

アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析

所 属 信州大学医学部 人体構造学
主任研究者 中山 耕造

研究要旨 APPの細胞内ドメイン(APPIC)は、神経細胞に選択的に細胞内毒性を持つことを示した。またγ-セクレターゼによって切り出されたAPPICは核に存在し、アポトーシスを調節する転写因子E2F1に結合することを示した。従って、APPICがADに関係している可能性が考えられる。

分担研究者

- (1) エーザイ株式会社 シーズ研究所 佐藤 俊孝
- (2) 独立行政法人国立病院機構 久里浜アルコール症センター 樋口進

A. 研究目的

多くの神経疾患、特にアルツハイマー病は加齢に従って発症し、現在のところ有効な治療法もない。従って高齢化社会において、有効な治療法の開発は急務であり、新しい創薬のターゲットを見いだすためにも、新しい観点からの病因の解明に期待が寄せられている。

NotchとDeltaは共に膜蛋白質で、神経細胞の分化において重要な役割をおこなっており、アルツハイマー病(AD)やCADASIL等の疾患との関連で注目されている。現在までは、Deltaは単なるNotchのリガンドであり、その細胞内ドメインに機能はないと考えられていた。しかしながら、我々はDeltaの細胞内ドメインに結合する蛋白質を同定し、Notch同様にDeltaの細胞内ドメインも、γ-セクレターゼによって切り出され、核に移行して転写因子Smadに結合して転写を調節することを示している。近年になって、多くのI型膜蛋白質がγ-セクレターゼによって切断され、細胞内ドメインが膜から切り出されることが知られてきている。従って、ある種のレセプター膜蛋白質ではDelta同様に、シグナルを受け取ると最終的にγ-セクレターゼによって細胞内ドメインが切り出され、それが核に移行し、転写因子に結合して転写を調節することはある程度一般化されるのではないかと考え、γ-セクレターゼによって調節されるシグナル伝達機構が広く存在する可能性を提唱している。

これらのことから、我々は現在のところ生理的機能があまり解析されていないAmyloid Precursor Protein (APP)もγ-セクレターゼによって細胞内ドメインが切り出されることに注目して、NotchやDeltaと同様に、切り出された細胞内ドメインが核に移行して特定の遺伝子の転写を調節しており、それがADに関係しているのではないかと考えて研究

している。

これらの結果を基に、本研究の直接的な目的は、APPの細胞内ドメインの機能解析にあり、具体的には以下の4点に焦点を絞って研究を進めている。

- (1) APPの細胞内ドメイン結合蛋白質の解析
- (2) APPの細胞内ドメインと結合する転写因子の同定
- (3) APPの細胞内ドメインの生理的機能の解析
- (4) アルツハイマー病における、APPの細胞内ドメインの病態への関与の可能性の検討

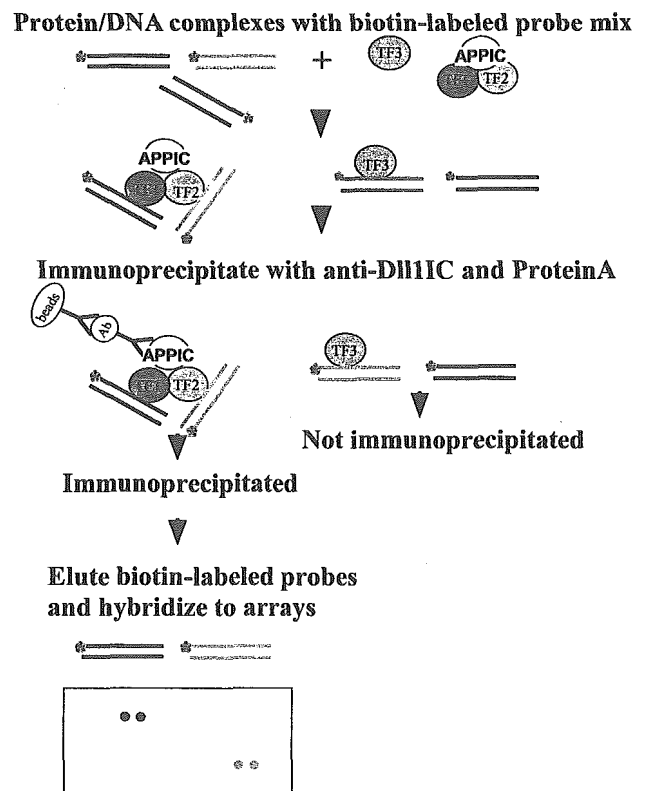


図1 APPIC結合転写因子のスクリーニング

B. 研究方法

APP の細胞内ドメインを発現する embryonic carcinoma 細胞 (P19 細胞) の作製と神経細胞への分化誘導

APP の細胞内ドメイン (APPIC) をコードする cDNA と FLAG 遺伝子を連結した発現ベクターを用いて P19 細胞に導入し、4 週間 G418 で選択して G418 耐性の複数のクローンを得た。その後、APP の C 末端の 20 アミノ酸に対する合成ペプチドでウサギに免疫して得られた抗体を用いてウエスタンブロッティングをおこない、発現の強いクローンを選択した。なお、コントロールとして、発現ベクターのみを導入した P19 細胞も同様に作製した。また、全長の APP を発現する P19 細胞も作製した。

P19 細胞の神経細胞への分化誘導は、レチノイン酸存在下で 4 日間バクテリア用のプレートを用いて浮遊培養した後に、レチノイン酸を除いて通常の細胞培養用のプレートに撒き直して培養することでおこなった。この方法で、90%以上の P19 細胞が、神経細胞へと分化した。

なお、現在のところ死細胞は、トリパンブルーによる染色で判定している。

APP の細胞内ドメイン結合蛋白質の同定

前述した、FLAG タグを導入した APPIC を発現させた P19 細胞から細胞質と核フラクションを調製した。APPIC 結合蛋白質は、Anti-FLAG M2 Agarose (Sigma) を用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製した。SDS 電気泳動後、ゲルを 2 mm 間隔で切り出し、その後、ゲル中のタンパク質の還元アルキル化を行った。トリプシン消化後、ペプチドをゲルから回収し、LC/MS によるタンパク質の同定をおこなった。なお、LC/MS によるタンパク質の同定は、LTQ (サーモエレクトロン) を用い、解析用ソフトウェア Mascot を用いて行った。

APP の細胞内ドメインと結合する転写因子のスクリーニング (図 1)

仮に、細胞内ドメインに結合する転写因子があったとしても、存在する量が少ないため前述の方法では同定できない可能性がある。従って、結合転写因子を同定するために、まったく新しい方法を用いた。具体的には各週齢及び胎児のマウスの脳から核蛋白質を抽出し、既知の 154 種類の転写因子の DNA 結合配列を合成して加え、APP の細胞内ドメインに対する抗体を用いて免疫沈降した。転写因子には合成 DNA が結合しており、もし転写因子が細胞内ドメインに結合すれば、細胞内ドメイン/転写因子/合成 DNA の三者の複合体が免疫沈降されるはずである。この沈降した複合体から DNA を回収しドットプロットを用いて、どの転写因子の結合配列が共沈降したかにより、結合する転写因子を推定した。

また、これらの転写因子の結合配列を持つプロモ

ーターをルシフェラーゼ遺伝子に連結し、細胞に導入する。この細胞に APP の細胞内ドメインをコードする cDNA を導入して発現させ、ルシフェラーゼ活性を指標に細胞内ドメインの転写活性に対する影響を調べた。

その他の実験方法は、通常の方法でおこなった。

(倫理面への配慮)

ヒトの試料を用いる研究は、厚生省の臨床研究の倫理指針に従って、国立療養所久里浜病院・臨床研究部で限局しておこなった。

具体的には、ヒト試料に関しては、剖検時において本研究の必要性等を家族に十分説明し、完全に同意を得られた場合のみ用いた。今後の遺伝子の解析に関しても、本人および家族に十分説明し、完全に同意を得られた場合のみおこなう予定である。また、個人のプライバシーを守るため、実験結果から個人が特定できないよう、十分に配慮した。

C. 研究結果

APP の細胞内ドメイン (APPIC) は、神経細胞に選択的な細胞内毒性を持つ

前述した仮説が正しいならば、APPIC は細胞内毒性を持つことになる。この点を調べるため、APPIC 及び全長の APP を発現する embryonic carcinoma 細胞 (P19 細胞) をレチノイン酸処理し、その後レチノイン酸を除くことにより神経細胞へと分化誘導した。その結果、発現ベクターのみを持つコントロール細胞同様に、90%以上の細胞が神経細胞へと分化した。全ての細胞において、分化誘導後 2 日目には突起を伸ばした神経細胞が認められた (図 2)。

培養を続けると、コントロール細胞では細胞が増殖しながら神経細胞へと分化し続け、多数の神経細胞が出現した。しかしながら、APPIC 及び全長の APP を発現する P19 細胞の場合、培養を続けると明らかに死んでいる細胞が多数出現し (図 2)、1 週間後には、全ての神経細胞が死滅した。

細胞がどのように死んでいるのかを調べるために、分化誘導後 3 日目、4 日目、5 日目に細胞を回収し、トリパンブルーで染色して死細胞数を数えた (図 3)。その結果、コントロール細胞はこの期間を通して 10%以下の細胞しか死んでいなかった。しかしながら、APPIC 及び全長の APP を発現する P19 細胞の場合、3 日目には少数の死細胞しかなくにもかかわらず、その後、明らかに死細胞が増えていた。細胞死を起こす割合は、APPIC を発現する細胞の方が全長の APP を発現する P19 細胞よりも倍程度多かった。従って、APPIC は、神経細胞に選択的な細胞内毒性を持つと考えられた。

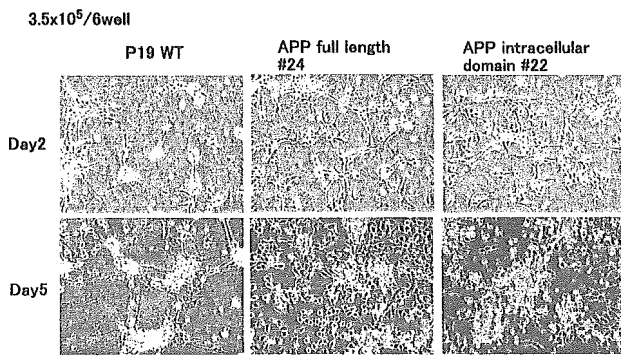


図2、全長のAPP (APP full length#24) と APPIC (APP intracellular domain#22) を発現した P19 細胞。神経細胞への分化誘導後、2 日目 (Day2) 及び5 日目 (Day5) を示す。分化誘導5 日目に、細胞死が起こっていることがわかる。P19WT は発現ベクターのみを導入したコントロール細胞で、5 日目でも明確な細胞死は認められない。

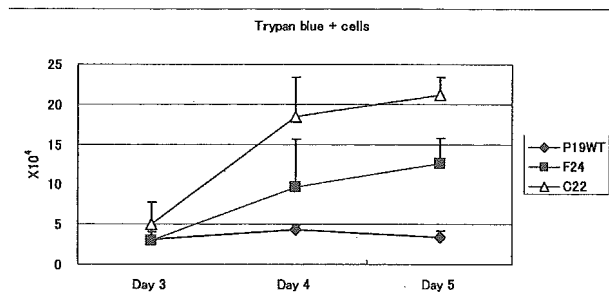


図3、全長のAPP (F24) と APPIC (C22) を発現した P19 細胞を神経誘導後の死細胞数。分化誘導後、3 日目 (Day3)、4 日目 (Day4)、5 日目 (Day5) にトリパンブルー染色により、死細胞数を数えた。P19WT は発現ベクターのみを導入したコントロール細胞。

APPIC は、核に存在する

前述したように、我々は APP も Notch や Delta 同様に、 γ -セクレターゼによって細胞内ドメインが切り出され、切り出された細胞内ドメイン (APPIC) が核に移行して特定の遺伝子の転写を調節しているのではないかと考えている。もしこの仮説が正しければ、APPIC は核に存在するはずである。

この点を明らかにするために、APP の C 末端の 20 アミノ酸に対する合成ペプチドでウサギに免疫して得られた抗 APPIC 抗体を用いて、8 週齢の正常雄マウス大脳皮質の免疫染色をおこなった。全てではないが 2 割程度の神経細胞の核が、この抗体で染色される事が明らかとなった (図4)。多くの細胞は細胞膜のみが染色されており、核は全く染色されていない。しかしながら、図中に矢印で示したように 2 割程度の細胞は、細胞膜だけでなく、核も強く染色

されている。この結果は、全ての細胞ではないが、2 割程度の正常大脳皮質細胞の核に APPIC が存在していることを強く示唆している。

核に APPIC が存在するかどうかという問題は、本プロジェクトに関して極めて重要であり、現在、より強力な証拠を得るために、細胞分画をおこなって、核フラクションに APPIC が存在することを生化学的に示そうとしている。

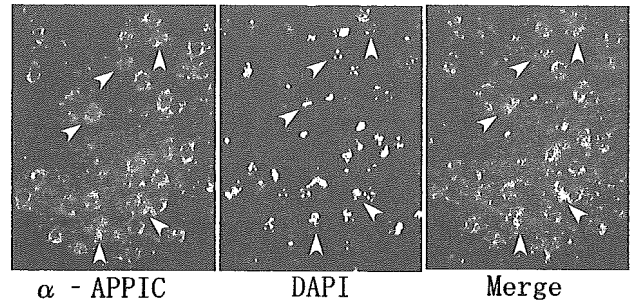


図4。抗 APP 細胞内ドメイン抗体を用いた、8 週齢マウスの大脳皮質の免疫染色像。

全てではないが、矢印で示したように、2 割程度の正常大脳皮質の細胞は、細胞質だけでなく核も抗体で染色される。

α -APPIC: 抗 APP 細胞内ドメイン抗体、DAPI: DAPI による核染色。

APP の細胞内ドメイン結合蛋白質の同定

我々の仮説が正しければ、APPIC はシグナル伝達に関係した何らかの分子と結合するはずである。この考えに基づいて、前述したように、FLAG タグを導入した APPIC を発現させた P19 細胞から細胞質と核フラクションを調製し、FLAG タグに対するアフィニティークロマトグラフィーで精製後、LC/MS によって APPIC 結合蛋白質の同定をおこなっている。現在、ようやくデータが出始めたところであるが、今までに同定された蛋白質の内の一つが Ran であった。後で詳しく考察するが、Ran は細胞質から核への分子の輸送に関係しており、APPIC が核に存在するという結果と関連する。また、我々は、Delta の細胞内ドメインは、 γ -セクレターゼによって膜から切り出された後に、Ran の系によって核に輸送されるという興味深い結果を得ており、一般的なメカニズムの可能性が考えられる。

APP の細胞内ドメインに結合する、転写因子の同定

転写因子は一般的に量が少なく、前述した蛋白質化学的方法では検出できない可能性が高い。この点を克服するために、研究方法で詳しく述べたように新規の方法を開発した (図1)。その結果、E2F1 が APPIC 結合転写因子として同定された。このスクリーニング方法を用いた場合、成体マウスの脳の核蛋白では E2F1 は強いシグナルを生じるが、胎児の脳の核蛋白では全くシグナルを示さない。この結果

は、E2F1 と APPIC が成体脳の核内で、複合物を形成して存在することを強く示唆している。E2F1 と APPIC の結合を確認するために、E2F1 と APPIC の発現ベクターを Cos7 細胞に導入して、免疫沈降をおこなった。図 5 に示すように、発現ベクターのみを導入したコントロール及び、E2F1 もしくは APPIC の発現ベクターのみを導入した Cos7 の場合、シグナルは検出できない。しかしながら、E2F1 と APPIC の両方の発現ベクターを導入した場合、強いシグナルが検出できた。この結果は、E2F1 と APPIC が結合することを明らかに示している。現在、リコンビナントの APPIC 蛋白質を作製し、E2F1 のゲルシフトアッセイに加えて、E2F1 の DNA への結合に影響を及ぼさないかを検討している。

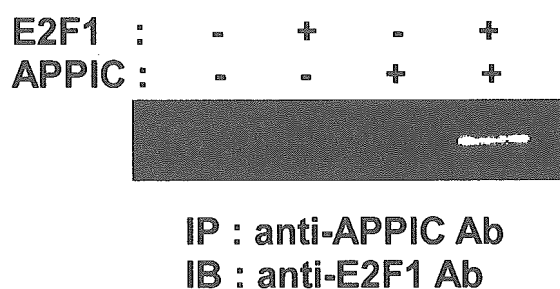


図 5、APP の細胞内ドメイン (APPIC) と E2F1 との結合

E2F1, APPIC, E2F1 と APPIC を強制発現させた Cos-7 の細胞溶解液を抗 APPIC 抗体を用いて免疫沈降した後、抗 E2F1 抗体を用いてウェスタンブローディングを行った。その結果、E2F1 と APPIC を強制発現させたもののみ、E2F1 の共沈が見られた。

IP : 免疫沈降、 IB : イムノブローディング

D. 考察

我々は Notch や Delta の解析結果から、 γ -セクレターゼによって、I 型膜蛋白質の細胞内ドメインが切り出され、切り出された細胞内ドメインが核に移行して特定の転写因子に結合し、遺伝子の転写を調節するという新しいシグナル伝達様式を提唱している。また近年知られてきたように、APP や Notch、Delta のみならず多くの I 型膜蛋白質が γ -セクレターゼによって切断されることから、このシグナル伝達様式は広く使われているのではないかと考えている。

生理的機能があまり解析されていない Amyloid Precursor Protein (APP) も同様のシグナル伝達の様式をとるといふ仮説のもと、これがアルツハイマー病 (AD) に関係している可能性を考えて研究している。

我々の γ -セクレターゼによって調節されるシグナル伝達の仮説が正しくて、かつ AD に関係している

のならば、APP の細胞内ドメイン (APPIC) は、細胞内毒性を持つはずである。APPIC 及び全長の APP を強制発現する embryonic carcinoma 細胞 (P19 細胞) を作製し、神経細胞へと分化誘導した。その結果、発現ベクターのみを持つコントロール細胞同様に、90%以上の細胞が神経細胞へと分化した。全ての細胞において、分化誘導後 2 日目には突起を伸ばした神経細胞が認められた。その後、培養を続けると、コントロール細胞では細胞が増殖しながら神経細胞へと分化し続け、多数の神経細胞が出現した。しかしながら、APPIC 及び全長の APP を発現する P19 細胞の場合、培養を続けると明らかに死んでいる細胞が多数出現し、1 週間後には、全ての神経細胞が死滅した (図 2、3)。

これらの結果から、大量に発現した APP には神経細胞に選択的な毒性があり、その毒性は細胞内ドメインにあると考えることができる。この APPIC による神経細胞死が AD における細胞死のモデルとなり得るかどうかは重要な問題であり、早急に研究を進めたいと考えている。

我々の仮説が正しければ、APPIC は核に存在するはずである。実際、APP の C 末端に対する抗体で、核が染色されるという報告もある。我々は、APP の C 末端の 20 アミノ酸に対する抗体を用いて、正常マウス大脳皮質の免疫染色をおこなった。その結果、2 割程度の神経細胞の核が、染色される事が明らかとなった (図 4)。

この結果は、2 割程度の正常大脳皮質細胞の核に APPIC が存在していることを強く示唆している。また、APPIC が γ -セクレターゼによって切り出され、核に移行して転写を調節するという本プロジェクトの仮説を強く支持することになる。

全ての細胞ではなく、2 割程度の神経細胞の核に APPIC が存在することは、シグナルを受け取った細胞の核のみに APPIC が存在していることを示しているのではないかと考えている。核に APPIC が存在するかどうかという問題は、本プロジェクトに関して極めて重要であり、現在、より強力な証拠を得るために、細胞分画をおこなって、核フラクションに APPIC が存在することを生化学的に示そうとしている。

APPIC を強制発現させた P19 細胞から、APPIC に選択的に結合する蛋白質を精製し、LC/MS によって同定をおこなっている。現在ようやく結果が出始めたところであるが、既に、Ran が APPIC 結合蛋白質として同定されている。

Ran は特定の蛋白質を結合して、細胞質から核へ蛋白質を輸送するシャトルとして知られている。我々は、Delta の細胞内ドメインが γ -セクレターゼによって切り出された後、Ran の系によって核に輸送されることを示している。APPIC に関しては、現在のところそれ以上の結果を持っていないが、Ran が結合するということは、Delta 同様に γ -セクレターゼによって切り出された APPIC が Ran によって核

に運ばれる可能性を示唆している。前述したように、免疫組織化学の結果によると、実際、核に APPIC が存在していると考えられる。

APPIC が核に存在することは、Delta 同様に、核内で転写因子に結合し転写を調節している可能性を示唆している。この点を明らかにするために我々が開発した新しい方法 (図 1) でスクリーニングをおこない、APPIC に結合する転写因子として E2F1 を同定した。また、免疫沈降によって、E2F1 と APPIC の結合を確認している (図 5)。

E2F1 は、アポトーシスや細胞周期を調節する転写因子である。多くの神経細胞において、E2F1 を強制発現すると細胞死がおこることが知られている。従って、APPIC が結合することにより E2F1 の活性に何らかの変化がおき、その結果として神経細胞死を引き起こす可能性が考えられ、AD との関係が興味深い。

今後、前述した APPIC を強制発現させた P19 細胞をモデルに用いて、siRNA により E2F1 の発現を阻害して、神経細胞への分化誘導に伴って起こる細胞死が、転写因子 E2F1 に依存するかどうかを明らかにする予定である。また、細胞内毒性が E2F1 に依存するとなれば、どのようなメカニズムなのかを調べる予定である。さらに、実際の AD で E2F1 がどのような働きをしているかを調べる予定である。

E. 結論

APPIC 及び全長の APP を強制発現する P19 細胞を作製し、神経細胞へと分化誘導したところ、細胞死がおこった。従って、APPIC は神経細胞に選択的な細胞毒性を持つと考えられた。

神経細胞の核に、APPIC が存在することを示した。また APPIC 結合蛋白質として、細胞質から核へ蛋白質を輸送するシャトルとして知られている Ran を同定した。従って、 γ -セクレターゼによって切り出された APPIC が Ran によって核に輸送される可能性が考えられる。

APPIC に結合する転写因子として、E2F1 を同定した。E2F1 は細胞周期及び、細胞死を調節していることが知られており、APPIC が結合することにより何らかの変化がおき、細胞死を引き起こす可能性が考えられる。

F. 研究発表

1. 論文

1. Matsushita S, Arai H, Matsui T, Yuzuriha T, Urakami K, Masaki T, Higuchi S: Brain-derived neurotrophic factor gene polymorphisms and Alzheimer's disease. *J Neural Transms*, in press.

2. Nakamura Y, Ohmori T, Ishikawa A, Kobayashi Y, Imazeki H, Higuchi S, Maruyama K: Homozygous (TG)11 allele in intron 8 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene has a protective role against bicarbonate decrease in pure pancreatic juice among Japanese male alcoholics. *Intern Med*, in press.

3. Mochizuki H, Masaki T, Matsushita S, Ugawa Y, Kamakura K, Arai H, Motoyoshi K, Higuchi S: Cognitive impairment and diffuse white matter atrophy in alcoholics. *Clin Neurophys* 116(1): 223-228, 2005.

4. Nakayama K, Nagase K, Tokutake Y., Koh C., Hiratochi M., Ohkawara T., Nakayama N., Multiple POU-binding motifs, recognized by tissue-specific nuclear factors, are important for Dll1 gene expression in developing neural stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 325, 991-996, 2004

5. Shiozawa T., Miyamoto T., Kashima H., Nakayama K., Nikaido T., Konishi I., Estrogen-induced proliferation of normal endometrial glandular cells is initiated by transcriptional activation of cyclin D1 via binding of c-Jun to an AP-1 sequence. *Oncogene*, 23, 8603-8610, 2004

6. Nakagawa A., Satake H., Nakabayashi M., Nishizawa M., Furuya K., Nakano S., Kigoshi T., Nakayama K. and Uchida K. Receptor gene expression of glucagons-like peptide-1, but not glucose-dependent insulinotropic polypeptide, in rat nodose ganglion cells. *Autonomic Neuroscience*, 110, 36-43, 2004

7. Miyatake R, Furukawa A, Matsushita S, Higuchi S, Suwaki H: Functional polymorphisms in the $\sigma 1$ receptor gene associated with alcoholism. *Biol Psychiatry* 55: 85-90, 2004.

8. Miyasaka K, Yoshida Y, Matsushita S, Higuchi S, Maruyama K, Niino N, Ando F, Shimokata H, Ohta S, Funakoshi A: Association of cholecystokinin-A receptor gene polymorphism with alcohol dependence in a Japanese population. *Alcohol Alcohol* 39: 25-28, 2004.

9. Nakamura Y, Yokoyama H, Higuchi S, Hara S, Kato S, Ishii H: Acetaldehyde accumulation suppresses Kupffer cell release of TNF- α and modifies acute hepatitis in rats. *J Gastroenterol* 39: 140-147, 2004.

10. Maruyama K, Higuchi S: The Japanese

Society of Alcohol-Related Problems.
Addiction 99: 419-424, 2004.

G. 知的財産権の出願・登録

なし

11. Miyasaka K, Yoshida Y, Matsushita S, Higuchi S, Shirakawa O, Shimokata H, Funakoshi A: Association of cholecystokinin-A receptor gene polymorphisms and panic disorder in Japanese. *Am J Med Genet* 127B: 78-80, 2004.

12. Koizumi H, Hashimoto K, Itoh K, Nakazato M, Shimizu E, Ohgake S, Koike K, Okamura N, Matsushita S, Suzuki K, Murayama M, Higuchi S, and Iyo M: Association between the brain-derived neurotrophic factor 196G/A polymorphism and eating disorders. *Am J Med Genet* 127B: 125-127, 2004.

13. Adachi J, Matsushita S, Yoshioka N, Funae R, Fujita T, Higuchi S, Ueno Y: Plasma phosphatidylcholine hydroperoxidase as a new marker of oxidative stress in alcoholic patients. *J Lipid Res* 45: 967-971, 2004.

14. Nakamura Y, Kobayashi Y, Ishikawa A, Maruyama K, Higuchi S: Severe chronic pancreatitis and severe cirrhosis have different frequencies and are independent risk factors in male Japanese alcoholics. *J Gastroenterol* 39: 879-887, 2004.

15. Matsushita S, Suzuki K, Murayama M, Nishiguchi N, Hishimoto A, Takeda A, Shirakawa O, Higuchi S: Serotonin transporter regulatory region polymorphism is associated with "core" anorexia nervosa. *Am J Med Genet* 128B: 114-117, 2004.

16. Masaki T, Mochizuki H, Matsushita S, Yokoyama A, Kamakura K, Higuchi S: Association of aldehyde dehydrogenase-2 polymorphisms with alcoholic polyneuropathy in humans. *Neurosci Lett* 363: 288-290, 2004.

17. Mochizuki H, Masaki T, Yokoyama A, Matsushita S, Kamakura K, Motoyoshi K, Higuchi S: Prolonged central sensory conduction time in alcoholics with hypoactive aldehyde dehydrogenase-2. *Neurosci Res* 50: 233-236, 2004.

18. Matsushita S, Kimura M, Miyakawa T, Yoshino A, Murayama M, Masaki T, Higuchi S: Association study of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene polymorphism and alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res* 28(11): 1609-1612, 2004