

論文内容の要旨

アミロイド前駆体タンパク質 (APP) 細胞内ドメインの生理機能解析
神経組織特異的な細胞内ドメイン Thr668 サイトリン酸化への APP 細胞外ドメインの関与
及び、新規 APP 結合タンパク質 hard1 の単離と APP 細胞内代謝へ及ぼす効果の解析

飯島 浩一

序論

アルツハイマー病患者脳に特徴的な病理学的変化として、大脳皮質、海馬等への老人斑の沈着がある。この老人斑の主要構成成分として β アミロイドペプチドが精製され、その前駆体タンパク質として、アミロイド前駆体タンパク質 (amyloid precursor protein ; APP) が単離された。APP は、長い細胞外ドメインと一つの膜貫通ドメイン、短い細胞内ドメインからなる、一回膜貫通型受容体に似た構造をとる糖タンパク質である。 β アミロイドドメインは、APP の細胞外から細胞膜内にかけての領域に存在し、細胞内代謝過程で、セクレターゼと呼ばれる酵素により切り出されることで β アミロイドペプチド ($A\beta$) が生成する。この $A\beta$ の持つ神経細胞毒性が、シナプスの脱落や神経細胞死を引き起こすという仮説が「 β アミロイド仮説」と呼ばれ、現在広く支持されている。アルツハイマー病の発症機構解明を目指し、APP からの $A\beta$ 生成メカニズムを解明しようとする試みが数多くなされているが、いまだその全貌は明らかではない。また、APP の生理機能についてはさらに不明な点が多い。APP のホモログ分子は *C.elegans*、*Drosophila*、*electric ray* といった生物種においても確認されており、哺乳類と同様に神経組織での発現レベルが高いことが知られている。これは、APP が神経組織において普遍的な生理機能を担っている可能性を示唆している。APP はその構造上、45 アミノ酸からなる短い細胞内ドメインがその生理機能の発現、また $A\beta$ 生成を含めた代謝制御において重要な役割を果たしていると考えられる。私は修士課程において、APP 細胞内ドメイン Thr668 サイトがラットにおいて神経組織特異的にリン酸化されているという興味深い現象を見出し、その生理的意義を解

明するという研究に取り組んできた。この Thr668 サイト周辺の配列は *C. elegans*、*electric ray* といった生物種においても完全に保存されており、特に、*electric ray* においては、このサイトが神経組織においてリン酸化を受けていることを見い出している (Iijima, K. et. al, 1998)。これらの事実は、Thr668 サイトのリン酸化が APP の普遍的な生理機能に参与している可能性を示唆している。私は修士課程の研究において、この Thr668 サイトのリン酸化が神経組織に特異的な現象であること、海馬初代培養神経細胞において、このサイトでリン酸化を受けた APP が神経突起に局在していること、さらに、このサイトが *in vitro* で Cdk5 (cyclin-dependent kinase 5) によりリン酸化されることを明らかにした (Iijima, K. et. al, 2000)。また当研究室の安藤により、PC12 細胞を NGF 刺激により神経細胞へ分化誘導すると、神経突起の伸長に伴い Thr668 サイトのリン酸化レベルが上昇すること、Thr668 サイトに変異を導入した APP を定常的に発現する PC12 細胞では、野生型 APP を定常的に発現させた PC12 細胞に比べて、NGF 刺激後の神経突起の伸長が著しく抑制されることなどが見い出され、このリン酸化の神経突起伸長への関与が示唆された (Ando, K. et. al, 1999)。以上のような事実をふまえ、私は APP が Cdk5 によりリン酸化されることで何らかの機能制御を受け、それが神経突起の伸長に参与しているのではないか、という仮説の下に Thr668 サイトリン酸化の生理機能発現分子メカニズムを解明する研究に取り組んできた。

本研究において、まず Thr668 サイトリン酸化制御への APP 細胞外ドメインの関与について検討を行った。その結果、APP 細胞外ドメインは Thr668 サイトのリン酸化制御には関与しないということを示した。次に、Thr668 サイトリン酸化により生じた細胞内ドメインの構造変化が APP 細胞内ドメイン結合タンパク質の親和性の変化を引き起こし、それが機能発現の引き金となるのではないかと考えた。そこで、Thr668 サイトリン酸化による細胞内ドメインの構造変化依存的に APP への結合様式が変化する分子を想定し、そのようなタンパク質を *yeast two-hybrid* 法により探索した。その結果、APP への結合様式は Thr668 サイトのリン酸化により変化しないものの、これまでに APP への結合が報告されていない新規 APP 結合タンパク質 *hard1* の単離に成功した。*hard1* は分子内に酵素ドメインをもち、これまでに APP 細胞内ドメインへの結合が報告されているアダプター様タンパク質とは明らかにタイプが異なり興味深い。そこで、*hard1* の APP 細胞内ドメインへの結合様式を詳しく検討し、さらにその機能解析の一端として APP の細胞内代謝、また A β 生成へ与える効果について検討を行った。

結果

1) APP 細胞外ドメインの Thr668 サイトリン酸化への関与の検討

APP は一回膜貫通型のレセプター様構造をとることから、レセプターとしての機能が想定され、APP 細胞外ドメインに相互作用するリガンドやレセプターを単離しようとする試みが数多くなされてきた。しかし、現在までにそのような試みは成功しておらず、APP の

細胞外ドメインに結合する有力な分子は報告されていない。さらに、APP が実際にレセプターとして機能しているのかについても不明である。APP 細胞内ドメイン Thr668 サイトのリン酸化は、神経組織および NGF 刺激により神経細胞分化させた PC12 細胞において観察されるが、その制御機構については不明である。私は、APP の細胞外ドメインへの何らかのリガンドの結合、または細胞外ドメインの構造変化が Thr668 サイトのリン酸化に関与している可能性を考え、これについて検討を行った。まず APP の細胞外ドメインを様々な欠失させたコンストラクトを作成し、次にこれらのコンストラクトを安定的に発現する PC12 細胞株を樹立した。各コンストラクトにおける Thr668 サイトリン酸化レベルの検討は以下の方法で行った。PC12 細胞は、NGF 刺激により神経突起を伸長し、副交感神経様細胞に分化する。また、NGF 刺激による神経突起の伸長に伴い APP の Thr668 サイトのリン酸化レベルが上昇することが当研究室で示されている。そこで、樹立した各細胞株を NGF 刺激して神経細胞分化させ、細胞外ドメインの欠失に伴う Thr668 サイトリン酸化レベルの変化について検討を行った。その結果、いずれの細胞外ドメイン欠失コンストラクトにおいても、野生型 APP と同程度に Thr668 サイトのリン酸化が見られた。以上より APP 細胞外ドメインは NGF 刺激により神経細胞分化した PC12 細胞で観察される Thr668 サイトのリン酸化制御に関与していないことを示した。

2) Thr668 サイトリン酸化依存的に APP 細胞内ドメインと結合する新規タンパク質の探索

Thr668 サイトのリン酸化がもつ生理機能の一つとして、このリン酸化に伴い生じた細胞内ドメインの構造変化により APP 細胞内ドメイン結合タンパク質の結合様式が変化することで、何らかの生理機能制御を行っている可能性が考えられる。また、APP の細胞内ドメインの立体構造は NMR と CD spectroscopy によって解析されており、Thr668 リン酸化サイト周辺の VTPEER 配列が type 1 β -turn 構造をとること、さらに VTPEER 配列は、N-cap (T668) と N-3 (E671) の側鎖と主鎖同士の水素結合がみられ、N-terminal helix capping box を作っている。この N-terminal helix capping box は立体構造の安定化に重要であることが報告されており、Thr668 サイトのリン酸化に伴い APP 細胞内ドメインの構造変化が生じることは十分に予想される。既知の APP 結合タンパク質 Fe65 family、X11-like 1、mDab1 については、当研究室の安藤が研究を進め、Fe65 family の APP への結合が、Thr668 サイトのリン酸化により著しく低下することが明らかになった。私は、Thr668 サイトのリン酸化に伴い APP 細胞内ドメインへの結合様式が変化する新規分子を想定し、特に Thr668 サイトのリン酸化により結合能の上昇するタンパク質を yeast two-hybrid 法により探索した。方法としては、bait として Thr668 サイトを Glu に置換したものをを用いた。この Thr668Glu 変異 APP は、Thr668 サイトでリン酸化を受けた APP の細胞内ドメインを特異的に認識する抗体により検出できることから、Thr668 サイトでリン酸化された APP と構造上類似していると考えられる。このような Thr668Glu 置換体を bait として、これと相互作用する分子の探索を、神経発生ならびに脳皮質形成が盛んな時期であるヒト胎児脳 cDNA ライブ

ラリー (Gal4 system)、およびヒト胎児前脳 cDNA ライブラリー (LexA system)を用いて行った。その結果、LexA system の cDNA ライブラリーのスクリーニングにより、新規 APP 結合タンパク質の単離に成功した。この分子は、yeast の *ard1* N-terminal acetyltransferase と全体のアミノ酸レベルで 40% 程度の相同性を示した。特に N-terminal acetyltransferase ドメインでは、相同性が 60% 以上であることから、このヒトホモログ分子であると考え、**human *ard1* N-terminal acetyltransferase ; *hard1*** と命名した。この分子について、APP 細胞内ドメイン結合への Thr668 サイトリン酸化の関与について調べた。しかし、両者の結合は Thr668 サイトのリン酸化に依存しないことが判明した。しかし、*hard1* は分子内に酵素ドメインとして N-terminal acetyltransferase domain を持ち、これまでに報告されているアダプター様の APP 結合タンパク質とは明らかにタイプが異なる。N-terminal acetyltransferase は、タンパク質の N 末端にアセチル基を付加することで、何らかの機能制御を行なうと考えられている。一つの可能性として、この分子が生体内において APP 細胞内ドメインの周辺環境に存在する分子をアセチル化することで、何らかの機能制御を行なっていることが考えられ興味深い。この *hard1* について、さらに解析を進めることにした。

3) 新規 APP 結合タンパク質 *hard1* が APP 細胞内代謝へ及ぼす効果の解析

hard1 の生理機能については全く報告がなく、この分子から直ちに APP の生理機能予測を行うことは困難である。そこで、まずこの分子のアルツハイマー病への関与という観点から研究を進めることにした。まず、*hard1* が APP family すべての細胞内ドメインに結合することを明らかにした。次に APP 細胞内ドメインの *hard1* 結合領域の決定を行なった。その結果、*hard1* との結合には細胞内ドメインの N 末側 19 アミノ酸で十分であり、さらにこの領域に含まれる YxxI 配列で特に重要だと考えられている tyrosine が結合に必須なアミノ酸であることが判明した。また、*hard1* 側の APP 細胞内ドメイン結合領域は C 末側の 50 アミノ酸であり、N-terminal acetyltransferase ドメインは結合には関与しないことが明らかとなった。さらに、両者は培養細胞内でも結合し、さらにその結合は直接おこっていることを証明した。また、HEK293 細胞内において、APP と *hard1* は細胞膜近辺で共局在する様子が観察された。このことは *hard1* が細胞膜近辺での mature APP の代謝に関与している可能性を示唆している。実際、*hard1* の強制発現が mature APP の細胞内代謝に作用し、その代謝分解を抑制することで細胞外に分泌される A β 40 量を抑制することを見出した。

総括

APP は一回膜貫通型のレセプター様構造をとるが、その細胞外ドメインには明確なリガンド結合モチーフはなく、実際にレセプターとして機能しているのかは不明である。私は、APP の細胞内ドメインが神経組織特異的に Thr668 サイトでリン酸化されていることに注目し、このリン酸化制御への APP 細胞外ドメインの関与について検討を行なった。その

結果、NGF 刺激により神経細胞分化させた PC12 細胞において、APP 細胞外ドメインを様々に欠失させたコンストラクトは、野生型 APP と同程度に Thr668 サイトでリン酸化を受けていた。以上の結果より、PC12 細胞において神経突起の伸長に伴い観察される細胞内ドメイン Thr668 サイトのリン酸化制御に APP 細胞外ドメインは関与していないと考えられる。次に、Thr668 サイトリン酸化の生理機能発現分子メカニズム解明の糸口を求めて、APP 細胞内ドメインへ Thr668 サイトのリン酸化状態依存的に結合するような分子の探索を行った。その結果、最初に想定したようなタンパク質を単離することは出来なかったが、これまでに APP 細胞内ドメインへの結合が報告されていない新規タンパク質、hard1 の単離に成功した。hard1 は分子内に N-terminal acetyltransferase ドメインを持ち、これまでに報告されているアダプター様の結合タンパク質とは明らかにタイプが異なり興味深い。hard1 のアルツハイマー病への関与という観点から、APP の細胞内代謝、及び A β 生成へ及ぼす効果について検討したところ hard1 の過剰発現により細胞内 APP の代謝分解が抑制され、さらに A β 40 の分泌量も減少することを見出した。この分子メカニズムは不明であるが、二つの可能性を考えている。第一に、hard1 の結合する YxxI 配列は APP の再取り込みシグナルとしての報告があること、また APP からの A β 40 生成の主要なコンパートメントは細胞膜上に分布後の再取り込みによる endosome/lysosome 分解系であることから、hard1 の過剰発現が APP の endocytosis を阻害している可能性を考えており、現在検証を進めている。第二に、YxxI 配列が basolateral sorting signal として機能するという報告があること、また、YxxI 配列に結合し、その分子内に kinesin light chain と類似した tandem repeat 構造をもつことから、APP の microtubule 上の輸送への関与が予想されているタンパク質として PAT1 が報告されていることから、hard1 の強制発現によりこの分子と APP の相互作用が競合阻害されることで、transgolgi から細胞膜への APP の輸送が阻害され、結果として APP の代謝分解が抑制され、A β 40 の生成も減少するという可能性も考えられる。しかし、PAT1 が細胞内において transgolgi に局在化しているのに対して、hard1 は細胞膜近辺に局在化することから、両者が分布する細胞内コンパートメントは異なり、実際に両者の APP への結合が競合しうるかについては疑問がある。また、APP 細胞内ドメインのもう一つの再取り込みシグナルとして知られている YENPTY 配列への結合タンパク質である Fe65 family、また X11 family についても、その強制発現による APP の代謝、また A β 生成への影響が調べられている。Fe65 family については A β の生成を抑制するという報告と促進するという報告がある。また X11 family については A β 生成を抑制することが報告されている。しかし、これらの効果はいずれも結合タンパク質が immature APP へ作用することで、mature APP への変換を促進または抑制し、その結果 A β 生成が促進、抑制されたと考えられる。この点において、今回私の単離した hard1 が APP の細胞内代謝に及ぼす効果は独特なものであり、非常に興味深い。今後は hard1 が実際に N-terminal acetyltransferase 活性を示すのかについて検討を進め、さらに A β 生成抑制への酵素活性の関与、またその生体内における基質についても明らかにしていきたいと考えている。