

新規カドヘリン関連分子 Alcadein の機能解析

- 新規小胞輸送カーゴ受容体と神経変性疾患発症における役割 -

平成 14 年進学

荒木 陽一

1. 序論

アルツハイマー病(AD)は進行性の神経変性疾患で、AD の罹患者数は全世界で 2000 万人にもなるうえ、その数は増加の一途をたどっており、経済的、人道的な面から早急な診断、予防、治療法の開発が望まれている。AD 脳に特徴的に観察される老人斑の主要構成成分は A β で、これは 1 回膜貫通型タンパク質アミロイド前駆体タンパク質(APP)より、 γ -secretase 切断を受けることにより生じる。A β 産生、蓄積は AD の発症原因に深く関連する病理であると考えられている (アミロイド仮説) ことからこの分子機構を解明することが重要である。

APP は 1 回膜貫通型の構造を持つ膜タンパクであり、細胞内ドメインに結合する分子によってその細胞内輸送や代謝調節を担われていると思われる。当研究室において単離された APP の細胞質ドメインに結合する分子 X11-like(X11L)は、APP の代謝を制御し、A β 産生量を減少させるがその詳細な分子機構は明らかになっていない。X11L は生体内で他の様々な機能分子と結合することが報告されていることから、X11L に結合し APP 代謝を制御する分子の探索を目的として Yeast two-hybrid 法が行われ、新規カドヘリン分子 Alcadein (Alc) が単離された。データベース検索によりヒトおよびマウスにおいて Alc は 、 、 のホモログ分子を持つ新規ノンクラシカルカドヘリンファミリーを形成することが明らかになった。

Alc の細胞質ドメインは X11L の PI(Phosphotyrosine Interaction)ドメインに結合する。APP の細胞質ドメインも X11L の PI ドメインに結合することから、その結合様式の解析を行い、APP, Alcadein は同時に X11L の PI ドメインに結合して、APP/X11L/Alcadein の三量体を形成することを明らかにした。この三量体が形成されると、APP の代謝が安定化されて、A β の産生が抑制されることを明らかにしてきた。

本研究において、私は AD との関連において Alcadein が APP とともにどのように細胞内で輸送・代謝を受けているかなどの機能解析を通じて、AD の発症機構の一端を明らかにしていくことを目的とした。

2. Alcadin と APP の γ -secretase による協調的代謝機構

APP は細胞内で 1 回目の切断により、CTF β / β を生じ、次いで γ -secretase により膜内で切断され、A β を培地中に放出するとともに、AICD(APP Intracellular domain)を細胞質に放出する。そこで、類似した構造をとり細胞内で APP と複合体を形成している Alcadin についてその代謝様式を調べた。Alcadin はまず細胞外で 1 回目の切断を受けて、培地中に sAlc を放出し、CTF1 になる。ここに γ -secretase の阻害剤である L-685,458 を作用させると APP CTF β / β 同様、Alc CTF1 が細胞内に蓄積することからこれが γ -secretase の基質であることが示唆された。さらに CTF1 が細胞内で γ -secretase により切断されると、培地中に β -Alc が、細胞内にその細胞内ドメインである Alc ICD が放出された。 β -Alc は、A β と異なりその 2 次構造内に β -turn 構造を持っていない。A β は β -turn 構造によりその N 末端側の β -helix 構造が容易に β -sheet に変換し、異常に凝集して神経細胞毒性を持つとされている。 β -Alc も N 末端側に β -helix 構造、C 末端側に β -sheet 構造と 2 次構造は類似しているものの、 β -turn 構造は持たないため、その溶液中での凝集性は A β に比して低いと考えられる。代謝様式自体は類似しているため、 β -Alc は、AD の進行具合を比較的反映した量がヒト髄液中に放出されていることが考えられ、AD の診断マーカーとして期待できる。

AICD はその NPTY 配列を用いて、FE65 に結合し AICD-FE65 複合体が核内に移行することにより転写活性化がおこることが知られている。Alc ICD も NP 配列を持ち FE65 に AICD と競合的に結合するため、AICD-FE65 の結合を減少させ、この結果 AICD-FE65 の転写活性化能を著しく抑制することを示した。

3. Alcadin は新規 Kinesin-I カーゴレセプターである

Alcadin の細胞質ドメインを用いた Yeast two-hybrid 法により、モータータンパク質 Kinesin-I のサブユニットであるキネシン軽鎖 (KLC1) を単離した。Kinesin-I は、キネシン重鎖 (KHC) 2 つとキネシン軽鎖 (KLC) 2 つのヘテロ四量体からなる微小管依存性のモータータンパク質であり細胞内での物質輸送を広く担っていると考えられている。

まず、生体内での Alc と Kinesin-I 複合体の結合を確認するためにマウス脳の膜画分を可溶化し、Alc β 、KLC1、KLC2 抗体を用いて共役免疫沈降を行った。その結果、Alc β より Kinesin-I のコンポーネントである、KHC、KLC1、2 が共役免疫沈降され、生体内で Alc β = Kinesin-I というカーゴ = モーター複合体が形成されている可能性が示唆された。次に、Alc β に蛍光タンパク質 Venus を融合し実際の細胞内での Alc β の動きを TIRFM (Total Internal Reflection Microscopy: 全反射顕微鏡)により観察した。その結果、Alc β -Venus は細胞内で ~ 1.2-1.6 μ m/sec の方向性を持った運動を行っていることが明らかになった。これは同じく Kinesin-I のカーゴ受容体と言われている APP (~ 3.0-3.8 μ m/sec)の約半分速度であった。ま

た微小管を破壊する薬剤である Nocodazole 処理によりこの運動が微小管依存性のものであることを確認した。

さらに GFP-KLC1 は普段は不活性化状態（カーゴを運んでいない状態）にあり、細胞質に局在するが、Alc をここに共発現させると、GFP-KLC1 は微小管上を Alc と共に運動するようになった（カーゴを運んでいる状態）。またこれも Nocodazole 処理により、微小管依存性の運動であることが明らかになった。Kinesin-I は生理的条件よりもやや酸性条件下で活性化され微小管上のカーゴを運ぶようになると言われていたが、Alcadein の細胞質ドメインには酸性領域があり、これが Kinesin-I の活性化を担っている可能性が示唆された。

4. 総括

本研究において私は新規ノンクラシカルカドヘリン分子 Alcadein を単離し、Alcadein が APP と類似した代謝様式を受けることによって、AICD-FE65 の転写活性化能を制御していることを明らかにした。さらに Alcadein は APP 同様、Kinesin-I に対するカーゴ受容体として働いていることを明らかにした。dAlc を過剰発現させたショウジョウバエはシナプス小胞が蓄積し、はい回れなくなることが予備的に明らかになっている。これより、1種類のカーゴ受容体を過剰に発現させると、モーター分子を過剰に独占してしまうため、他のカーゴが運ばれなくなること示唆しており、生体内で Alc がカーゴ受容体として機能している証拠と考えられる。今後、APP や Alcadein、または他のシナプス小胞のカーゴベシクルがどのような機序でモーター分子につなぎ換えを行っているのかを明らかにしていくことで、細胞生物学上の課題である“カーゴ問題”の一端を明らかにするばかりでなく、AD の発症原因やその予防・治療法に知見をもたらしていく可能性が考えられる。

5. 主要参考文献

1. Araki. Y., Tomita. S., Yamaguchi. H., Miyagi. N., Sumioka. A., Kirino. Y., Suzuki. T. Novel cadherin-related membrane proteins, Alcadeins, enhance the X11-like protein-mediated stabilization of amyloid β -protein precursor metabolism. *J. Biol. Chem.* 278, 49448-49458 (2003)
2. Araki. Y., Miyagi. N., Kato. N., Yoshida. T., Wada. S., Nishimura. M., Komano. H., Yamamoto. T., Strooper. B., Yamamoto. K., Suzuki. T. Coordinated metabolism of Alcadein and amyloid β -protein precursor regulates FE65-dependent gene transactivation. *J. Biol. Chem.* 279, 24343-24354 (2004)