

課題番号 51

C1-domain を含む分子 (PKC, chimaerin, 等) と β -amyloid との相互作用, およびアルツハイマー病の病態形成への関与に関する研究

[1] 組織

代表者: 小西 吉裕

(国立病院機構鳥取医療センター臨床研究部)

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:

西尾 愛子 (国立病院機構鳥取医療センター臨床研究部)

下田 有紀 (国立病院機構鳥取医療センター臨床研究部)

加藤 智子 (滋賀医科大学神経難病研究センター)

研究費: 物件費 11 万 1.7 千円

旅費 18 万 8.3 千円

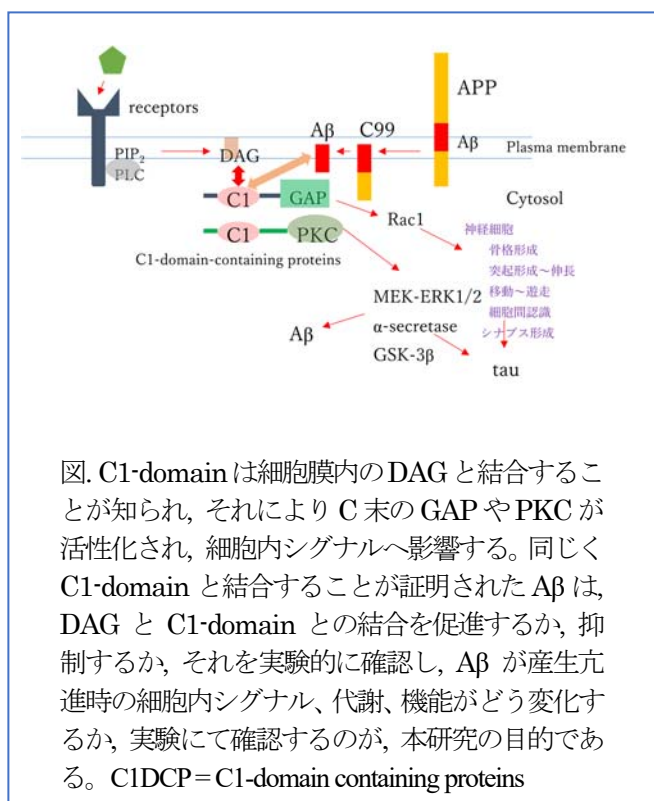
[2] 研究経過

アルツハイマー病発症・進展の分子機能の解明は、アミロイド仮説に基づく試験的治療がほぼ失敗となっている現状において、その治療法の見直しが迫られている中、その解明の作業も見直しが必要である。それにより、同病の分子病態の研究、およびそれに基づく新たな治療戦略法の開発は、近年ますますその重要性が再認識されている。

本共同研究は、 β -アミロイドと相互作用する分子、 $\alpha 1$ -chimaerin が、その C1-domain を介する相互作用により、 β -アミロイド側から見るのではなく、 $\alpha 1$ -chimaerin の細胞内機能がどう変化するか解析することにより、新しい同病の治療戦略考案に寄することを目的としている。これは、さらに C1-domain を有する他の分子 (PKC など) との相互作用による細胞機能への影響の解析に発展させることができる (図)。この図で示す通り、 $A\beta$ が C1-domain へ結合することで C1-domain-containing proteins (CIDCP) の機能が変化し、それでアルツハイマー病脳でみられる分子レベル、細胞レベルでの病的変化を説明できればと考えている。

以下、研究活動状況の概要を記す。本研究の打ち合わせは、平成 29 年 6 月 11~19 日に当研究室の下

田を仙台へ派遣し、研究計画の確認を行い、仙台、鳥取での分担を明らかにし、実験に取りかかった。そして、途中経過の結果を持って、平成 30 年 2 月 18~24 日に、再び下田を仙台へ派遣して、結果のまとめと次年度へ向けての計画を検討した。いずれにおいても、代表者の小西も、平成 29 年 6 月 12 日、平成 30 年 2 月 22 日に仙台へ行き、検討会に参加した。



[3] 成果

(3-1) 研究成果

本研究申請書でも記載したように、本研究は3つのパートから成っており、(i) PKC, chimaerins 等の C1-domain に結合する DAG の合成亢進はどのような機序で起こるか。(ii) DAG が PKC や chimaerins の C1-domain に結合すると、CIDCP の細胞内 translocation が起こる。膜にある $A\beta$ も C1-domain に結合し得るが、DAG と $A\beta$ は競合するのか、協働するのか。(iii) chimaerins 等の CIDCP が膜直下へ移動することで、chimaerins の C 末にある GAP 活性化

PKC 活性がどう変化するか。A β がある場合はどうなるのか、亢進する結果となるのか否か。

このうち、本年度はパート(ii)を中心にそれを達成させるために実験を行ってきた。

(a) GST-tagged C1DCP と His-tagged A β を使った Far Western blot 解析: C1DCP のうち、 α 1-chimaerin に関しては、すでに A β を相手として用いて、A β は α 1-chimaerin の C1-domain 部分に結合することは幾回か Far Western blot 実験し、証明済みである。

PKC に関しては、種々の PKC isoforms を大腸菌に作らせて、電気泳動でサイズを確認まで終了しており、来年度は実際の Far Western blot を行い、PKC の C1-domain と A β が結合することを検証して行く。

また、Far Western blot にて、A β が結合する α 1-chimaerin 分子内部分は C1-domain (71-136 aa) が主ではあるが、微かに、それよりも N 末部分 (1-79 aa) にも結合する結果を得た。この α 1-chimaerin の N 末部分は α 1-chimaerin の proteasomal degradation に関係しているとの報告がある。よって、 α 1-chimaerin を定常的に発現している培養細胞を proteasome activity inhibitor である MG132 で処理したものと、していないもので、その培養細胞の α 1-chimaerin に結合している蛋白質の電気泳動パターンの違いを検出し、mass spectrometry を使い、その結合する蛋白質が何か、そこに A β が含まれているか検討することを行っており、これも来年度に引き続き行ってゆく予定である。現在の時点では、その結合蛋白として、プロテインキナーゼ PRKCK, DAPK1, CSNK1A1 等を同定した。

(b)Flag-tagged C1DCP と GFP-A β を培養細胞に導入しての co-immunoprecipitation: C1DCP のうち、 α 1-chimaerin に関しては、すでに APP 分子内の A β とその C 末部分 (細胞内ドメイン) を有する分子との結合は co-immunoprecipitation にて証明済みであるので、A β のアミノ酸配列が逆の、例えば A β 42-1, さらには APP 全長 との co-immunoprecipitation を行う計画である。必要な constructs は作成中である。

(c)DAG/PE および A β の C1DCP の細胞局在に対する影響: GFP-tagged α 1-chimaerin (あるいは PKCD) と dsRed-tagged A β を共に培養細胞に導入して、GFP-tagged α 1-chimaerin (あるいは PKCD) のみの細胞内導入での α 1-chimaerin (あるいは PKCD) の細胞内局在部位との比較を行う。このための各種 constructs 作成は、上の(a), (b) にも共通することで、現在、それを作成中である。

DAG (phorbol ester) と A β の両方が存在したら、CaDCP への競合するか、あるいは協働して C1-domain へ結合するのか、それによって細胞内の α 1-chimaerin の発現や細胞内局在がどう変化す

るのか、さらに進めてゆきたい。それを確認するために、 α 1-chimaerin と A β をコードする遺伝子両者を細胞内に導入するという上記の方法以外に、 α 1-chimaerin を定常的に発現している培養細胞に APP 遺伝子を導入し、A β をより多く産生する Swedish APP mutant と、それより A β 産生が少ない Swedish + London APP mutations や wild type APP との比較の上で、 α 1-chimaerin の発現や細胞内局在を検討する計画であり、すでに実験中であるし、来年度も継続してゆく計画である。そのために、APP 遺伝子導入、APP や α 1-chimaerin 遺伝子を si 技術で発現抑制し、Western blot 上で α 1-chimaerin や A β oligomers/monomers を確認することを、本年度は方法確立のために行ってきた。それを免疫細胞学的染色で確認するための抗 A β 抗体の選択と α 1-chimaerin 抗体の作成 (市販されていない) を行って来た。次年度は、培養細胞への DAG/PE 添加が、A β と α 1-chimaerin の結合、 α 1-chimaerin の発現や細胞内局在に影響するのかを、DAG/PE 添加手順は既報 (Coloca MJ, et al. J Biol Chem. 1997; Colón-González F, et al. 2008) の方法を参考にしつつ、 α 1-chimaerin を定常的に発現している培養細胞を使い、免疫細胞染色、細胞分画 (Coloca MJ, et al. J Biol Chem. 1997; Colón-González F, et al. 2008 を参考) などの Western blot 解析にて行うための準備中である。

(3-2) 波及効果と発展性など

上記のパート(ii) から更に発展させ、(i), (iii) のパートへと進み、アルツハイマー病脳でみられる病的な変化を、分子レベル、細胞レベルにおいて、A β の結合により変化した C1DCP の機能的異常変化で説明できれば、現在の行き詰っている「アミロイド仮説」を、それを肯定しつつも更に進展させ、アルツハイマー病の病態における「Amyloid plus C1-domain dysfunction hypothesis」なるものを樹立できるかもしれない。これを、本共同研究において、東北大学加齢医学研側からは、学外研究者との交流により証明できれば、両者の交流がさらに飛躍的に活性化し、新たな仮説に基づくアルツハイマー病の新しい治療戦略法の開発に結びつき、今後の発展が期待される。

[4] 成果資料

今年度はない。