

課題番号 55

C1-domain を含む分子と 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 (東北大学加齢医学研究所)

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)

清水 拓郎

(国立病院機構鳥取医療センター臨床研究部)

研究費：物件費 15 万円

[2] 研究経過

アルツハイマー病の発症・進展の分子機構の解明については、アミロイド仮説に基づく治験が期待外れに結果し同仮説の見直しが論議されている中、依然として β -アミロイド ($A\beta$) が同病の主要な原因であり、病態形成の中心と考えられている。しかし、同病の病態の全容は明らかになっておらず、**disease-modifying** な治療法も見つかっていない。高齢化に伴い認知症が社会問題となっている現在、同病の病態解明・治療法開発は喫緊の問題として、近年その重要性は益々増している。従来のアミロイド仮説に捉われない発想の転換も求められているところである。

そのような状況の中、 $A\beta$ と相互作用する分子についても数多く発見され報告されてきたが、その多くの場合、相互作用による $A\beta$ の産生や毒性などへの影響が論議されてきた。本研究は、 $A\beta$ と相互作用する分子としての $\alpha 1$ -chimaerin が、その C1-domain を介して $A\beta$ と相互作用することにより $A\beta$ 側の影響に注目するのではなく、 $\alpha 1$ -chimaerin や PKC などの C1-domain を含む諸分子 C1-domain-containing protein (C1DCP) 側の機能変化に基づく細胞レベルでの変化を解析し、アルツハイマー病でみられる分子レベルの変化が説明可能かを見極め、ひいては、有効な治療法開発に役立つ

ことを目的とする。

具体的には、下図で示したように、本研究は 3 つの部分から成っている。(i) C1DCP の C1-domain に結合する DAG の合成亢進のメカニズムを解明する。(ii) C1DCP の C1-domain と DAG が結合することで起こる C1DCP の translocation に、 $A\beta$ の C1-domain への結合はどのような影響を表すか解明する。(iii) C1DCP の translocation により PKC や chimaerin の GAP 活性促進は、 $A\beta$ の C1-domain への結合によりどのような影響を受けるか解明する。以上の 3 部分のうち、現在は (ii) を中心に研究を進めている。

本研究の活動状況は、前年度の研究を継続の形で平成 30 年度も開始し、代表者が他の用事で仙台を訪れた 6 月に、東北大加齢研側の研究者と討論を行った他は、主に電子メールでやり取りしつつ研究を進めた。

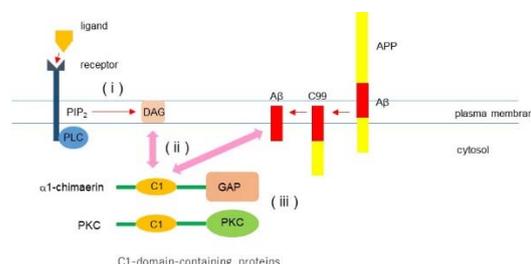


図. C1-domainは細胞膜内のDAGと結合することが知られ、その結合によりC末のGAPやPKCが活性化され、細胞内シグナルへ影響する。同じく、C1-domainと結合することが証明されている $A\beta$ は、DAGとC1-domainとの結合を促進するのか、抑制するのか、それを実験で確認するのが、本研究の根幹的な目的である。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は、引き続き、上で示した (ii) を中心に研究を進めた。C1DCP の 1 つ、 $\alpha 1$ -chimaerin と $A\beta$ の相互作用を細胞レベルで見るのに、 $\alpha 1$ -chimaerin を定常的に発現している株化細胞を使用している。それに、amyloid 前駆体蛋白 (APP) の遺伝子 DNA を組み込んだプラスミド DNA のトランスフェクションを行い、細胞内での両者の相互作用を調べている。まず第1に、信頼性のあるデータを得るために、市販されていない抗 $\alpha 1$ -chimaerin 抗体を作成し homology の高い $\alpha 2$ -chimaerin を認識しない抗体を作成すること、 $A\beta$ を認

識するが APP は認識しない抗 A β 抗体を使用すること、細胞に APP 遺伝子を導入し、目的の A β が産生されていることを免疫細胞染色および Western blot 解析で確認すること、相互作用の確認のために siRNA 技術により APP や α 1-chimaerin の蛋白合成を抑制する方法を確立すること等、を踏まえて実験を行っている。

特異的な抗 α 1-chimaerin をすでに得ている (38 kDa の α 1-chimaerin 分子を認識)。また、市販の MOAB-2 抗体 (凝集していない A β を認識するが APP は認識しない) を使用し、APP 遺伝子を導入した培養細胞で染色性を検討している。APP 遺伝子を培養細胞に導入後、cell lysates を Western blot 解析し、A β の oligomers の他、4 kDa の monomer まで検出できるようになり、siRNA で APP 合成をブロックした際、monomer A β まできちんと消えているか、正確に確認できるようになった。その上で、上述の (ii) を完成させ、さらには (iii) へと実験を進めてゆく予定である。

α 1-chimaerin と A β との相互作用については、少なくとも前者の C1-domain に A β が結合することは証明済みであるが、第 2 の興味は、 α 1-chimaerin などの C1DCP と tau 蛋白、もしくはそのリン酸化に関わっている諸分子との相互作用である。flag-tagged α 1-chimaerin を定常的に発現している細胞の cell lysates を抗 flag 抗体で免疫沈降し、それを電気泳動して得た幾つかのバンドを質量分析することで、 α 1-chimaerin に結合する蛋白質として、プロテインキナーゼ PRKCQ, DAPK1, CSNK1A1 などが同定できた。特に DAPK1 は、tau 蛋白の蓄積とリン酸化を促進することが報告されており (Human Mol. Genet. 25, 2498, 2016) , α 1-chimaerin と tau 蛋白の関係性を調べてゆく計画である。

現在のところ、上で述べた実験は、 α 1-chimaerin を定常的に発現している HEK 293 細胞で行っている。データを論文にした際、必ず、primary neurons で確認したか問われることになる。よって、本研究の第 3 番目の点は、ヒト皮膚線維芽細胞から iPS 技術で幹細胞化し、さらに神経細胞に分化させ、それをアルツハイマー病例から神経細胞を得て、それをを用いて HEK 293 で得た結果を確認する計画を進めている。現在、幹細胞化まで成功している。

(3-2) 波及効果と発展性など

本研究を共同研究にて行い、引き続き、研究の (ii) , (iii) を完成させて論文化すれば、大型プロジェクトへの発展が期待される。

[4] 成果資料

Kato, T. et al. Alpha1-chimaerin, a Rac 1 GTPase-activating protein, is expressed at reduced mRNA levels in the brain of Alzheimer's disease patients. Neurosci. Lett. 591, 19-24, 2015