

博士論文内容の要旨

アミロイド前駆体タンパク質リン酸化の機能解析

安藤 香奈絵

<序>

アミロイド前駆体タンパク質 (Amyloid precursor protein; APP) は、長い細胞外ドメインと短い細胞内ドメインをもつ一回膜貫通型のタンパク質で、その代謝過程でアルツハイマー病患者脳に蓄積する β アミロイド(A β)を生成する。APP の細胞内ドメインには、いくつかの結合タンパク質が報告されている。しかし、APP と結合タンパク質の相互作用を制御するメカニズムは明らかではない。

本研究室では、APP 細胞内ドメインの Thr668 サイトが、神経組織特異的にリン酸化されることを明らかにしている (Fig 1)。このリン酸化サイト Thr668 は、PC12 細胞の神経突起の伸長に重要な役割を担うことが分かっている (Ando et al., 1999)。

また、このリン酸化サイト Thr668 は、培養細胞では、細胞周期 G2/M 期特異的にリン酸化を受けている。しかし、その生理機能は不明である。

多くのタンパク質において、リン酸化は生理機能を調節する重要な現象である。APP の細胞内ドメインに多くのタンパク質が結合することは、APP の生理機能が結合タンパク質を介するものであること、リン酸化によってこれらのタンパク質との結合が制御されていることを予想させた。しかし、APPThr668 リン酸化依存的に結合の変化するタンパク質は報告されていなかった。そこで、新規な APP 結合タンパク質の探索とともに、既に報告されている細胞内結合タンパク質への APP の結合が、Thr668 依存的に変化するかを調べた。

その結果、Thr668Glu 変異によって、APP の Fe65 タンパク質への結合が弱まることを見出した。Thr668 のリン酸化によっても、APP の Fe65 への結合は弱まった。Fe65 はすでに APP に結合するタンパク質として報告されていたが、APP Thr668 がタンパク結合に関与するという報告は今までになかった。さらに、Thr668 が脳組織特異的にリン酸化されていることから、神経

細胞内では、リン酸化がタンパク結合を制御していると考えられる。

Fe65 は神経組織に豊富に発現し、複数のタンパク結合ドメインをもつアダプタータンパク質と考えられるが、その生理機能は明らかではない。私は Fe65 の生理機能の一つとして、APP 代謝への関与を調べた。その結果、Fe65 の過剰発現によって、APP の代謝が抑制され、A β の抑制されることを見出した。

さらに私は、HeLa 細胞 cDNA ライブラリから、新規 APP 細胞内ドメイン結合タンパク質を単離した。APP^{Thr668} は、培養細胞では細胞周期 G2/M 期特異的にリン酸化を受けており、このタンパク質の解析は、細胞周期特異的なリン酸化の機能解析に結びつく可能性がある。

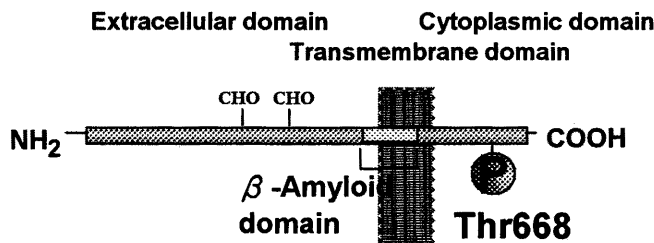


Fig.1.APP の構造とリン酸化サイト

<結果>

1. APP 細胞内ドメイン結合タンパク質の Thr668 変異 APP への結合。

PC12 細胞の APP 細胞内ドメインには、X11, X11L, X11L2, Fe65, Fe65L1, Fe65L2, mDab1 が結合することが報告されている。これらは、その phosphotyrosine interaction (PI) domain を介して APP に結合する。X11L \cdot Fe65 \cdot Fe65L1 \cdot Fe65L2 \cdot mDab1 について、野生型または Thr668 変異 APP への結合に差があるかを調べた。各タンパク質の PI domain の GST 融合タンパク質を作成し（それぞれ、X11L PI-GST, Fe65 PI2-GST, Fe65L1 PI2-GST, Fe65L2 PI2-GST, mDab1 PI-GST）、精製後グルタチオンビーズに結合した。野生型 APP または Thr668Ala 変異 APP を発現させた 293 細胞抽出液に、各 GST 融合タンパク質を加え、回収された APP の量をウエスタンブロットにより比較した。その結果、X11L PI-GST, mDab1 PI-GST では Thr668Ala 変異による APP への結合変化は見られなかったが、Fe65 PI2-GST, Fe65L1 PI2-GST, Fe65L2 PI2-GST の Thr668 変異 APP への結合は、野生型 APP への結合に比べて減少していた。また、APP^{Thr668Ala} 変異による Fe65 の結合減少は、293 細胞を用いた共役免疫沈降実験でも確認された。

APP と同じ遺伝子ファミリーに属する APLP2 (Amyloid precursor like protein 2)にも、APP^{Thr668} に相当するリン酸化サイトが、Thr736 として保存されており、APP と同じリン酸化制御を受ける。この Thr736 サイトについても、Thr736Ala 変異 APLP2 を作成して、X11 PI-GST, mDab1 PI-GST, Fe65 PI2-GST について同様の実験を行った結果、APP と同様に、Thr736Ala 変異に対して Fe65 protein family のみ結合の低下が見られた。

また、Thr668Glu 変異 APP についても、結合の変化を調べた。いくつかの事例で、Glu 変異は Ser/Thr のリン酸化状態のアナログとして作用することが報告されている。リン酸化された Thr668 を含む APP の配列を抗原として作成した、リン酸化 APP 特異抗体は、リン酸化されていない野生型 APP または Thr668Ala 変異 APP は認識しないが、Thr668Glu 変異 APP は認識した。この結果は、Thr668Glu 変異 APP が Thr668 でリン酸化された APP を模しているという仮説を支持する。

Thr668Glu 変異 APP についても同様の実験を行って、Fe65 への結合が変化するかを調べたところ、Thr668Glu 変異によっても、APP の Fe65 への結合が減少することがわかった。

2. APPThr668 リン酸化依存的な APP と Fe65 の結合変化

Fe65 と APP の結合は、APP Thr668Glu 変異により変化することから、Thr668 リン酸化が Fe65 への結合に影響を与えると予想された。APP 細胞内ドメイン 645-695 のアミノ酸配列からなるペプチド（非リン酸化ペプチド）、または Thr668 サイトにリン酸化を導入した APP651-695 のアミノ酸配列からなるペプチド（リン酸化ペプチド）を用いて、Fe65 PI2-GST と 293 細胞に発現させた APP との結合の、競合阻害実験を行った。その結果、リン酸化ペプチドによる結合阻害は、非リン酸化ペプチドによる阻害より弱く、リン酸化ペプチドは非リン酸化ペプチドより Fe65 に結合しにくいことが示された。

また、*in vivo* で Thr668 リン酸化の起きているラット脳由来のリン酸化・非リン酸化 APP について、Fe65-GST に対する結合の強さに差があるかを調べた。ラット脳抽出液から、Fe65 PI2-GST に結合する APP を回収し、APP 抗体またはリン酸化特異的 APP 抗体で検出した。免疫沈降した全 APP または X11L PI-GST で回収した APP と比較すると、Fe65 PI2-GST に結合した APP におけるリン酸化 APP の割合は低く、ラット脳でリン酸化された APP も、非リン酸化 APP に対して、Fe65 に結合しにくいことが示された。

3. Fe65 の APP 代謝に及ぼす影響

Fe65 は、神経組織に主に発現し、複数のタンパク結合ドメインを持つアダプタータンパク質であるが、その生理機能はほとんど明らかになっていない。

Fe65 は APP の代謝に重要な再取り込みシグナル NPTY 配列に結合することから、Fe65 が APP 代謝に影響を及ぼすことが予想された。私は、Thr668 と Fe65 の生理機能の一つとして、Fe65 が APP 代謝に及ぼす影響を調べた。その結果、Fe65 と APP をともに発現させた HEK293 細胞では、APP の代謝が抑制されることを見出した。

Fe65 の発現によって、 $A\beta$ 生成に変化が生じるかを調べた。APP のみ、または APP と Fe65 を、293 細胞に一過性に発現させ、細胞培養液を回収して、sandwich ELISA 法で $A\beta$ 量を定量した。Fe65 をともに発現させた場合、APP のみを発現させた場合と比較して、細胞培養液中の $A\beta$ 量は低下していた。Fe65 の発現により、 $A\beta$ 42 量は $A\beta$ 40 より大きく減少していた。

また、Thr668Glu APP からの $A\beta$ 放出に対する、Fe65 の効果を同様にして調べた。Thr668Glu APP からの $A\beta$ 40 放出は、単独で発現した場合と Fe65 とともに発現した場合で、有意な差がみられなかった。Fe65 の発現により、 $A\beta$ 42 放出は減少した。

Thr668GluAPP に対しては、野生型に対するよりも Fe65 の $A\beta$ 放出抑制効果が弱いため、Fe65 をともに発現させた状況で、Thr668Glu APP と野生型 APP からの $A\beta$ 放出を比較すると、Thr668Glu APP からの $A\beta$ 放出は、 $A\beta$ 40、 $A\beta$ 42 とともに、野生型 APP に比べて多かった。

また、293 細胞に Fe65 を発現させ、Fe65 の細胞内局在を調べた。Fe65-Myc を 293 細胞に一過性に発現させ、細胞を抗 Myc 抗体で免疫染色した。Fe65-Myc は、細胞膜近辺に局在した。また、APP を発現させ、APP と Fe65-Myc を二重染色すると、Fe65-Myc と APP は、細胞膜近辺

で共局在していた。これより、Fe65 は細胞膜近辺で APP 代謝に作用していると考えられる。

4. 新規 APP 結合タンパク質の単離

APP 細胞内ドメインのリン酸化サイト Thr668 は、分裂する培養細胞で、細胞周期 G2/M 期特異的にリン酸化を受けている。細胞周期におけるリン酸化の生理機能を探索する目的で、HeLa cDNA ライブラリから、Thr668 依存的に結合の変化する APP 細胞内ドメイン結合タンパク質の探索を行った。プローブとして、APP 細胞内ドメインの GST 融合タンパク質を、大腸菌に発現させ精製して用いた。野生型 APP、Thr668Glu APP, Thr668Ala APP の細胞内ドメイン GST 融合タンパク質を作成し、これらについて結合の異なるものを探索した。Uni-Zap express vector に組み込まれた HeLa brain cDNA library を大腸菌 XL1-Blue MRF に感染させ、10mM IPTG でタンパク発現を誘導した。発現したタンパク質を、ニトロセルロース紙に写し取り、Thr668Glu 変異 APP 細胞内ドメインの GST 融合タンパク質とともにインキュベートし、抗 GST 抗体で GST 融合タンパク質の結合を検出した。1×10⁷ clone についてスクリーニングを行った。Thr668Glu に結合が強いが、Thr668Ala には結合が弱いクローンを一種類単離した。このクローンは、ヒトゲノムプロジェクトで報告された染色体 19 番上で予測されていた 680 アミノ酸からなるタンパク質の C 末端部分 (378-680) を含んでいた。APPThr668 依存的に APP の結合が異なるため、このタンパク質を Thr668-dependent APP binding protein (TAB) と名づけた。

単離したタンパク質の APP への結合を確認する目的で、APP 細胞内ドメイン GST 融合タンパク質 (GST-cAPP) を用いた pull-down assay を行った。スクリーニングで単離された TAB378-680 の C 末端に Myc 配列を付加し、プラスミドベクターに組み込んで COS7 細胞に発現させた。細胞抽出液にグルタチオンビーズに結合した GST-cAPP を加え、結合したタンパク質を回収した。Myc 抗体を用いたウエスタンブロットにより解析した。また、Thr668 変異による APP のこのタンパクへの結合変化を調べるため、野生型 (GST-cAPP wt)、Thr668Ala 変異型 (GST-cAPP T668A) , Thr668Glu 変異型 (GST-cAPP Thr668Glu) の APP 細胞内ドメイン GST 融合タンパク質を用いた。

この結果、TAB378-680 は、GST-cAPP wt にもっとも強く、GST-Thr668Ala にもっとも弱い結合を示した。このことから、APP の TAB への結合は、Thr668 変異によって変化することが分かった。

ヒト 19 番染色体のゲノム配列から、TAB の全 cDNA が予測されていた。この情報からプライマーを作成し、HeLa 細胞から total RNA を抽出し、この情報を元に作成したプライマーを用いた RT-PCR 法によって、TAB 完全長 cDNA をクローニングした。

TAB の C 末端に Myc タグを付加したものを含むプラスミドを作成した (TAB-Myc)。TAB-Myc を、FLAG タグを付加した APP (FLAG-APP) とともに 293 細胞に発現させた。TAB-Myc を発現させた HEK293 細胞抽出液について抗 Myc 抗体によるウエスタンブロットを行うと、TAB-Myc は 90kDa-100kDa の、二本のバンドとして検出された。細胞溶解液から抗 FLAG 抗体による免疫沈降で APP を回収した後、抗 Myc 抗体でウエスタンブロットを行うと、APP とともに沈降された TAB を検出することができた。この結果から、APP と TAB が細胞内でも結合していることが確認された。

また、ノザンプロット法により、成体ヒト各組織での TABmRNA の発現を比較した。プローブとして TAB cDNA をラベルして用いた。その結果、肝臓、腎臓で約 4.6Kbp に弱い発現が観察された。

また、マウス発生過程での TAB の発現を、ノザンプロットにより検出した。その結果、胎児発生 11 日目にもっとも強い発現が観察された。

抗 TAB 抗体による培養細胞の免疫染色を行うと、アクチン抗体による染色に似たパターンを示した。

<まとめと考察>

APP 細胞内ドメインには、いくつかの結合タンパク質が報告されていたが、その結合・解離のメカニズムはまったく解析されていなかった。この研究で、APP Thr668 サイトの変異またはリン酸化によって、Fe65 と APP の結合が変化することが明らかになった。Fe65 は、脳に多く発現し、APP と結合する PI domain のほかにさらにひとつの PI domain および他のタンパク結合モチーフ WW domain をもつアダプタータンパク質と考えられるが、その生理機能は不明である。Fe65 の APP を介した生理機能の解明が今後の課題である。

Fe65 の生理機能の一つとして、APP の代謝に関する影響を検討した。Fe65 の発現によって、APP からの細胞培養液中への A β 放出は抑制された。この効果は Thr668Glu 変異 APP には少ない。HEK293 細胞には、内在性の Fe65 はほとんど発現していないと考えられるが、神経細胞では Fe65 が多く発現している。神経細胞内では、Thr668 でリン酸化された APP に対しては、Fe65 の効果が少ないことが予想される。神経細胞内では、リン酸化制御の乱れが APP 代謝の乱れにつながる可能性がある。

また、APPThr668 は、分裂している培養細胞で、細胞周期 G2/M 期特異的に p34/cdc2 kinase によってリン酸化される。しかし、この細胞周期特異的なリン酸化の生理機能もまた不明である。私は、HeLa 細胞 cDNA ライブラリから、新規 APP 結合タンパク質 TAB を単離した。Thr668Glu 変異 APP の TAB への結合が弱いことから、Thr668 リン酸化によって APP の結合が弱まる可能性がある。TAB の生理機能は不明だが、マウスの胎生 11 日目に最も強い発現を示すことから、発生過程で何らかの機能を担っている可能性もある。

孤発性アルツハイマー病の発病メカニズムについては、いまだに謎のままであり、様々な角度からの研究が必要とされる。複数の生理機能が予想される APP について、リン酸化という制御機構に焦点をあてて研究を進めることは、アルツハイマー病研究の上に多くの重要な情報をもたらすと考えられる。本研究から、APP のリン酸化がタンパク結合に重要な役割を担っていることが、初めて明らかになった。この結果は、APP の神経組織特異的な生理機能について理解する上で、重要であると考えられる。