

論文の内容の要旨

論文題目 APP結合分子の機能解析

氏名 住岡 暁夫

<背景>

アルツハイマー病は老化に伴い発症する最も患者数の多い老人性認知症で、現在まで有効な治療法は確立されていない。APP (Amyloid Precursor Protein)は 型膜タンパク質で、2回の切断を受けて A β を生成するが(Fig. 1)、A β の産生はAD発症と強く相関することが知られている。現在まで APPの生理機能は未解明な点が多く、APPの機能解析はAD発症の解析、治療法の探索を考える上で非常に重要である。

APPから切断により細胞内に放出される細胞質ドメイン(AICD)は、FE65と複合体を形成し転写活性化能を有すると2000年に報告された。しかし発現制御を受ける遺伝子の同定は明確に行われておらず、AICD+FE65複合体の転写活性機構も未解明である。

私はAPPの機能解明という最終的な目標に対して、AICDが転写シグナルに関与すると仮説を立て、AICD結合分子の解析を下流遺伝子の探索・検証の手段として研究を行った。

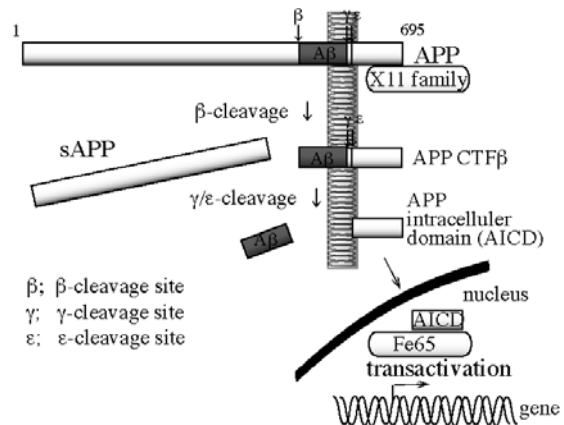


Fig. 1 APP代謝の模式図

APPはI型膜タンパク質で2回の切断を受ける。一段階目の切断の結果sAPP、CTF β を産生し、二段階目の切断によってA β 、AICDを産生する。

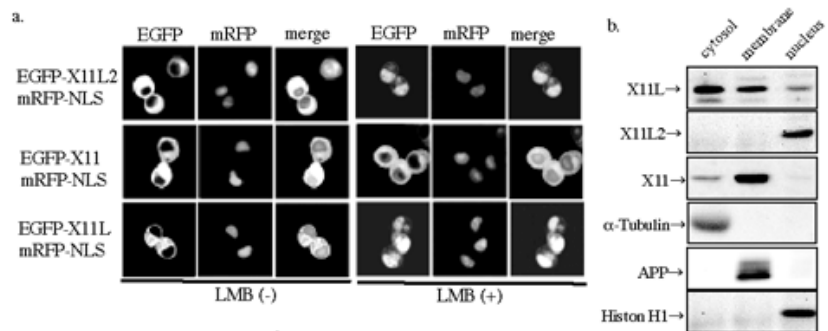


Fig. 2 X11 family分子の細胞内局在

a. N2-a細胞に各コンストラクトを強制発現、24 hr. 後さらにLMB, 50 ng/mlで5 hr. で処理しLSM-510で観察。LMBは Nucleo-cytoplasmic exporting Inhibitorである。

b. mouse brainを生化学的手法で分画し、各fractionをSDS-PAGE後、western blotで検出

<FE65 に関する解析>

AICD+FE65 複合体の転写活性化能は既に報告されている。FE65 の欠損コンストラクトを用いた解析から FE65 の 1st PI domain が必須であり、1st PI domain に結合する分子 Tip60 が重要な分子であると考えられている(1)。そして Tip60 の転写活性化能を指標に AICD の産生が転写活性化能に必要でない結論づけられている(2)。ここで使用された FE65 の欠損コンストラクトは、実際には FE65 の 1st PI domain と大きく離れた領域を欠損させている。そこで私は改めて複数の FE65 の欠損コンストラクトを作製し、Reporter gene assay により FE65 内の転写活性化能に重要な領域の同定を追試した。その結果、従来考えられていた 1st PI domain ではなく WW domain が必須であることを確認した。さらに WW domain に結合する分子について、報告のあるものを複数クローニングを行い、Reporter gene assay で、結合分子の中でも転写因子 YB-1 のシグナルに關与することを確認した。

<APP 結合分子の核移行性>

AICD は短いペプチド(49 アミノ酸)で既知の機能ドメインを有さないが、複数のタンパク分子が結合分子として確認されている。私は、APP の結合分子及びその関連分子の核移行性を検討する目的で、結合が報告された分子群をクローニングし、培養細胞に強制発現させ、Exportin 依存古典的な核細胞質輸送経路の阻害剤・LMB を用いて、強制発現した分子の局在を観察した。その結果、既に報告されていた FE65 以外にこれまで細胞質分子として考えられてきた X11L、X11L2 が LMB 処理時に核内に局在することを確認できた(Fig. 2a)。さらに、マウス脳を生化学的手法で分画し細胞内局在を調べたところ、X11L、X11L2 が核に存在することを確認した(Fig. 2b)。以上から X11L、X11L2 が核移行性を有することを明らかにした。

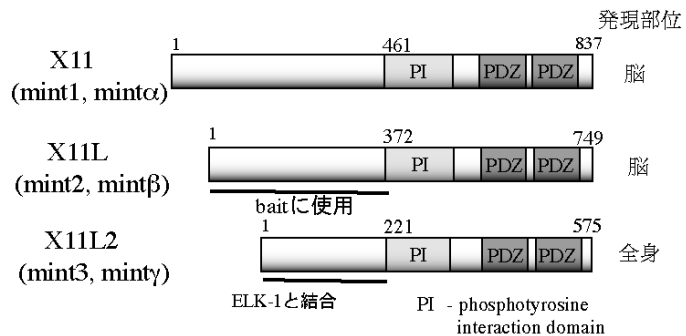


Fig. 3 X11 familyの構造
human X11 familyは、X11、X11L、X11L2から構成される。
X11 familyは相同性の低いN末端領域、APPと相互作用部位である PI domain、2つのPDZ domainを有する。

<X11L2 に関する解析>

Gal4 DNA binding domain を FE65 に融合したタンパク質 (Gal4BD-FE65) が転写活性化能を有すると報告されている。同様に Gal4BD-X11L2 が転写活性化能を有するかを、Reporter gene assay で検証した。その結果 Gal4BD-X11L2 は GalBD-FE65 と同様に Gal4BD 単独に比べ有意に高い転写活性が確認され (Fig. 4c)、Gal4BD-X11L2 が転写活性化能を有することを明らかにした。

さらに Gal4BD-X11L2 による転写活性化能の詳細な解析を進め、この活性が MEK 阻害剤(U0126)により抑制され (Fig. 4d)、転写因子

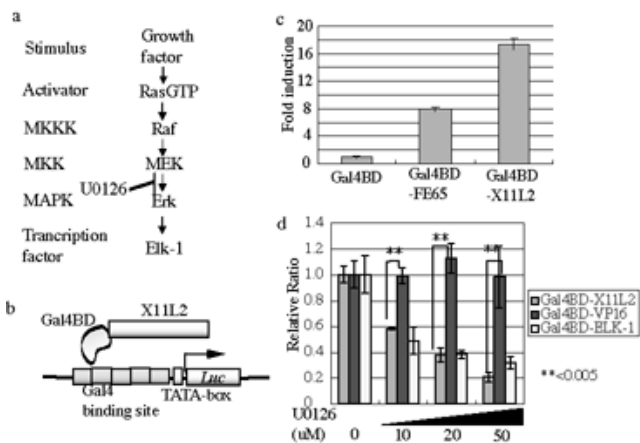


Fig. 4 Gal4BD-X11L2の転写活性の解析

- a. Erk シグナルの簡易概略
- b. Reporter assay 模式図
- c. N2-a細胞に各コンストラクトを強制発現させ、24 hr. 後に細胞を lysisし、Luciferase活性を測定。
- d. N2-a細胞に各コンストラクトを強制発現させ、指定濃度のU0126存在下で24 hr. 培養し、細胞をlysisし、Luciferase活性を測定。

ELK-1 と X11L2 が相互作用することを明らかにした。これらのことから X11L2 が Erk シグナリングのカスケードに位置する機能が予想された。

ELK-1 は ETS DNA binding domain を有し、DNA への結合方法として、1) SRF+ELK-1 複合体を形成し DNA 中の SRE (serum response element) に結合する、もしくは 2) ELK-1 単独で DNA 中の ETS binding site に結合する、2 種類の様式が報告されている。前者の例として c-Fos promoter の促進、後者の例として PS-1 promoter の抑制が挙げられる。内在性 X11L2 が転写シグナルに影響するかを評価するため、c-Fos promoter、PS-1 promoter を用いて、さらに内在性 X11L2 を RNAi によってノックダウンを行い Reporter assay を行った。その結果、内在性 X11L2 のノックダウンによって、c-Fos promoter の活性は低下し、PS-1 promoter の活性は上昇した。以上から内在性 X11L2 は ELK-1 による転写シグナルに促進的に機能していると考えられる。

<X11L に関する解析>

Gal4BD-X11L は Gal4BD-X11L2 と異なり、培養細胞系では十分な転写活性化能は検出されず、また X11L の N 末端領域に結合する転写因子の報告はない。そこで、X11L の N 末端領域を bait に、human adult brain library から yeast twohybrid 法によって結合分子の探索を行った。その結果、GR (Glucocorticoid Receptor) を単離し、培養細胞系での相互作用を確認した (Fig. 6a)。さらに X11L が GR シグナルへ与える影響を検討するため、GRE (GR の結合配列) を用いた promoter assay を行った。その結果 X11L により GR シグナルの促進が確認された。以上から、X11L は GR シグナルに関与することが想定できる。

<候補下流遺伝子についての検討>

以上から候補に挙げられる、X11L2+ELK-1 を介するもの、X11L+GR を介するもの、また報告のある FE65 を介する下流遺伝子について検討を進めた。-secretase inhibitor を用いて AICD の産生を止め、候補遺伝子の promoter assay を行い、promoter 活性の変動を検出した。その結果、X11L2+ELK-1+ETS binding site を介した経路と、定常的な活性値は低いものの X11L+GR を介した経路が -secretase inhibitor による制御を受けた。

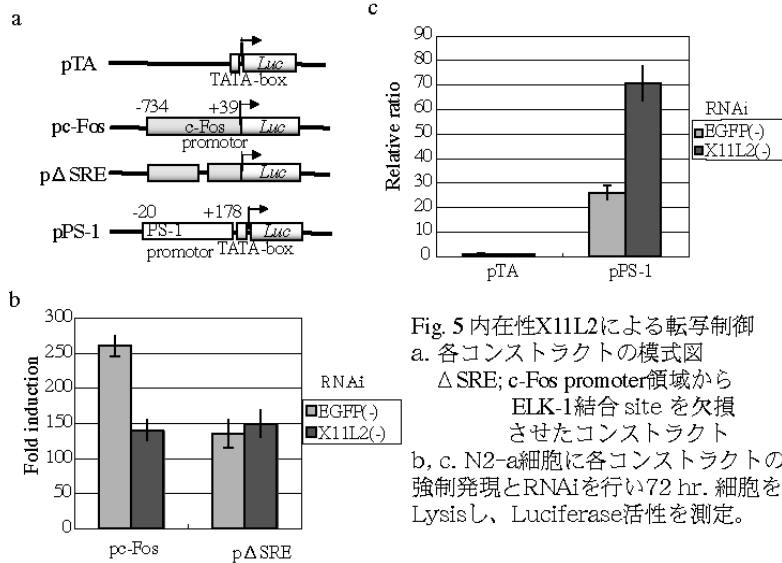


Fig. 5 内在性X11L2による転写制御
a. 各コンストラクトの模式図
ΔSRE; c-Fos promoter領域から ELK-1結合 site を欠損させたコンストラクト
b, c. N2-a細胞に各コンストラクトの強制発現とRNAiを行い72 hr. 細胞をLysisし、Luciferase活性を測定。

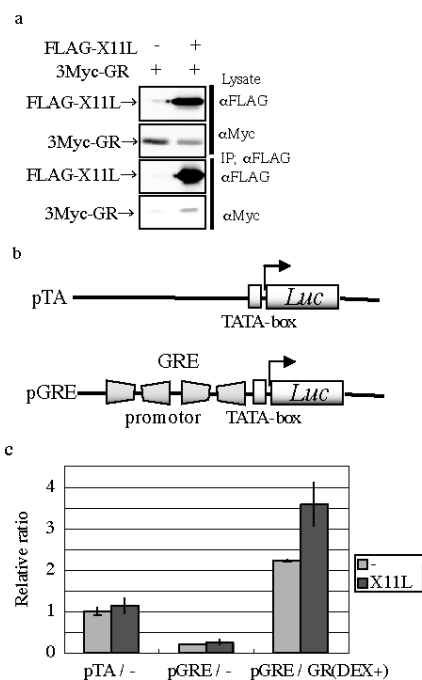


Fig. 6 X11LによるGRシグナルへの関与
a. N2-a細胞に各コンストラクトを強制発現、24 hr. で細胞をlysisし、X11Lを免疫沈降、共沈されたGRをSDS-PAGE後Western Blotで検出
b. コンストラクト模式図
GRE; Glucocorticoid receptor response element
c. N2-a細胞に各コンストラクトを強制発現、更にDEXで24 hr. 刺激後、細胞をlysisしLuciferase活性を測定
DEX; GR agonist

<14-3-3 に関する解析>

Gal4BD-AICD による転写活性に必要な領域は 666-695 a.a. (APP695)である。この N 末端領域側(666-680)を bait にした two-hybrid screening により結合分子の探索を行ったところ 14-3-3 protein が単離された。14-3-3 protein family は真核生物に広く存在し、最も発現量の多い蛋白の一つである。14-3-3 protein family は多くの場合、結合分子に対してリン酸依存的に相互作用を行う。そして 14-3-3 は、target 分子への結合により酵素活性の制御や局在の制御を行う、機能制御機構の場を与える足場蛋白である。そこで、14-3-3 protein family の APP との相互作用の解析と Gal4BD-AICD による転写活性への寄与について検討を行った。

Human 14-3-3 protein family は、*Y143*、*Y144*、*Y145*、*Y146*、*Y147*、*Y148*、*Y149* の 7 分子から成る。これらをクローニングし、APP との相互作用を検証した。APP 647-695 peptide と精製 GST-14-3-3 を用いた In vitro の pull down assay から、AICD と 14-3-3、phosphorylated AICD-Thr668 と 14-3-3 がそれぞれ相互作用を行うことが分かった。また、マウス脳可溶性サンプルと抗 14-3-3 抗体を使用した In vivo の共役免疫沈降法から、APP と 14-3-3 の相互作用が確認された。次に、Gal4-BD-AICD の転写活性への寄与について検討を行った。その結果、14-3-3 protein は Gal4BD-AICD+FE65 複合体による転写活性に促進的に寄与し、14-3-3 protein は Gal4BD-AICD+X11L2 複合体による転写活性に促進的に寄与することが分かった。以上の結果は、AICD による転写シグナルに、Thr668 のリン酸化と 14-3-3 protein の相互作用を介し、制御を行う可能性を示唆している。

<まとめ>

私は今回の研究によって、これまで細胞質蛋白として考えられてきた X11L2、X11L の核移行性を見出し、その核内機能について解析を行った。その結果、X11L2 は ErK シグナルに関与し、ELK-1 による転写シグナルに機能することを明らかにした。さらに、ELK-1 による転写シグナルの内、ETS binding site を Target にするシグナルでは β -secretase inhibitor の影響を受け、これは AICD による転写制御が示唆される。また、X11L による GR シグナルへ関与する可能性を明らかにした。GR は社会的ストレスへの応答に関わる分子で、X11L は組織内での発現分布について GR と良く一致しており、X11L のノックアウトマウスでは社会的ストレスへの応答に異常が見られる。今回得られた知見は X11L の機能解析に大きく寄与すると期待できる。

今回、X11L2、X11Lの解析によって得られた知見によって、AICDによる転写シグナルを想定したTarget遺伝子が挙げられた。今後さらなる詳細な解析と、ADとの関係の有無などの検討が必要である。