

分子シャペロン誘導剤のアルツハイマー病治療への応用

分担研究者 工藤 喬 大阪大学大学院医学系研究科助教授

研究要旨：小胞体(ER)シャペロンである BiP のプロモーター領域を用いたレポーターアッセイ系を構築し、コンパウンドスクリーニングから、BIX を得た。BIX は BiP のみを誘導し、他の ER ストレス反応分子の発現変化をもたらさなかった。BIX で前処理した SK-N-SH 細胞は ER ストレスに対する耐性を示した。BIX を脳室内投与したマウスに中大脳動脈閉塞による脳虚血を負荷すると、梗塞層の減少が観察された。BIX は BiP を誘導することで、アミロイド前駆体蛋白(APP)の局在を変え、分泌アミロイド蛋白(A β)の減少をもたらした。以上のことから、BIX は ER ストレス脆弱性の改善と A β 分泌の抑制という2点から、アルツハイマー病の治療薬となる可能性が示された。

A. 研究目的

小胞体(ER)に折りたたみが不整な蛋白が蓄積する減少を ER ストレスと呼ぶが、有核細胞にはそれを克服する手段として unfolded protein response(UPR)が存在する。UPR は、蛋白の転写を抑制してこれ以上不整蛋白ができないようにする機構、分子シャペロシを誘導して不整蛋白の折りたたみを是正する機構、そして不整蛋白をプロテアソームに移動させ分解させる機構(ERAD)で構成され、これらがうまく機能しないと、ER を起源とするアポトーシスが発動する。これまで、不整蛋白を検知する分子として、IRE1、PERK、ATF6 が報告されている(Zhang K, Kaufman RJ: The unfolded protein response: A stress signaling pathway critical for health and disease. *Neurology* 66 (suppl. 1) s102-s109, 2006)。

近年、UPR の異常がいくつかの神経変性疾患の原因となることが示されている。

我々はプレセニリン1の変異神経細胞では、IRE1、PERK、ATF6 の活性が低下しており、ER ストレス脆弱性を呈することを示した(Katayama T, Imaizumi K, Sato N et al: Presenilin-1 mutations downregulate the signalling pathway of the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 8, 479-485, 1999) (Katayama T, Imaizumi K, Honda A et al: Disturbed activation of endoplasmic reticulum stress transducers by familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 mutations. *J.Biol.Chem* 276(3) 2108-2114, 2001)(Yasuda Y, Kudo T, Katayama T et al: FAD-linked presenilin-1 mutants impede translation regulation under ER stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 296, 313-318, 2002)。また、家族性のパーキンソン病の検討から Parkin の異常が発見され、ユビキチンリガーゼ3であるこの蛋白の異常は ERAD をきたし、ER ストレスを

介したアポトーシスを起こすとされている (Kitada T, Asakawa S, Hattori N et al: Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. Nature 392, 605-608, 1998) (Imai Y, Soda M, Inoue H et al: An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. Cell 105, 891-902, 2001)。さらに、SCA3 のポリグルタミン鎖の伸展で発症する Machado-Joseph 病でも ERAD の異常から ER を起源とするアポトーシスが起ると報告されている。(Nishitoh H, Matsuzawa A, Tobiume K, et al. ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. Gene Dev 16, 1345-1355, 2002) (Bence NF, Sampat RM, Kopito RR: Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. Science 292, 1552-1555, 2001) これらの知見は、アルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患の治療ターゲットとして、UPR が有力であることを示している。

本研究では、UPR のうち分子シャペロン誘導に着目し、分子シャペロン BiP を発現誘導するコンパウンド BIX を発見し、その ER ストレス耐性効果について検討した。また、BiP 誘導はアミロイド前駆体蛋白(APP) の局在を変え、分泌 A β を抑制するという事実 (Kudo T, Okumura M, Imaizumi K et al: Altered location of amyloid precursor protein under endoplasmic reticulum

stress. Biochem Biophys Res Commun in press) から、BIX の A β 分泌抑制についても検討した。

B. 研究方法

1. BiP レポーターアッセイ系の構築

BiP プロモーター領域 (-132 +7)(Yoshida H, Haze K, Yanagi H et al: Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. J.Biol.Chem 273,33741-33749, 1998) を、Luciferase Assay System(プロメガ社)に組み込み、レポーターアッセイ系を構築した。

2. BiP 誘導コンパウンドの検索

上記のアッセイ系を用いてコンパウンドライブラリーを検索した結果、BiP inducer X(BIX)を見いだした。

3. BIX の UPRs への影響の検討

SK-N-SH 細胞に BIX を 0-50 μ M BIX を 0-12 h 投与し、BiP、XBP-1、CHOP に関しては Northern 法や RT-PCR 法で、リン酸化 eIF2 α に関しては Western 法にて検討した。また、BiP に関しては、TaqMan プローブを用いた real-time PCR でメッセージの定量を行った。対照には、ER ストレス誘導剤である tunicamycin や thapsigargin を用いた。

4. BIX の作用機作についての検討

BiP プロモーター領域の3連ある ER ストレス反応エレメント(ERSE)を削除したレポーターを用意し、BIX の反応について検討した。また、ER ストレス検知分子 IRE1、PERK のノックアウトの MEF 及び ATF6 の RNAi

によるノックダウンのMEFを用意し、BIXの反応を検討した。

5. BIXによるERストレス耐性の検討

SK-N-SH細胞にBIXを12時間前に前投与し、tunicamycinをあたえて、Hoechst染色で細胞の生存率を検討した。また、Western法にてcaspase 4の活性化についても検討した。

6. BIXの中大脳動脈閉塞も出るに対する効果の検討

マウスの脳室に5-20 μ g BIXを投与し、30分後に片側中大脳動脈をナイロン栓子で閉塞し(Hara H, Huang PL, Panahian N et al: Reduced brain edema and infarction volume in mice lacking the neuronal isoform of nitric oxide synthase after transient MCA occlusion, J. Cereb. Blood Flow Metabol. 16, 605-611, 1996)、24時間後に神経学的評価の後断頭してTTC染色にて梗塞巣を評価した。

7. BIXによる分泌A β 抑制の検討

APPを発現せしめたSY5Y細胞(SY5Y/APP^{sw})にBIXを投与し、18時間後の培地中のA β 量をELISAで検討し細胞内のAPPについてもWestern法にて検討した。

C. 研究結果

BiPレポーターアッセイでコンパウンドライブラリーを検索したところ、BIXを得た。

Northern法やreal-time PCRよりBIXは濃度依存的にBiPを誘導することが示された。この誘導は、Western法により蛋白レベルでも確認された。BIX投与によるBiP誘導の経時的変化は、6時間がピークとなることが示された。

RT-PCRの検討から、BIXはBiPを誘導するが、XBP-1のスプライシング、CHOPの誘導などは観察されなかった。Western法では、BIXはeIF2 α のリン酸化による活性化をもたらさないことが示された。

BiPプロモーター領域のERSE領域が欠落すると、BIXのBiP誘導効果は激減し、BIXもERSEを介した反応でBiPを誘導することが示された。また、IRE1のノックアウト、PERKのノックアウトMEFにBIXを作用させるとBiPは誘導されたが、ATF6のノックダウンMEFではBIXによるBiP誘導効果が認められなかった。これは、BIXのBiP誘導がATF6の系路に何らかの関連があることを示唆している。

SK-N-SH細胞に12時間前にBIXを投与し、tunicamycinを投与してERストレスをかけたところ、vehicleに対して細胞生存率が上昇することが観察され、Hoechst染色によって観察される核の断片化も抑制された。BIX前処理群ではcaspase4の活性化も抑制されていた。

マウスの脳室内に、5、20 μ gを投与し、30分後に中大脳動脈を栓子で閉塞し、24時間後に神経学的評価を行ったところ、vehicle投与群より神経徴候の改善が見られた。また、TTC染色による梗塞巣の評価では、BIX投与群で両濃度とも有意に縮小していることが観察された。

SY5Y/APP^{sw}にBIXを投与したところ、濃度依存的に分泌A β が低下し、APPのmaturationの低下が認められ、BIXにより誘導されたBiPがAPPに結合し、APPをearly compartmentに移動させることで、A β 産生が低下したことが示唆された。

D. 考察

今回の結果は、BIXはBiPのみを誘導し、他のUPR系路を活性化しないことが示され、ERストレス誘導剤によるアポトーシスの抑制や脳虚血による梗塞巣の減少に効果をもたらすことが示された。

BIXの作用機作として、ERSEの配列によること、ATF6の系路に関与することまでは明らかになったが、未だ詳細を検討する必要があると思われる。今回の結果より、BIXの効果は細胞レベルでは6時間をピークに一過性であることが示されている。BiPはERストレス検知分子から解離することでERストレス検知を行うとされている

(Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM et al: Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein. *Nat Cell Biol* 2, 326-332, 2000) ので、持続性にBiPの濃度が上昇している状況はこの検知機構に障害を及ぼす可能性があるが、BIXのこの一過性の効果はその点で有利かもしれない。

近年、eIF2 α の選択的な脱リン酸化阻害剤をERストレスに伴う障害に利用するとする報告(Boyce M, Bryant KF, Jousse C et al: A selective inhibitor of eIF2 α dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science* 307:935-939, 2005)が出されたが、eIF2 α のリン酸化/脱リン酸化はダイナミックなものとの報告があり、我々の提案するシャペロン誘導のほうが利用しやすいと考えられる。

過去の我々の検討から、家族性アルツハイマー病ばかりでなく孤発性のアルツハイマー病でも、脳内のBiPの発現量が低下していたり

et al: Presenilin-1 mutations downregulate the signalling pathway of the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 8, 479-485, 1999)、ERを起源とするcaspase4の発現があがっていたり(Hitomi J, Katayama T, Eguchi Y et al: Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and A β -induced cell death. *J Cell Biol*. 165(3):347-356, 2004) おり、アルツハイマー病の病態のベースとしてERストレス脆弱性がある。今回の検討では、BIXはBiPを誘導することで、APPの局在を変え、A β の抑制効果をもたらすことも示した。従って、BIXはERストレス脆弱性の改善とA β 分泌の抑制という2点から、アルツハイマー病の治療薬となる可能性が示された。

E. 結論

シャペロン誘導剤BIXはERストレス脆弱性の改善とA β 分泌の抑制という2点から、アルツハイマー病の治療薬となる可能性が示された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Double-strand RNA dependent protein kinase (PKR) is involved in the extrastriatal degeneration in Parkinson's disease and Huntington's disease.

Yoshio Bando, Reiko Onuki, Taiichi Katayama, Takayuki Manabe, Takashi Kudo, Kazunari Taira, Masaya Tohyama. *Neurochem Int* 46, 11-18, 2005.

2. Interaction of presenilins with FKBP38 promotes apoptosis by reducing mitochondrial Bcl-2

Hua-Qin Wang, Yoshifumi Nakaya, Zhenyu Du, Takuya Yamane, Michiko Shirane, Takashi Kudo, Masatoshi Takeda, Koichi Takebayashi, Yoichi Noda, Keiichi I. Nakayama, Masaki Nishimura
Human Molecular Genetics 14(13), 1889-1902, 2005

3. Formation of Tau Inclusions in Knock-in Mice with Familial Alzheimer Disease (FAD) Mutation of Presenilin 1 (PS1). Kentaro Tanemura, Du-Hua Chui, Tetsuya Fukuda, Miyuki Murayama, Jung-Mi Park, Takumi Akagi, Yoshitaka Tatebayashi, Tomohiro Miyasaka, Tetsuya Kimura, Tsutomu Hashikawa, Yuka Nakano, Takashi Kudo, Masatoshi Takeda, and Akihiko Takashima

J. Biol. Chem., 281(8): 5037-5041, 2006

4. Altered localization of amyloid precursor protein under endoplasmic reticulum stress. Takashi Kudo, Masayo Okumura, Kazunori Imaizumi, Wataru Araki, Takashi Morihara, Hitoshi Tanimukai, Eiichiro Kamagata, Nobuhiko Tabuchi, Ryo Kimura, Daisuke Kanayama, Akio Fukumori, Shinji Tagami, Masayasu Okochi, Mikiko Kubo, Hisashi Tanii, Masaya Tohyama, Takeshi Tabira, Masatoshi Takeda. Biochem Biophys Res Commun 344: 525-530, 2006

2. 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

「分子シャペロン BiP 誘導剤 (BiP inducer X; BIX)」出願準備中

海馬尾部および灰白層におけるアルツハイマー病変の検討

分担研究者 巻淵 隆夫 独立行政法人国立病院機構さいがた病院、臨床研究部長

研究要旨 海馬はアルツハイマー型痴呆において最も高度に障害される部位である。しかしながら、海馬の様々なレベル、とくにその最尾部から灰白層についての病理所見、またアルツハイマー病(AD)、アルツハイマー型老年痴呆(SDAT)という臨床的サブグループに応じた病理所見の差異については、十分明らかにされていない。我々は、AD4例、SDAT6例、生前痴呆を認めなかった正常高齢者(N)5例において、通常の染色法に加え、リン酸化タウに対する特異抗体(AT8)を用いてこれを検討し、以下の結果を得た。すなわち、①臨床的サブグループによらず、海馬のアルツハイマー病変は吻側で高度、尾側で減弱、②ADでは、視床枕レベルより尾側で急速に障害程度が減弱、③灰白層外側部は、SDATにおいて高度に障害され、ADより病変程度が強い、④灰白層外側部は、隣接する後部帯状回との間の2つの白質を有し、AT8染色性を示した。これまで新皮質の障害がADでSDATより高度であることが強調されてきたが、③は、単にADの病理像がSDATの延長線上にあるのではなく、両者の進展様式、さらにはそれに関わるメカニズムが異なっている可能性を示唆している。また③、④は、アルツハイマー型認知症の早期患者における、後部帯状回での血流低下に関与している可能性があり、この点についても考察を試みた。

研究協力者 清水宏、五十嵐善男、長澤大輔

A. 研究の背景とその目的

アルツハイマー型痴呆において、海馬は最も高度に障害される部位のひとつである。しかしながらこれまでの海馬におけるアルツハイマー病変についての研究は、冠状断で外側膝状体のレベルでの検討が殆どである。我々は、海馬尾部および、海馬尾部から連続し、海馬の痕跡的構造であるといわれる灰白層(Indusium griseum)のアルツハイマー病変に注目し、65歳未満発症のアルツハイマー病(AD)患者、65歳以降発症のアルツハイマー型老年痴呆(SDAT)患者という、臨床的サブグループに応じた病理学的差異の有無を検討した。さらに、アルツハイマー型痴呆早期患者において報告されている後部帯状回での血流低下と、この灰白層における病理所見との関連についても考察した。

B. 研究方法

対象はAD 4例(発症年齢 58.5 ± 5.8 歳、罹病

期間 13.8 ± 2.9 年)、SDAT 6例(発症年齢 83.5 ± 4.2 歳、罹病期間 2.5 ± 1.2 年)、生前痴呆を認めなかった正常高齢者 6例(N群、死亡年齢 76.8 ± 5.8 歳)。剖検脳を冠状断、1cm間隔で切り出し、作成したパラフィン包埋切片について、HE、KB、Bodian、Methenamine silver、Gallyas染色および、抗リン酸化タウ抗体(AT8抗体; Innogenetics, Ghent, Belgium; monoclonal; diluted 1:50)による免疫組織化学染色を施行した。まず、海馬尾部および灰白層の構造を観察した。次に、海馬尾部および灰白層における、神経細胞脱落、グリオシスの程度、顆粒空胞変性、Neuropil thread (NT)、Neurofibrillary tangle (NFT)の出現頻度、AT8染色性について解析した。解析レベルは、海馬は外側膝状体レベルおよび視床枕レベル、海馬尾部は脳梁膝レベル、灰白層は視床枕レベルを選択した。

C. 研究結果

1.海馬尾部及び灰白層の構造についての検討

海馬はその最尾部、つまり脳梁膝レベルにおいて灰白層へ連続し、灰白層は2, 3層のまばらな神経細胞層からなる内側部と、帯状溝の最外側部に存在し、より密な神経細胞の集団からなる外側部に分かれた。外側部では顆粒空胞変性を豊富に認め、海馬CA1からの連続であることが示唆された。内側部が脳梁膝を回り込んで、脳梁背側全体を薄く覆ったのに対し、外側部は視床枕から脳梁膝のレベルに局限し、さらに隣接する後部帯状回の表層および深部白質へ連なるような、2つの白質を伴っていた。

2. 海馬、海馬尾部、灰白層におけるアルツハイマー病変化の検討

神経細胞脱落、NT、NFT、AT8染色性といったアルツハイマー病変化は、AD、SDAT、N群のいずれにおいても、海馬吻側から尾側へ移行するに従い減弱した。AD群においては、アルツハイマー病変化が脳梁膝レベルで急速に減弱する傾向を示したのに対し、SDAT群においては、海馬尾部および灰白層外側部まで比較的強い障害を認めた。同じBraakのNFTステージで比較した場合、灰白層外側部においてはSDATがADより強いアルツハイマー病変化を示した。N群でもBraakのNFTステージが高い患者においては、灰白層外側部の障害を認めた。AD、SDAT、N群のすべてにおいて、灰白層外側部から後部帯状回へ連なる2つの白質もAT8染色性を示し、また灰白層内側部は保たれていた。

D. 考察

我々の検討により、①臨床的サブグループによらず、海馬のアルツハイマー病変は吻側で高度、尾側で減弱すること、②ADにおいては、視床枕レベルより尾側で急速に障害程度が減弱すること、③灰白層外側部は、SDATにおいて高度に障害され、ADより病変程度が強いこと、④灰白層外側部と後部帯状回との間の2つの白質もAT8染色性を示すことが明らかにされた。これまで、灰白層におけるアルツハイマー病変化は軽度であると報告されており¹⁾、③は新たな知見であると言える。さらに、新皮質の障害がADでSDATでより高度である²⁾という過去の知見とあわせると、海馬は尾側まで病変が進展するが新皮質へは広がりにくいSDATと、海馬は吻側にとどまるが新皮質へは広範に進展するADという、両者の進展様式の違いが明らかとなる。このように、海馬尾部と新皮質の障害程度が、SDATとADとで逆転するため、両者の病理像を単なる病期の違いで説明することは困難で

あり、各々の発症・進展には異なったメカニズムが関わっていることが示唆される。

灰白層外側部には後部帯状回が隣接することから、③、④は、アルツハイマー型痴呆早期患者で報告されている、後部帯状回での血流低下や代謝低下³⁾に関連する可能性がある。ただし、我々の検討では灰白層の病理学的変化はSDATで顕著であるのに対し、血流低下は若年発症者で高度であることが報告されている⁴⁾。灰白層は小さく、痕跡的な構造であり、未だその機能については不明でもあり、後部帯状回における血流低下との関連については今後の検討を要する。

E. 結論

海馬尾部、灰白層におけるアルツハイマー病変を、AD、SDATというサブグループによる差異に注目して検討し、海馬尾部から灰白層外側部にかけて、SDATでより障害されやすいことを明らかにした。アルツハイマー病変は、ADにおいては新皮質へ進展しやすいが海馬は吻側に局限し、他方でSDATにおいては海馬は尾側まで進展するが、新皮質には及びにくいという、両者の進展様式の違い、さらに疾患の発症、進展に関わるメカニズムの違いを示唆していると考えられる。正常高齢者においても灰白層外側部にアルツハイマー病変を認める症例があり、隣接する後部帯状回における血流低下との関係を今後の検討課題としたい。

F. 研究発表

Takehiro Yasukawa, Yohei Kirino, Norie Ishii, Ian J. Holt, Howard T. Jacobs, Takao Makifuchi, Nobuyoshi Fukuhara, Shigeo Ohta, Tsutomu Suzuki, Kimitsuna Watanabe. Wobble modification deficiency in mutant tRNAs in patients with mitochondrial diseases. *FEBS Letters* 579: 2948-2952, 2005.

引用文献

- 1 Lippa CF et al. The indusium griseum in Alzheimer's disease: an immunocytochemical study. *J. Neurol. Sci.* 1992; 111: 39-45
- 2 Arai T et al. Morphometrical comparison of neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer's disease and the senile dementia of Alzheimer type. *Neuropathology* 1995; 14: 21-26.
- 3 Minoshima S et al. Metabolic reduction in the posterior cingulate cortex in very early

Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1997; 42: 85-94

- 4 Hanyu H et al. Effect of age on regional cerebral blood flow patterns in Alzheimer's disease patients. *J. Neurol. Sci.* 2003 ;209: 25-30.

5 Hanyu H et al. Regional cerebral blood flow patterns in Alzheimer's disease patients. *J. Neurol. Sci.* 2003 ;209: 25-30.

6 Hanyu H et al. Regional cerebral blood flow patterns in Alzheimer's disease patients. *J. Neurol. Sci.* 2003 ;209: 25-30.

7 Hanyu H et al. Regional cerebral blood flow patterns in Alzheimer's disease patients. *J. Neurol. Sci.* 2003 ;209: 25-30.

8 Hanyu H et al. Regional cerebral blood flow patterns in Alzheimer's disease patients. *J. Neurol. Sci.* 2003 ;209: 25-30.

9 Hanyu H et al. Regional cerebral blood flow patterns in Alzheimer's disease patients. *J. Neurol. Sci.* 2003 ;209: 25-30.

10 Hanyu H et al. Regional cerebral blood flow patterns in Alzheimer's disease patients. *J. Neurol. Sci.* 2003 ;209: 25-30.

11 Hanyu H et al. Regional cerebral blood flow patterns in Alzheimer's disease patients. *J. Neurol. Sci.* 2003 ;209: 25-30.

シナプス機能障害を標的としたアルツハイマー病新規治療法の開発

分担研究者 武田雅俊 大阪大学大学院・精神医学

研究要旨 アルツハイマー病 (AD) は高齢化社会の保健・福祉・生活衛生に大きな影を落とす神経変性疾患であり、その高い有病率、長い罹病期間、障害の重大さから大きな社会問題となっており、その克服はきわめて優先度が高い研究課題である。本研究の目的は、AD の認知障害に関連するシナプス障害に焦点を当ててその病態メカニズムを明らかにし、シナプス障害を阻害する治療法開発をめざすことにある。AD 脳に特異的に認められる老人斑の主たる構成要素は凝集した A β である。A β は β APP が BACE による細胞外切断を受けた後、引き続いて膜内でプレセニリン複合体酵素による γ 切断を受けて分泌される。この A β の凝集過程に AD の病因があるのではないかと考えられている。つまりシナプス毒性を呈するのは既に凝集した A β ではなく、その中間体である A β オリゴマーである可能性が示唆されている。本研究ではこの A β のオリゴマー形成を阻害することを標的とした手法を提案することを目標とした。A β オリゴマー産生には新規産生 A β と A β フィブリルが関与していると考えられる。前年度までの検討の結果、A β オリゴマー産生には線維形成後の A β フィブリルの溶解過程に比較して新規産生 A β が大きく関与している可能性が示唆された。また新規産生 A β のうち A β 40 に比較して A β 42 の作用が大きいを明らかにした。これらの事実は A β オリゴマー産生を阻害するためには、A β 42 産生あるいは A β 42 の凝集を阻害する必要があることを示唆している。最終年度では、我々が開発した A β 42 の産生を特異的に減少させるような γ セクレターゼ修飾薬の薬理機序に関して解析を進めた。また A β 産生を抑制する他の手法として、 γ セクレターゼの上流に位置する BACE 活性を抑制する新たな方法を提示した。さらに A β 42 の分解を促進することで A β オリゴマー産生を阻害する方法を示した。作用機序の異なるこれらの手法を組み合わせることにより、より有効な A β オリゴマー形成が抑制できるのではないかと推察した。

キーワード: アルツハイマー病、アミロイド β 蛋白、オリゴマー形成、シナプス毒性、BACE、NSAID
研究協力者 田上真次 大河内正康
大阪大学大学院・精神医学

イド沈着の抑制という観点に絞られてきており、 γ セクレターゼ阻害剤、 β セクレターゼ阻害剤、アミロイドワクチン療法などが試みられている。本研究では A β 産生・オリゴマー形成・プロトフィブリルなどの凝集体形成を阻害するアルツハイマー病治療法の根拠となるメカニズムを解析しその結果を利用して現在の薬剤開発の問題点を克服し新規薬剤探索の根拠となる方法論とアッセイ系を確立するために実施した。

A. 研究目的

アルツハイマー病 (AD) の治療法開発は現実的な研究課題となりつつある。世界的に見ても現時点での治療戦略はアミロ

B. 研究方法

1) BACE による A β オリゴマー形成阻害実験

アミロイド β 蛋白(1-40および1-42)(Bachem社から購入)をHFIP処理した後、両者を10:1の比率で混合、150mMクエン酸ナトリウム pH 6.4で溶解した。

37度で決められた時間静置しオリゴマーを生成させた。アッセイバッファー中にリコンビナント野生型 BACE 或いはドミナントネガティブ BACE を加えた。サンプルを抗オリゴマー抗体(A11抗体)でドットブロットし、chemiluminescenceで定量化した。

2) 細胞培養

HEK293細胞にスウェーデン変異型ベータアミロイド蛋白前駆体(sw APP)を恒常的に発現させ、定法により培養した。また sw APP と human BACE1 を恒常的に発現する細胞株を樹立し定法により培養した。

3) 分泌アミロイドベータ蛋白のウェスタンブロットティング及びマススペクトロミー解析

回収した培養上清を抗 A β 抗体(4G8)で免疫沈降、10-20%トリストリンゲルで SDS-PAGE を行った後、ニトロセルロース膜に転写した。定法により抗 A β 抗体(4G8)を用いてフィルムに感光させた。またサンプルの半量を同様に免疫沈降した後、飽和アルファ-シアノ-4-ヒドロキシシナミ酸を含む TWA(トリフルオロ酢酸:水:アセトニトリル=1:20:20)に溶解し、マススペクトロミーで解析した。

4) *in vitro* A β ペプチド切断アッセイ

合成 A β 40 および A β 42 を 150mM クエン酸ナトリウム pH 6.4 または pH5.0 中でリコンビナント BACE と混合、37°C、4 時間インキュベートした後、抗 A β 抗体(4G8)で免疫沈降しマススペクトロミーで解析した。

5) 消光性基質を用いた *in vitro* BACE assay 系

MOCAC-SEVNL-DAEFRK(Dnp)-RR-NH₂ を基質として、BACE 発現細胞の膜分画を 0.5% Triton X で可溶化し抗 BACE 抗体で精製した BACE 及びリコンビナント BACE を酵素として用いた。

C. 研究結果

背景

前年度までの研究で A β オリゴマー生成に通常の40アミノ酸残基のA β よりも長さの長いA β 42が重要な働きを持つこと、および A β 4, 3, 2 量体が比較的安定であることを SEC および SDS-PAGE 解析で示した。また A β の凝集過程でA β オリゴマーとA β モノマーの間には一方向性の平衡関係があることを示唆した。A β 凝集体生成後はA β オリゴマーの産生は殆ど認められず、A β 凝集体とA β オリゴマーの間の平衡関係もA β 凝集体形成に偏っていたことを示した。試験管内反応では SEC で分離されるようなA β オリゴマーはA β モノマーと異なり A β の凝集過程に一時的に存在する中間体であることが示唆された。これらの結果より A β オリゴマーを抑制するにはA β 42産生を特異的に阻害する方法とA β 42の分解を促進する方法を組み合わせればより効果的ではないかと考えた。A β 42産生を抑制する

方法の一つとして、NSAID 様の効果を持つ薬剤のスクリーニングを行った。NSAID のうち γ セクレターゼ修飾作用が報告されている薬剤とそれがないとされている薬剤の特徴から新規 30 コンパウンドを選択した。培養上清中の $A\beta$ および cell-free アッセイのスクリーニングの結果その内一つのコンパウンドが「 $A\beta_{42}$ 産生を下げ $A\beta_{38}$ 産生を上げる」作用を持つことが明らかした。このコンパウンドの IC_{50} 値は 20 μM 程度で Sulindac Sulfide の半分以下であった。本年度はこのコンパウンドの作用点について検討した。

$A\beta$ 産生を抑制するには γ セクレターゼ活性を阻害する他に BACE 活性を阻害する方法がある。我々は驚くべきことに BACE が $A\beta$ そのものを切断することを明らかにした。この性質を利用して $A\beta$ ペプチドを用いて BACE 活性を阻害する方法、ならびに BACE を用いて $A\beta$ 、 $A\beta_{42}$ 分解を促進する方法を開発することを試みた。

NSAID s の作用は β APP 特異的ではない。我々の開発した化合物や NSAID の一部は延長型 $A\beta_{42}$ 産生量を選択的に減少させることがわかっている。また NSAID の類縁体には逆に $A\beta_{42}$ を上昇させる活性があることもわかっている。これらの化合物の作用点は基質である β APP なのか或いはプレセニリン γ セクレターゼ複合体であるのか不明であった。我々はプレセニリン γ セクレターゼの基質である Notch1 から $A\beta$ 様ペプチドの一つである $N\beta$ が分泌されていることを明らかにした。 $N\beta$ の分子種は主として $N\beta_{21}$ と $N\beta_{25}$ で構成されており、延長型 $N\beta_{25}$ は全体の約 20% を占めていた。そこで各種 NSAID ならびに新たに開発した化合物が $A\beta_{42}$ 産生を変

化させる際、分泌される $N\beta$ の分子種がどのように変化するかを検討した。その結果 $A\beta_{42}$ 分泌量は延長型 $N\beta_{25}$ 分泌量とほぼ相関することが明らかになった。このことから NSAID の作用点は基質の一つである β APP 特異的ではなく、酵素であるプレセニリン γ セクレターゼである可能性が示された。

$A\beta$ ペプチドにより BACE 活性が阻害される。 $A\beta$ 産生機構における BACE の機能を調べる目的で sw APP 発現細胞に BACE を共発現する細胞株を樹立した。ライセート中の CTF- β の量は予想どおり増加したが、驚くべきことに $A\beta$ の量はむしろ減少し、短縮した $A\beta$ が主な分子種であった。その構成は $A\beta_{11}$ 位と 35 位で切断された $A\beta_{11-34}$ 、 $A\beta_{11}$ 位で切断された $A\beta_{11-40}$ 、 $A\beta_{35}$ 位で切断された $A\beta_{1-34}$ であり、重要なことに全長 $A\beta$ 分子種ならびに $A\beta_{42}$ はほとんど認められなかった。これらの切断が直接的に生じていることをリコンビナント BACE と $A\beta$ ペプチドを用いた実験で明らかにした。このことは $A\beta$ 産生カスケードの最終産物である $A\beta$ ペプチドが、BACE による β APP の切断を阻害する可能性が考えられる。そこで消光性基質と細胞から免疫沈降で精製した BACE を酵素として用いた *in vitro* BACE assay 系に $A\beta$ ペプチドを加えたところ、 $A\beta$ ペプチドは濃度依存的に BACE 活性を低下させた。この結果より少なくとも *in vitro* では $A\beta$ ペプチドは BACE の活性を阻害することが明らかになった。さらに $A\beta$ ペプチドのどの断片が BACE を阻害する活性があるのかを検討した。その結果 $A\beta$ の C 末部分に BACE を阻害する活性が存在することが示唆された。

BACEはA β オリゴマー形成を阻害する。驚くべきことにリコンビナント BACE は凝集能が高いA β 42も切断した。A β オリゴマー形成が BACE により阻害されるかどうか調べるために、HFIP 処理した A β 42 と A β 40 を *in vitro* で凝集させる際にリコンビナント BACE を加えて、オリゴマー形成を経時的に観察した。その結果野生型 BACE の存在下、A β オリゴマー形成は顕著に阻害された。

D. 考察

前年度までの検討で A β オリゴマーは主に新規産生 A β から出来ることおよび A β 42 がより重要な働きをすることが示唆された。そこで A β 42 産生を下げることで結果的に A β オリゴマー形成を阻害することに繋がると考え、 γ セクレターゼ修飾薬の開発を行った。

本年度はこの化合物ならびに各種 NSAIDs は Notch から産生される A β 様ペプチドである N β ペプチドの構成にも影響を及ぼすことを明らかにした。この結果より NSAID の作用点は β APP 特異的ではなく、プレセニリン γ セクレターゼ複合体であることが示唆された。この事実は NSAID を AD の治療法の一つとして選択する場合、その効果が β APP のみならず、他の基質にも影響を及ぼす可能性があることを留意しなければならないことを示している。

我々は BACE が産生された A β ペプチドを A β 35 位でならびに A β 11 位で切断することを見出した。さらに重要なことに A β ペプチドは少なくとも *in vitro* では BACE の活性を阻害することを示した。これは一度産生された A β が BACE 活性を阻害することで、新たに産生される A β の量を減じるメカニズムが存在することを示唆している。また A β ペプチドの C 末端側の配列が BACE 阻

害活性を持つことを明らかにした。この作用機構を調べることで活性中心を阻害する以外の方法で BACE 活性を抑制する新たな薬剤ターゲットを開発できるかもしれない。

またこの BACE による A β 切断能力を利用して、BACE が A β オリゴマー形成を阻害することを示唆した。BACE に何らかの修飾を加えることで β A β 切断活性を持たず A β 切断活性を保持させることができれば、オリゴマー形成を阻害させる新たな方法に結びつけることが可能かもしれない。

E. 結論

シナプス毒性を呈すると考えられている A β オリゴマー形成を阻害する方法として、A β 42 産生を抑制する方法と分解を促進する方法を提示した。A β 42 の産生を特異的に減少させるような γ セクレターゼ修飾薬のスクリーニングを行い、その作用点がプレセニリン γ セクレターゼであることを示唆した。また A β ペプチドにより BACE 活性が阻害されることを明らかにした。さらに BACE による A β 切断能を利用することで、A β オリゴマー形成が阻害されることを示唆した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Secretion of the Notch-1 A β -like peptide during Notch signaling

Okochi M, Fukumori A, Jiang J, Itoh N, Kimura R, Steiner H, Haass C, Tagami S, Takeda M

J Biol Chem. 2006 Epub

Presenilin-dependent γ -secretase on plasma membrane and endosomes is functionally distinct

Fukumori A, Okochi M, Tagami S, Jiang J, Itoh N, Nakayama T, Yanagida K, Ishizuka-Katsura Y, Morihara T, Kamino K, Tanaka T, Kudo T, Tanii H, Ikuta A, Haass C, Takeda M

BIOCHEMISTRY 2006 in press

Development of new screening system for Alzheimer disease, in vitro A β sink assay, to identify the dissociation of soluble A β from fibrils

Sato N, Okochi M, Taniyama Y, Kurinami H, Shimamura M, Takeuchi D, Hamada H, Fukumori A, Kiyosue K, Taguchi T, Tanaka T, Miyasaka M, Takeda M, Ogihara T, Morishita R

Neurobiology of Disease. 2006 Epub

The GxGD motif of Presenilin contributes to Catalytic Function and Substrate

Identification of γ -secretase

Yamasaki A, Eimer S, Okochi M, Smialowska A, Kaether C, Baumeister R, Haass C, Steiner H

J Neuroscience 2006 in press

Identification of susceptibility genes for sporadic Alzheimer's disease using hippocampus-related candidate genes

K Taguchi, H Yamagata, W Zhong, K Kamino, H Akatsu, R Hata, T Yamamoto, K Kosaka, M Takeda, I Kondo, T Miki
Ann Neurol 57: 585-588, 2005

Alpha-synuclein-positive structures induced in leupeptin-infused rats

Nakajima T, Takauchi S, Ohara K, Kokai M, Nishii R, Maeda S, Takanaga A, Tanaka T, Takeda M, Seki M, Morita Y
Brain Res 1040: 73-80, 2005

Toll-like receptor 3 mediated hyperphosphorylation of tau in human SH-SY5Y neuroblastoma cells.

Nessa BN, Tanaka T, Kamino K, Sadik G, Ansar AB, Kimura R, Tanii H, Okochi M, Morihara T, Tagami S, Kudo T, Takeda M.
Psychiatry Clin Neurosci. 2006 Apr;60 Suppl 1:S27-33.

Albumin gene encoding free fatty acid and beta-amyloid transporter is genetically associated with Alzheimer disease.

Kimura R, Kamino K, Yamamoto M, Kida T, Akatsu H, Uema T, Kobayashi T, Hattori H, Nuripa A, Nessa BN, Kazui H, Ikejiri Y, Tanaka T, Tanii H, Kudo T, Yoneda H, Yamagata H, Miki T, Takeda M.
Psychiatry Clin Neurosci. 2006 Apr;60 Suppl 1:S34-9.

Interaction of presenilins with FKBP38 promotes apoptosis by reducing mitochondrial Bcl-2

Hua-Qin Wang, Y Nakaya, Z Du, T Yamane,
M Shirane, T Kudo, M Takeda, K
Takebayashi, Y Noda, Keiichi I. Nakayama,
M. Nishimura
Human Molecular Genetics 14(13),
1889-1902, 2005

Aluminum alters viability and axonal
transport system in Alzheimer's disease
pathogenic mutation-bearing cells
H Tanii, N Matsumoto, Y Kashiwagi, M
Okochi, T Tanaka, T Kudo, K Kamino. Y
Okazaki, M Takeda
Psychogeriatrics 4, 20-23, 2005.

Possible assessment of
Alzheimer's γ -secretase activity by level of
A β -like peptide
Masayasu Okochi, Masatoshi Takeda
Psychogeriatrics 54, suppl2, S57-S61,
2005

研究成果の刊行に関する一覧表

著者氏名	論文タイトル名	雑誌名	号、巻、頁	年
Lakshmana MK, Araki W, <u>Tabira T</u>	Amyloid beta peptide binds a novel death-inducing protein, AB-DIP	FASEB J	doi: 10.1096/fj.05-3672fi (e)	2005
<u>Ohyagi Y</u> , Tsuruta Y, Motomura K, Miyoshi K, Kikuchi H, Iwaki T, Taniwaki T, Kira J	Intraneuronal amyloid β 42 enhanced by heating but counteracted by formic acid	Neurosci Method	in press	2006
<u>Ohyagi Y</u> , <u>Tabira T</u>	Intracellular amyloid β -protein and its associated molecules in the pathogenesis of Alzheimer's disease (review)	Med Chem	in press	2006
Taniwaki T, Okayama A, Yoshiura T, Togao O, Nakamura Y, Yamasaki T, Ogata K, Shigeto H, <u>Ohyagi Y</u> , Kira J, Tobimatsu S	Functional network of the basal ganglia and cerebellar motor loops in vivo. Differential activation patterns between self-initiated and externally triggered movements	NeuroImage	in press	2006
Furuya H, Murai H, Takasugi K, <u>Ohyagi Y</u> , Urano F, Kishi T, Ichinose H, Kira J	A case of late-onset Segawa syndrome (autosomal dominant dopa-responsive dystonia) with a novel mutation of the GTP-cyclohydrolase I (GCH1) gene	Clin Neurol Neurosurg	in press	2006
Furuya H, Ikezoe K, <u>Ohyagi Y</u> , Miyoshi T, Fujii N	A case of progressive posterior cortical atrophy (PCA) with vivid hallucination: are some ghost tales vivid hallucinations in normal people?	J Neurol Neurosurg Psychiatry	in press	2006
<u>Ohyagi Y</u> , Asahara H, Chui D-H, Tsuruta Y, Sakae N, Miyoshi K, Yamada T, Kikuchi H, Taniwaki T, Murai H, Ikezoe K, Furuya H, Kawarabayashi T, Shoji M, Checler F, Iwaki T, Makifuchi T, Takeda K, Kira J, <u>Tabira T</u>	Intracellular A β 42 activates p53 promoter: a pathway to neurodegeneration in Alzheimer's disease	FASEB J	19: 255-257	2005
Furuya H, Shinnoh N, <u>Ohyagi Y</u> , Ikezoe K, Kikuchi H, Osoegawa M, Fukumaki Y, Nakabeppu Y, Hayashi T, Kira J	Some flavonoids and DHEA-S prevent the <i>cis</i> -effect of expanded CTG repeats in the stable PC12 cell transformant	Biochem Pharmacol	69: 503-516	2005
Furuya H, Yamada T,	Neurological signs and	J Dermatol	S39-S44	2005


<u>Ohyagi Y</u> , Miyoshi T, Fujii N, Kira J	symptoms in patients with chronic PCB intoxication (<i>Yusho</i> accident) for more than 36 years	Sci (Suppl 1)		
Yoshio Bando, Reiko Onuki, Taiichi Katayama, Takayuki Manabe, <u>Takashi Kudo</u> , Kazunari Taira, Masaya Tohyama	Double-strand RNA dependent protein kinase (PKR) is involved in the extrastriatal degeneration in Parkinson's disease and Huntington's disease	Neurochem Int	46: 11-18	2005
Wang HQ, Nakaya Y, Du Z, Yamane T, Shirane M, <u>Kudo T</u> , <u>Takeda M</u> , Takebayashi K, Noda Y, Nakayama KI, Nishimura M	Interaction of presenilins with FKBP38 promotes apoptosis by reducing mitochondrial Bcl-2	Human Molecular Genetics	14(13): 1889-1902	2005
Tanemura K, Chui DH, Fukuda T, Murayama M, Park JM, Akagi T, Tatebayashi Y, Miyasaka T, Kimura T, Hashikawa T, Nakano Y, <u>Kudo T</u> , <u>Takeda T</u> , Takashima A	Formation of tau inclusions in knock-in mice with familial Alzheimer disease (FAD) mutation of presenilin 1 (PS1)	J Biol Chem	281(8): 5037-5041	2006
<u>Takashi Kudo</u> , Okumura M, Imaizumi K, Araki W, Morihara T, Tanimukai H, Kamagata E, Tabuchi N, Kimura R, Kanayama D, Fukumori A, Tagami S, Okochi M, Kubo M, Tanii H, Tohyama M, Tabira T, <u>Takeda M</u>	Altered localization of amyloid precursor protein under endoplasmic reticulum stress	Biochem Biophys Res Commun	344: 525-530	2006
Yasukawa T, Kirino Y, Ishii N, Holt IJ, Howard T, Jacobs, <u>Makifuchi T</u> , Fukuhara N, Ohta S, Suzuki T, Watanabe K	Wobble modification deficiency in mutant tRNAs in patients with mitochondrial diseases	FEBS Letters	579: 2948-2952	2005
Okochi M, Fukumori A, Jiang J, Itoh N, Kimura R, Steiner H, Haass C, Tagami S, <u>Takeda M</u>	Secretion of the Notch-1 A β -like peptide during Notch signaling	J Biol Chem	Epub	2006
Fukumori A, Okochi M, Tagami S, Jiang J, Itoh N, Nakayama T, Yanagida K, Ishizuka-Katsura Y, Morihara T, Kamino K, Tanaka T, Kudo T, Tanii H, Ikuta A, Haass C,	Presenilin-dependent γ -secretase on plasma membrane and endosomes is functionally distinct	BIOCHEMISTRY	in press	2006

<u>Takeda M</u>				
Sato N, Okochi M, Taniyama Y, Kurinami H, Shimamura M, Takeuchi D, Hamada H, Fukumori A, Kiyosue K, Taguchi T, Tanaka T, Miyasaka M, <u>Takeda M</u> , Ogihara T, Morishita R	Development of new screening system for Alzheimer disease, in vitro A β sink assay, to identify the dissociation of soluble A β from fibrils	Neurobiology of Disease	Epub	2006
K Taguchi, H Yamagata, W Zhong, K Kamino, H Akatsu, R Hata, T Yamamoto, K Kosaka, <u>M Takeda</u> , I Kondo, T Miki	Identification of susceptibility genes for sporadic Alzheimer's disease using hippocampus-related candidate genes	Ann Neurol	57: 585-588	2005
Nakajima T, Takauchi S, Ohara K, Kokai M, Nishii R, Maeda S, Takanaga A, Tanaka T, <u>Takeda M</u> , Seki M, Morita Y	Alpha-synuclein-positive structures induced in leupeptin-infused rats	Brain Res	1040: 73-80	2005
Nessa BN, Tanaka T, Kamino K, Sadik G, Ansar AB, Kimura R, Tanii H, Okochi M, Morihara T, Tagami S, <u>Kudo T</u> , <u>Takeda M</u>	Toll-like receptor 3 mediated hyperphosphorylation of tau in human SH-SY5Y neuroblastoma cells	Psychiatry Clin Neurosci	Apr;60 Suppl 1:S27-33.	2006
Kimura R, Kamino K, Yamamoto M, Kida T, Akatsu H, Uema T, Kobayashi T, Hattori H, Nuripa A, Nessa BN, Kazui H, Ikejiri Y, Tanaka T, Tanii H, <u>Kudo T</u> , Yoneda H, Yamagata H, Miki T, <u>Takeda M</u>	Albumin gene encoding free fatty acid and beta-amyloid transporter is genetically associated with Alzheimer disease	Psychiatry Clin Neurosci	Apr: 60 Suppl 1:S34-9	2006
Hua-Qin Wang, Y Nakaya, Z Du, T Yamane, M Shirane, T Kudo, <u>M Takeda</u> , K Takebayashi, Y Noda, Keiichi I	Interaction of presenilins with FKBP38 promotes apoptosis by reducing mitochondrial Bcl-2 Nakayama, M. Nishimura	Human Molecular Genetics	14(13): 1889-1902	2005
H Tanii, N Matsumoto, Y Kashiwagi, M Okochi, T Tanaka, T <u>Kudo</u> , K Kamino, Y Okazaki, <u>M Takeda</u>	Aluminum alters viability and axonal transport system in Alzheimer's disease pathogenic mutation-bearing cells	Psychogeriatrics	4: 20-23	2005
Masayasu Okochi, <u>Masatoshi Takeda</u>	Possible assessment of Alzheimer's γ -secretase activity by level of A β -like peptide	Psychogeriatrics	54: suppl2, S57-S61	2005

Amyloid beta peptide binds a novel death-inducing protein, AB-DIP

Madepalli K. Lakshmana,^{*,1} Wataru Araki,[†] and Takeshi Tabira^{*,1}

^{*}Department of Vascular Dementia Research, National Institute for Longevity Sciences, Obu, Japan; and [†]Department of Demyelinating Disease and Aging, National Institute of Neuroscience, Kodaira, Japan

 To read the full text of this article, go to <http://www.fasebj.org/cgi/doi/10.1096/fj.05-3672fje>; doi: 10.1096/fj.05-3672fje

SPECIFIC AIMS

The aims of this study were to 1) identify A β binding proteins by the yeast two-hybrid system from human brain cDNA library using human A β 1–42 fused to Gal4-DNA binding domain as bait; and 2) understand the role of such a potential A β binding protein in A β -induced cell death.

PRINCIPAL FINDINGS

1. We identified a novel protein, A β -related death-inducing protein (AB-DIP), specifically binding to A β peptide

AB-DIP protein is characterized by the presence of caspase activation and recruitment domain (CARD) and nuclear targeting sequence in addition to other domains.

2. Binding of A β with AB-DIP was confirmed in SH-SY5Y neuroblastoma cells by two-way coimmunoprecipitations (Fig. 1)

Using a series of AB-DIP deletion mutants, we mapped binding of A β with both the N- and C-terminal regions but not the middle region.

3. Overexpression of AB-DIP-induced cell death and coexpression of A β enhanced cell death in SH-SY5Y cells (Fig. 2D)

4. During apoptosis, 97 kDa full-length AB-DIP is cleaved to p62AB-DIP

Coexpression of A β and AB-DIP also produced p62AB-DIP.

5. Experiments using purified caspases and site-directed mutagenesis of AB-DIP confirmed the cleavage of AB-DIP by caspase-9 at the sequence LEKD

6. siRNA-mediated knockdown of AB-DIP protein expression significantly protected SH-SY5Y cells from A β -induced cell death (Fig. 2E)

CONCLUSIONS AND SIGNIFICANCE

Alzheimer's disease (AD) is characterized by extensive cell death in the brains of affected individuals. There is now genetic, pathological, and biochemical evidence to suggest that A β plays the casual role in AD. We recently demonstrated immunocytochemical staining of A β in the cytoplasm as well as the nucleus of many degenerating neurons from AD brains. Such an accumulation of intracellular A β is relevant to neurodegeneration in AD. Although the pathway leading to A β generation and accumulation is well defined, specific molecular pathways and obligate mechanisms for A β -induced neuronal death remain poorly defined. Therefore, we searched for cellular proteins that specifically bind A β and identified a novel A β binding protein, AB-DIP. Multiple evidence suggests that AB-DIP may mediate A β -induced cell death. This conclusion is supported by our finding that coexpression of A β and AB-DIP produced potentially the activated form, p62AB-DIP, and enhanced the cell death. AB-DIP-specific siRNAs significantly protected neuroblastoma cells from A β -induced cell death. However, it remains to be verified whether targeting AB-DIP in vivo may have a therapeutic value in AD. FJ

¹ Correspondence: Department of Vascular Dementia, Research National Institute for Longevity Sciences, National Center for Geriatrics and Gerontology, 36-3 Gengo, Morioka, Obu, Aichi 474-8522, Japan. E-mail: laxman@nils.go.jp; tabira@nils.go.jp doi: 10.1096/fj.05-3672fje

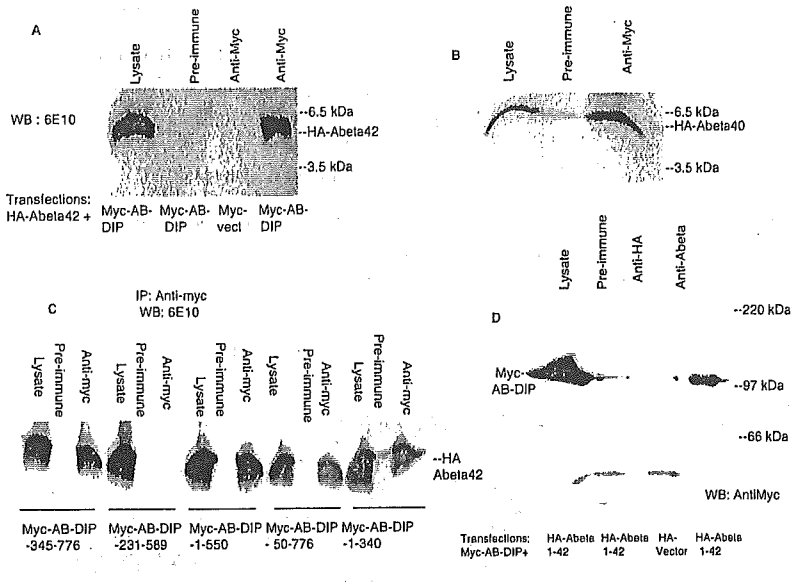


Figure 1. Direct interaction of A β with AB-DIP: pull-down assay. A β coprecipitates with AB-DIP. *A*) SHSY5Y cells cotransfected with pCMV-Myc-AB-DIP or pCMV-Myc empty vector along with pCMV-HA-Abeta42. After 36 h, cells were lysed and subjected to immunoprecipitation with anti-myc antibody. *B*) SH-SY5Y cells cotransfected with pCMV-myc-AB-DIP and pCMV-HA-A β 40. After 36 h, cells were lysed and subjected to immunoprecipitation with anti-myc antibody. Anti-A β (6E10) antibody was used to detect HA-A β 40 by immunoblot. *C*) SH-SY5Y cells cotransfected with pCMV-HA-A β 42 and various myc-tagged AB-DIP deletion mutants. After 36 h, cells were lysed and subjected to overnight immunoprecipitation with anti-myc antibody. A β binds AB-DIP at both the N- and C-terminals, but not the region between amino acids 231–589. *D*) Reciprocal coimmunoprecipitation. pCMV-HA-A β 42 or pCMV-HA empty vector and pCMV-myc-AB-DIP were cotransfected and subjected to immunoprecipitation with anti-HA or anti-A β (6E10) antibodies.

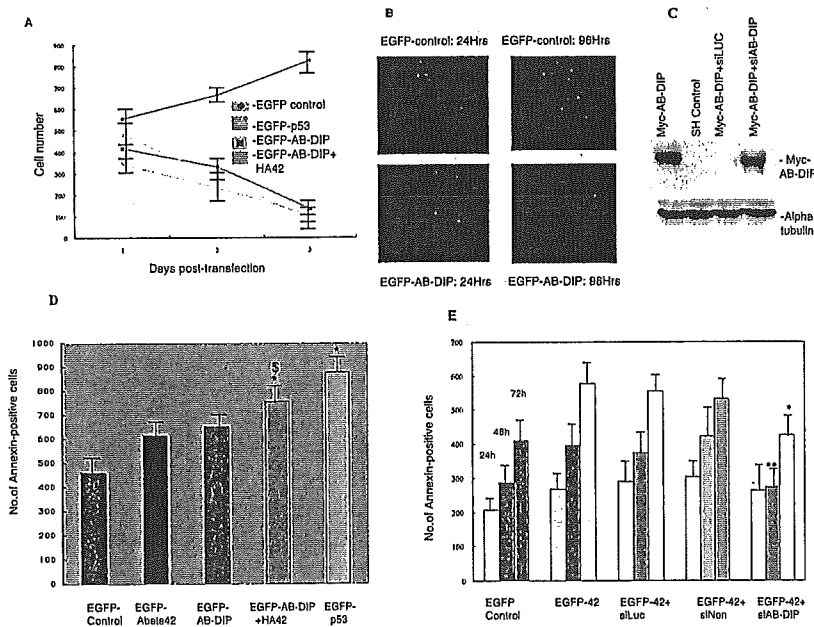


Figure 2. Down-regulation of AB-DIP protein levels protects SH-SY5Y cells from A β -induced cell death. *A*) Live cell counts of GFP fluorescence at different days after the transient transfection of EGFP empty vector, EGFP-AB-DIP, EGFP-AB-DIP+HA-A β 42, and EGFP-p53 by fluorescence microscopy. $^{**}P < 0.01$ when EGFP control was compared with any of the other groups. *B*) SH-SY5Y cells were transiently transfected with either EGFP control vector (pEGFPN1) or AB-DIP fused to EGFP (pEGFP-AB-DIP); after 24 or 96 h, cells were processed for immunocytochemical staining with polyclonal GFP antibody. *C*) siRNA-mediated knockdown of AB-DIP protein expression in SH-SY5Y cells. Cells were cotransfected with myc-AB-DIP and either AB-DIP-specific siRNA duplex or luciferase-specific siRNAs. After 48 h, cells were subjected to immunoblot analysis and myc-AB-DIP was detected with anti-myc antibody. *D*) Number of annexin V-positive cells after transient transfection of SH-SY5Y cells with the indicated plasmids. $^{*}P < 0.05$ when EGFP-AB-DIP+HA-A β 42 or EGFP-p53 was

compared with EGFP-A β 42; $^{*}P < 0.05$ when EGFP-AB-DIP+HA-A β 42 was compared with EGFP-AB-DIP by *t* test ($n=3$). *E*) Knockdown of AB-DIP protein expression by siRNAs protects SH-SY5Y cells from A β toxicity. A β 42 was fused to EGFP (EGFP-A β 42) and cotransfected with either AB-DIP siRNA duplex, nonspecific siRNAs (siNon), or siRNAs against the luciferase gene (siLuc). Cell death was detected by annexin V staining after 24, 48, and 72 h of transfection. $^{*}P < 0.05$ compared with pEGFP-42, $^{**}P < 0.01$ compared with pEGFP42 or pEGFP-42+siNon by *t* test ($n=3$).

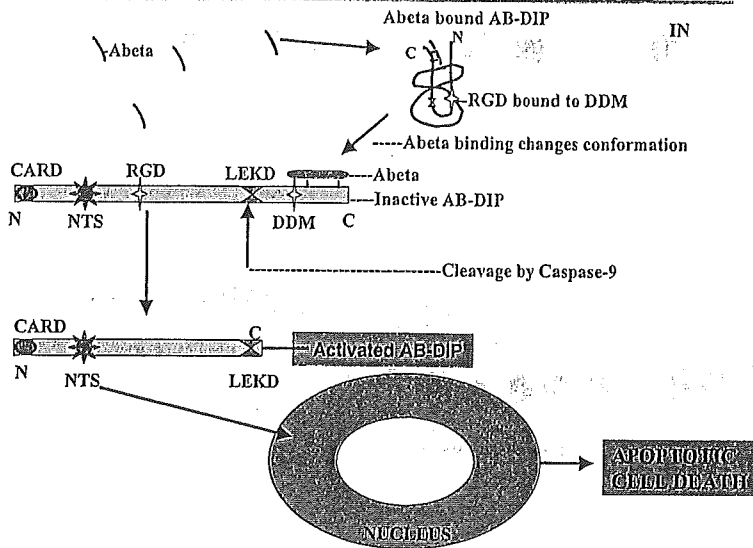


Figure 3. Schematic diagram illustrating a suggested mechanism for intracellular Aβ-induced cell death. When the cell is in the unperturbed condition, RGD motif bind with DDM motif within AB-DIP masking the caspase cleavage site, LEKD and thus AB-DIP remain in an inactive state. When the intracellular levels of Aβ increases, Aβ binds to AB-DIP, changing its conformation and exposing LEKD. Caspase-9 then cleaves full-length AB-DIP to 62AB-DIP, which may then enter the nucleus with its nuclear targeting sequence and induce apoptosis through an as yet unknown mechanism.