの確認実験は、Herp cDNA を HEK293 細胞に導入し、この細胞の産生する A $\beta$ 量が増加するか否かで解析した。また、Herp とプレセニリンとの結合性は、Herp に対する抗体、および、プレセニリンに対する抗体を用いて、免疫沈降実験により解析した。

## (倫理面への配慮)

本研究で行われる遺伝子工学的手法はすべて P1 あるいは P2 レベルの操作であり、実験操作は P1 および P2 施設で行った。

## C. 研究結果

我々のスクリーニングにより得られた cDNA のひとつが、小胞体ストレスによって誘導される Herp と命名された機能不明な既知の膜蛋白 (Kokame et al., J.Biol.Chem. 275, 32846-32853, 2000) をコードしていることが明らかとなった。次に、Herp cDNA を HEK293 細胞に導入し、この細胞の産生する A $\beta$ 量が増加するか否かを解析したところ、Herp cDNA を遺伝子導入することにより、細胞の産生する A $\beta$ 量が 1.8 倍に増加することが明らかとなった。さらに、Herp 蛋白が、家族性アルツハイマー病原因遺伝子産物プレセニリンと結合し、 $\gamma$ -セクレターゼ活性をあげることを見いだした (Sai et al., J. Biol. Chem. in press. 2002)。

## D. 考察

これらの結果から、Herp は、家族性アルツハイマー病原因遺伝子産物プレセニリンに作用し、 $\gamma$ -セクレターゼ活性を上昇させる $\gamma$ -セクレターゼ活性調節因子としての機能をもつことが考えられ、老化に伴う A $\beta$ 量の変動、老人斑の形成に、小胞体ストレスによる Herp 発現の誘導が関与している可能性が示唆された。

## E. 結論

本研究により、独自に開発したスクリーニング系を用いることにより、 $\gamma$ -セクレターゼ活性の調節因子のひとつが小胞体ストレスによって誘導

される Herp であることが明らかとなった。このことにより、老化に伴う A $\beta$ 量の変動や老人斑の形成に、小胞体ストレスによって誘導される Herp の関与が可能性として考えられた。今後は、さらに、老化に伴う Herp の発現の誘導を解析する必要がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kawamura Y, Kikuchi A, Takada R, Takada S, Sudoh S, Shibamoto S, Yanagisawa K and Komano H.

Inhibitory effect of a *presenilin 1* mutation on the Wnt signalling pathway by enhancement of  $\beta$ -catenin phosphorylation. *Eur J Biochem* 268:3036-3041,2001

Sai X, Kawamura Y, Kokam K, Yamaguchi H, Shiraiishi H, Suzuki R, Suzuki T, Kawaichi M, Miyata T, Kitamura T, De Strooper B, Yanagisawa K and Komano H.

Endoplasmic reticulum stress-inducible protein, Herp, enhances presenilin-mediated generation of amyloid  $\beta$ -protein. *J Biol Chem* (in press)

##### 2. 学会発表

駒野宏人、川村勇樹、蔡 暁蕊、川市正史、北村俊雄、柳澤勝彦  
ガンマーセクレターゼ活性調節因子 cDNA 同定のための新しいスクリーニング法  
第 44 回 日本神経化学・第 24 回日本神経科学合同大会 2001 年 9 月 26-28 日 京都

蔡暁蕊、川村勇樹、小亀浩市、宮田俊行、柳澤勝彦、駒野宏人  
 $\gamma$ -セクレターゼ活性を促進する因子  
第 44 回 日本神経化学・第 24 回日本神経科学合同大会 2001 年 9 月 26-28 日 京都

駒野宏人、川村勇樹、蔡 暁蕊、川市正史、北村俊雄、柳澤勝彦  
新しいスクリーニング系を用いたガンマーセクレターゼ活性調節因子の同定について  
第 74 回 日本生化学会 2001 年 10 月 28 日 京都

蔡暁蕊、川村勇樹、小亀浩市、宮田俊行、柳澤勝彦、駒野宏人  
 $\gamma$ -セクレターゼ活性におよぼす Herp の影響  
第 74 回 日本生化学会 2001 年 10 月 28 日 京都

駒野宏人  
 $\gamma$ -セクレターゼ活性を調節する因子について  
第 37 回 脳のシンポジウム 2002 年 3 月 15 日 長野

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

- 1) アルツハイマー病関連遺伝子のスクリーニング法 (出願済)
- 2) アルツハイマー病関連遺伝子、タンパク質およびそれらの用途 (出願済)

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

$\beta$ アミロイド分解に関与するネプリライシンの解析

分担研究者 西道隆臣 理化学研究所脳科学総合研究センター  
神経蛋白制御研究チーム チームリーダー

研究要旨

孤発性アルツハイマー病における $\beta$ アミロイド蓄積の原因として、分解システムの低下が考えられる。脳内の分解システムを解析したところ、ネプリライシンが律速を担っていることを見いだした。ネプリライシン遺伝子ノックアウトマウスでは、脳内の $\beta$ アミロイド量が増加していたことから、ネプリライシンが、実際に生体内で脳内の $\beta$ アミロイドの分解に関与していることが示された。また、免疫組織化学的解析により、ネプリライシンがインターニューロンに強く発現することが判明し、神経ペプチドによる発現あるいは活性の制御を受けている可能性が考えられる。

A. 研究目的

アルツハイマー病の大半を占める孤発性アルツハイマー病において、何故 $\beta$ アミロイドが蓄積するのか、今の時点では全く不明である。家族性アルツハイマー病と異なり、 $\beta$ アミロイド合成の上昇が普遍的な現象として認められないことから、老化に伴う $\beta$ アミロイドの分解システムの低下が脳内の $\beta$ アミロイドレベルを上昇させ、蓄積の原因となる可能性が考えられる。しかしながら、脳内における $\beta$ アミロイド分解システムの実体は未解明であった。そこで、本研究では、分解酵素を同定し、さらに、その作用部位や活性制御機構を解析することによって、脳内における  $A\beta$ 蓄積の予防、および、蓄積  $A\beta$ の除去を行う方法を目的とする。

B. 研究方法

ネプリライシンノックアウトマウスは、Craig Gerard (Harvard Medical School) より入手し、繁殖を行った。 $A\beta$ の定量は、サンドイッチ ELISA 法を使用した。ネプリライシンの免疫染色は、抗ネプリライシンモノクローナル抗体を用いて間接蛍光抗体法によっておこない、協商点レーザー顕微鏡で観察した。

（倫理面への配慮）

本研究で行われる遺伝子工学的手法はすべて P1 あるいは P2 レベルの操作であり、実験操作は P1 および P2 施設で行った。また、実験材料としてマウスを用いる場合は麻酔を用い、動物に苦痛を与えないよう配慮した。ラジオアイソトープの実験は、ラジオアイソトープ実験室で行った。

C. 研究結果

ラジオアイソトープで多重標識した 42mer の $\beta$

アミロイドペプチドをラット海馬に投与し、代謝過程を捕捉する実験系を確立し、ネプリライシンが主要な A $\beta$ 分解酵素であることを見いだした。さらに、直接的な証拠を得るため、ネプリライシン遺伝子のノックアウトマウスを用いて解析を行った。その結果、ネプリライシンノックアウトマウスでは、脳内の $\beta$ アミロイド量が増加していた。この結果は、ネプリライシンが、実際に生体内で脳内の $\beta$ アミロイドの分解に関与していることが示すものである (Iwata, et al., Science, 292, 1550-1552, 2001)。免疫組織化学的解析から、一部のネプリライシンは脂質ラフトに存在することが明らかとなった。このことから、ラフトは A $\beta$ 産生だけでなく分解も介して A $\beta$ 代謝にかかわると考えられる。

また、詳細な免疫組織化学的解析によりネプリライシンは、軸索付近およびプレシナプスに存在すること、および、インターニューロンに強く発現することを観測した。また一方で、ネプリライシンをプライマリカルチャーに強制発現することによって、細胞内外の A $\beta$ を除去することができることを示した。

#### D. 考察

以上の結果は、老化に伴う $\beta$ アミロイド量の増大は、ネプリライシンの発現レベルや、活性の低下によって引き起こされている可能性を示唆している。また、ネプリライシンの発現レベルや発現部位を制御することによって、脳内における A $\beta$ レベルを制御することができる可能性が考えられる。

#### E. 結論

ネプリライシン遺伝子ノックアウトマウスを

用いた解析から、ネプリライシンが、実際に生体内で脳内の A $\beta$ の分解に関与していることが示された。また、免疫組織化学的解析により、neprilysin がインターニューロンに強く発現することが判明し、neprilysin の発現あるいは活性は、神経ペプチドによる制御を受けている可能性が考えられた。

$\beta$ アミロイド分解システムは、老化に伴う $\beta$ アミロイド量の増加や、孤発性アルツハイマー病における $\beta$ アミロイド蓄積の機構において重要な役割を果たしている可能性が示唆される。

また、アルツハイマー病の予防や治療へと発展する可能性がある。孤発性アルツハイマー病は脳老化の終末像であると考えられることから、 $\beta$ アミロイド蓄積を制御することは脳老化の制御へと発展することが期待される。また、本研究は新たなアルツハイマー病動物モデル作成に応用させることも期待される。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Shirotani K, Tsubuki S, Iwata N, Takaki Y, Harigaya W, Maruyama K, Kiryu-Seo S, Kiyama H, Iwata H, Tomita T, Iwatsubo T and Saido TC.

Neprilysin degrades both amyloid  $\beta$  peptides 1-40 and 1-42 most rapidly and efficiently among thiorphan- and phosphoramidon-sensitive endopeptidases.

J Biol Chem 276: 21895-21901,2001

Choi W-S, Lee E-H, Chung C-W, Jung Y-K, Jin B K, Kim S U, Oh T H, Saido TC and Oh Y J. Cleavage of Bax is mediated by caspase-dependent or -independent calpain activation in dopaminergic neuronal cells: Protective role of Bcl-2. J Neurochem 77: 1531-1541,2001

Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Shirotani K, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Hama E, Lee H-J and Saido TC. Metabolic regulation of brain A $\beta$  by neprilysin. *Science* 292: 1550-1552,2001

Kaneko T, Yamashima T, Tohma Y, Nomura M, Imajoh-Ohmi S, Saido TC, Nakao M, Saya H, Yamamoto H and Yamashita J.

Calpain-dependent proteolysis of merlin occurs by oxidative stress in meningiomas: a novel hypothesis for tumorigenesis. *Cancer* 92: 2662-2672,2001

Hama E, Shirotani K, Masumoto H, Sekine-Aizawa, Y, Aizawa H and Saido TC.

Clearance of extracellular and cell-associated amyloid  $\beta$  peptide through viral expression of neprilysin in primary neurons. *J Biochem* 130:721-726,2001

Russo C, Schettini G, Saido TC, Gambetti P, Tabaton M and Teller JT.

N-Terminally truncated amyloid  $\beta$  peptides and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 22:345,2001

Kitazume S, Tachida Y, Oka R, Shirotani K, Saido TC and Hashimoto Y.

Alzheimer's  $\beta$ -secretase,  $\beta$ -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme, is responsible for cleavage secretion of a golgi-resident sialyltransferase. *Proc Natl Acad Science USA* 98: 13554-13559,2001

Kim JE, Han BS, Choi WS, Eom DS, Lee EH, Oh TH, Markelonis GJ, Saido TC, Lee GE, Chung IK and Oh YJ.

Temporospatial sequence of cellular events associated with etoposide-induced neuronal cell death: role of antiapoptotic protein Bcl-X<sub>L</sub>. *J Neurosci Res* 66: 1074-1082,2001

Fukami S, Watanabe K, Iwata N, Haraoka J, Lu B, Gerard NP, Gerard C, St. George-Hyslop P. and Saido TC.

A $\beta$ -degrading endopeptidase, neprilysin, in mouse brain: Synaptic and axonal localization inversely correlating with A $\beta$  pathology. *Neurosci Res* (in press)

## 2. 学会発表

Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Shirotani K, Lee H-J, Watanabe K, Sekiguchi M, Hosoki E, Lu B, Gerard NP, Gerard C and Saido TC.

The role of neprilysin in the metabolism of A $\beta$  in brain. Society for Neuroscience 31th annual meeting, Nov.10-17, 2001, San Diego, USA

Takaki Y, Tsubuki S, Iwata N, Shirotani K, Yano L, Okamoto T. Gerard NP, Lu B, Gerard C and Saido TC.

Association of A $\beta$ -metabolizing neutral endopeptidases with lipid raft in the brain. Society for Neuroscience 31th annual meeting, Nov.10-17, 2001, San Diego, USA

Tomioka M, Lee H-J, Fujii K, Tsubuki S, Watanabe K, Iwata N and Saido TC.

Transgenic generation of N-truncated A $\beta$  bearing pyroglutamate induces calpain activation in the brain. Society for Neuroscience 31th annual meeting, Nov.10-17, 2001, San Diego, USA

## H. 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

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

アミロイドβ蛋白前駆体結合蛋白の解析に関する研究

分担研究者 鈴木利治 北海道大学大学院薬学研究科 教授

#### 研究要旨

アルツハイマー病の原因因子とされるβ-アミロイド(Aβ)は、アミロイド前駆体タンパク質 (APP) から細胞内の代謝過程で生成される。APP の代謝は、APP の細胞質ドメインとそこに結合するタンパク質によって制御されているが、その詳細な分子機構は未解明な点が多い。従って、APP と結合タンパク質の相互作用機構を解析することで Aβ生成の分子機構が解明でき、老化に伴う Aβ生成の質的・量的変化と神経変性の関係の解明が期待される。

#### A. 研究目的

老化に伴うアミロイドタンパク質代謝変化の機構を解析するために、アミロイド前駆体タンパク質 APP の細胞質ドメインと相互作用を行うタンパク質のうち Fe65 によるβ-アミロイド(Aβ)産生制御の分子機構の解明を行う。

#### B. 研究方法

APP 細胞質ドメインに結合し、Aβ 生成を制御する神経特異タンパク質に Fe65 が報告されている。APP と Fe65 の結合・解離の機構を細胞を用いて解析する。既に単離してあるヒト APP および Fe65 の cDNA を用いる。

(倫理面への配慮)

本研究で行われる遺伝子工学的手法はすべて P1 あるいは P2 レベルの操作であり、実験操作は P1 および P2 施設で行った。

#### C. 研究結果

Fe65 は APP の細胞質ドメインに結合するが、結合サイトより 14 アミノ酸アミノ末端側の Thr668 がリン酸化されると、Fe65 は APP から解離した。その結果、Fe65 による Aβ 生成の抑制効果も解除された。Thr668 のリン酸化は神経細胞に特異的に検出でき、リン酸化により APP 細胞質ドメインの構造変換が引き起こされる事を証明した。APP の同じ領域に結合する X11L はリン酸化による結合制御は受けなかった (Ando et al., J. Biol. Chem. 276, 40353-40361. 2001)。

#### D. 考察

これまで、Fe65 や X11L は APP との直接相互作用を介して Aβの生成を制御していることが示されていたが、その制御機構は不明であった。本研究により APP のリン酸化を介した Aβ生成制御機構が存在する可能性が示唆された。APP のリン酸化は老化に伴って変化する可能性があり、老化に伴うリン酸化制御機構の変化が、APP と

Fe65 等の結合タンパク質との相互作用に影響を与え、A $\beta$ 生成量の増加をもたらしている事が考えられる。

#### E. 結論

(1) APP 細胞質ドメインと結合する蛋白質 Fe65 は、APP のリン酸化により結合が制御されている。(2) APP リン酸化による Fe65 の解離は、A $\beta$ の産生を増加させる。(3) APP のリン酸化は APP 細胞質ドメイン全体の構造変換を引き起こす。

#### F. 健康危険情報

APP は cdk5 キナーゼおよびストレスキナーゼ (JNK) によってリン酸化を受けると考えられている。リン酸化の増加は A $\beta$ の産生増加を引き起こすので、ストレスを避ける事が大切と考えられる。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Nakaya T, Kawahara S, Watanabe S, Lee D-S, Suzuki T and Kirino Y.  
Identification and expression of a novel gene in odour-taste associative learning in the terrestrial slug. *Genes Cells* 6: 43-56,2001

Satoh Y, Hirakura Y, Shibayama S, Hirashima, N, Suzuki T and Kirino Y.  
 $\beta$ -amyloid peptides inhibit acetylcholine release from cholinergic presynaptic nerve endings isolated from an electric ray. *Neurosci Lett* 302:97-100,2001

Ando K, Iijima K, Elliott JI, Kirino Y and Suzuki T. Phosphorylation-dependent regulation of the interaction of amyloid precursor protein with Fe65 affects the production of  $\beta$ -amyloid. *J Biol Chem* 276:40353-40361,2001

Sai X, Kawamura Y, Kokame K, Yamaguchi H, Shiraishi H, Suzuki R, Suzuki T, Kawaichi M, Miyata T, Kitamura T, De Strooper B,

Yanagisawa K and Komano H.  
Endoplasmic reticulum stress-inducible protein, Herp, enhances presenilin-mediated generation of amyloid  $\beta$ -protein. *J Biol Chem* (in press)

Hase M, Yagi Y, Taru H, Tomita S, Sumioka A, Hori K, Miyamoto K, Sasamura T, Nakamura M, Matsuno K and Suzuki T.  
Expression and characterization of the *Drosophila* X11-like/Mint protein during neural development. *J Neurochem* (in press)

中矢正、鈴木利治、新井平伊  
アミロイド蛋白とアルツハイマー病  
分子精神医学 1(3):242-250,2001

中矢正、浅海真、鈴木利治  
長期記憶形成と遺伝子発現  
*Bio industry* 18(7):24-31,2001

多留偉功、馳桃子、鈴木利治  
Rel ホモロジドドメイン  
*生体の科学* 52(5):386-387,2001

富田進、鈴木利治  
PDZ ドメイン  
*生体の科学* 52(5):496-497,2001

##### 2. 学会発表

鈴木利治  
アミロイド前駆体タンパク質 APP のリン酸化—APP の機能および代謝、 $\beta$ -アミロイド生成における役割— 第 38 回日本生化学会北海道支部例会特別講演 2001 年 7 月 17 日 札幌

安藤香奈絵、飯島浩一、鈴木利治  
APP リン酸化による APP-Fe65 相互作用と $\beta$ -アミロイド生成の制御機構 第 74 回日本生化学会大会 2001 年 10 月 25-28 日 京都

荒木陽一、富田進、鈴木利治  
X11-like と結合する新規膜蛋白質の構造と機能解析 第 74 回日本生化学会大会 2001 年 10 月 25-28 日 京都

住岡暁夫、李東錫、富田進、鈴木利治  
X11L 結合タンパク質 XB51 の Alternative splicing による結合の制御 第 24 回日本分子生物学会年会 2001 年 12 月 9-12 日 横浜

Ando K, Iijima K, Kirino Y and Suzuki T.  
Phosphorylation-dependent regulation on the interaction of amyloid precursor protein with Fe65 and the production of beta amyloid. 第 24 回日本分子生物学会年会 2001 年 12 月 9-12 日 横浜

多留偉功、飯島浩一、馳桃子、八木克将、桐野豊、鈴木利治

アミロイド前駆体タンパク質の細胞質ドメイン結合分子による代謝調節 第24回日本分子生物学会年会 2001年12月9-12日 横浜

荒木陽一、富田進、鈴木利治

X11-like を介した Golgi 体非依存的な APP 輸送経路の解析 第24回日本分子生物学会年会 2001年12月9-12日 横浜

Iijima K, Asaumi M, Ando K, Kirino Y and Suzuki T. hARD1, human homologue of ARD1 N-terminal acetyltransferase, binds to Alzheimer's Amyloid Precursor Protein and reduces A $\beta$ 40 secretion.

第24回日本分子生物学会年会 2001年12月9-12日 横浜

佐野良威、武田志津、高島愛子、富田進、石龍徳、糸原重美、鈴木利治

マウス脳における X11-like タンパク質の発現解析 第24回日本分子生物学会年会 2001年12月9-12日 横浜

#### H. 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



## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 書籍

著者氏名	論文タイトル	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Sai X, Kawamura Y, Kokam K, Yamaguchi H, Shiraishi H, Suzuki R, Suzuki T, Kawaichi M, Miyata T, Kitamura T, De Strooper B, Yanagisawa K, Komano H.	Endoplasmic reticulum stress-inducible protein, Herp, enhances presenilin-mediated generation of amyloid $\beta$ -protein.	J Biol Chem	(in press)		
Kawamura Y, Kikuchi A, Takada R, Takada S, Sudoh S, Shibamoto S, Yanagisawa K, Komano H.	Inhibitory effect of a presenilin 1 mutation on the Wnt signalling pathway by enhancement of $\beta$ -catenin phosphorylation.	Eur J Biochem	268	3036-3041	2001
Fukami S, Watanabe K, Iwata N, Haraoka J, Lu B, Gerard NP, Gerard C, St. George-Hyslop P, Saido TC.	$A\beta$ -degrading endopeptidase, neprilysin, in mouse brain: Synaptic and axonal localization inversely correlating with $A\beta$ pathology.	Neurosci Res	(in press)		
Shirotani K, Tsubuki S, Iwata N, Takaki Y, Harigaya W, Maruyama K, Kiryu-Seo S, Kiyama H, Iwata H, Tomita T, Iwatsubo T, Saido TC.	Neprilysin degrades both amyloid $\beta$ peptides 1-40 and 1-42 most rapidly and efficiently among thiorphan- and phosphoramidon-sensitive endopeptidases	J Biol Chem	276	21895-21901	2001
Choi W-S, Lee E-H, Chung C-W, Jung Y-K, Jin BK, Kim SU, Oh TH, Saido TC, Oh YJ.	Cleavage of Bax is mediated by caspase-dependent or -independent calpain activation in dopaminergic neuronal cells: Protective role of Bcl-2.	J Neurochem	77	1531-1541	2001
Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Shirotani K, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Hama E, Lee H-J, Saido TC.	Metabolic regulation of brain $A\beta$ by neprilysin	Science	292	1550-1552	2001
Kaneko T, Yamashima T, Tohma Y, Nomura M, Imajoh-Ohmi S, Saido TC, Nakao M, Saya H, Yamamoto H, Yamashita J.	Calpain-dependent proteolysis of merlin occurs by oxidative stress in meningiomas: a novel hypothesis of tumorigenesis.	Cancer	92	2662-2672	2001
Hama E, Shirotani K, Masumoto H, Sekine-Aizawa Y,	Clearance of extracellular and cell-associated amyloid $\beta$ peptide through viral expression of neprilysin in primary	J Biochem	130	721-726	2001

Aizawa H, <u>Saïdo TC</u> .	neurons.				
Russo C, Schettini G, <u>Saïdo TC</u> , Gambetti P, Tabaton M, Teller JT.	N-Terminally truncated amyloid $\beta$ peptides and Alzheimer's disease.	Neurobiol Aging	22	345	2001
Kitazume S, Tachida Y, Oka R, Shirohani K, <u>Saïdo TC</u> , Hashimoto Y.	Alzheimer's $\beta$ -secretase, $\beta$ -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme, is responsible for cleavage secretion of a golgi-resident sialyltransferase.	Proc Natl Acad Science USA	98	13554-13559	2001
Kim JE, Han BS, Choi WS, Eom DS, Lee EH, Oh TH, Markelonis GJ, <u>Saïdo TC</u> , Lee GE, Chung IK, Oh YJ.	Temporospatial sequence of cellular events associated with etoposide-induced neuronal cell death: role of antiapoptotic protein Bcl-X <sub>L</sub> .	J Neurosci Res	66	1074-1082	2001
Hase M, Yagi Y, Taru H, Tomita S, Sumioka A, Hori K., Nakamura M, Matsuno K, <u>Suzuki T</u> .	Expression and characterization of the Drosophila X11-like/Mint protein during neural development.	J Neurochem	(in press)		
Nakaya T, Kawahara S, Watanabe S, LeeD-S, <u>Suzuki T</u> , Kirino Y.	Identification and expression of a novel gene in odour-taste associative learning in the terrestrial slug.	Genes Cells	6	43-56	2001
Satoh Y, Hirakura Y, Shibayama S, Hirashima N, <u>Suzuki T</u> , Kirino Y.	$\beta$ -amyloid peptides inhibit acetylcholine release from cholinergic presynaptic nerve endings isolated from an electric ray.	Neurosci Lett	302	97-100	2001
Ando K, Iijima K, Elliott JL, Kirino Y, <u>Suzuki T</u> .	Phosphorylation-dependent regulation of the interaction of amyloid precursor protein with Fe65 affects the production of $\beta$ -amyloid.	J Biol Chem	276	40353-40361	2001
中矢正、 <u>鈴木利治</u> 、新井平伊	アミロイド蛋白とアルツハイマー病	分子精神医学	1	242-250	2001
中矢正、浅海真、 <u>鈴木利治</u>	長期記憶形成と遺伝子発現	Bio industry	18	24-31	2001
多留偉功、馳桃子、 <u>鈴木利治</u>	Rel ホモロジドメイン	生体の科学	52	386-387	2001
富田進、 <u>鈴木利治</u>	PDZ ドメイン	生体の科学	52	496-497	2001

## 研究成果の刊行物・別刷

20010222

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。