

## アルツハイマー病病態への $\alpha 1$ -chimaerin とアミロイド相互作用機序の関与

### The interaction of $\alpha 1$ -chimaerin with $\beta$ -amyloid involved in the Alzheimer's disease pathology

#### [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：

三浦由真子, 荒木紀帆

(鳥取医療センター)

研究費：物件費 20 万円

#### [2] 研究経過

(本研究の目的) 脳における  $\beta$ -amyloid peptide (A $\beta$ ) の産生・凝集・沈着はアルツハイマー病 (AD) にみられる特徴的な病的変化であるが、A $\beta$  が本来果たすべき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毒性を発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 つとも仮定できる。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新たな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)。

$\alpha$ -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

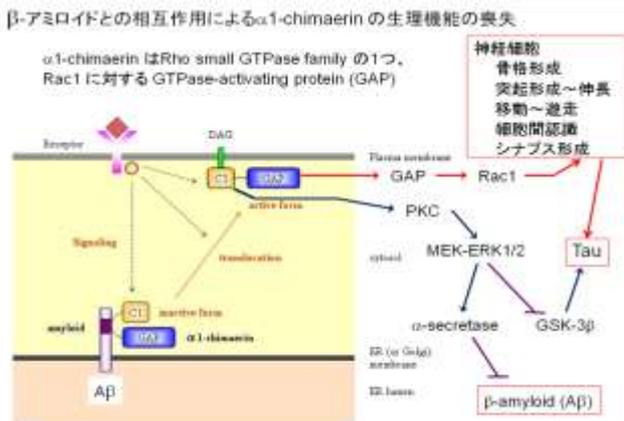
を出す。しかし、 $\alpha 1$ -chimaerin は上記 N 末端領域と SH2 ドメインを持たないため、 $\alpha 1$ -chimaerin を不活性型として保持するような  $\alpha 2$ -chimaerin とは別の機構が存在することが示唆される。そこで、我々はこれまでの結果から、A $\beta$  がそのメカニズムに関与する可能性があるのではないかと推測した。本研究は、A $\beta$  と  $\alpha 1$ -chimaerin の相互作用機構と、それによる  $\alpha 1$ -chimaerin の機能異常や細胞の形態・機能的な変化を明らかにし、新たな A $\beta$  の機能としての  $\alpha 1$ -chimaerin の活性調節、ひいては AD における神経細胞死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。

(本研究の概要) 我々はこれまでに、リコンビナント  $\alpha 1$ -chimaerin タンパク質の deletion mutant を作成し、Far-Western 法によって A $\beta$  との相互作用部位が C1 ドメインであることを特定した。また、FLAG 融合  $\alpha 1$ -chimaerin と、NGFP 融合 C99 (APP の A $\beta$  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。

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  $\alpha 1$ -chimaerin 分子を構成する GAP ドメインと C1 ドメインの機能が発揮できなくなるのではないかと推測できる。とくに A $\beta$  は C1 ドメインと結合するために、C1 ドメインの機能変化に注目した。

(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。平成 25 年初頭には、当研究室スタッフを派遣

した。派遣はこれで2回行っている。



### [3] 成果

(3-1) 研究成果：上記の仮説を証明するために、以下のような実験を計画し、進行中である。(1) APP あるいは C99, もしくは Aβ の産生の亢進によって、Aβ が α1-chimaerin の C1 ドメインに結合し、C1 ドメインの機能が阻害されるか否か検討している。C1 ドメインは PKC 活性を有するとされている (Colón-González and Kazanietz, *Biochem. Biophys. Acta* 1761, 827, 2006)。PKC は上図のように、MEK/ERK 系を介して α-secretase 活性を高め、GSK-3β 活性を抑制することが知られている。現在、培養細胞に α1-chimaerin と APP を過剰発現させて、α-secretase 活性および GSK-3β 活性を測定することの準備を進めている。さらには、α-secretase の変化で他の secretase に変化が及ぶか、GSK-3β の変調がタウ蛋白リン酸化に影響するかを検討する。その際、APP を transfect して Aβ を過剰に産生させるには、家族性 AD の原因の 1 つである London mutation (Chartier-Harlin et al., *Nature* 349, 704, 1991) と Swedish mutation (Crawford et al., *Nat. Genet.* 1, 345, 1992) を持った APP を細胞に導入することが必要で、現在、その double mutant APP の cDNA をクローニング中である。(2) Aβ が α1-chimaerin の C1 ドメインに結合することで、隣の GAP ドメインが影響するのかが検討する。これは、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 (Herrera and Shivers, *J Cell Biochem* 56, 582, 1994) 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。(3) さらに、過剰発現系のみならず、α1-chimaerin もしくは APP の遺伝子発現を抑えた場合においても、お互いの分子の機能や細胞内動向に変化がくるのか検討する。遺伝子発現をブロックする方法として siRNA にて

α1-chimaerin 発現を蛋白レベルで抑制することに成功した。APP 発現の抑制は、現在行っている。(4) APP あるいは C99, もしくは Aβ が α1-chimaerin と細胞内のどこで会うのかを明らかにする必要がある。cytosol にある α1-chimaerin と膜蛋白である Aβ はどこで会うのか、出会う確率は小さいのではないのかという質問を学会発表時に著名な AD 研究者から受けている。それを解決するために、平成 25 年度は上半期、スタッフを二重免疫電子顕微鏡技術を専門とする研究者のもとに 2 カ月派遣して double immunoEM を試みたがまだ成功していない。しかし、これについては東北大側と検討を行い、出会うという報告がある (Penke et al. *Electrophoresis* 33, 3608, 2012) ので電顕までは不要ではないかと思われるに達している。

(3-2) 波及効果と発展性など：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。髄液は東北大加齢医学研究所の荒井教授にご協力いただいている。本研究の結果次第では、α1-chimaerin は AD 治療の良きターゲットと成り得る。Amyloid hypothesis を元に Aβ を直接ターゲットとする治験が失敗する現状で、amyloid hypothesis の中で Aβ が AD の病態の本流ではなく、それと相互作用する分子の機能異常が AD 病態の本流とし、相互作用する分子を AD 治療のターゲットにする方法は今後非常に重要な AD 治療戦略になると期待される。PKC 活性が AD で低下していることは古くから知られている (Masliah et al. *J. Neurosci.* 11, 2759, 1991) が、それがなぜ起こるかは明白でなかった。それに一定の説明ができることになる。PKC は上図のように、MEK/ERK 系を介して α-secretase と GSK-3β に繋がっている。α-secretase は Aβ に、GSK-3β はタウリン酸化に関係しており、AD での 2 大 hallmark を結び付ける分子としておおいに脚光をあびよう。

### [4] 成果資料

現在、α1-chimaerin の AD 脳における mRNA および蛋白レベルの変化に関する結果だけを第一報として論文執筆中である。