

$\alpha 1$ -chimaerin とアミロイドの相互作用メカニズムと アルツハイマー病の病態への関与

[1] 組織

代表者：小西 吉裕

(鳥取医療センター)

対応者：安井 明, 菅野新一郎

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：森本 香織, 吉田衣智子

(鳥取医療センター)

研究費：物件費30万円

[2] 研究経過

(目的) 脳における β -amyloid peptide ($A\beta$) の産生・凝集・沈着による老人斑の形成は、アルツハイマー病 (AD) にみられる特徴的な病理学的変化である。 $A\beta$ が本来果たす生理学的役割や代謝経路は完全には解明されていない。単に $A\beta$ 自体が oligomer の形成や凝集により細胞毒性を發揮するだけが神経細胞変性に至る病態ではなく、むしろ $A\beta$ の量的 (あるいは質的) 異常が本来の $A\beta$ の生理的機能を損なう結果、神経細胞が機能異常に陥り AD が発症する可能性も推測される。後者の場合、 $A\beta$ が何らかの分子と相互作用しその機能を調節するのが本来の $A\beta$ の生理機能の 1 つと仮定し、このような分子の探索を行い、その生理作用、両者の相互作用を解明する研究は、AD の分子病態解明及び治療法の開発に新たな道を開くことになる。

以上の理由により、 $A\beta$ と結合するタンパク質を同定し、その機能を解析することを目的に human brain cDNA library をスクリーニングし、分子の探索を行った。その結果、 $\alpha 1$ -chimaerin をコードするクローンを同定した。既知の分子であったが $A\beta$ との相互作用は報告されていなかった。 $\alpha 1$ -chimaerin は、RAS 関連 p21(RAC) に対する GTPase 活性化タンパク質 (GTPase-activating protein: GAP) で、神経細胞特異的である (Lim et al., Biochem J 287, 415, 1992)。

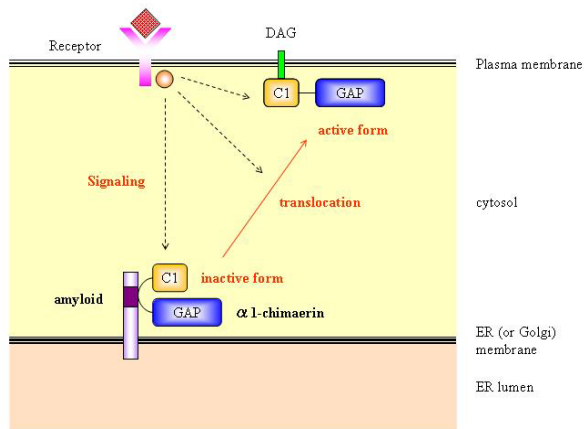
α -chimaerin には 2 つの isoform があり、 $\alpha 2$ -chimaerin においては、N 末端領域と SH2 ドメインを介して C1 ドメインと相互作用し自己抑制することが知られている (Colón-González et al., J Biol Chem 283, 35247, 2008)。この自己抑制は EGFR などの活性化により解かれ、C1 ドメインを露呈させるシグナルを出す。しかし、 $\alpha 1$ -chimaerin は上記 N 末端領域と SH2 ドメインを持たない。このため、 $\alpha 1$ -chimaerin を

不活性型として保持するような $\alpha 2$ -chimaerin とは別の機構が存在することが示唆される。そこで、我々はこれまでの結果から、 $A\beta$ がそのメカニズムに関与する可能性があるのではないかと推測した。本研究は、 $A\beta$ と $\alpha 1$ -chimaerin の相互作用機構とそれによる細胞の形態・機能的な変化を明らかにし、新たな $A\beta$ の機能としての $\alpha 1$ -chimaerin の不活性化、ひいては AD の病態への関与のメカニズム解明に迫ることを目的とする。

(概要) 我々はこれまでに、リコンビナント $\alpha 1$ -chimaerin タンパク質を用いて Dot blot 法を行い、 $\alpha 1$ -chimaerin と $A\beta$ の結合を確認した。さらに、 $\alpha 1$ -chimaerin の deletion mutant を作成し、Far-Western 法によって $A\beta$ との相互作用部位を同定した。また、FLAG 融合 $\alpha 1$ -chimaerin と、NGFP 融合 C99 ($A\beta$ の C 末端ドメインを含む C 末断端) を細胞で共発現させ、免疫沈降法により $\alpha 1$ -chimaerin と C99 における相互作用を確認した。NGFP 融合 $\alpha 1$ -chimaerin と Ds Red 融合 C99 を HeLa 細胞、または U2OS 細胞で共発現させた結果、 $\alpha 1$ -chimaerin と C99 がゴルジ体または小胞体で共局在していることが示された。さらに、in situ hybridization 法により、control 例と AD 例の両群において、側頭葉皮質と海馬の神経細胞に $\alpha 1$ -chimaerin が発現しており、その発現が AD 症例の側頭葉皮質や海馬で減少していることも明らかにした。real-time PCR 法でも、AD 例の脳で $\alpha 1$ -chimaerin mRNA の発現の著しい減少が示された。蛋白レベルでは、mRNA レベルほど著しくはないが、AD 例の側頭葉皮質で低下していた。また、AD 例の髄液中では、 $\alpha 1$ -chimaerin の濃度が減少傾向にあることもわかった。機能的には、PC12 細胞を $A\beta$ 処理すると、 $\alpha 1$ -chimaerin が活性化されないことも判明した。

これまでの結果より、ゴルジ体または小胞体で APP あるいは C99 の産生が増加することによって、 $A\beta$ もしくは C99 と $\alpha 1$ -chimaerin の相互作用、及び $\alpha 1$ -chimaerin の活性化状態や細胞内局在が影響を受けると考えられる。その結果、次図に示すように、 $A\beta$ もしくは C99 が増加すれば、その結合により $\alpha 1$ -chimaerin がジアシルグリセロールやホルボール

エステルによって細胞膜に移動して活性型となるのが妨げられ、その結果 p21-Rac を不活性化する GAP としての酵素機能が阻害されるのではないかと推測できる。



これ以降の本研究は、上記の仮説を証明するため、APP あるいは C99、もしくは Aβ の産生の亢進によって、α1-chimaerin の RAS 関連 p21(RAC) に対する脳 GTPase 活性化タンパク質 GAP としての機能や、GAP により不活性化される p21-Rac 系の変化、ひいてはそれにより惹起される神経細胞の形態的・機能的変化が AD 脳でみられる形態変化や分子病態に一致するのかが確認することにある。

(研究打ち合わせ等の開催状況) メールおよび電話で、研究計画および方法論について幾度か話し合った。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

まずは、APP あるいは C99、もしくは Aβ が α1-chimaerin とゴルジ体や小胞体のどこで出会うのかを明らかにする必要がある。ゴルジ体や小胞体の中と外で pH が異なることを利用し、pH の違いで色が変わる蛍光色素で Aβ や α1-chimaerin をラベルして調べる方法や、あるいは免疫電子顕微鏡技術を用いる方法などを検討中である。

その前提のもと、APP あるいは C99、もしくは Aβ が α1-chimaerin に結合することで、α1-chimaerin の GAP としての働きが阻害されることを APP と α1-chimaerin の siRNA 技術による機能阻害で代用して培養細胞への影響を調べる実験を行っている。まだ条件を工夫する必要があるが、まずは α1-chimaerin の機能阻害 siRNA にて行い、mRNA および蛋白質レベルで発現が抑制されること、GAP の酵素活性が抑制されることを確認した。それに伴い、培養細胞の培養表面への接着性に变化がみられた。現在、それを客観的に評価する実験を

行っている。現に、p21-Rac 系は細胞骨格再編成に関与していると報告されている (Herrera and Shivers, J Cell Biochem 56, 582, 1994)。さらには、α1-chimaerin の機能阻害によるアミロイドの細胞内局在の変化や RAS 関連 p21 (RAC) 系の変化などの測定を行う。また、その培養上清を用いて、可溶性 APP (sAPP α 及び sAPP β) や Aβ1-40 及び Aβ1-42 を ELISA によって測定し、細胞内外におけるアミロイド局在の変化についても検討を行う。また、Aβ を産生する酵素である α-セクレターゼ及び β-セクレターゼ活性についても測定を行う。一方、アミロイドを機能阻害するために APP の siRNA も検討し、mRNA や蛋白質レベルでの抑制を確認している。それにて α1-chimaerin の細胞内局在の変化について検討する。

以上より、アミロイドと α1-chimaerin の相互作用機構を解明し、それが神経細胞機能、ひいては AD の病態へどのように関与するのかが検討する計画である。

(3-2) 波及効果と発展性など

(大型プロジェクトへの発展・国際会議 (シンポジウム) への発展・学外研究者との交流、共同研究による効果・研究者ネットワークの拡大・若手研究者の育成・新研究領域の開拓・成果の他分野への応用・萌芽的研究への発展等)

本共同研究を遂行することにより、他の幾つかの研究施設の研究者との交流が飛躍的に活性化した。

[4] 成果資料

一部成果は、平成 23 年 7 月に、パリで開催された国際アルツハイマー病会議、および同年 9 月に米子で開催された日本認知症予防学会で発表した。平成 24 年度中に論文とする。