

博士論文

アミロイド前駆体タンパク質 APP の機能解析及び
その代謝産物 β CTF による小胞輸送障害機構の解明

令和 4 年 3 月

金城 那香

岡山大学大学院

医歯薬学総合研究科

博士後期課程

薬科学専攻

目次

略語表	6
使用薬物・材料一覧	8
使用抗体一覧	11
要約	12
序論（第1章）	13
第1章 APP代謝及びその機能に対する A β 配列・膜近傍配列の解析	
1-1. 目的.....	16
1-2. 実験方法	
1-2-1. 細胞培養	16
1-2-2. ゲノム編集.....	16
1-2-3. APP 変異体の選択	17
1-2-4. 変異の同定	17
1-2-5. トランスフェクション, RNA 干渉及び分化誘導	17
1-2-6. RT-PCR 法.....	18
1-2-7. 試薬処理.....	19
1-2-8. ウェスタンブロット.....	19
1-2-9. 統計解析.....	19
1-3. 実験結果	
1-3-1. 同定された変異.....	20
1-3-2. 同定された変異が APP 代謝に及ぼす影響	22
1-3-3. 各変異体が突起伸長へ及ぼす影響	26
1-3-4. APP 及びその代謝物が突起伸長へ及ぼす影響	28
1-4. 考察.....	30
終章（第1章）	32
序論（第2～5章）	34
第2章 内因性 TMEM30A・ β CTF 複合体形成による両者の局在変化	
2-1. 目的.....	38

2-2. 実験方法	
2-2-1. Plasmid DNA コンストラクトの作製.....	38
2-2-2. 細胞培養.....	39
2-2-3. 4G8 抗体を用いた A β の免疫沈降法.....	39
2-2-4. 共免疫沈降法.....	39
2-2-5. イオジキサノール密度勾配遠心によるオルガネラの分画.....	40
2-2-6. 免疫染色.....	40
2-2-7. ウェスタンブロット.....	41
2-2-8. 統計解析.....	41
2-3. 実験結果	
2-3-1. BACE1 恒常発現細胞の樹立.....	42
2-3-2. TMEM30A と β CTF の結合.....	44
2-3-3. TMEM30A と β CTF の局在変化.....	46
2-3-4. エンドソームの形態変化.....	48
2-4. 考察.....	51

第 3 章 β CTF の増加によるリピッドフリッパーゼ機能不全

3-1. 目的.....	53
3-2. 実験方法	
3-2-1. 膜画分の調製.....	54
3-2-2. 膜画分を用いた共免疫沈降法.....	54
3-2-3. 共免疫染色法.....	54
3-2-4. Nano-Glo live cell assay (NanoBiT 法).....	55
3-2-5. ウェスタンブロット.....	57
3-2-6. 統計解析.....	57
3-3. 実験結果	
3-3-1. リピッドフリッパーゼの形成不全.....	58
3-3-2. リピッドフリッパーゼの活性変化.....	60
3-4. 考察.....	67

第 4 章 AD モデルマウスの解析

4-1. 目的.....	70
4-2. 実験方法	
4-2-1. ADモデルマウス.....	70
4-2-2. マウス脳における膜画分の調製.....	70
4-2-3. 膜画分を用いた共免疫沈降法.....	71
4-2-4. ウェスタンブロット.....	71
4-2-5. 統計解析.....	71
4-3. 実験結果	
4-3-1. 3ヶ月齢のA7マウスにおける解析.....	72
4-3-2. 6ヶ月齢のA7マウスにおける解析.....	75
4-3-3. App ^{NL-G-F/NL-G-F} マウスにおける解析.....	80
4-4. 考察.....	82
第5章 Aβ/βCTF 結合性ペプチド T-RAP によるエンドソーム肥大化の改善	
5-1. 目的.....	84
5-2. 実験方法	
5-2-1. T-RAP, TAT-T-RAP によるリピッドフリッパーゼ活性への影響.....	85
5-2-2. T-RAP によるエンドソーム形態変化の観察.....	85
5-2-3. T-RAP による細胞毒性への影響.....	85
5-2-4. ウェスタンブロット.....	85
5-2-5. 統計解析.....	85
5-3. 実験結果	
5-3-1. T-RAP によるリピッドフリッパーゼ活性に対する影響.....	87
5-3-2. T-RAP によるエンドソームの肥大化, βCTF の蓄積に対する影響.....	89
5-4. 考察.....	93
終章 (第2～5章)	95
引用文献.....	97
参考文献.....	104
謝辞.....	105

略語表

α CTF	α -secretase cleaved carboxyl-terminal fragment
β CTF	β -secretase cleaved carboxyl-terminal fragment
AD	Alzheimer's disease
AICD	APP intracellular domain
APP	Amyloid precursor protein
APS	Ammonium Persulfate
APP-CTF	APP carboxyl-terminal fragment
A β	Amyloid beta
BACE1	β -site APP cleaving enzyme 1
BCA	Bicinchoninic acid
BSA	Bovine serum albumin
BPB	Bromophenol Blue
CAA	Cerebral amyloid angiopathy
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
CO ₂	Carbon dioxide
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole
DAPT	<i>N</i> -[<i>N</i> -(3,5-difluorophenacetyl)- <i>L</i> -alanyl]- <i>S</i> -phenylglycine <i>t</i> -butyl ester
ddH ₂ O	Deionized-distilled H ₂ O
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylenediamine- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid epidermal
EtBr	Ethidium bromide
EtOH	Ethanol
FBS	Fatal bovine serum
FL	Full length
GFP	Green fluorescent protein
HRP	Horseradish peroxidase
IgG	Immunoglobulin G
KD	Knockdown
LgBiT	Large BiT
MF	Membrane fraction
NaCl	Sodium chloride
PBS	Phosphate buffered saline
PBS-T	Phosphate buffered saline-tween (0.05%)
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFA	Paraformaldehyde
PNS	Post nuclear supernatant
PI	Protease inhibitor

PS	Phosphatidylserine
PVDF	Polyvinylidene difluoride
P4-ATPase	Type 4 P-type ATPase
RA	All- <i>trans</i> Retinoic Acid
rpm	Revolution per minute
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
RNA	Ribonucleic acid
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
sAPP α	Secreted form of APP α
sAPP β	Secreted form of APP β
SDS	Sodium dodecylsulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SmBiT	Small BiT
Swe	APP-Swedish mutation
TAT	Trans-activator of transcription protein
TBS-T	Tris buffered saline-tween
TCA	Trichloroacetic acid
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl ethylenediamine
Tg	Transgenic
TMEM30A	Transmembrane protein 30a
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
T-RAP	TMEM30A related amyloid-beta interacting peptide
Tween20	Polyoxyethylene(20)solbitan monolaurate
WB	Western blotting
WCL	Whole cell lysate
WT	Wild type

使用薬物・材料一覧

2-mercaptoethanol	Merck Millipore
2-propanol	富士フィルム和光純薬
Acrylamide	ナカライテスク
Agarose S	ニッポンジーン
Age1	New England Biolab
Alamar Blue	Bio-Rad
All- <i>trans</i> Retinoic Acid	富士フィルム和光純薬
Ampicillin sodium	富士フィルム和光純薬
Antifade Mounting Medium with DAPI	Vector Laboratories, Inc
APS	富士フィルム和光純薬
Bacto™ agarBD	BD (Becton, Dickinson and Company)
Bacto™ tryptone	BD (Becton, Dickinson and Company)
Bacto™ yeast extract	BD (Becton, Dickinson and Company)
BamHI	New England Biolab
BbsI	New England Biolab
BCA reagent A	TAKARA Bio
BCA reagent B	TAKARA Bio
BPB	富士フィルム和光純薬
BSA	Sigma Aldrich
β-secretase inhibitor IV	Cayman chemical
Can Get Signal	TOYOBO
CHAPS	Bio Vision
CHAPSO	同仁化学
Chloroform	富士フィルム和光純薬
cComplete™ Protease Inhibitor Cocktail (PI)	Roche
DAPT	Cayman chemical
D-MEM	富士フィルム和光純薬
D-MEM/Ham's F12	富士フィルム和光純薬
DMSO	PIERCE
EcoRI	New England Biolab
EDTA	同仁化学
EmeraldAmp Max PCR Master Mix	TAKARA Bio
EtBr	amresco
Ethanol	富士フィルム和光純薬
Favorgen Plasmid Midiprep Kit	Favorgen
Favorgen Plasmid Miniprep Kit	Favorgen
FBS	Biosera
Glycerol	富士フィルム和光純薬
Glycine	富士フィルム和光純薬

HCl	富士フィルム和光純薬
HEPES	同仁化学
Hygromycin	東京化生工業
ImmunoStar® LD	富士フィルム和光純薬
ImmunoStar® Zeta	富士フィルム和光純薬
Iodixanol (60%)	コスモ・バイオ
KCl	富士フィルム和光純薬
KH ₂ PO ₄	富士フィルム和光純薬
Large BiT	Promega
Lipofectamine 2000 reagent	Thermo Fisher Scientific
Lipofectamine 3000 reagent	Thermo Fisher Scientific
Lipofectamine RNAiMAX	Thermo Fisher Scientific
Methanol	富士フィルム和光純薬
Mighty TA-cloning kit	TAKARA Bio
NaCl	富士フィルム和光純薬
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	富士フィルム和光純薬
Nano-Glo live cell assay kit	Promega
NaOH	富士フィルム和光純薬
NEBuilder HiFi DNA assembly mix	New England Biolab
Normal mouse IgG	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY
Normal rabbit IgG	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY
NotI	New England Biolab
Opti-MEM	GIBCO
pcDNA4-TO	Thermo Fisher Scientific
pEB Multi-Hyg	富士フィルム和光純薬
pEB Multi-Puro	富士フィルム和光純薬
Penicillin-Streptomycin Solution (x100)	富士フィルム和光純薬
PEI-MAX	Polysciences, Inc
PFA	富士フィルム和光純薬
pMD20-T ベクター	TAKARA Bio
pMx-Puro-BACE1	Dr. Gopal Thinakaran
	USF Neuroscience Institute
Poly-L-Lysine	Sigma Aldrich
PrimeSTAR DNA polymerase	TAKARA Bio
Protein G Sepharose 4 Fast Flow	GE Healthcare Life Sciences
Protein A/G agarose beads	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY
pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459)	Addgene
p3×FLAG CMV10	九州大学生体防御医科学研究所
	佐々木裕之教授
Puromycin	富士フィルム和光純薬
PVDF (Immobilon-P)	Merck Millipores

PVDF (0.2 μm)	PALL Life Science
Sall	New England Biolab
SDS	富士フィルム和光純薬
Skim milk	雪印乳業
Small BiT	Promega
SnaBI	New England Biolab
Sucrose	富士フィルム和光純薬
Synthetic Aβ40	Peptide Institute
Synthetic Aβ42	Peptide Institute
Taq DNA polymerase	New England Biolab
TCA	富士フィルム和光純薬
TEMED	富士フィルム和光純薬
T-RAP	GenScript
(NFYQNHRRYVKSRDDSQLNGDPSAL)	
TAT-GG-T-RAP	GenScript
(YGRKKRRQRRRGGNFYQNHRRYVKSRDDSQLNGDPSAL)	
Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit	Roche
Tricine	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY
TRI reagent	Sigma Aldrich
Triton X-100	Sigma Aldrich
Trizma base	Sigma Aldrich
Tween20	Bio-Rad
VECTASHIELD Vibrance	Vector Laboratories
Antifade Mounting Medium with DAPI	
Wizard Genomic DNA Purification kit	Promega
XhoI	New England Biolab

使用抗体一覧

* 下記に、使用した抗体、抗体の宿主、提供源、カタログ No または、クローン名、そして各実験 (western blot, immunoprecipitation, immunofluorescence) における抗体の希釈条件を記載している

Antibody	Supplier	Identifier	Diluted condition
β 3-tubulin (mouse)	Proteintech	Cat# 66375-1-Ig	1:5000, Can Get Signal
mouse anti- β -amyloid (1-16)	BioLegend	M3.2 (clone)	1:1000, Can Get Signal
APP-N terminal (mouse)	MBL	3E9 (clone)	1:200, Can Get Signal
ATP8A1 (rabbit)	Proteintech	Cat# 21565-1-AP	1:1000, Can Get Signal
PLEKHB2 (Evectin-2) (rabbit)	Novus Biologicals	Cat# NBP1-56835	1:1000, Can Get Signal
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase α -subunit (mouse)	Developmental Studies Hybridoma Bank	a5	1:2500, Can Get Signal
LAMP2 (mouse)	Santa Cruz Biotechnologies	H4B4 (clone)	1:1000, Can Get Signal
Calreticulin (mouse)	Stressgen	FMC75 (clone)	1:3000, Can Get Signal
Rab5A (mouse) (immunofluorescence)	Cell Signaling Technology	Cat# E6N8S	1:200, 1% BSA/PBS
Rab5A (rabbit) (western blot)	Proteintech	Cat# 11947-1-AP	1:2000, Can Get Signal
Rab4 (rabbit)	Cell Signaling Technology	Cat# 2167	1:100, 1%BSA/PBS
anti-human Amyloid β (N) (mouse)	Immuno-Biological Laboratories	82E1 (clone)	1:1000, Can Get Signal
anti- β -Amyloid 17-24 (mouse)	BioLegend	4G8 (clone)	4 μ g/sample
anti- β -Amyloid 1-16 (mouse)	BioLegend	6E10 (clone)	1:1000, Can Get Signal
anti-human BACE1 (C) (rabbit)	Immuno-Biological Laboratories	Cat# 18711	1:500, Can Get Signal
anti-human sAPP β -wild type (rabbit)	Immuno-Biological Laboratories	Cat# 18957	1:100, Can Get Signal
normal rabbit IgG	Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation	Cat# 148-09551	1 μ g/sample
normal mouse IgG	Santa Cruz Biotechnologies	Cat# sc-2025	1 μ g/sample
GFP monoclonal antibody (mouse)	Invitrogen	3E6 (clone)	1 μ g/sample
mouse monoclonal anti FLAG peroxidase (HRP)	Sigma Aldrich	M2 (clone)	1:50000, 5% skim milk/TBS-T
HA tag mouse monoclonal antibody (immunofluorescence)	Cell Signaling Technology	6E2 (clone)	1:200, 1% BSA/PBS
HA tag rabbit polyclonal antibody (western blot)	Proteintech	Cat# 51064-2-AP	1:3000, 5% BSA/TBS-T
α -tubulin (mouse)	Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation	10G10 (clone)	1:1000, Can Get Signal
anti-tubulin hFAB Rhodamine	Bio-Rad	Cat# 12004165	1:1000, TBS-T
APP-C terminal (C15) (rabbit)	gift from Dr. T. Sakurai	Takasugi et al., PLoS One 2018	1:1000, Can Get Signal
TMEM30A-C terminal (rabbit)	gift from Dr. T. Sakurai	Takasugi et al., PLoS One 2018	1:1000, Can Get Signal
HRP linked anti rabbit IgG (2 nd antibody) (western blot)	Invitrogen	Cat# NA9340V	1:25000, TBS-T
HRP linked anti mouse IgG (2 nd antibody) (western blot)	Invitrogen	Cat# NA9310V	1:25000, TBS-T
HRP linked anti rabbit IgG, light chain specific (western blot)	Jackson ImmunoResearch	Cat# 211-032-171	1:25000, TBS-T
Goat anti-rabbit IgG (H+L) conjugated with Alexa Fluor 488 (immunofluorescence)	Invitrogen	Cat# A11008	1:400, 1% BSA/PBS
Goat anti-mouse IgG (H+L) conjugated with Alexa Fluor 594 (immunofluorescence)	Invitrogen	Cat# A11005	1:400, 1% BSA/PBS

要約

アルツハイマー病 (AD) は、脳内で凝集した Amyloid β ($A\beta$) が発症因子であると提唱されており (アミロイド仮説), $A\beta$ を標的とした治療薬が開発されてきた. しかし, 有効な治療効果が得られておらず, アミロイド仮説を補完する新たな治療標的の同定が望まれる.

アミロイド前駆体タンパク質 (APP) は小胞輸送 (エンドサイトーシス) される過程で, β -セクレターゼ (BACE1) 及び γ -セクレターゼによる連続的な切断を受け APP カルボキシ末端断片 β CTF, そして $A\beta$ を産生する. 近年, $A\beta$ 非依存的な病態形成に, APP や β CTF を含む APP 代謝物が関与することが指摘されており, アミロイド仮説を補完する現象として注目されているが, その病態形成メカニズムについては未だ明らかでない. 本研究では特に, APP 及び β CTF について, AD 初期病態への関与機構を明らかにし, 根本的な治療標的を同定することを目的として研究を行なった.

初めに, APP の機能変化を解析するため, 家族性 AD 変異が豊富に存在する領域 ($A\beta$ 配列を含む) に注目し, ゲノム編集による変異体を作製した. その結果, $A\beta$ 配列が APP の代謝を介して神経分化に対する機能を制御することが明らかとなり, AD における神経分化の抑制に寄与することが考えられた (Kaneshiro *et al.*, 2018).

続いて, $A\beta$ 配列を含み APP 代謝物である β CTF の病態形成メカニズムについて解析を行なった. 当研究室ではこれまで, $A\beta$ 配列を介し β CTF と結合する因子として TMEM30A を同定しており (Takasugi *et al.*, 2018), β CTF の蓄積に伴い両者が結合し, エンドソームの肥大化など小胞輸送障害を引き起こす可能性を示していた.

TMEM30A は, 活性サブユニットである P4-ATPase ファミリータンパク質と結合しリピッドフリッパーゼを構成する. リピッドフリッパーゼは, 脂質二重層においてホスファチジルセリン (PS) などのリン脂質を細胞質側に輸送する酵素である (Andersen *et al.*, 2016). エンドソームにおける細胞質側 PS の分布は, PS に特異性が高い P4-ATPase の一つである ATP8A1 により制御されており (Wang *et al.*, 2018), 膜の屈曲や分離に必要な PS 結合タンパク質のリクルートを促進することから小胞輸送に必須である (Arumugam and Kaur, 2017).

本研究では, 孤発性 AD 患者脳内で発現・活性が上昇している BACE1 (Ahmed *et al.*, 2010) 恒常発現細胞 (β CTF が増加するモデル細胞) 及び, AD モデル動物において, β CTF の増加により TMEM30A と β CTF が結合し, TMEM30A と ATP8A1 によるリピッドフリッパーゼの形成・活性が低下することが明らかとなった. また, TMEM30A/ β CTF 複合体形成に伴うリピッドフリッパーゼの機能不全は, $A\beta$ 蓄積以前に生じることが示唆された.

さらに, 所属研究グループで見出された TMEM30A 由来の β CTF 結合性ペプチド “T-RAP” は, リピッドフリッパーゼの機能を回復させる可能性が認められた. 同時に, T-RAP は β CTF を減少させ, エンドソームの肥大化も改善することが明らかとなった (Kaneshiro *et al.*, 2022).

以上本研究により, リピッドフリッパーゼの機能低下は, β CTF の蓄積による小胞輸送障害に関与することが示唆され, AD 初期病態の改善を目的とした新規治療標的となることが期待される.

序論（第1章）

高齢化が進む先進国では、認知症患者の増加が大きな社会問題となっている。実際に厚生労働省の調査によれば、日本では2025年までに約700万人、65歳以上では5人に1人が認知症を発症すると示唆されており（厚生労働省 HP: https://www.mhlw.go.jp/okoro/know/disease_recog.html），根本的治療法の開発が喫緊の課題である。認知症とは、脳内神経細胞が変性することで日常生活に支障をきたすほどの記憶障害や、認知機能の低下を主徴とする疾患のことである。認知症の中でもアルツハイマー型認知症（AD）は最も多く、そのほとんどが加齢に伴って発症する孤発性で（一部分は家族性）、未だ根本的治療法が確立されていない神経変性疾患である（Scheltens *et al.*, 2021）。ADの病理所見として、脳内神経細胞の変性に伴う大脳の萎縮、脳内で老人斑と呼ばれる斑点状構造物の沈着、そして神経細胞内における線維状凝集物の蓄積（神経原線維変化）が報告されている（DeTure and Dickson, 2019）。老人斑はアミロイド β （A β ）ペプチドが、神経原線維は微小管結合タンパク質タウの異常なリン酸化体が主要構成因子である（Lane, Hardy and Schott, 2018）。

これまで、認知機能を呈する約20年以上前からA β が蓄積し、その後のタウの異常なリン酸化や神経細胞死に寄与することが示唆されている（Bateman *et al.*, 2012）。また、家族性AD変異はA β 代謝に関与する遺伝子に多いことから（Alzforum HP: <https://www.alzforum.org/mutations>），ADでは脳内におけるA β の凝集が発症要因であると提唱されてきた（アミロイド仮説：Hardy and Selkoe, 2002）。一方で、A β 標的治療薬の多くは有効な効果が得られにくいと考えられている（Huang, Chao and Hu, 2020）。その理由として、AD初期にA β 以外の分子による病態形成が存在することが指摘されている（Herrup, 2015）。そのためADの根本的な治療を目指すには、アミロイド仮説を補完する新たな治療標的の同定が必要である。

A β は、1回膜貫通型のアミロイド前駆体タンパク質（APP）により産生される。APPはタンパク質として合成された後、小胞体やゴルジ体を経て糖鎖修飾を受け、成熟型のみが細胞表面やエンドソームなどの輸送小胞に局在する（Zhang and Song, 2013）。そして細胞表面や、エンドサイトーシスされる過程で、 α -セクレターゼ（SS Sisodia, 1992）または β -セクレターゼ（Vassar *et al.*, 1999）による切断を受ける。 α -セクレターゼは主に細胞表面に存在するAPPを切断し、 α CTF・sAPP α を産生する（Zhang and Song, 2013）。一方で、 β -セクレターゼは主にエンドソームに存在するAPPを切断し、2種類の切断箇所の違いから β 1CTFまたは β 11CTF、そしてsAPP β を産生する（Deng *et al.*, 2013）。続いて、 α CTF、 β CTFは γ -セクレターゼ（Takasugi *et al.*, 2003）による切断を受けそれぞれ、p3ペプチドまたはA β 、そしてAICDを産生する（Fig. 1）。

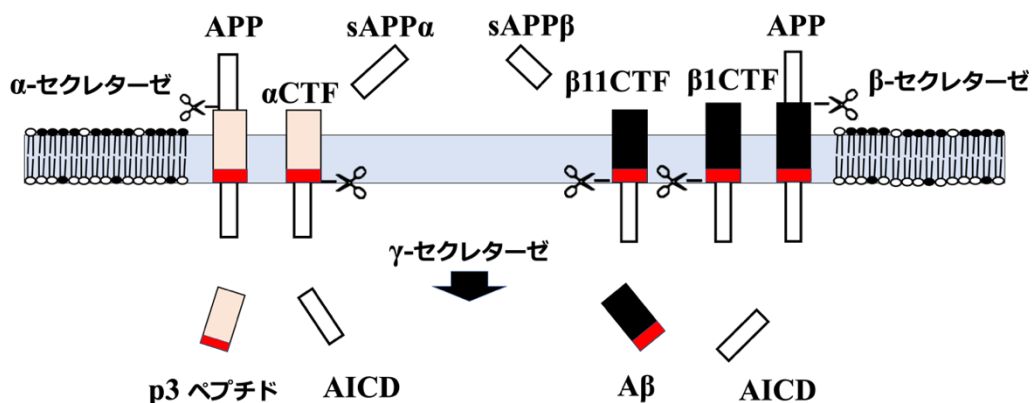
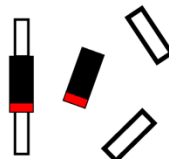
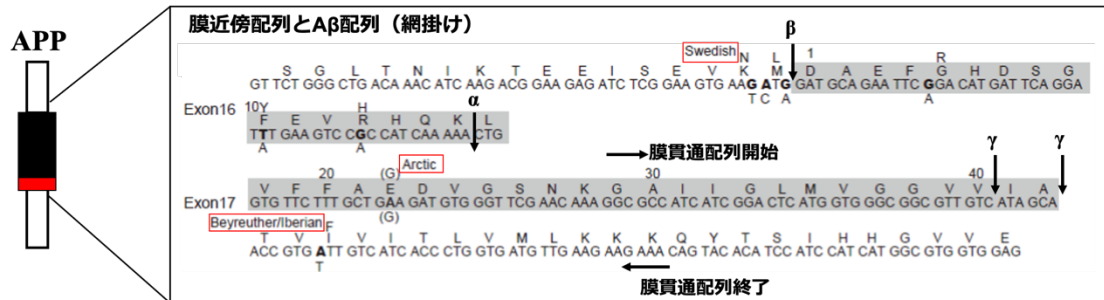


Fig. 1 APPの代謝

近年、APPによる神経発達の抑制や (Kwak *et al.*, 2006), APPカルボキシ末端断片βCTFの蓄積による小胞輸送障害 (Kim *et al.*, 2016) などが報告されており、アミロイド仮説を補完する現象として注目されている。しかし、その詳細なメカニズムは明らかでなかった。そこで本論文では、APP及びβCTFがどのようにAD病態に寄与するのか明らかにし、新規治療標的の同定を目指して研究を行なった。まず第1章ではAPPの機能変化について、次に第2～5章ではβCTFの病態形成について解析を行なった。

APPの膜近傍・膜貫通領域 (Aβ配列を含む) は家族性AD変異が多く、各種セクレターゼにより切断を受ける領域である (Alzforum HP: <https://www.alzforum.org/mutations>)。本領域はこれまで、コレステロールなど脂質との結合 (Nierzwicki and Czub, 2015) や、APP、代謝産物βCTFのダイマー化を介して (Kienlen-Campard *et al.*, 2008)、セクレターゼの切断に影響を及ぼすことが報告されている。また、APPのダイマー化は細胞表面におけるAPPの局在や細胞内への輸送にも関与し (Deyts, Thinakaran and Parent, 2016)、本領域はAPPの細胞内動態と深く関与することが指摘されている。

以上の知見から、膜近傍・膜貫通領域はAPPによるAD病態への寄与に重要であると考えられているが、詳細なメカニズムは明らかでない。そこで、第1章ではAPPの膜近傍・膜貫通領域に着目し、APPの代謝や機能に及ぼす影響について解析することで、ADにおけるAPPの病態形成機構について明らかにすることを目的とした (Fig. 2)。



Aβ 配列・膜近傍配列が APP 代謝・機能に及ぼす影響を検討

Fig. 2 APP の膜近傍・膜貫通配列の解析
 (Saito et al., Nat Neurosci, 2014 より改変、赤枠：家族性 AD 変異の一例)

第1章 APP 代謝及びその機能に対する A β 配列・膜近傍配列の解析

1-1. 目的

遺伝的 AD リスク因子である APP は、A β 配列を含む膜貫通・膜近傍領域における連続的な切断を受け A β を産生する。家族性 AD 変異の多くはこれらの部位に存在するため (Alzforum HP: <https://www.alzforum.org/mutations>), APP の膜貫通・膜近傍配列における変異は AD 発症と深く関与することが示唆されている (Deyts, Thinakaran and Parent, 2016). しかし、膜近傍・膜貫通領域領域がどのように AD に寄与するのか、またどの領域が重要であるかは明らかでない。

そこで本章では、標的配列にランダムな変異を起こす CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を利用して、A β 配列を含む膜貫通・膜近傍領域 (Exon 16, 17 に相当) が APP 及びその代謝産物にどのような影響を及ぼすのか明らかにすることを旨とした。

1-2. 実験方法

1-2-1. 細胞培養

マウス神経芽細胞腫 Neuro2A (N2a) 細胞 (ATCC® CCL-131™) は、56°C, 30 分間非働化処理した 10%FBS 及び 1% ペニシリン/ストレプトマイシンを含む D-MEM (High Glucose) を用いて 37°C, 95% air-5% CO₂ の条件下で培養した。

1-2-2. ゲノム編集

マウス APP Exon16 / Exon17 (Ex16 / Ex17: Fig. 3) をターゲットとする forward・reverse オリゴ DNA は、CHOPCHOP (ソフトウェア HP: <https://chopchop.cbu.uib.no/>) を用いオフターゲットが最小になるよう設計した (Montague *et al.*, 2014). そしてオリゴ DNA を 95°C で融解し、30 分かけて 30°C に段階的に冷却することによりアニーリングを行なった。アニーリング産物を Bbs1 で切断した pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) plasmid にライゲーションし、目的の CRISPR-Cas9 plasmid を得た (Table 1 ; オリゴの配列)。なお、本項の PX459 を含め、本研究に使用した全ての plasmid はサンガーシーケンス法によりシーケンスを確認している。

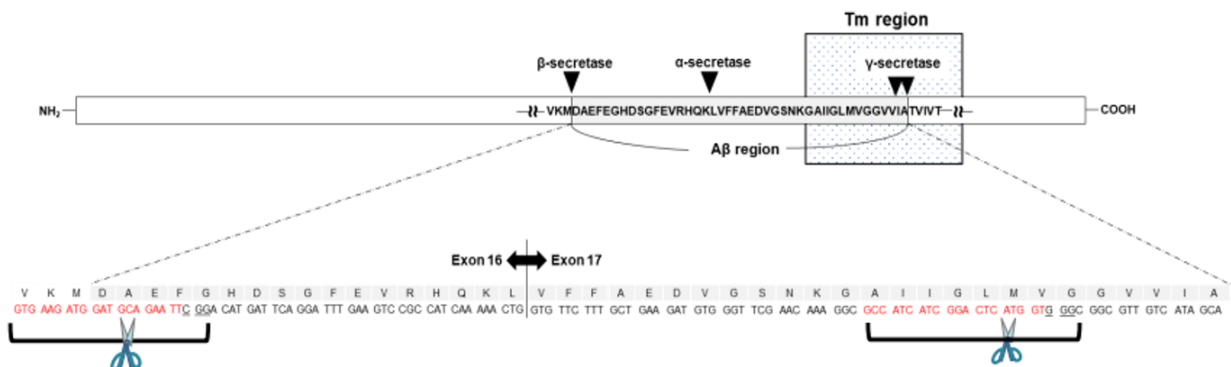


Fig. 3 マウス APP Ex16/17 ターゲット配列

Table 1. PX459 cloning ターゲットオリゴ DNA 配列

	forward	reverse
Exon 16	5'-CAC CGT GAA GAT GGA TGC AGA ATT-3'	5'-AAA CAA TTC TGC ATC CAT CTT CAC-3'
Exon 17	5'-CAC CGC CAT CAT CGG ACT CAT GGT-3'	5'-AAA CAC CAT GAG TCC GAT GAT GGC-3'

1-2-3. APP 変異体の選択

1-2-2 で得られた plasmid (1 μ g) と Lipofectamine 2000 reagent (3 μ l) を Opti-MEM 100 μ l 内で混合し 20 分静置した後、さらに 1×10^5 個の N2a 細胞を添加し、5 分間静置した後播種した (Reverse 法)。遺伝子導入 24 時間後に、抗生物質 Puromycin を最終 1 μ g/ml になるよう添加し、その後ベクターを導入していない N2a 細胞が完全に死滅する期間として 2 日間培養し、遺伝子導入細胞を選択した。持続的に抗生物質選択を行うと PX459 自体がゲノムに挿入されたクローンを選択する可能性が高くなるため、その後は抗生物質を加えず培養を行なった。生存した細胞から限界希釈法により単一クローンを得た。

1-2-4. 変異の同定

それぞれのクローンから Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega) を用いてゲノム DNA を抽出した。PrimeSTAR Max を用い目的の配列を PCR 法で増幅後 (Table 2 ; primer 配列), Taq DNA polymerase を加えアデニンを付加した。得られた PCR 産物を Mighty TA-cloning kit を用いて pMD20-T ベクターに挿入した。各クローンの変異部位は DNA シーケンス解析によって同定した。対立遺伝子の導入のため $n=6\sim 8$ 個/クローンの解析を行なった。

Table 2. Ex16 / Ex17 領域増幅プライマー配列

	forward	reverse
Exon 16 target	5'-GCC AAG AGA GAA CTT TAA GGC A-3'	5'-ACT GGG ACC ACC TCT AAA TGA A-3'
Exon 17 target	5'-TGA ACG TCT AGG TTC CGT TTT T-3'	5'-TCT TGC GCT TAC AGA CCT TTT-3'

1-2-5. トランスフェクション, RNA 干渉及び分化誘導

3.5 cm dish に N2a 細胞を翌日に 50~70%の割合になるよう播種し、分化誘導試薬であるレチノイン酸 (RA) (10 μ M) in D-MEM / 1% FBS を細胞に処理し、分化を誘導した。また、pDEST-APP-Venus (今岡亮介 修士 論文, 2017) の導入は、2.5 μ g DNA と plasmid 導入試薬である Lipofectamine 3000 reagent (3.75 μ l) を 250 μ l の Opti-MEM に溶解後、reverse 法に則り行なった。トランスフェクション 24 時間後に上記と同様に RA を処理した。APP ノックダウン実験については APP の Ex18 領域をターゲットとするオリゴ (Sigma Genosys: Table3) を使用した。RNA 干渉のプロトコルは文献に従い (Takasugi *et al.*, 2011), Lipofectamine RNAiMAX (7.5 μ l) に対し 25 pmol の siRNA を用いて reverse 法に則り行なった。

Table 3. APP Ex18 領域ターゲット siRNA 配列

APP siRNA pairs	5'-UCA AAG AAC UUG UAA GUU GAA-3'
	5'-CAA CUU ACA AGU UCU UUG AGC-3'

1-2-6. RT-PCR 法

N2a 細胞を 24 時間後回収時に confluent になるよう 6 cm dish に播種した。24 時間後に PBS で 2 回洗浄し、1 ml の TRI reagent を加え細胞から RNA 抽出を行なった。200 μ l の Chloroform を加え vortex により混合し、室温 (RT) で 3 min 静置した。その後遠心 (12000 g, 15 min, 4°C) により DNA, タンパク質, RNA 層を分離した。RNA 層 (水層) のみを回収し、500 μ l の 2-propanol を加え混合, RT, 10 min 静置し、遠心 (12000g, 10 min, 4°C) により RNA の沈殿サンプルを得た。RNA ペレットに対し、75%の EtOH 1 ml を処理し、遠心 (15000 rpm, 5 min, 4°C) (Rotor No: MA-2024, KUBOTA) により 2-propanol を除去した。RNA ペレットを乾燥後、滅菌 MilliQ (ddH₂O) 40 μ l で溶かした。その後 cDNA 合成を行なった。

cDNA は、Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche)を用いて、kit のプロトコルに従い、Random hexamer プライマーにより合成した。 β -actin 及び APP のターゲット配列は、Table 4 に示す primer を用いて、EmeraldAmp Max PCR Master Mix により増幅した。

Table 4. β -actin 及びマウス APP の primer 配列

	forward	reverse
β -actin	5'-TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A-3'	5'-CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG G-3'
APP (増幅領域: Ex 6-11)	5'-TGA AGA CAA AGT AGT AGA AGT-3'	5'-ACC TGG GAC ATT CTC TCT CGG TGC TTG GC-3'

増幅条件: β -actin 1. 95°C 2 min 2. 95°C 2 min 3. 65°C 30 s 4. 72°C 30 s Step 2~4 を 18 cycles 5. 72°C 7 min 6. 4°C ~

増幅条件: APP 1. 94°C 5 min 2. 94°C 30 s 3. 56°C 30 s 4. 72°C 1 min Step 2~4 を 25 cycles 5. 72°C 7 min 6. 4°C ~
--

合成した cDNA は 1~2%のアガロース電気泳動 (100 V, 20 min) により解析した。泳動後のゲルは EtBr 溶液と RT, 20 min で反応させ、Gel Doc Ez Imager (Bio-Rad) により検出

した。

1-2-7. 試薬処理

3.5 cm dish に WT の N2a 及び変異クローン細胞を 50~70%の割合で播種し、翌日 vehicle である DMSO または、 γ -セクレターゼ阻害薬 (DAPT) (10 μ M) を処理した。その 24 時間後に、細胞を回収し WB に供した。

1-2-8. ウェスタンブロット (Western Blot: WB)

細胞を 100 μ l 以上の RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 1% Sodium deoxycholate, protease inhibitor: PI) で溶解し、細胞溶解液 (whole cell lysate: WCL) の粘りがなくなるまで、超音波破碎機 (VP-5S, TAITEC) による sonication (hand pulse: 4~6) を行いタンパク質の抽出を行なった。その後 2 x sample buffer (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% 2-mercaptoethanol, 4% SDS, 10% glycerol, 0.01% BPB) を加え、95°C, 3 min 熱処理を行なった。全てのサンプルで同じタンパク量になるよう SDS-PAGE を行なった。泳動は、Tris-Glycine ゲルの場合は 80 V, 30 分行い、続けて 130 V, 60 分行なった。0.75 mm, 17x15 cm の大きさの Tris-Tricine ゲル (16.5%) の場合は、70 V, 60 min, 100 V, 60 min, 140 V (70 mA), 6 時間行なった。ゲルをポアサイズ 0.45 μ m の PVDF membrane に転写し (100 V, 60 min, 4°C), membrane を 5% milk/TBS-T (TBS-T: 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.1% tween20) で 30 分ブロッキングした。APP-CTF を含めた小分子は、ポアサイズの小さい 0.2 μ m の PVDF membrane に転写した (30 mA, 15h 20 min, 4°C)。Membrane を TBS-T で洗浄し、目的タンパク質に対する特異的 1 次抗体、そして Horseradish peroxidase (HRP) 標識の 2 次抗体 (1 次抗体の宿主に対する抗体; 使用抗体一覧参照) を反応させ、HRP 基質 (ImmunoStar LD/zeta) を加えた後、ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad) により目的タンパク質のバンドを検出した。定量化は、ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad) を用いて行なった。具体的には、membrane のバックグラウンドを除いた各バンドのシグナル強度 (Densitometric intensity) を絶対量として表示し、Figure に示した各実験のコントロールに対する割合を 100 分率 (%値) として算出し、統計処理に供した。

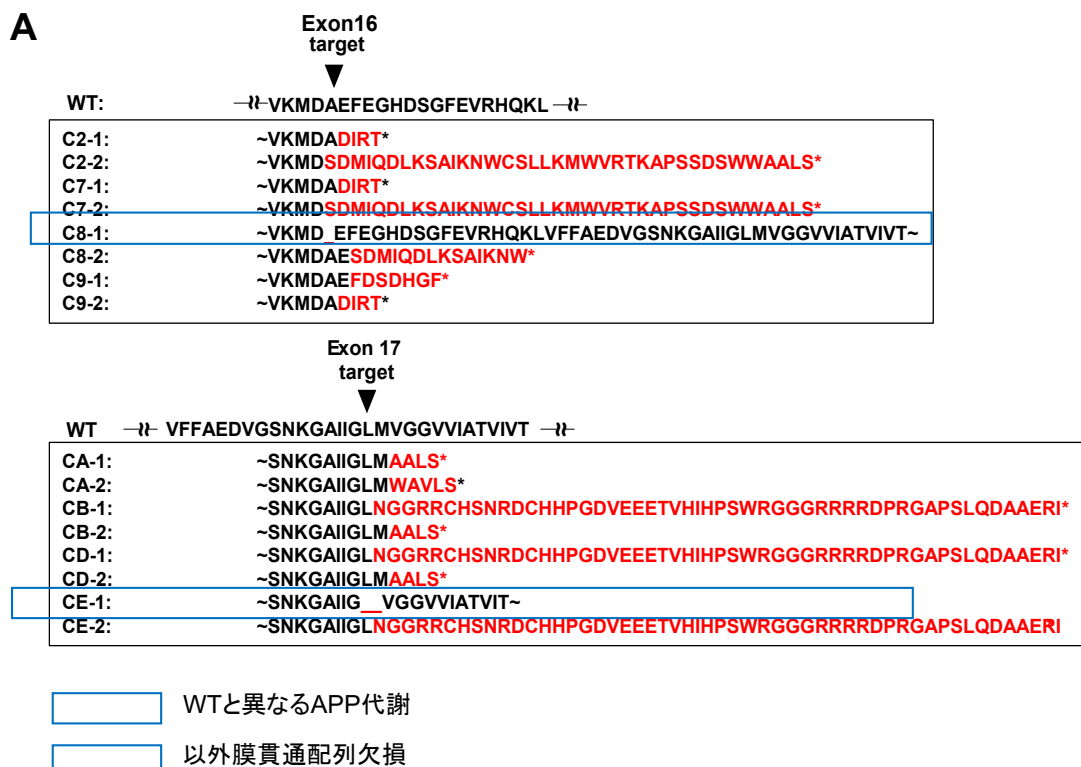
1-2-9. 統計解析

本章における全てのデータは、平均値 (mean) \pm s.e.m で表示した。統計解析は、GraphPad Prism8 ソフトウェアを用いて Two-tailed Student's t test または、One-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test を適用した。* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001.

1-3. 実験結果

1-3-1. 同定された変異

初めに、APP と APP 代謝物の発現様式に着目し、A β 配列を含むマウス Ex16 / 17 部位について CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を行なうことで、特徴的な変異株を選定することを目的とした。その結果、複数の変異が同定された (Fig. 4A)。このうち青色の四角で囲まれていない変異は、シーケンシング、膜貫通配列予測ソフトウェア (TMHMM server v2.0 ; <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)、そして WB による初期的検討の結果、可溶性タンパク質として発現することが示唆された (Fig. 4A)。一方で、青色で囲まれた 2 種類の変異は膜貫通配列が存在し、WT の APP と異なる代謝を示すことが予想された (Fig. 4A)。実際の代謝様式については Fig. 6A で後述する。以上から、異なる APP 代謝の表現型ごとに (可溶性タンパク質または、WT と異なる APP 代謝)、代表的な変異クローンとして C8, CA, CE を選別した (Fig. 4B)。具体的には、C8, CE 各クローンにおいてそれぞれ、673 番目のアラニンが欠損した $\Delta 673A$ 変異 (欠失変異)、705 番目と 706 番目のロイシン、メチオニンが欠損した ΔLM 変異 (欠失変異) の他、対立遺伝子変異として膜貫通部位を欠損した可溶性タンパク質として発現する変異 (フレームシフト変異) を同定した (TMHMM server v2) (Fig. 4B)。また CA に関しては、対立遺伝子はどちらも A β 配列の途中でストップコドンが挿入された、膜貫通部位を欠損した可溶性タンパク質となる変異であった (Fig. 4B)。



B

WT gtgaagatggatgcagaattcggacatgattcaggattgaagtcgccatcaaaaactg

C8-1	gtgaagatggat	gaattcggacatgattcaggattgaagtcgccatcaaaaactg
C8-2	gtgaagatggatgca	tcggacatgattcaggattgaagtcgccatcaaaaactg

WT tcgaacaaaggcgccatcatcggactcatggtggggcggcgttgcatagcaaccgtg

CA-1	tcgaacaaaggcgccatcatcggactcatg	gcggcgttgcatagcaaccgtg
CA-2	tcgaacaaaggcgccatcatcggactcatgg	cggcgttgcatagcaaccgtg

WT tcgaacaaaggcgccatcatcggactcatggtggggcggcgttgcatagcaaccgtg

CE-1	tcgaacaaaggcgccatcatcgga	gtggggcggcgttgcatagcaaccgtg
CE-2	tcgaacaaaggcgccatcatcggactcaatggtggggcggcgttgcatagcaaccgtg	

Ex16

671-672 β 689-690 α

WT —VKMDAEFEGHDSGFVVRHQKL—

C8-1	—VKMD_EFEGHDSGFVVRHQKL—
C8-2	—VKMDAESDMIQDLKSAIKNW* — 膜貫通領域欠損型 可溶性タンパク質

Ex17

γ 711-713

WT —SNKGAIIGLMVGGVVIATV—

CA-1	~SNKGAIIGLMAALS*	} γ セクレターゼ切断部位直前でストップコドンの挿入
CA-2	~SNKGAIIGLMWAVLS*	
CE-1	~SNKGAIIG_VGGVVIATVIT~	
CE-2	~SNKGAIIGLNGGRRCHSNRDCHHPGDVEETVHIHPSWRGGGRRRRDPRGAPSLQDAAERI	

膜貫通領域欠損型 可溶性タンパク質

Fig. 4 同定された変異配列と $\alpha/\beta/\gamma$ -セクレターゼ切断部位との位置関係

A : Ex 16, 17 を標的として同定された変異を示す。各クローンにつき、ゲノム抽出を行い、シーケンス解析後 ClustalW で WT と比較した。青色で囲んだ変異は WT と異なる APP 代謝を示し、それ以外は全て膜貫通配列を欠損した可溶性タンパク質であった。

B : 上記 3 種類の表現型を示す代表的な変異を示す（上: 塩基配列, 下: アミノ酸配列）。* 数字は各セクレターゼ切断部位のアミノ酸番号を示す。

1-3-2. 同定された変異が APP 代謝に及ぼす影響

Fig. 5 に用いた抗体の抗原部位、及び各 APP 代謝物との対応を示す。これらの抗体を用いて 1-3-1 で同定された変異クローンにおける、FL-APP・APP 代謝物の産生量について検討した。

C8 は M3.2 認識部位を持たない sAPP 様産物、及び ΔA 変異を持つ APP の発現が予想された (Fig. 4)。C8 では FL-APP の発現 (<20%) 及び APP-C 末端断片・APP-CTF (α CTF) の産生量がわずかであり (約 25%), sAPP 分泌物の産生は M3.2, 3E9 の両抗体で殆ど認められなかった (Fig. 5, 6A, C, E)。

CE は sAPP 様産物、さらに膜貫通部位に ΔLM の変異を持つ APP の発現が予想された。CE では FL-APP の発現がわずかに減少したものの、APP-CTF は顕著に (>50%) 減少し、さらに、分子量の減少も認められた (Fig. 5, 6A, C)。おそらく 2 アミノ酸欠損による影響であると推察する。一方で、sAPP α 様産物は顕著に増加した (Fig. 5, 6E)。

CA に関しては sAPP α 様産物のみの発現が予想され、実際に FL-APP の発現及び APP-CTF の産生は認められなかった (Fig. 5, 6A, C, E)。また、FL-APP の発現が顕著に減少している CA や C8 に関して、mRNA 発現における変化は認められなかったため (Fig. 6B)、これらの結果は APP の代謝様式の変化を示すと予想された。なお、RT-PCR は変異箇所でない APP-mRNA 領域を標的として増幅しており、増幅効率は変異の影響を受けないと考えられる。

以上の結果から、膜貫通部位/C 末端部分を持つ APP について、C8 では ΔA 、CE では ΔLM 変異体の動態が反映されており、細胞外に分泌された sAPP 様産物に関しては対立遺伝子の変異も関与すると予測し、C8 の ΔA 変異は APP の安定性、CE の ΔLM 変異は APP のセクレターゼ切断等の代謝に影響すると予想した。

そこでまず、これら変異 (ΔA や ΔLM) が γ -セクレターゼによる切断に影響するか、 γ -セクレターゼ阻害薬 (DAPT) 処理により検討した。その結果、DAPT 処理により WT では APP-CTF が 2.5 倍と蓄積するのに対し、C8 では 4 倍、CE では約 7 倍増加していたが、C8, CE いずれも WT に比べ低いままであった (Fig. 5, 6A, D)。この結果から、CA, CE 変異は γ -セクレターゼによる切断を受けやすい可能性もあるが、実際に切断活性に影響を及ぼすかを明らかにするためには、*in vitro* による直接的な活性測定や $A\beta$, AICD 量なども検討する必要がある。また ΔLM 変異は、sAPP α 様産物の分泌が増加していたことから、膜貫通欠損変異による sAPP α 用産物の分泌増加に加え、 α -セクレターゼによる切断が増加していることが示唆された (Fig. 5, 6E)。

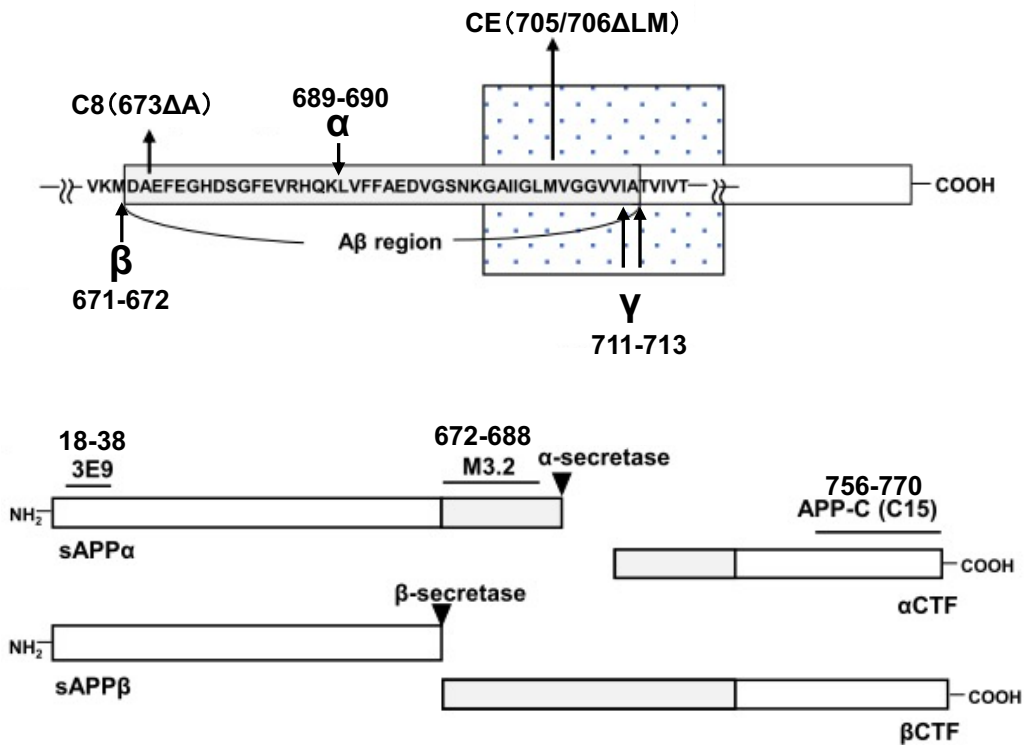


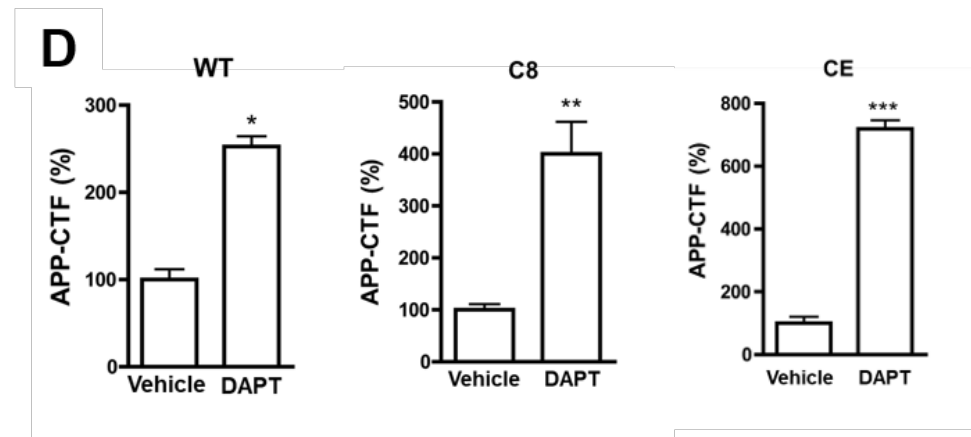
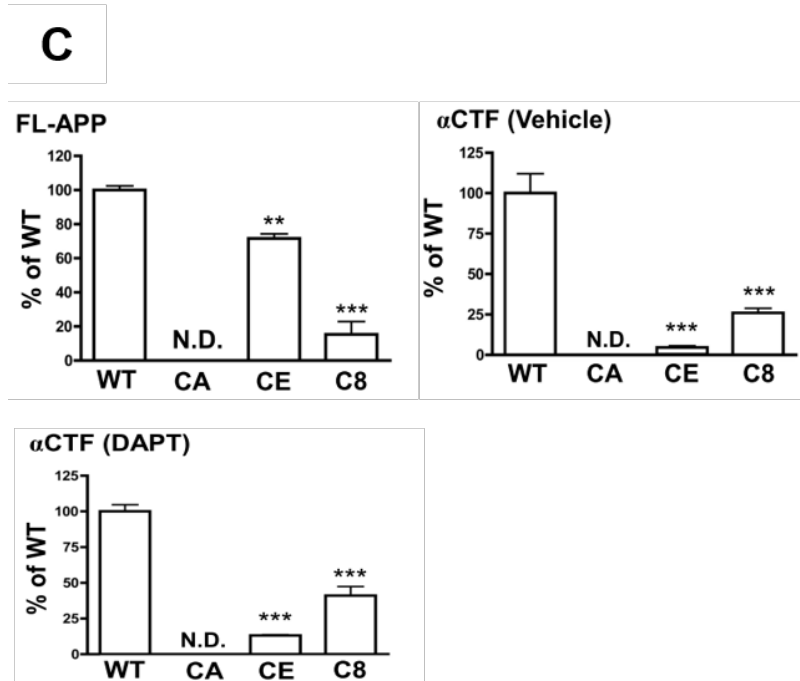
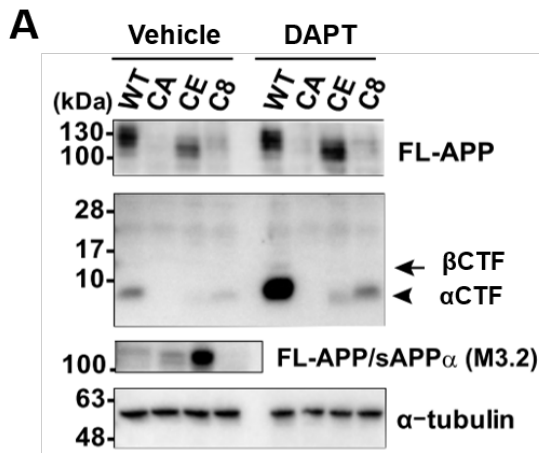
Fig. 5 C8, CE クローン変異部位と抗体認識部位
($\alpha/\beta/\gamma$ は各セクレターゼの切断部位である)

3E9: sAPP α/β を認識

APP-C (C15): FL-APP, APP-CTF, AICD を認識

M3.2: sAPP α のみ認識

*各種セクレターゼ切断部位, 変異部位, 抗体認識部位のアミノ酸番号を示す.



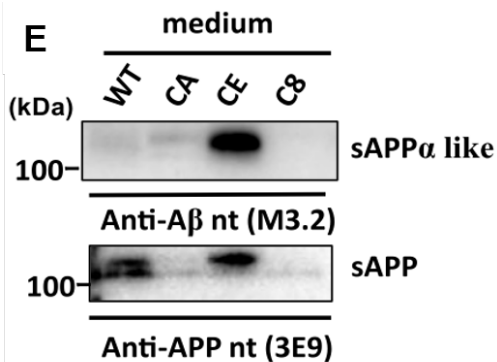


Fig. 6 C8, CA, CE クローン別 APP 及びその代謝物の発現変化

- A : WT と各クローンに DMSO / DAPT (10 μ M) を処理し, 24 時間後にその WCL を WB に供し, APP C 末端抗体を用いて FL-APP 及び APP-CTF (α CTF), M3.2 抗体を用いて sAPP α を検出した. Loading control: α -tubulin.
- 注) 通常 APP-CTF は α CTF が主に産生され, β CTF の産生量はそれと比較して殆ど認められない (Mathews *et al.*, 2002).
- B : CA, C8 クローンにおける mRNA レベルを RT-PCR 法により検出した. APP695 は神経細胞で多く発現する FL-APP のアイソフォームである. Loading control: β -actin
- C : A における FL-APP, APP-CTF (α CTF) について各変異体と WT をそれぞれ比較・定量化した. One-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test (n=3) * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001. data mean \pm s.e.m.
- D : WT と各クローンについて DAPT を処理した際の APP-CTF (α CTF) を定量化した. Two-tailed Student's t test (n=3). * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001. data mean \pm s.e.m.
- E : 各クローンの medium を回収後 WB に供し, M3.2 抗体 (sAPP α のみ認識) と 3E9 抗体 (sAPP α / β を認識) を用いて検出した.

1-3-3. 各変異体が突起伸長へ及ぼす影響

FL-APP 及びその代謝物は神経細胞において突起伸長や軸索の伸長など神経細胞の分化に関与することがこれまでに報告されている (Young-Pearse *et al.*, 2007). 一方でこれまでの知見では, FL-APP 及び, APP 代謝物を含んだ解析がなされており, 各因子の神経分化に対する正確な機能は明らかでなかったため, 本研究で得られたクローンがその解析に用いる事が出来るのではないかと考えた. そこで次に, 同定された変異クローン (C8, CA, CE) の神経分化に対する影響を, 神経分化マーカーとして知られる β 3-tubulin の発現量, 及び位相差顕微鏡観察によって検討した. その結果分化誘導以前から, CA 及び C8 クローンでは WT に比べ β 3-tubulin の発現が増加することが明らかとなった (Fig. 7A, B). さらに RA 処理により分化誘導を行なった結果, CA 及び C8 クローンにおいて, 突起の伸長が促進した (Fig. 7C). 一方で, CE クローンに関しては WT に比べ, β 3-tubulin の発現量及び, 突起の伸長に変化は認められなかった (Fig. 7A-C).

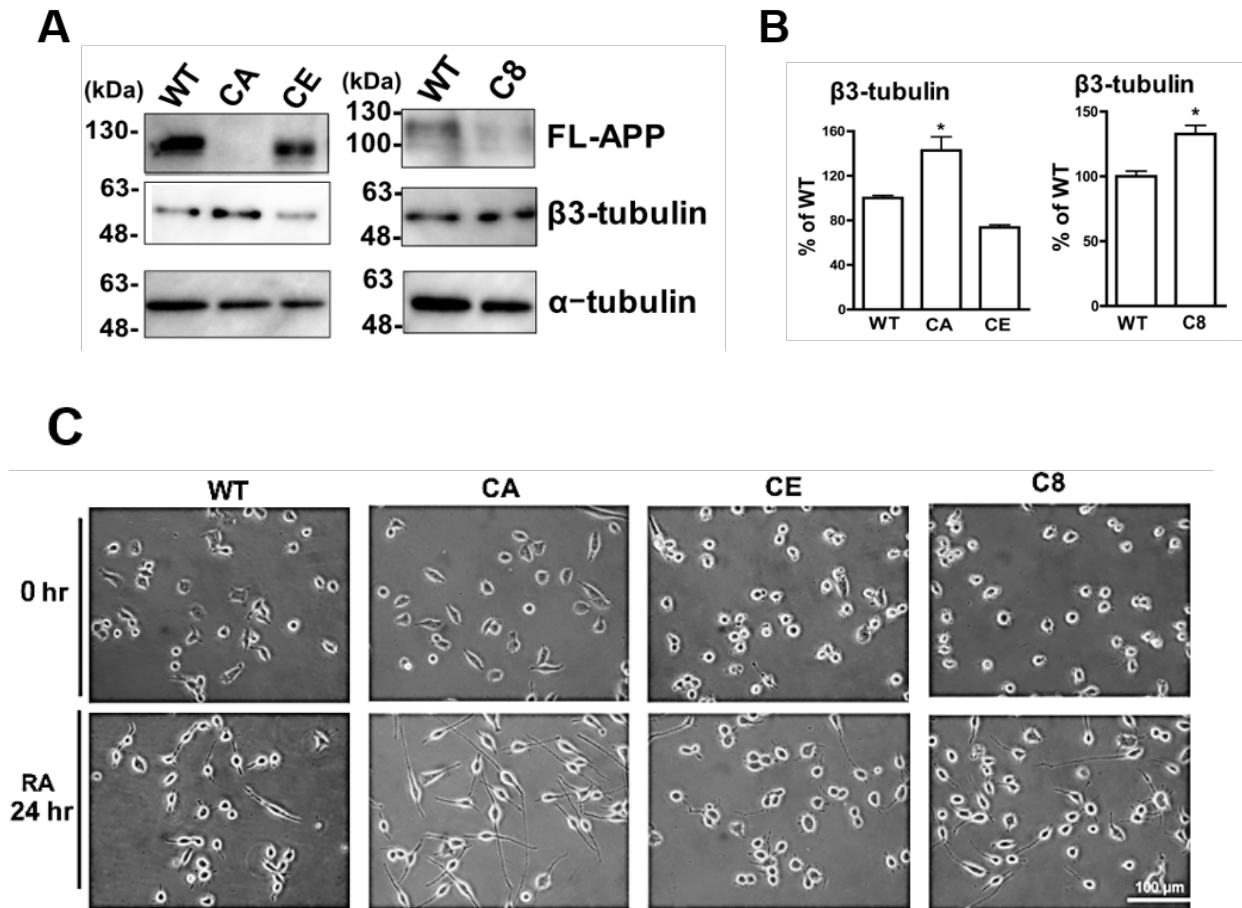


Fig. 7 各変異体の $\beta 3$ -tubulin 発現及び突起伸長に対する影響

A : WT 及び各変異体における神経分化マーカー・ $\beta 3$ -tubulin の発現変化を WB に供し, FL-APP は APP C 末端抗体により, それ以外のタンパク質は特異的抗体により検出した. Loading control: α -tubulin.

B : A を定量化した. One-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test (n=3) * $p < 0.05$. data mean \pm s.e.m. (左)

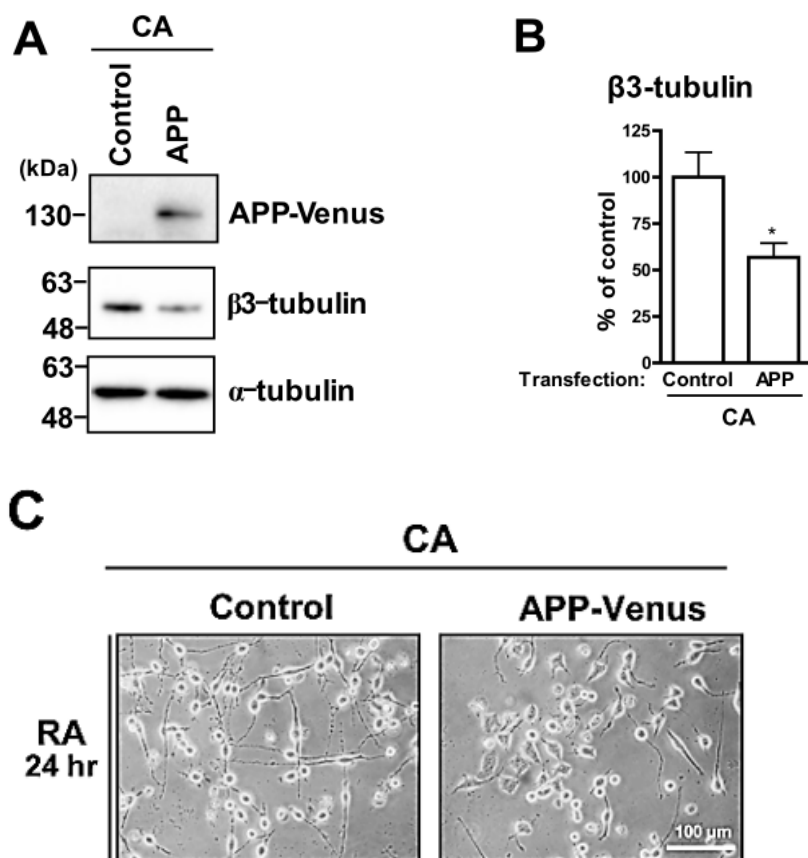
Two-tailed Student's t test (n=3). * $p < 0.05$. data mean \pm s.e.m. (右)

C : N2a 細胞を播種した翌日に RA (10 μ M) を処理し, その 24 時間後に位相差観察を行なった. 神経突起に焦点を当てるため, コントラスト調整を行なった. なお, WT~C8 まで同じコントラストである. Scale: 100 μ m

1-3-4. APP 及びその代謝物が突起伸長へ及ぼす影響

同定された変異クローンの内、C8 及び CE はそれぞれ FL-APP や APP-CTF の発現がほとんど認められない (Fig. 6A). また C8 及び CA は、WT や CE と比べ突起伸長が促進していた事 (Fig. 7C) を考慮すると、FL-APP や APP-CTF の発現は神経の分化に抑制的である事が示唆された. そこで次に、CA に APP を過剰発現した場合において β 3-tubulin の発現と突起伸長への影響を検討した. その結果、APP-Venus を過剰発現させる事で β 3-tubulin の発現が有意に減少し、RA 処理による突起伸長が抑制される事が認められた (Fig. 8A~C). さらに、その他 APP 代謝物 (APP-CTF, A β , AICD) の関与を調べるため、野生型に DAPT (APP-CTF は増加、AICD \cdot A β は減少) を処理し β 3-tubulin の発現変化を検討した. その結果、DAPT を処理しても β 3-tubulin の発現に変化は認められなかったことから、FL-APP が突起伸長に関与している可能性が強く示唆された (Fig. 8D, E).

一方で、本研究でゲノム編集により作製された変異クローンは、オフターゲット効果を示す可能性 (Zhang *et al.*, 2015), 及び人工的な変異によって sAPP α/β 様産物量も変化したことから、これらの変異が突起伸長に影響した可能性を完全には否定できない. そこで次に、RNA 干渉法を用いて APP のノックダウンを行い、 β 3-tubulin の発現に対する影響を検討した. その結果、野生型及び CE で APP ノックダウンにより β 3-tubulin の発現が増加した (Fig. 8F). 以上より、FL-APP が β 3-tubulin の発現及び突起伸長を抑制する事が示唆された.



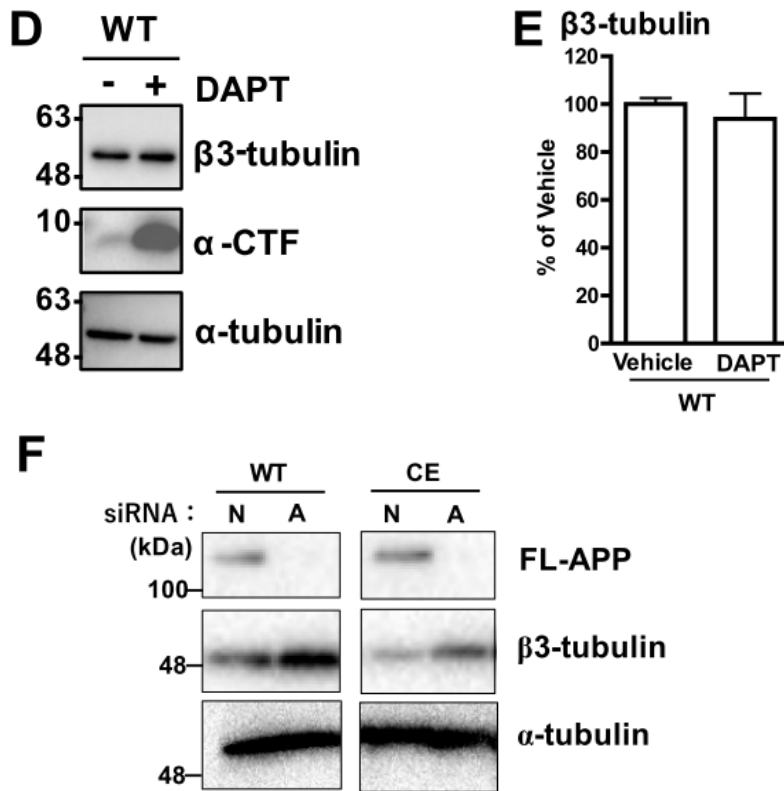


Fig. 8 APP 及びその代謝物による $\beta 3$ -tubulin の発現・突起伸長への影響

- A : CA に APP-Venus をトランスフェクションし 24 時間後に WCL を WB に供した. APP-Venus は APP C 末端抗体により, それ以外のタンパク質は特異的抗体により検出した. Loading control: α -tubulin.
- B : A を定量化した. Two-tailed Student's t test (n=3). * $p < 0.05$. data mean \pm s.e.m.
- C : CA に APP-Venus をトランスフェクションし 24 時間後に RA を処理し, 位相差観察を行なった. 神経突起に焦点を当てるため, コントラスト調整を行なった. なお, control と APP-Venus は同じコントラストである. Scale: 100 μ m
- D : WT に DAPT を処理し 24 時間後に WCL を WB に供し, 特異的抗体により検出した. α CTF は APP C 末端抗体により検出した. Loading control: α -tubulin.
- E : D を定量化した. Two-tailed Student's t test (n=3). * $p < 0.05$. data mean \pm s.e.m.
- F : WT と CE に siRNA による APP のノックダウンを行い, その WCL を WB に供した. N : None, A : Added. FL-APP は APP C 末端抗体により, それ以外のタンパク質は特異的抗体により検出した. Loading control: α -tubulin.

1-4. 考察

本章では、APPのA β 配列を含む膜貫通・膜近傍部位にCRISPR/Cas9によるゲノム編集を行い、種々のAPP代謝を示す変異を同定した。また、変異ごとに得られる突起伸長や β 3-tubulinの発現量変化などから、変異によるAPPの代謝変化と神経分化との関連性が示唆された (Table 5)。

Table 5. 変異別のAPP代謝, β 3-tubulin, 突起伸長に対する影響

WTと比較	APP発現量	APP-CTF (α CTF)産生量	sAPP分泌量	β 3-tubulin発現量	RA処理による突起伸長
C8	↓↓ (<20%)	↓↓ (25%)	ほとんどなし	↑	↑
CA	検出不可	検出不可	WTと同程度のsAPP α 様産物	↑	↑
CE	↓ (70%)	↓↓ (<10%)	sAPP α 様産物↑	-	-

尚、今回同定された変異はヘテロ変異であり、単に遺伝子のコピー数や内在的発現変動がFL-APPの発現、その代謝物の産生量に影響を及ぼした可能性を完全に否定できない。しかし、C8でFL-APP・APP-CTFが50%以上、CEでAPP-CTFが50%以上減少していた (Fig. 6A)。つまり単純に片側遺伝子の完全な遺伝子発現欠損がおこったと考えても、その影響による発現量の減少は50%に留まるはずだが、50%以上減少したということから、得られた変異が表現型 (APPの代謝変化) に大きく影響している可能性が高い。また全ゲノムシーケンス解析により、CRISPR/Cas9のオフターゲット効果について検証する必要はあるが、今回用いた標的配列は、オフターゲット効果を最小限にするソフトウェアCHOPCHOPを用いて設計しており、標的配列以外が編集される可能性は低いと予想される。

APPはADだけでなく、アミロイドアンギオパチー (CAA) にも関与することが知られており、FL-APPやその代謝物の機能は注目されている (Herrup, 2015)。特にAPPの膜近傍・膜貫通部位は家族性ADやCAA関連変異が多く、また、受容体や切断酵素がAPPファミリータンパク質を認識する上で重要な部位である (Deyts, Thinakaran and Parent, 2016)。本研究では、APPの膜近傍・膜貫通部位に異なるAPP代謝を示す変異を同定した (Fig. 4, 6)。

C8クローンは673番目のアラニンが欠損した変異 (Δ A) と、膜貫通領域が欠損した変異を有しており、FL-APPはほとんど確認されず、APP-CTFはわずかに認められた (Fig. 4, 6)。また、sAPP分泌量はほとんど検出されなかった (Fig. 6)。これらのことから、 Δ A変異は主にAPPの安定性に影響を及ぼすことが示唆された。

CEクローンは705番目のロイシンと706番目のメチオニンが欠損した変異 (Δ LM) と膜貫通部位が欠損した変異を有しており、細胞内ではAPP-CTFのみ顕著に減少し、細胞外ではsAPP α 様産物の顕著な増加が認められた (Fig. 4, 6)。この結果から、 Δ LM変異は α 又は γ -セクレターゼの活性に影響を及ぼす可能性が予想された。 α -セクレターゼは形質膜で切断活性を有し、そのひとつTACEは膜貫通ドメインに基質認識部位を持つと考えられている (Li *et al.*, 2007)。そのため、CEクローンの膜貫通領域におけるLM部位は、 α -セクレターゼの基質認識又は、APPの細胞表面における存在量、つまり

その輸送に影響を及ぼす可能性が考えられた。また、対立遺伝子の膜貫通領域欠損変異により (Fig. 4), sAPP α 様産物が増加したことも考えられる。一方で, DAPT (γ -セクレターゼ阻害薬) を処理した際に APP-CTF の蓄積量が WT において約 2.5 倍, CE では約 7 倍増加していたことから, Δ LM は γ -セクレターゼによる切断活性変化にも関与する可能性はあるが, WT と比べその存在量は低いままであった (Fig. 6)。そのため, Δ LM が γ -セクレターゼの切断活性に影響を及ぼすのかを明らかにするには, 今後 A β ・AICD の産生量や, *in vitro* による直接的な活性変化を検討する必要があると考える。また 705 番目のロイシンは CAA と関連する変異部位である事が報告されており (Obici *et al.*, 2005), 今後 Δ LM 変異による APP の代謝変化と CAA との関連が注目される。

これまで, APP の発現増加は神経細胞の突起伸長を抑制し, 反対に, APP の欠失では促進されるという報告があり, APP は神経の発達・分化を抑制する機能を有していることが示唆されてきた (Young-Pearse *et al.*, 2007)。また, FL-APP 以外に sAPP α ・AICD・APP-CTF についても突起伸長に影響を及ぼす事が示されている (Wirhth, 2017)。しかし, これまでの FL-APP や APP 代謝物を含んだ解析では, 各因子の神経分化に対する正確な作用は不明であった。

本章で同定された変異クローンは様々な APP 代謝を示す事で β 3-tubulin や突起伸長に影響を及ぼした。C8 (FL-APP 顕著に減少・APP 代謝産物僅かに存在) 及び CA (FL-APP の欠失) は, β 3-tubulin の発現増加及び RA 処理による突起伸長の促進が認められた (Fig. 7)。CE (APP-CTF のみ顕著に減少) は WT と同様の結果であった (Fig. 7)。さらに, CA において APP-Venus を過剰発現した際, β 3-tubulin の発現減少及び突起伸長の抑制が認められ (Fig. 8A-C), WT 及び CE において FL-APP をノックダウンした際, β 3-tubulin の発現増加が示された (Fig. 8F)。また他の APP 代謝物の関与についても, DAPT (APP-CTF 増加, A β ・AICD 減少) を処理する事で β 3-tubulin の発現に対する影響を検討した結果, 変化は認められなかった (Fig. 8D, E)。これらの結果は, APP 代謝物ではなく, FL-APP 自体が神経の分化に抑制的に機能する事を強く示唆している。

APP がどのように神経分化に関与するかについては, 先行研究において神経成長因子 (NGF) の受容体であるチロシンキナーゼ (Trk) と, APP の膜近傍・膜貫通配列が細胞表面において結合することで, NGF の取り込みが阻害されることが報告されている (Zhang *et al.*, 2013)。そのため, 今回得られた Δ LM などの変異により APP の構造変化や細胞表面における局在の増加が起こることで, 神経分化を抑制することが予想され, ビオチン標識による細胞表面の APP 存在量などについて検証する必要がある。

本研究では人工的なヘテロ変異を解析している点に大きな欠点があるが, APP の膜近傍・膜貫通配列 (A β 配列を含む) 変異の網羅的解析により, これまでにあまり解析が進んでいなかった部位の機能解明につながると考えている。また, 得られたクローンは今後 FL-APP 及び APP 代謝物の機能を解析する上で有用なツールとなることが期待される。

終章 (第 1 章)

APP の膜近傍・膜貫通配列は各種セクレターゼにより切断を受ける領域で、家族性 AD 変異が多く報告されている。これらのことから、本領域は APP による AD 病態への寄与に重要であると示唆されていたが、詳細なメカニズムは明らかでなかった。

本章では、A β 配列を含む膜貫通・膜近傍配列 (Exon 16, 17 に相当) が APP の代謝・機能にどのような影響を及ぼすのか解析することで、APP による AD 病態への関与を明らかにすることを目指した。また、膜近傍・膜貫通配列のどの領域が APP 代謝に重要であるのか明らかにすることも目的とし、標的配列にランダムな変異を起こす CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を利用して解析した。

得られた変異について、3 種類の変異株を選定し APP の代謝・機能を調べた結果、以下のことが示唆された。

1. 膜近傍・膜貫通配列の中でも、A β 配列が APP の代謝に重要である
2. 全長 APP は主として神経分化を抑制する
3. APP-CTF がほとんど産生されない変異 (Δ LM) が新たに同定された

これらのことから、A β 配列が APP の代謝に影響を及ぼし、全長 APP による神経分化を制御することが示唆された (Fig. 9)。

APP は慢性・急性ストレスにより、その発現が増加すること (Rosa *et al.*, 2005)、また AD 初期において神経新生が抑制されることが報告されており (Scopa *et al.*, 2020)、全長 APP による神経分化の抑制は AD 病態に寄与する可能性が考えられた。

一方で、本研究で得られた変異が、どのような機構で AD における APP の代謝・機能に影響を及ぼすのかは明らかでない。今後は、APP の構造や局在に着目し、変異による APP の代謝・機能変化のメカニズムを解析していく必要があるのではないかと考察する。

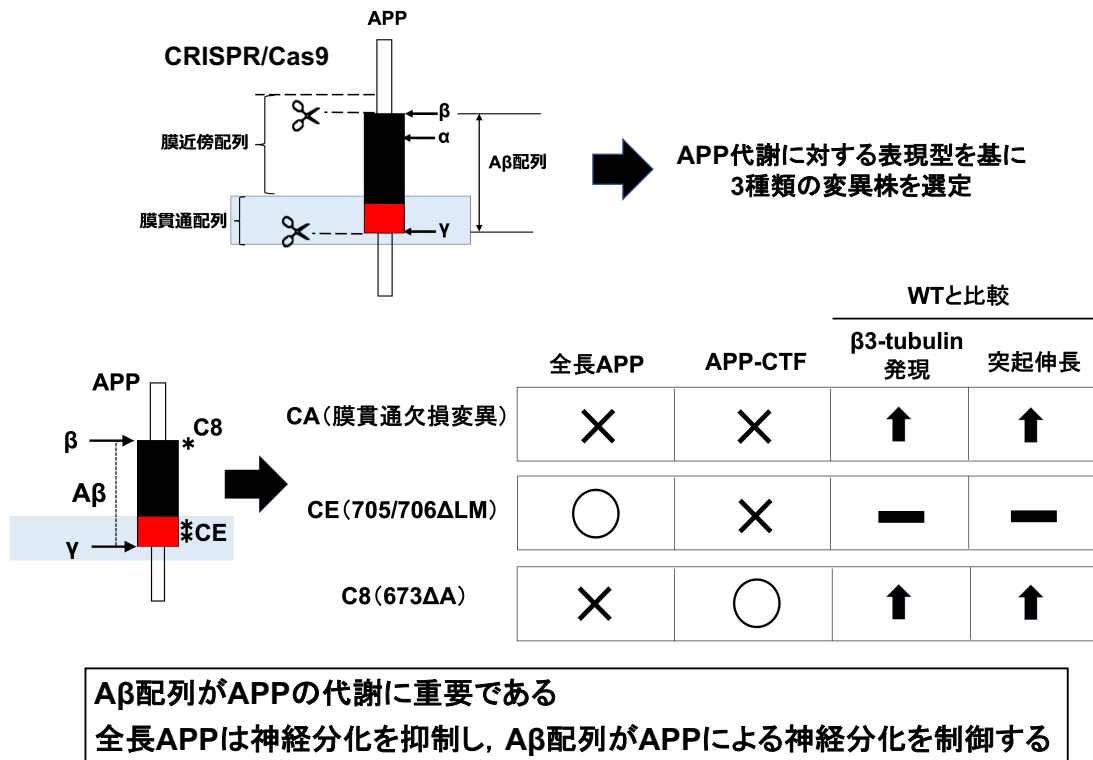


Fig. 9 Graphical abstract

序論 (第2章～5章)

アミロイド仮説を補完する病態として、 β CTF の蓄積による小胞輸送障害も報告されている (Kim *et al.*, 2016). そこで、第2章以降では β CTF による病態形成に着目した.

小胞輸送とは、膜の分離 (出芽) や融合により、オルガネラ同士やオルガネラ膜と形質膜との間で、輸送小胞を介し、物質の運搬を行う経路である. 小胞輸送障害とは、輸送小胞を介した物質の運搬経路が障害されることを指し、オルガネラ小胞であるエンドソームの肥大化を主徴とする (Lauritzen *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2016) (Fig. 10).

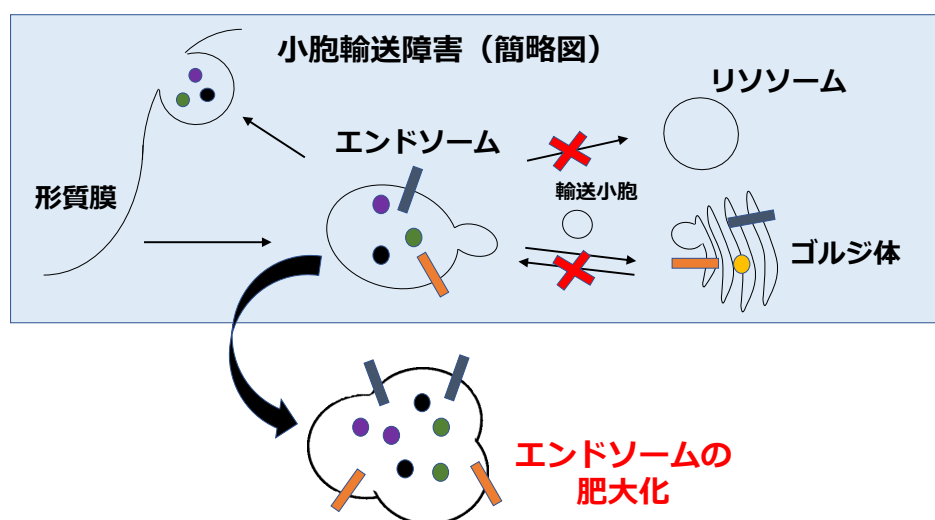


Fig. 10 小胞輸送障害とエンドソームの肥大化

これまで、AD 患者において $A\beta$ が沈着していない段階から、脳内でのエンドソームの蓄積が観察されており、 $A\beta$ 蓄積以前の初期病態として注目されてきた (Cataldo *et al.*, 2000). また、GWAS (genome-wide association studies) 解析により、BACE1 (β -セクレターゼ) の輸送を制御する BIN1 や (Miyagawa *et al.*, 2016), APP, γ -セクレターゼの輸送を制御する PICALM (Xiao *et al.*, 2012; Kanatsu *et al.*, 2014) などの小胞輸送関連因子が、遺伝的 AD リスク因子として報告されており、小胞輸送障害は AD 発症と密接に関与することが示唆されている (Van Acker, Bretou and Annaert, 2019).

近年、AD 初期に生じる小胞輸送障害は $A\beta$ ではなく、 β CTF が蓄積することが引き金であると指摘されている (Lauritzen *et al.*, 2012; Kwart *et al.*, 2019). 具体的には、ヒト iPS 由来の神経細胞に、 γ -セクレターゼ阻害薬を処理すると ($A\beta$ 産生低下・ β CTF など APPC 末端断片の産生増加)、エンドソームの肥大化が観察されることことや (Kwart *et al.*, 2019), モデルマウスにおいて $A\beta$ の沈着以前に β CTF の蓄積やエンドソームの肥大化が生じることが示されている (Lauritzen *et al.*, 2012).

β CTF は、APP がエンドサイトーシスされる過程で、BACE1 切断により産生される (Haass *et al.*, 1992), その後 γ -セクレターゼによる切断を受け (Takasugi *et al.*, 2003), $A\beta$ が産生される. β CTF の蓄積により小胞輸送障害が生じると、エンドサイトーシスなどの細胞内取り込み経路は増加する一方で、細胞内の分解経路は抑制され、 $A\beta$ を含む

様々な物質が蓄積する可能性が提示されており、 β CTF による小胞輸送障害は AD 発症の根幹に関与することが示唆されている (Traffic jam 仮説: Kimura and Yanagisawa, 2018). 実際には、 β CTF の過剰発現マウスや (Oster-Granite *et al.*, 1996; Berger-Sweeney *et al.*, 1999), β CTF が増加し $A\beta$ が減少する BACE1 過剰発現マウスは (Rockenstein *et al.*, 2005), 加齢依存的な神経変性・シナプス変性, そして認知機能の低下を示すことが報告されており, β CTF 自体の毒性が AD 病態に寄与する可能性が指摘されている. しかし, β CTF の蓄積による小胞輸送障害の分子機構は明らかでなく, 小胞輸送障害を定量化する有効な測定系もないため, 治療薬の開発は困難であった.

私たちは以前, $A\beta$ 配列を介し APP・ β CTF と結合する因子として TMEM30A を同定している (Takasugi *et al.*, 2018). これまで一過性の過剰発現系において, TMEM30A と APP・ β CTF の結合によりエンドソームの肥大化を誘導する可能性を示したが (Fig. 11), 内因性 TMEM30A による結合と AD における小胞輸送障害との関連性及び, そのメカニズムについては明らかでなかった.

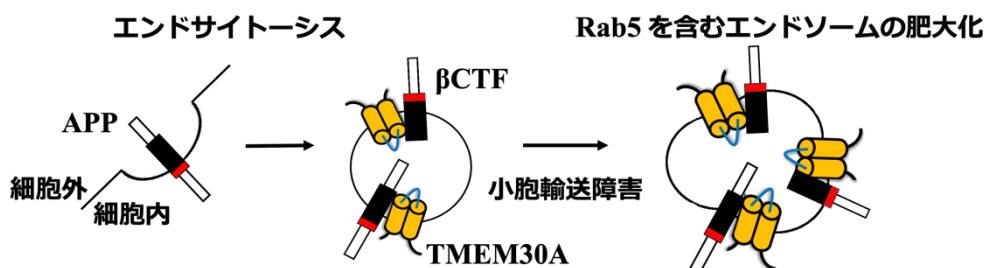


Fig. 11 TMEM30A と APP・ β CTF の結合に伴う肥大化小胞の形成

TMEM30A は 2 回膜貫通タンパク質で, 活性中心である P4-ATPase ファミリータンパク質と結合しリピッドフリッパーゼを構成することで, 脂質二重層におけるリン脂質の非対称性を制御する (Andersen *et al.*, 2016). 特にその細胞外領域は P4-ATPase 酵素活性の維持に重要であると報告されている (Segawa, Kurota, and Nagata, 2017). リン脂質の一つ, ホスファチジルセリン (PS) は脂質二重層の細胞質側に分布し, エンドソームにおいて小胞膜の屈曲や切断に関与する PS 結合タンパク質を集積させることで, 小胞輸送に関与する (Lee *et al.*, 2015; Arumugam and Kaur, 2017). エンドソームにおける PS の分布を担う P4-ATPase として ATP8A1 や ATP8A2 などが知られ (Lee *et al.*, 2015; Coleman and Molday, 2011), これらの P4-ATPase は PS 特異性が高く, その局在・活性には TMEM30A との結合が必要とされる (Andersen *et al.*, 2016) (Fig. 12).

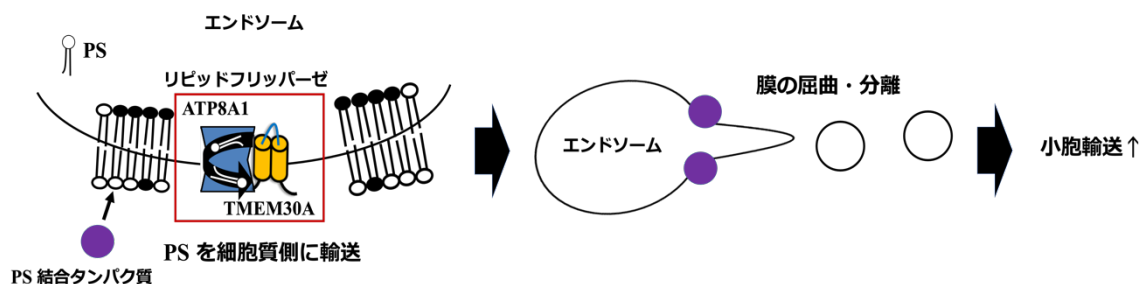


Fig. 12 エンドソームにおける TMEM30A の生理機能

これまで ATP8A1 のノックアウトマウス や (Levano *et al.*, 2012), ATP8A2 の機能喪失変異体を発現するマウスでは (Zhu *et al.*, 2016), 神経細胞において PS が細胞外に露出され, 細胞死を伴わない学習能力やシナプス機能の低下, 軸索変性など AD 様病態が認められている. さらに, その他の P4-ATPase である ATP8B4 の機能喪失変異が AD リスクバリエーションとして同定されるなど (Holstege *et al.*, 2020), リピッドフリッパーゼの機能不全が AD 病態に寄与する可能性が提示されている.

そこでまず培養細胞を用い, 第 2 章では内因性 TMEM30A と APP・ β CTF の複合体形成が小胞輸送障害に関与するのかが検討し, 第 3 章ではリピッドフリッパーゼの機能変化に着目しメカニズムの解明を目指した. 第 4 章では TMEM30A/ β CTF 複合体形成により, リピッドフリッパーゼの機能変化が AD 初期の病態形成に関与するのかを明らかにすること及び, 培養細胞で得られた現象が, モデル動物でも生じうるのかが明らかにすることを旨として, $A\beta$ 沈着以前の月齢のモデルマウスを用いた解析も行なった (Fig. 13)

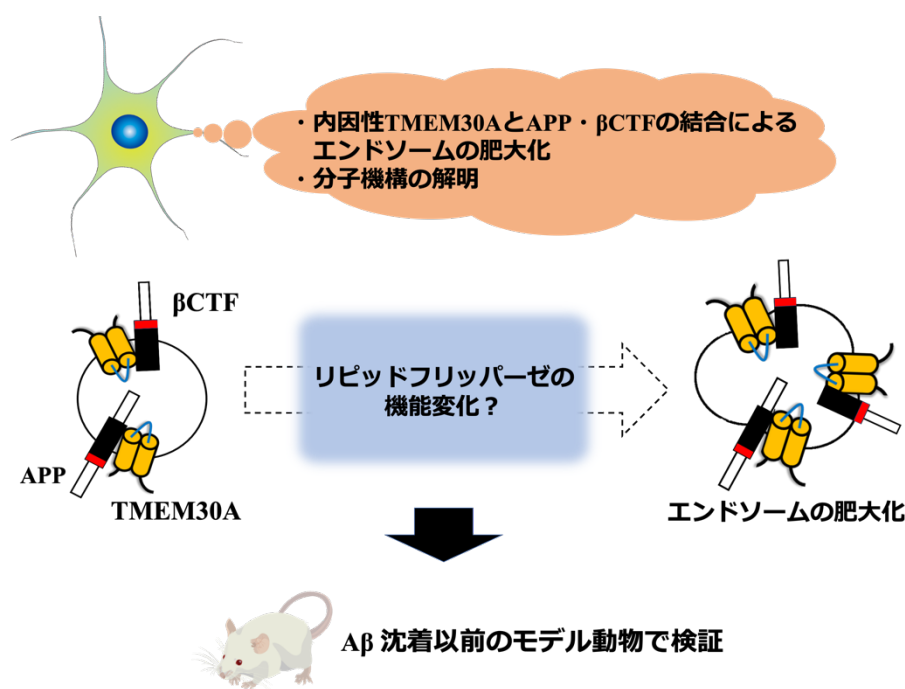


Fig. 13 複合体形成による小胞輸送障害の分子機構及び AD 初期病態との関連性を解析

これまで AD では初期病態を標的とした治療薬は開発されておらず, 本課題を解決することは当該分野において大きな進歩となりうる.

当研究室では, TMEM30A 細胞外領域の配列, 'T-RAP' が β CTF の $A\beta$ 配列と結合することを見出している (Takasugi *et al.*, 2018; 今岡亮介 修士論文, 2017). 最後に, 第 5 章ではその領域を合成した T-RAP ペプチドが TMEM30A と β CTF の複合体形成を阻害し, 小胞輸送障害 (エンドソームの肥大化) を改善するのかが初期的な解析を行なうことで, 新規治療候補分子の同定につなげることを目指した (Fig. 14).

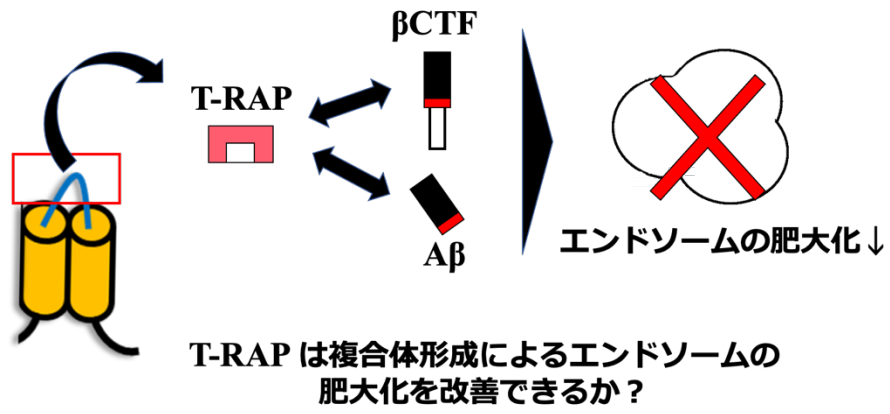


Fig. 14 β CTF 結合性ペプチド T-RAP の効果を検討

第2章 内因性 TMEM30A と β CTF の結合に伴う エンドソームの異常

2-1. 目的

近年, AD 初期病態として $A\beta$ の直接的前駆体である β CTF が AD 患者脳内で蓄積し, 小胞輸送障害を引き起こすことが注目されている (Kim *et al.*, 2016). しかし, その詳細な分子機構は明らかでない. 当研究室ではこれまで, アフリカミドリザル腎臓由来 COS-7 細胞を用い, 一過性の過剰発現系において APP \cdot β CTF に結合し, 小胞輸送障害を引き起こすパートナー分子として TMEM30A を同定した (Takasugi *et al.*, 2018). 本章では, ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞において, 内因性 TMEM30A が APP \cdot β CTF と結合するか否かを検討し, これら複合体と小胞輸送障害との関連を明らかにすることを目的とした.

2-2. 実験方法

2-2-1. Plasmid DNA コンストラクトの作製 (増幅に用いた primer 配列は Table 6 に示す)

pEB-Hyg-BACE1: pMx-Puro-BACE1 (Vetrivel *et al.*, 2009) を鋳型として, PrimeSTAR Max DNA Polymerase を用いて製品のプロトコルに従い, BACE1 配列を増幅した. 得られた PCR 産物を Sall と BamHI 酵素で切断後 (37°C, 3 h), 同様の酵素で切断されたエピソーマルベクター pEB-Hyg (Tanaka *et al.*, 1999) と混合し, 16°C, o/n でライゲーション反応を行なった.

pEB-Hyg-TO-SC100: SC100 (artificial β CTF) 配列は pcDNA3.1/Hygromycin-SC100 (Iwata *et al.*, 2001) を鋳型として増幅した. PCR 産物は, NEBuilder HiFi DNA assembly mix (New England Biolab) を用いて製品のプロトコルに従い, XhoI と NotI 酵素で切断された pEB-Hyg に導入した. その後, pEB-Hyg-SC100 と pcDNA4-TO (Thermo Fisher) 両方を SnaBI と XhoI 酵素で切断しライゲーション反応を行なった.

pEB-Hyg-TO-SC89: pEB-Hyg-TO-SC100 を鋳型として, PrimeSTAR Max DNA Polymerase を用い PCR 変異導入により作製した.

Table 6. BACE1, SC100, SC89 配列の増幅に用いた primer 配列

Plasmids	Primer (forward)	Primer (reverse)
pEB-Hyg-BACE1	5'-CCC GTC GAC CAC CAT GGC CCC AGC GCT GCA CTG G-3'	5'-GGG GGA TCC CTT GAG CAG GGA GAT GTC ATC-3'
pEB-Hyg-TO-SC100	5'-TAC CGG GCC CCC CCT CGA GGC ACC ATG GCG CAG TTC CTG-3'	5'-TGA TTA TGA TCT AGA GTC GCG GCC GCT AGT TCT GCA TCT GCT CAA AGA AC-3'
pEB-Hyg-TO-SC89	5'-TGG CTA CAG TGC AGG CAG AAG TTC A-3'	5'-ATT TTT GAT GAT GAA CTT CTG CCT GC-3'

2-2-2. 細胞培養

ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞は、10% FBS 及び 1% ペニシリン/ストレプトマイシンを含む D-MEM/Ham's-F12 を用いて 37°C, 95% air-5% CO₂ の条件下で培養した。また、アフリカミドリザル腎臓由来 COS-7 細胞、及びヒト胎児腎臓由来 HEK293T 細胞は、10%FBS 及び 1% ペニシリン/ストレプトマイシンを含む D-MEM (High Glucose)を用いて上記と同様の条件で培養した。恒常発現細胞の作製については、初めに 3.5 cm dish のスケールにおいて、エピソードベクターである pEB Multi-Hyg, pEB Multi-Hyg-BACE1 又は pEB Multi-Hyg-TO-SC100 の恒常発現用 plasmid 2.5 µg と plasmid 導入試薬 Lipofectamine 3000 reagent (3.75 µl) を 250 µl の Opti-MEM に溶解後、SH-SY5Y 細胞及び COS-7 細胞に reverse transfection により導入した。24 時間後に Hygromycin (50 mg/ml) を最終 250 µg/ml になるように加え、陽性細胞を選択した。その後は上記と同様の条件で培養し、10 cm dish までスケールアップして生存が認められた細胞を選択した。以降恒常発現細胞においては、SH-control, SH-BACE1, SH-SC100, COS-control, COS-BACE1 と表記する。

2-2-3. 4G8 抗体を用いた Aβ の免疫沈降法

10 cm dish で培養した SH-control, SH-BACE1 細胞の培養上清 (24・48 時間) 及び、SH-Swe 細胞 (pEB-Hyg-APP_{swe} を用いて作成した APP Swedish 変異体の恒常発現細胞: 高杉展正 准教授より供与) の培養上清 (48 時間) を回収し、遠心 (3000 rpm, 4°C, 10 min) (Rotor No: MA-2024, KUBOTA) により死細胞を除去した。遠心後の上清に PMSF (最終 0.1 mM) を加え、Triton X-100 (最終 0.01%), 4G8 抗体 (4 µg), protein A/G agarose beads (20 µl) を加え、4°C, o/n でインキュベーションした。翌日、4000 rpm, 4°C, 3 min 遠心後、4G8 wash buffer (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.6, 0.01% Triton X-100) を 700 µl 加え、4°C で 20 分インキュベーションした。次に、4000 rpm, 4°C, 3 min で遠心し上清を除いた後、100 µl の 4G8 wash buffer を加えた懸濁サンプルを 1 ml の 1 M Sucrose/4G8 wash buffer 上に静かにアプライした。そして 10000 rpm, 4°C, 1 min 遠心後、上清を除いた。続いて、200 µl の 10 mM Tris-HCl (pH 7.6) を加え懸濁後、4000 rpm, 4°C, 3 min 遠心し上清を除いた。最後に 2 x sample buffer を加え、WB に供した。また、免疫沈降反応のポジティブコントロールとして、合成 Aβ (0.1µM) を PBS または 10% FBS 入りの培地で調製し。上記と同様に 4G8 抗体による免疫沈降を行なった。

2-2-4. 共免疫沈降法

Fig. 16C : 10 cm dish に SH-control, SH-BACE1 細胞を 70% の割合で播種した翌日、DMSO, DAPT (10 µM), BACE1 阻害薬 (β-secretase inhibitor IV : BACE1 の活性部位に結合し切断を抑制) (10 µM) を処理した。24 時間後に細胞を PBS で 2 回洗浄後、IP buffer (20 mM HEPES-NaOH pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1% CHAPS, protease inhibitor) 1 ml で scrape により回収した。4°C, 30 分インキュベーションにより可溶化後、15000 rpm, 1 min, 4°C で遠心 (Rotor No: MA-2024, KUBOTA) し、不溶物を除去した。その上清を新しい 1.5 ml チューブに移し、Input サンプルを回収した。残ったサンプルに抗体を 1 µg/sample 加え、4°C で 2 時間反応させた。その後、予め平衡化した protein G Sepharose beads を 20~30 µl ずつ各サンプルと 4°C, o/n で反応させた。翌日 2

x sample buffer を加えタンパク質を抽出後、WB に供した。

Fig. 16D : 3.5 cm dish に HEK293T 細胞を 60% の割合で播種した。翌日、plasmid 導入試薬である PEI-MAX (5 μ l) 及び、pDEST-CFP-TMEM30A (Takasugi *et al.*, 2018) と pEB Multi-Hyg-TO-SC100 または pEB Multi-Hyg-TO-SC89 を total DNA 量 2 μ g になるよう 1:1 で 500 μ l の Opti-MEM に溶解後細胞に導入し、6 時間後に培地を交換した。トランスフェクションから 48 時間後に、細胞を PBS で 2 回洗浄し、500 μ l の IP buffer で scrape により回収した。以降は上記と同様の方法で行なった。

2-2-5. イोजキシサノール密度勾配遠心によるオルガネラの分画

24 時間後に confluent になるよう 15 cm dish に細胞を播種した。そして播種した 24 時間後に PBS で 2 回洗浄し、Homogenize buffer (250 mM sucrose, 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, protease inhibitor) 1 ml で回収し、氷上でダウンス型ホモジナイザー (20 strokes), 21 G 注射針をつけたシリンジ (20 strokes) に通す事で細胞を破碎した。遠心 (3000 rpm, 15 min, 4°C) (Rotor No: MA-2024, KUBOTA) により、核画分及び未破碎細胞を除去し、その上清から 10% Input サンプルを回収した。残った細胞溶解液に同量の 50% イोजキシサノールを加え、超遠心専用チューブに移した。その上に順に 20%, 18.5%, 16.5%, 14.5%, 12.5%, 10.5%, 8.5%, 6.5%, 5% のイोजキシサノール溶液を上層し、密度勾配を作製した。その後 SW41Ti スウィングローター (Beckman Coulter) を用いて、超遠心 (27000 rpm, 20 h, 4°C) に供した。超遠心後、チューブの最上端から 500 μ l ずつサンプルを回収し、全てのサンプルに TCA (final 15%) を加え、転倒混和により TCA を攪拌させた。その後、氷上で 30 分インキュベーションしたのち遠心 (15000 rpm, 4°C, 15 min) によりタンパク質を濃縮した。得られた沈殿に RIPA 15 μ l, 2 x sample buffer 15 μ l を加え vortex し、50°C, 30 分熱処理する事で可溶化したサンプル (溶解した上清のみ) を WB に供した。

2-2-6. 免疫染色

初めに、カバーガラス (C013001, Matsunami) を 0.001% Poly-L-Lysine/ddH₂O に浸し、4°C, o/n でコーティングした。PBS で 10 回洗浄後、コーティングしたカバーガラスを 12 well plate に入れ、COS-control, COS-BACE1 細胞を 40~50% の confluent で播種した。24 時間後に PBS で 2 回洗浄後、4% paraformaldehyde/PBS (4% PFA) を使用し、室温で 20 分固定した。その後 PBS で 5~10 回洗浄した。次に 0.1% Triton X-100/PBS で 4°C, 10 分細胞を透過後、PBS で洗浄し、1% BSA/PBS により室温で 1 時間ブロッキング処理を行なった。続いて、Rab5 に対する一次抗体をブロッキング溶液に 1:200 の割合で希釈し、4°C, o/n で反応させた。翌日、カバーガラスを PBS-T で 5 分、3 回洗浄後、2 次抗体 (使用抗体一覧参照) を 1:400 の割合で希釈し室温で 30 分反応させた。その後 PBS-T で同様に洗浄後、核染色色素 DAPI が含まれた VECTASHIELD Mounting Medium で封入した。撮像は BZ-X810 (Keyence) の顕微鏡を使用し、全てのサンプルにおいて同じ露光時間で行なった。Rab5 陽性粒子の解析については、粒子の解像度を上げるために 60 倍の対物油浸レンズを用いて、z 軸に沿って 0.1 μ m 間隔で z-stack 画像を撮像後、BZ-X Analyzer ソフトウェアを用いて 25 枚の z-stack 画像を 1 枚のフルフォーカス画像に統合した。各サンプルにおいて、10 枚の z-stack 画像をランダムに選択し、BZ-X Analyzer

Hybrid Cell Count and Macro Cell Count ソフトウェア (Keyence) を用いて、画像を 2 値化後、全ての画像において Rab5 陽性粒子のサイズ・その分布に関して同一条件で測定した。

2-2-7. ウェスタンブロット (Western blot: WB)

Vehicle である DMSO を処理した SH-control, SH-BACE1 細胞及び BACE1 阻害薬 (10 μ M) を 48 時間処理した SH-BACE1 細胞の WCL は、1-2-8 と同様に細胞を 100 μ l 以上の RIPA buffer で溶解し調製した。そして WCL, 免疫沈降 (IP) サンプル, 密度勾配遠心サンプルを、それぞれ 1-2-6 と同様に SDS-PAGE に供し、目的タンパク質に対する特異的 1 次抗体, そして Horseradish peroxidase (HRP) 標識の 2 次抗体 (1 次抗体の宿主に対する抗体; 使用抗体一覧参照) を反応させ、HRP 基質 (ImmunoStar LD/zeta) を加えた後、ChemiDoc (Bio-Rad) により検出した。定量法は、1-2-8 と同様である。

2-2-8. 統計解析

Rab5 陽性 puncta の面積については box plot で示しており、中央値 (median), 最小値 (min), 最大値 (max) を表示した。それ以外のデータについては、 $\text{mean} \pm \text{s.e.m}$ で表示した。統計解析は、GraphPad Prism8 ソフトウェアを用い、Two-tailed Student's t test を適用した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。

2-3. 実験結果

2-3-1. BACE1 恒常発現細胞の樹立

AD の初期病態として β CTF の蓄積に加え、その産生酵素である BACE1 の発現・活性も上昇することが知られている (Zetterberg *et al.*, 2008; Ahmed *et al.*, 2010). そこで、病態初期に準じたモデルを作製するため、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を用いて BACE1 恒常発現細胞系を樹立した. BACE1 はその切断部位から β 1 又は β 1 より N 末端領域が短い β 11CTF を産生する (Fig. 1 参照). 初めに、本モデル細胞における APP の代謝や BACE1 のタンパク質発現量を検討した (TMEM30A については後述する). その結果、BACE1 恒常発現細胞では BACE1 の発現増加が確認されると共に、 β 1 (10 kDa より上側)・ β 11CTF (10 kDa 付近)が増加し、 α CTF はほとんど認められなかった (Fig. 15A). 一方で、BACE1 阻害薬処理により β CTF のみが減少し、 α CTF の産生が増加した (Fig. 15A). このことから、以前の報告通り BACE1 恒常発現により、APP の代謝について α -セクレターゼによる切断よりも、 β -セクレターゼによる切断が増加していることが確認された (Vetrivel *et al.*, 2011). 実際には、BACE1 恒常発現細胞において、異なる糖鎖修飾により 100 kDa 付近に 3 本観察される APP シグナルのうち、一番上のシグナル (成熟型: Jämsä *et al.*, 2011) が減少し、BACE1 阻害薬処理により回復した (Fig. 15A). 成熟型 APP や BACE1 はエンドソームに局在するため (Zhang and Song, 2013), 成熟型 APP の減少は、BACE1 による切断を受け β CTF が増加したことを示唆している.

さらに、medium (培養上清) 中の $A\beta$ 量を測定するため、ヒト $A\beta$ を認識する 4G8 抗体により免疫沈降を行なった. 初めに、PBS 及び、10% FBS を含む培地に合成 $A\beta$ を混合したサンプルでは、強いシグナルが検出されたことから、免疫沈降における抗体の反応性が確認された (Fig. 15B). また、ポジティブコントロールとして、BACE1 の切断が増加し、 $A\beta$ 産生が増加する家族性 AD 変異を持つ APP を恒常発現する SH-Swe 細胞でも (Ancolio *et al.*, 1999), control 細胞に比べ、シグナルが増加することを確認している (Fig. 15B). 次に、ネガティブコントロールである IgG 処理では $A\beta$ のシグナルが検出されず、4G8 抗体処理では、control 細胞に比べ、BACE1 恒常発現細胞において、そのシグナルが顕著に増加した (Fig. 15B). そのため、 $A\beta$ に関しても BACE1 恒常発現細胞で増加することが確認された (Vetrivel *et al.*, 2011).

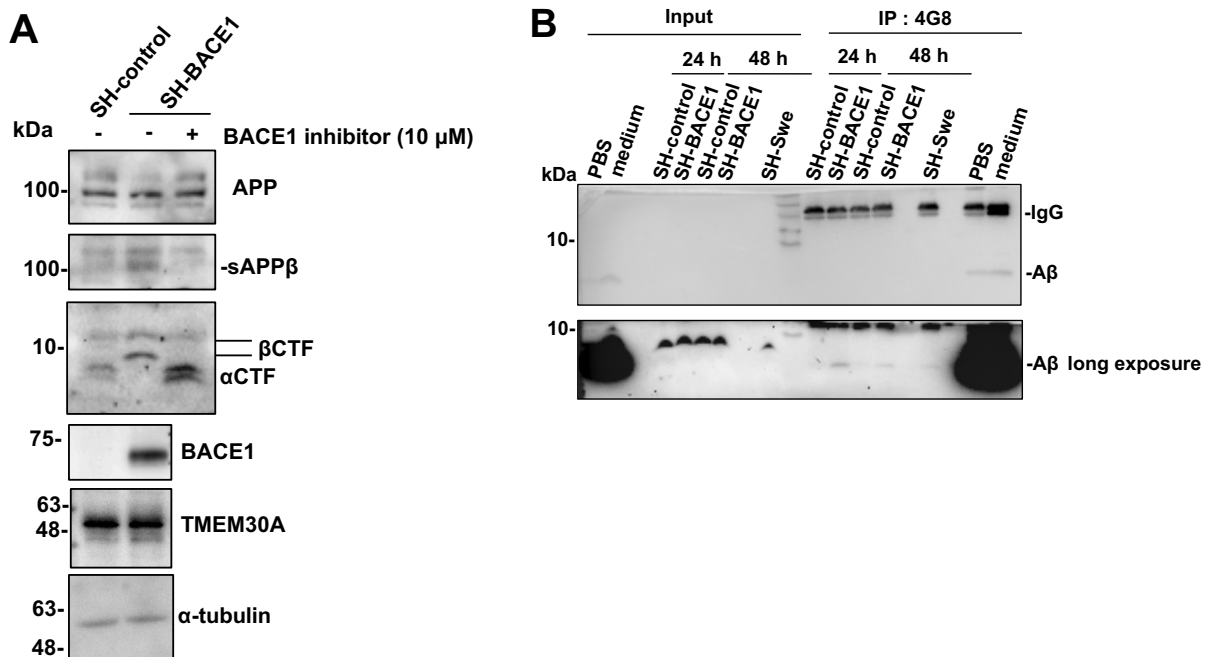


Fig. 15 BACE1 恒常発現による APP 代謝の変化

- A : SH-control と SH-BACE1 細胞の WCL を WB に供し、各タンパク質を特異的抗体により検出した。 α CTF、 β CTF は APP C 末端抗体により検出した。 β CTF の上側のバンドは β 1 を、下側のバンドは β 11 を示す。 sAPP β の検出については medium を WB に供している。 BACE1 inhibitor は SH-BACE1 細胞に処理した。 Loading control: α -tubulin.
- B : SH-control, SH-BACE1 細胞の medium を 24 時間、48 時間後に回収し、4G8 抗体を用いて免疫沈降を行い、82E1 抗体で A β を検出した。尚、PBS や FBS を含んだ medium に合成 A β を溶解したサンプルは、免疫沈降のポジティブコントロールとして用いた。また、SH-Swe は A β が増加するポジティブコントロールとして使用した。

2-3-2. TMEM30A と β CTF の結合

本モデル細胞系を用いて、内因性 TMEM30A と APP・ β CTF の結合を共免疫沈降により検討した。初めに、 β CTF の可溶性について検討したところ、SDS などの界面活性剤を含む RIPA で溶解した WCL では、BACE1 恒常発現細胞において β CTF のシグナルが増加し、細胞の膜画分を比較的マイルドな界面活性剤である CHAPS により可溶化した際には control 細胞と比べシグナルが増加しなかった (Fig. 16A, B)。通常、 β CTF はエンドソーム膜などの膜画分で産生され (Haass *et al.*, 1992)、BACE1 恒常発現により WCL と同様膜画分においても、 β CTF のシグナルが増加する。これらのことから、BACE1 恒常発現細胞において、CHAPS により膜画分に局在する β CTF が十分に可溶化できなかった可能性が考えられた。実際に、 β CTF が lubrol などのマイルドな界面活性剤に溶けにくいことが示唆されている (Sakurai *et al.*, 2008)。

そこで、共免疫沈降の検出感度を上げるため、APP-CTF (α CTF, β CTF) を蓄積させる γ -セクレターゼ阻害薬 DAPT (Morohashi *et al.*, 2006) (10 μ M) を処理し、TMEM30A と APP 又は β CTF の結合を検討した。その結果、ネガティブコントロールである IgG 処理では、APP, β CTF が両方とも共沈せず、TMEM30A 抗体処理では、BACE1 恒常発現細胞において、 β CTF のみが共沈した (Fig. 16C)。また、BACE1 阻害薬処理により β CTF の産生が減少した際、TMEM30A 抗体と共沈降された β CTF は認められなかった (Fig. 16C)。以上の結果から、APP-CTF が蓄積した際、内因性 TMEM30A は APP と結合せず、 β CTF と結合することが示唆された。なお、TMEM30A のタンパク質量は変化しなかったことから (Fig. 15A)、両者の結合は TMEM30A のタンパク質発現量の違いによる影響ではないことが示唆された。

続いて、TMEM30A が β 1, β 11CTF のどちらと結合するのかを明らかにするため、HEK 293 細胞に人工的な β 1 (SC100)、または β 11 (SC89) を CFP-TMEM30A と共発現させ、control IgG または GFP 抗体を用いて共免疫沈降法により検討した。その結果、ネガティブコントロールである IgG 処理では β 1, β 11CTF が共に共沈しなかったが、GFP 抗体処理では、いずれも CFP-TMEM30A と共沈した (Fig. 16D)。このことから、TMEM30A は β 1 及び、 β 11CTF 両方と結合することが示唆された。

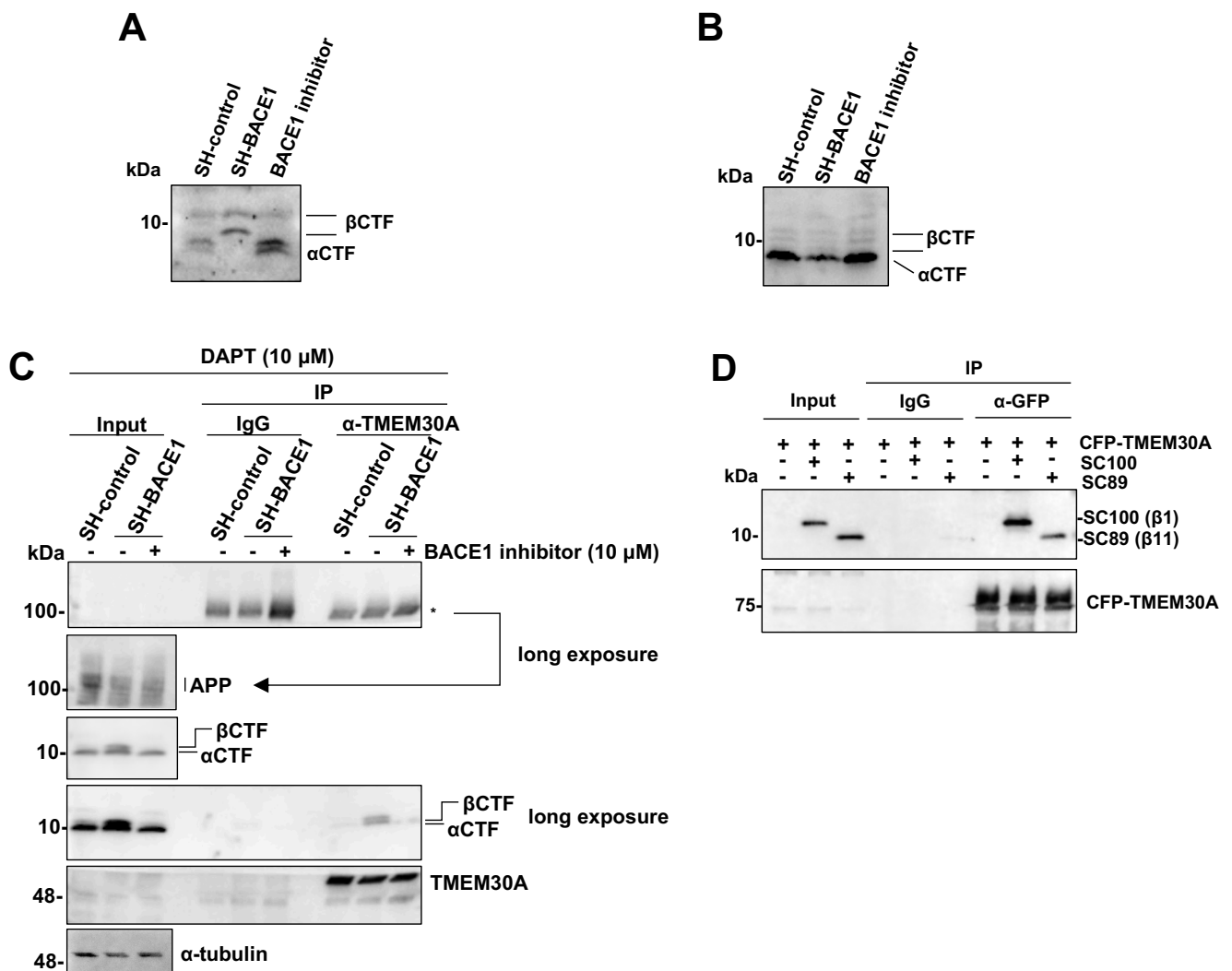


Fig. 16 BACE1 恒常発現による TMEM30A と β CTF (β 1, β 11) の結合

- A : SH-control, SH-BACE1 細胞の WCL を RIPA で溶解し WB に供した. Fig. 15A と同じ図で, B と比較するために示している.
- B : SH-control, SH-BACE1 細胞の膜画分を 1%CHAPS を含んだ溶液 (膜画分の共免疫沈降法を参照) で溶解し WB に供した. α CTF, β CTF は APP C 末端抗体により検出した.
- C : SH-control, SH-BACE1 細胞に DAPT (10 μ M), または BACE1 inhibitor (10 μ M) との共処理を行い, その 24 時間後に TMEM30A 抗体又は, control IgG で共免疫沈降を行なった. *は IgG の dimer であると考える. 各タンパク質は特異的抗体により検出した. Loading control: α -tubulin.
- D : HEK293T 細胞に CFP-TMEM30A 及び, SC100 (β 1CTF) 又は SC89 (β 11CTF) を共発現させ, その 48 時間後に GFP 抗体又は, control IgG で共免疫沈降を行なった. CFP-TMEM30A は TMEM30A 抗体により, SC100 \cdot SC89 は APP C 末端抗体により検出した.

2-3-3. TMEM30A と β CTF の局在変化

続いて、TMEM30A と β CTF の結合により両者の局在が変化するのか、イオジキサノール密度勾配遠心によるオルガネラの分画を行い検討した。その結果、リソソームマーカーである LAMP2 や小胞体 (ER) マーカーである Calreticulin の分布については、SH-control・SH-BACE1 細胞ともに変化しなかった (Fig. 17A)。一方で、初期エンドソームマーカーである Rab5A は、SH-control において Fraction (Fr) 7~12 に分布し、SH-BACE1 ではさらに、重い画分である Fraction (Fr) 14~16 においても認められた (Fig. 17B)。なお、Rab5A のタンパク質量は変化しなかったことから (Fig.17B)、分布の違いはタンパク質発現量の違いによる影響ではないと考えられる。 β CTF に関しては、SH-control において Fr 6~9 に分布し、SH-BACE1 においては Rab5A と同様 Fr 14~16 に分布していた (Fig. 17B)。これに伴って、BACE1 は SH-control において Fr 6~10 に分布し、SH-BACE1 において Fr 14~16 に認められ (Fig. 17A)、 β CTF と同様の分布を示した。さらに、TMEM30A の分布に関しては、SH-control において Fr 7~12 に分布していたが、SH-BACE1 において顕著に変化し、重い画分である Fr 14~16 に豊富に存在していた (Fig. 17B)。以上の結果から、BACE1 恒常発現により、TMEM30A 及び β CTF の分布が変化し、通常とは異なるエンドソーム画分に局在することが示唆された。

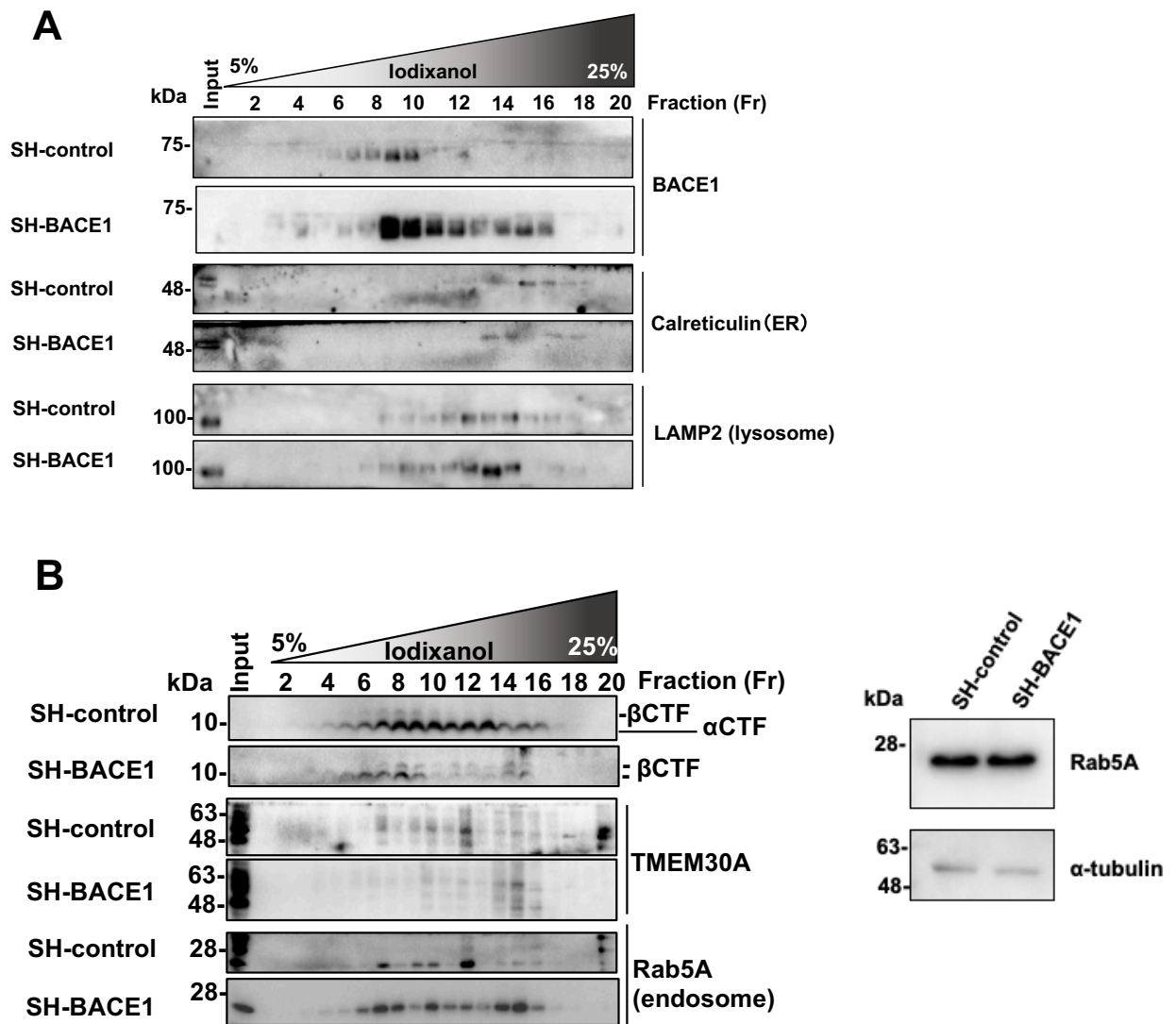


Fig. 17 BACE1 恒常発現による TMEM30A と β CTF の局在変化

A : SH-control と SH-BACE1 の細胞溶解液をイオジキサノール密度勾配遠心に供し、オルガネラの分画を行なった。BACE1, 小胞体 (ER) マーカーである Calreticulin, リソソームマーカーである LAMP2 は、それぞれ特異的抗体により検出した。フラクション (Fr) が右にいくにつれて、重い画分を表している。

B : A と同様、SH-control と SH-BACE1 の細胞溶解液をオルガネラの分画に供した (左)。Rab5A はエンドソームマーカーとして使用した。各タンパク質は特異的抗体により検出した。 α CTF, β CTF は APP C 末端抗体により検出した。また SH-control と SH-BACE1 細胞の WCL を WB に供し、Rab5A を特異的抗体により検出した (右)。Loading control: α -tubulin.

2-3-4. エンドソームの形態変化

オルガネラの分画により，通常とは異なるエンドソームの存在が推察されたため，その形態変化について COS-7 細胞を用いて観察した．COS 細胞は，細胞の形が扁平状で細胞面積が広いいため，SH-SY5Y 細胞に比べ，オルガネラの形態変化を観察しやすく広く用いられている (Takasugi *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2015; Matsudaira *et al.*, 2017)．初めに，Rab5A に対する免疫蛍光染色の結果，以前の報告通り (Takasugi *et al.*, 2018)，核（青色）の周囲に dot 状の Rab5A の蛍光シグナル（赤色）が検出され，既知のエンドソームの染色と一致することを確認した (Fig. 18A)．次に，Rab5A 陽性エンドソームの形態変化を解析したところ，BACE1 恒常発現細胞において，その平均面積及び (Fig. 18A, B)，肥大化したエンドソーム ($0.5\sim 3.0\ \mu\text{m}^2$) の割合が有意に増加していた (Fig. 18A, C)．一方で，BACE1 恒常発現細胞において，Rab5A 陽性エンドソームの輝度が増加している傾向が観察されたが，Rab5A のタンパク質発現量は変化しなかった (Fig. 18A, D)．

続いて，エンドソームの肥大化が BACE1 の活性に依存するのかを検討するため，BACE1 阻害薬処理により，同様にエンドソームの形態変化を観察した（ただし，上記と異なり試行回数は 1 回である）．その結果，BACE1 恒常発現細胞で増加した Rab5A 陽性エンドソームの平均面積が減少する傾向が得られた (Fig. 18E)．このことから，BACE1 による βCTF の産生が低下し，エンドソームの肥大化が改善する可能性が考えられた．

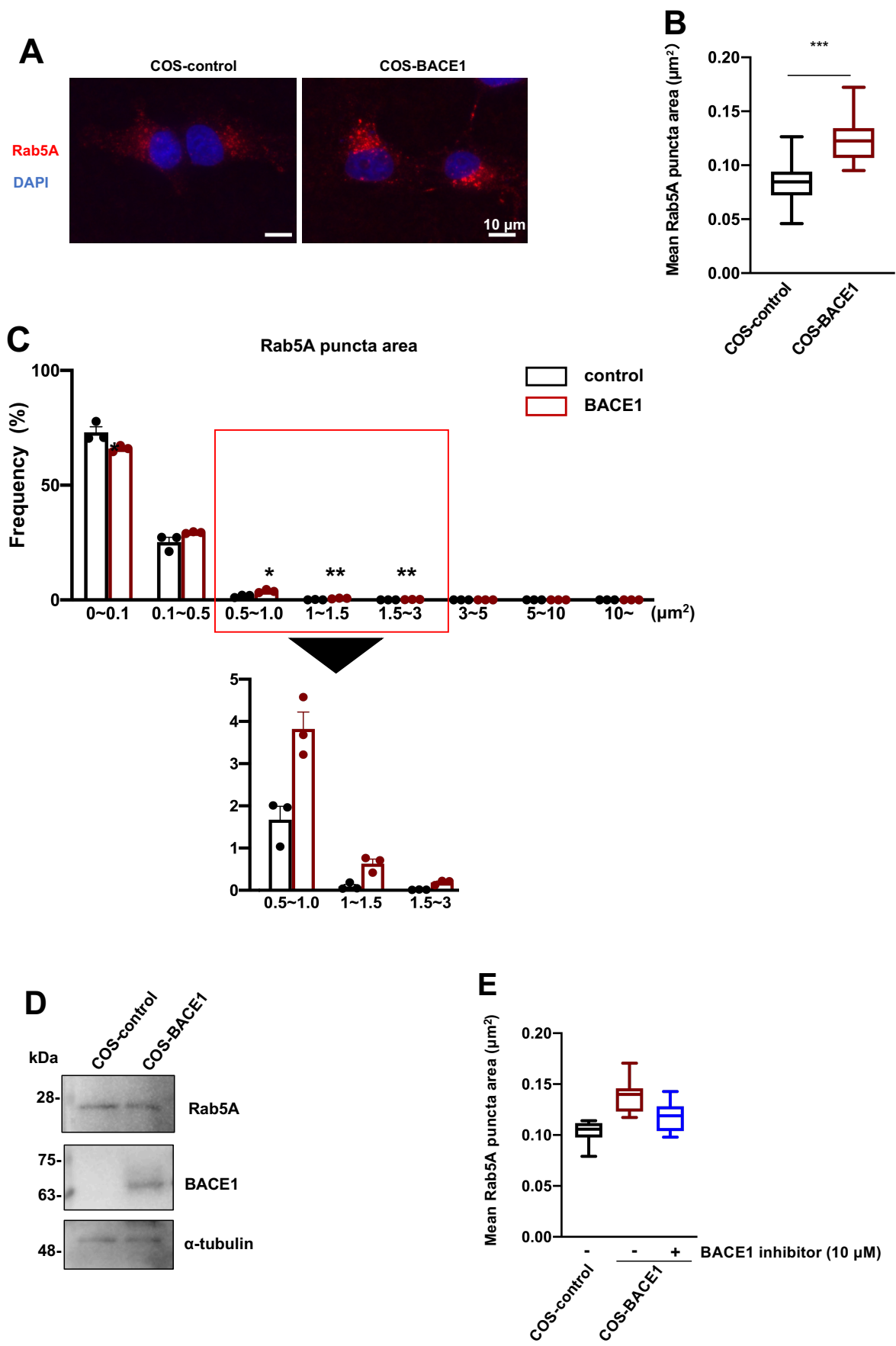


Fig. 18 BACE1 恒常発現によるエンドソームの肥大化

- A : COS-control, COS-BACE1 細胞において, Rab5A に対する免疫染色を行なった. 図は 60 倍の油浸対物レンズで撮影し, 2.6 倍に拡大したものである. 青色 (DAPI) は核を示す. Scale: 10 μm .
- B : A において, 各サンプルにつき解析した全視野 (n=30; 10 fields x 3 trials) における, 単一 Rab5A 陽性 puncta の平均面積を定量化した. Two-tailed Student's t test (n=30: 10 fields x 3 trials). *** $p < 0.001$. The bar in the box: median; whiskers: Min to Max.
- C : A における Rab5A 陽性 puncta について, サイズごとの存在割合を表している. 縦軸は, 全体の puncta 数に対する各サイズ puncta の割合を示す. 矢印の下は, 0.5~3 μm^2 の面積の割合について図を拡大したものである. Two-tailed Student's t test (n=3). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. data mean \pm s.e.m.
- D : COS-control 及び COS-BACE1 細胞の WCL を WB に供し, Rab5A のタンパク質量を特異的抗体により検出した. Loading control: α -tubulin
- E : BACE1 inhibitor (10 μM) を処理し, 48 時間後に Rab5A に対する免疫染色を行なった. グラフは, 各サンプルにつき解析した全視野 (n=10; 10 fields x 1 trial) における, 単一 Rab5A 陽性 puncta の平均面積を示す. The bar in the box: median; whiskers: Min to Max. *試行回数は 1 回であるため, 統計解析は行っていない.

2-4. 考察

当研究室では以前、一過性の過剰発現系において TMEM30A と APP・ β CTF が結合し、エンドソームに蓄積すること及び、エンドソームの肥大化を引き起こすことを示した。一方で、内在的な発現量で TMEM30A が APP や β CTF と結合するのか及び、エンドソームの肥大化に関与するのかは明らかでなかった。本章では、より AD 初期病態に近いモデル細胞系を樹立することで、内因性 TMEM30A に関しても APP・ β CTF と結合し、エンドソームの肥大化に寄与するのか明らかにすることを試みた。

そこで、病態初期で発現・活性が上昇する BACE1 に注目し、SH-SY5Y 細胞における BACE1 恒常発現系を樹立した結果、DAPT 処理により α CTF 及び、 β CTF が蓄積した際、内因性 TMEM30A は β CTF と結合し、APP や α CTF と結合しないことが示唆された (Fig.16C)。実際には、10 kDa 付近で観察される α CTF と β CTF を正確に区別できていないため、 β CTF の N 末端側のみを認識する抗体 (82E1 や 6E10) を用いてさらに検証する必要がある。しかし、BACE1 阻害薬処理により β CTF が減少した際、TMEM30A と β CTF の結合は顕著に抑制されたことから、TMEM30A と β CTF の結合は α CTF ではなく、 β CTF の蓄積に依存する可能性が高いと考える。さらに、TMEM30A は β 1・ β 11CTF の両者と結合する可能性が示された (Fig.16D)。APP や α CTF と、 β CTF の TMEM30A に対する結合の違いとして、局在とアフィニティーの違い、2つの可能性が考えられる。

APP は細胞表面にも存在し、主に α -セクレターゼにより切断され α CTF を産生する (SS Sisodia, 1992)。 β CTF は、APP が細胞内に取り込まれることで、BACE1 による切断を受け、エンドソームで主に産生される (Haass *et al.*, 1992)。そのため、エンドソームにおいて β CTF が TMEM30A と結合しやすいのではないかと考える。

一方で、以前の知見において、 β CTF の細胞外 N 末端領域は loop 構造及び helix 構造を有し、コレステロールなどの脂質と結合しやすいなど機能的な領域であることが報告されている (Barrett *et al.*, 2012)。この β CTF の N 末端側が露出することで、APP や α CTF と異なるアフィニティーを示す可能性も予想された。

本解析では、BACE1 恒常発現細胞において膜画分における β CTF のシグナルが、control 細胞に比べ増加しなかった (Fig. 16B)。上記で述べたように、 β CTF は通常、細胞質ではなくエンドソームで主に産生され、膜画分に多く存在する (Haass *et al.*, 1992)。それにもかかわらず、膜画分における β CTF のシグナルが弱かったのは、CHAPS に可溶化しにくい可能性が考えられた。おそらく、BACE1 恒常発現細胞における β CTF の周囲の環境が、 β CTF の可溶性を変化させ、エンドソームにおける TMEM30A との結合実験 (共免疫沈降法) に影響を及ぼしたのではないかと予想する。実際に、 β CTF が培養細胞において、lubrol などの弱い界面活性剤に耐性を持つ画分 (コレステロールなどが豊富に存在するラフト画分など) に局在することで、BACE1 による切断が増加し、 $A\beta$ 産生増加に寄与する仮説が提唱されている (Sakurai *et al.*, 2008)。そのため相互作用の検出感度を上げることを目的に DAPT を処理したが (Fig. 16C)、実際の AD 患者における β CTF の蓄積量を反映しているかは明らかでない。今後は、共免疫沈降法以外の手法により、DAPT 非処理下の SH-BACE1 における β CTF レベルでも TMEM30A との結合を検討する必要がある。

続いて、TMEM30A/ β CTF 複合体形成によるこれらタンパク質の局在及び、エンドソ

ームに対する影響をオルガネラ分画・免疫染色により検討した。初めに、オルガネラ分画の結果 SH-BACE1 において、エンドソームマーカーである Rab5 の分布が SH-control における画分よりも重い画分 (Fr 14~16) で認められた (Fig. 17B)。また、TMEM30A, β CTF, さらには BACE1 がこれら異常なエンドソーム画分 (Fr 14~16) に局在することが明らかとなった (Fig. 17A, B)。

オルガネラ分画の結果観察された、通常とは異なるエンドソーム画分が肥大化したエンドソーム画分であるのか、あるいはオートファゴソームやその他のオルガネラ画分であるのかを明らかにするためには、スクロースなどを用いたより分離の高い密度勾配遠心を行うことで解決できる可能性はある。しかし、オルガネラ分画では密度でしか分離できないため、肥大化エンドソームとその他のオルガネラなどを区別することが困難である。そこで、エンドソームの性質について、免疫染色による形態観察を行なった結果、COS-BACE1 において Rab5 陽性エンドソームの平均面積及び、肥大化しているエンドソームの割合が COS-control と比較して有意に増加していたことから、BACE1 恒常発現によりエンドソームが肥大化することが示唆された (Fig. 18A-C)。さらに、BACE1 阻害薬処理により、Rab5 陽性エンドソームの平均面積が減少する傾向が得られ、エンドソームの肥大化は BACE1 の活性に依存することが考えられた (Fig. 18E)。

免疫染色の結果から、BACE1 恒常発現により β CTF が増加することで、エンドソームが肥大化することが示唆された。実際に、ラットのプライマリーニューロン (コリン作動性ニューロン) において、 β CTF を過剰発現すると、Rab5 陽性エンドソームが肥大化することが報告されている (Xu *et al.*, 2016)。また以前、COS 細胞における共免疫染色の結果、肥大化したエンドソームに TMEM30A と β CTF が共局在していた知見を考慮すると (Takasugi *et al.*, 2018), Fr 14~16 で認められた異常なエンドソーム画分は肥大化エンドソームを含む可能性が高いと考える。なお、免疫染色の実験では COS 細胞を用いて解析を行なったが、その由来であるサルと SH-SY5Y 細胞由来のヒトにおける APP は相同性が非常に高く、特に C 末端領域は保存されている (Podlisny, Tolan and Selkoe, 1991)。そのため、サルの APP はヒトと類似した APP 代謝を示すと考えられる。また、サル (カニクイザル) を用いて加齢依存的なエンドソームの肥大化や、認知機能の低下を解析できるモデル系も確立されている (Kimura *et al.*, 2009)。これらのことから、COS-7 細胞で観察されたエンドソームの肥大化は、SH-SY5Y 細胞でも生じている可能性が高い。

本章では、BACE1 恒常発現による β CTF の増加が TMEM30A との結合、エンドソームの肥大化を引き起こすこと、そしてこれらタンパク質が肥大化したエンドソームに局在することが示唆された。また、以前の報告から TMEM30A との結合条件下で、 β CTF が蓄積することも考慮すると (Takasugi *et al.*, 2018), BACE1 の異常な分布 (Fr14~16, Fig. 17A) がさらなる β CTF の増加を誘導し、エンドソーム異常を促進する悪循環が考えられる。しかし本章では、神経芽細胞腫において BACE1 を過剰発現しているため、実際の AD 患者の病態を完全に反映しているとは言えない。今後は、AD 初期病態であるエンドソームの肥大化が同様に観察される AD 患者や DS 患者の iPS 細胞を神経に分化させ、TMEM30A/ β CTF 複合体形成を介した AD 病態への寄与を明らかにする必要がある。

第3章 β CTF の増加によるリピッドフリッパーゼ機能不全

3-1. 目的

第2章では、TMEM30A/ β CTF 複合体形成により、両者の局在が変化し、エンドソームの肥大化が生じることが示唆された。本章では、TMEM30A/ β CTF 複合体形成がどのようにエンドソームの肥大化を引き起こすのか、TMEM30A の機能変化に注目し、詳細な分子機構の解明を試みた。

2回膜貫通タンパク質である TMEM30A は、P4-ATPase ファミリータンパク質と結合しリピッドフリッパーゼを構成する。リピッドフリッパーゼの活性中心は P4-ATPase であるが、TMEM30A はその安定性、小胞体から成熟型糖鎖修飾が行なわれるゴルジ体への局在、さらには活性維持に重要である (Coleman and Molday, 2011)。そのため、TMEM30A が β CTF と結合することで、リピッドフリッパーゼの形成・機能に影響を及ぼすことが想定された (Fig. 19)。

リピッドフリッパーゼは、脂質二重層においてホスファチジルセリン (PS) などのリン脂質を細胞質側に輸送し、リン脂質の非対称性を制御する (Andersen *et al.*, 2016)。これまで、エンドソームにおいて細胞質側に分布した PS は、膜の屈曲、切断などを行う因子と結合し、小胞の出芽を促進することで小胞輸送に関与することが示唆されている (Arumugam and Kaur, 2017) (Fig. 12 参照)。そこで本章では、TMEM30A/ β CTF 複合体形成による小胞輸送障害 (エンドソームの肥大化) が、リピッドフリッパーゼの機能を介して生じるのか明らかにすることを目指した。またこれまで、小胞輸送障害を免疫染色などで定性的に評価することは可能でも、定量的に測定できる有効なツールは開発されていなかった。本章ではさらに、将来的な小胞輸送障害の定量測定系開発に貢献することを目指した。

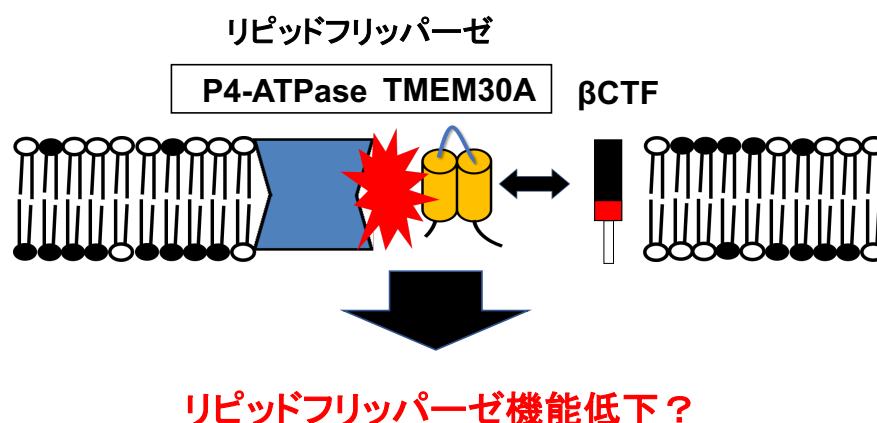


Fig. 19 TMEM30A/ β CTF 複合体によるリピッドフリッパーゼへの影響

3-2. 実験方法

3-2-1. 膜画分の調製

BACE1 阻害薬処理による影響については, SH-control, SH-BACE1 細胞を 10 cm dish 3 枚分に 60~70%で播種し, 翌日 BACE1 inhibitor (10 μ M) を処理した. 試薬処理 48 時間後に細胞を PBS で洗浄後, scrape そして遠心 (3000 rpm, 5 min, 4°C) (Rotor No: MA-2024, KUBOTA) により回収した. TMEM30A のノックダウンによる影響については, plasmid 導入試薬である Lipofectamine 3000 reagent (30 μ l) と, shTMEM30A (pENTR-U6 に TMEM30A オリゴ DNA 配列を組み込んだ plasmid: 高杉展正 准教授より供与) 20 μ g を 2.5 ml の Opti-MEM に溶解後, WT の SH-SY5Y 細胞に reverse transfection により導入した. TMEM30A のノックダウンから 72 時間後に上記と同様の方法で細胞を回収した. TMEM30A のオリゴ DNA 配列は Table 7 に示す.

細胞ペレットを Homogenize buffer (HB : 10 mM HEPES-NaOH (pH 7.4), 150 mM NaCl, 10% glycerol, protease inhibitor) で懸濁し, ダウンスホモジナイザー (10 strokes), さらに, 21 G 注射針をつけたシリンジ (20 strokes) に通し細胞を破碎後, 遠心 (1500 g, 10 min, 4°C) により核画分を除去した. 得られたペレットに対しシリンジに通す工程を繰り返した後に, その上清から post nuclear supernatant (PNS) を回収後, SW41Ti スウィングローター (Beckman Coulter) を用いて超遠心 (25000 rpm, 1 h, 4°C) により粗膜画分を得た. Evectin-2 の膜移行性に関しては, RIPA で膜画分を可溶化後, WB に供した. 膜画分の共免疫沈降に関しては下記に述べている.

Table 7. shTMEM30A オリゴ DNA 配列

shTMEM30A oligo pairs	5'-CCG GGC CTC ATC TTC ATT CCC ATT GCT CGA GCA ATG GGA ATG AAG ATG AGG CTT TTT G-3'	5'-AAT TCA AAA AGC CTC ATC TTC ATT CCC ATT GCT CGA GCA ATG GGA ATG AAG ATG AGG C-3'
--------------------------	---	---

3-2-2. 膜画分を用いた共免疫沈降法

3-2-1 で得られた粗膜画分について, 1% CHAPS を含んだ HB で懸濁後 21 G 注射針をつけたシリンジに通し (20 strokes), さらに 4°C, 1 h, rotate で可溶化した. 最後に遠心 (15000 rpm, 1 min, 4°C) (Rotor No: MA-2024, KUBOTA) により不溶化物を除去後, その上清から Input サンプルを得た. 残ったサンプルを共免疫沈降実験に供した (2-2-4 参照). 多回膜貫通タンパク質の解析では 50°C, 30 分間熱処理を行なった.

3-2-3. 共免疫染色法

初めに, カバーガラス (C013001, Matsunami) を 0.001% Poly-L-Lysine /ddH₂O に浸し, 4°C, o/n でコーティングした. PBS で 10 回洗浄後, コーティングしたカバーガラスを 12 well plate に入れ, COS-7 細胞を 40~50%になるように播種した. 翌日, LgBiT-HA-Rab5 または control vector 1 μ g と plasmid 導入試薬である Lipofectamine 3000 reagent (1.5 μ l) を 100 μ l の Opti-MEM に溶解後, 細胞に導入した. その 24 時間後に 2-2-6 と同様の方法で免疫染色を行なった. なお 1 次抗体は, HA 抗体を 1 : 200, Rab4 抗体を 1 : 100 で希釈し, 反応させた. 撮像は, 2-2-6 と同様, BZ-X810 (Keyence) の顕微鏡を使用し, 60 倍の対物油浸レンズを用いた. ただし z-stack 処理は行っていない.

3-2-4. Nano-Glo live cell assay (NanoBiT 法)

NanoBiT 法は、大小 2 つの Nanoluc®断片の相補性を利用したタンパク質間相互作用の解析ツールである (Promega HP: https://www.promega.co.jp/products/tech/nanoluc_tech/). 大きな断片を Large BiT (LgBiT), 小さな断片を Small BiT (SmBiT) とし、両者が結合する事で基質を加えると発光する. その発光強度を測定しタンパク質間相互作用を定量化できる仕組みである (Dixon *et al.*, 2016). そこで, Ectectin-2 のエンドソーム移行性を検討するために, LgBiT, SmBiT をそれぞれ Rab5, Ectectin-2 に融合し, 両者が接近することで発光する仕組みを利用した (Fig. 20).

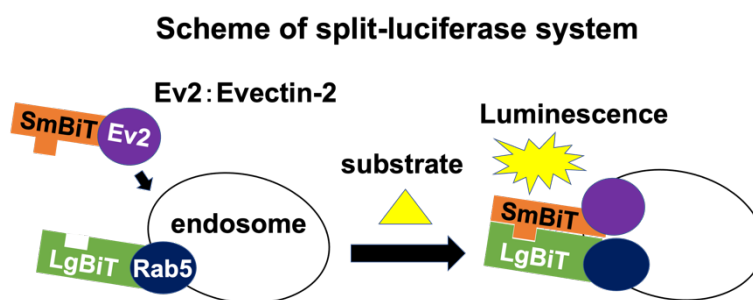


Fig. 20 NanoBiT 法を利用した Ectectin-2 のエンドソーム移行性

具体的には LgBiT-HA-Rab5 (pEB Multi-Puro に LgBiT, HA タグ, Rab5 を組み込んだ plasmid) 及び, SmBiT-Ectectin-2 (p3xFLAG CMV10 に SmBiT, Ectectin-2 を組み込んだ plasmid) を用いて細胞に発現させ, ルシフェラーゼ再構成による発光を測定した. pEB-Puro-HA-LgBiT-Rab5, p3xFLAG CMV10-SmBiT-Ectectin-2 (WT/K20E) の作製については下記の通りで, 用いたプライマー配列を Table 8 に示す.

pEB-Puro-HA-LgBiT-Rab5: 初めに CMV HaloTag-LgBiT (Promega) を鋳型として, PrimeSTAR Max DNA Polymerase を用いて製品のプロトコルに従い, LgBiT 配列を増幅した (1st PCR). 得られた PCR 産物を鋳型として, HA タグを N 末端に融合した HA-LgBiT 配列を増幅した (2nd PCR). 続いて, Rab5A は pDEST40-CFP-Rab5A (Rab5A) を鋳型として増幅した. PCR 産物 HA-LgBiT と Rab5A を, NEBuilder HiFi DNA assembly mix を用いて製品のプロトコルに従い, XhoI と BamHI 酵素で切断された (37°C, 3 h) pEB-Puro に導入した.

p3xFLAG CMV10-SmBiT-Ectectin-2: 初めにヒト Ectectin-2 が組み込まれた pEGFP-N1-Ectectin-2 (高杉展正 准教授より供与) を鋳型として, PrimeSTAR Max DNA Polymerase を用いて製品のプロトコルに従い, SmBiT 配列 (Promega) を N 末端に融合した SmBiT-Ectectin-2 配列を増幅した (1st PCR). 次に得られた PCR 産物を鋳型として, 3xFLAG-SmBiT-Ectectin-2 を増幅した (2nd PCR). 2nd PCR 産物は NEBuilder HiFi DNA assembly mix を用いて, EcoRI と NotI 酵素で切断された p3xFLAG CMV10 に導入した.

p3xFLAG CMV10-SmBiT-Ectectin-2 (K20E): p3xFLAG CMV10-SmBiT-Ectectin-2 を鋳型として, PrimeSTAR Max DNA Polymerase を用い PCR 変異導入により作製した.

Table 8. 増幅に用いたプライマー配列

Plasmids	Primer (forward)	Primer (reverse)
pEB-Puro-HA-LgBiT-Rab5		
HA-LgBiT (1 st PCR)	5'-TAC CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC GCT GTC TTC ACA CTC GAA GAT TTC GTT GGG GAC-3'	5'-CTT TTT TGT ACA AGC TGT TGA TGG TTA CTC G- 3'
(2 nd PCR)	5'-AAG GGG TAC CGG GCC CCC CCC ACC ATG TAC CCA TAC GAT G-3'	5'-CTT TTT TGT ACA AGC TGT TGA TGG TTA CTC G- 3'
Rab5A (Rab5A)	5'-CAT CAA CAG CTT GTA CAA AAA AGC AGG C-3'	5'-CGG CCG CTC TAG AAC TAG TGG TAC AAG AAA GCT GGG TC-3'
p3xFLAG CMV10-SmBiT-Evectin-2		
SmBiT-Evectin-2	5'-GTG ACC GGC TAC CGG CTG TTC GAG GAG ATT CTG ATG GCG TTT GTG AAG AGT GGC TGG TTG-3'	5'-CTA GAG CGG ATC CAC AAT TAA GAC CCA AAA-3'
3xFLAG-SmBiT-Evectin-2	5'-AAG CTT GCG GCC GCG GTG ACC GGC TAC CGG-3'	5'-ATC TAT CGA TGA ATT CTA GAG CGG ATC CAC-3'
p3xFLAG CMV10-SmBiT-Evectin-2 (K20E)	5'-GCG CTG GGA GAA GAA CTG GTT TGA TC-3'	5'-TTC TTC TCC CAG CGC TTC AAA ATA GT-3'

本解析では全ての実験において 24 well plate に細胞を播種した。Luciferase subunits (LgBiT-HA-Rab5, 3xFLAG-SmBiT-Evectin-2) などの plasmid DNA は、siRNA を除く total plasmid DNA 量 1 µg (各 plasmid 同比率) と導入試薬である Lipofectamine 3000 reagent (1.5 µl) を 100 µl の Opti-MEM に溶解後、細胞に導入した。

BACE1 阻害薬処理による影響については、luciferase subunits を reverse transfection により導入後、24 時間後に BACE1 inhibitor (10 µM) を処理し、その 48 時間後に培地を Opti-MEM に交換した。その後、Nano-Glo live cell assay kit (N2011, Promega) を用いて、kit の使用方法に従い、基質と LCS dilution buffer の混合液を 125 µl/well 加え、15 s 間穏やかに plate を揺らし酵素と基質を反応させた。測定機器 GloMax® Discover (Promega) の使用方法 (簡易測定モード) に従い、integration time (測定時間) 0.5 s, RT の条件下で luciferase activity を測定した。最終的に検出シグナルは integration time 1s あたりの積算値として表示される。TMEM30A のノックダウンに関しては、reverse transfection により luciferase subunits 及び、shTMEM30A を同時に発現させ (各 plasmid 1 : 1 : 2), transfection から 72 時間後に上記と同様の方法により、integration time 0.3 s, RT の条件下で luciferase activity を測定した。APP のノックダウンに関しては、siRNA 導入試薬である RNAiMAX (1 µl) と siRNA (50 nM) を 100 µl の Opti-MEM に溶解後、reverse transfection により細胞に導入し、24 時間後に luciferase subunits を forward transfection により導入した。そしてノックダウンから 72 時間後に上記と同様の方法により、integration time 0.3 s または 1 s, RT の条件下で luciferase activity を測定した。尚 APP ノックダウンのターゲット配列 (Sigma Aldrich: SASI_Hs01_00185800) は Table. 9 に示す。

SH-SC100（人工的な β CTF 恒常発現細胞）の luciferase activity については、reverse transfection により luciferase subunits を導入後 48 時間後に上記と同様の方法により、integration time 1 s, RT の条件下で luciferase activity を測定した。Evecitin-2 の変異体（K20E）による luciferase activity への影響については、reverse transfection により、LgBiT-HA-Rab5 と 3xFLAG-SmBiT-Evecitin-2 (WT) または 3xFLAG-SmBiT-Evecitin-2 (K20E) を共発現させ（各 plasmid 1 : 1）、その 48 時間後に上記と同様の方法により、integration time 1 s, RT の条件下で luciferase activity を測定した。

測定後、PBS で 2 回洗浄、RIPA buffer 100 μ l 以上で細胞を溶解し、BCA 法によりタンパク定量を行なった。バックグラウンドサンプル（pEB Multi-Puro, p3xFLAG-CMV10 を発現した細胞）を除く RLU（Relative Light Unit）は以下のように設定した（Formula. 1）。まずトランスフェクションのストレスを最小限にするため、バックグラウンドのサンプルを基準に、他のサンプルの RLU をタンパク質濃度で規格化した。次に、これらの値を各 Figure に示すコントロールサンプルに対するトランスフェクションの比率（Bio-Rad ソフトウェアで定量した SmBiT-Evecitin-2 のタンパク質量）で規格化した。バックグラウンド RLU は、得られたシグナルである。統計解析では、バックグラウンドを差し引いた RLU を適用した。

Formula 1 . RLU の算出方法

$$\text{RLU} = \text{Obtained signal} / \left[\frac{\text{Ratio of protein concentration}}{\frac{\text{Other samples (luciferase subunits)}}{\text{Background (empty vectors)}}} \right] / \left[\frac{\text{Ratio of transfection}}{\frac{\text{SmBiT-Evecitin-2 level in each sample}}{\text{SmBiT-Evecitin-2 level in control}}} \right]$$

Table 9. APP siRNA ターゲット配列

APP siRNA	5'-GAAGAUGUGGGUCAAACA-3'	5'-UGUUUGAACCCACAUCUUC-3'
-----------	--------------------------	---------------------------

3-2-5. ウェスタンブロット (WB)

WCL 及び、膜画分における Evecitin-2 の解析については、100 μ l 以上の RIPA buffer で溶解後、sonication (hand pulse: 4~6) を行い、タンパク質を抽出した。その後、2 x sample buffer を加え、95°C, 3 min, 熱処理を行なった。膜画分の共免疫沈降サンプルについては、2 x sample buffer を加え、50°C, 30 min, 熱処理を行なった。1-2-8 と同様に、全てのサンプルは SDS-PAGE に供した後、目的タンパク質に対する特異的 1 次抗体、そして Horseradish peroxidase (HRP) 標識の 2 次抗体（1 次抗体の宿主に対する抗体；使用抗体一覧参照）を反応させ、HRP 基質（ImmunoStar LD/zeta）を加えた後、ChemiDoc (Bio-Rad) により検出した。定量法は、1-2-8 と同様である。

3-2-6. 統計解析

本章における全てのデータは、平均値 (mean) \pm s.e.m で表示した。統計解析は、GraphPad Prism8 ソフトウェアを用いて Two-tailed Student's t test または、One-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test を適用した。* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, **** p <0.0001.

3-3. 実験結果

3-3-1. リピッドフリッパーゼの形成不全

TMEM30A は、P4-ATPase ファミリータンパク質と結合することでリピッドフリッパーゼを構成し、P4-ATPase の活性維持に重要である (Coleman and Molday, 2011). そこで、TMEM30A が β CTF と結合することで、P4-ATPase との結合が阻害されることを予想した. 特に、脳内で多く発現し、エンドソームに局在する P4-ATPase として ATP8A1 が知られており (Wang *et al.*, 2018), 両者によるリピッドフリッパーゼ形成について膜画分の共免疫共沈降法により検討した. その結果、ネガティブコントロールである IgG 処理では、ATP8A1 が共沈せず、TMEM30A 抗体処理では ATP8A1 が共沈することが確認された (Fig. 21A). 一方で BACE1 恒常発現細胞においてそのシグナルは減少し、BACE1 阻害薬処理により有意に回復した (Fig. 21A, B). なお、膜に局在する Calreticulin が膜画分で濃縮されていること及び、細胞質に存在する α -tubulin が膜画分で減少していることから (Fig. 21C), 膜画分は精製できていると考える. 以上の結果から、BACE1 恒常発現により、TMEM30A と ATP8A1 の結合が減少し、両者によるリピッドフリッパーゼの形成は、BACE1 活性依存的に変化することが示唆された.

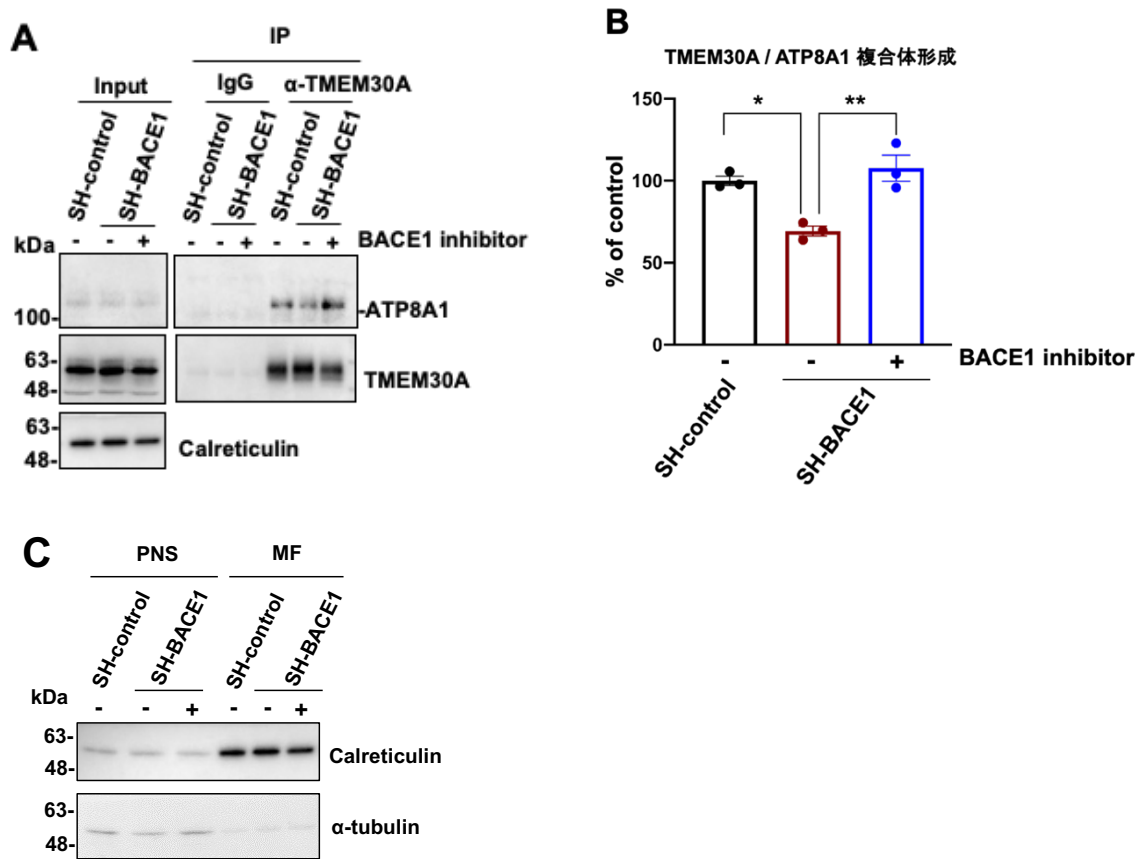


Fig. 21 リピッドフリッパーゼの形成不全

A : SH-control, SH-BACE1 及び BACE1 inhibitor (10 μ M) を 48 時間処理した SH-BACE1 の膜画分に対し, control IgG 又は TMEM30A 抗体により共免疫沈降を行なった後, WB に供した. 各タンパク質は特異的抗体により検出した. Calreticulin は膜画分の loading control として使用した.

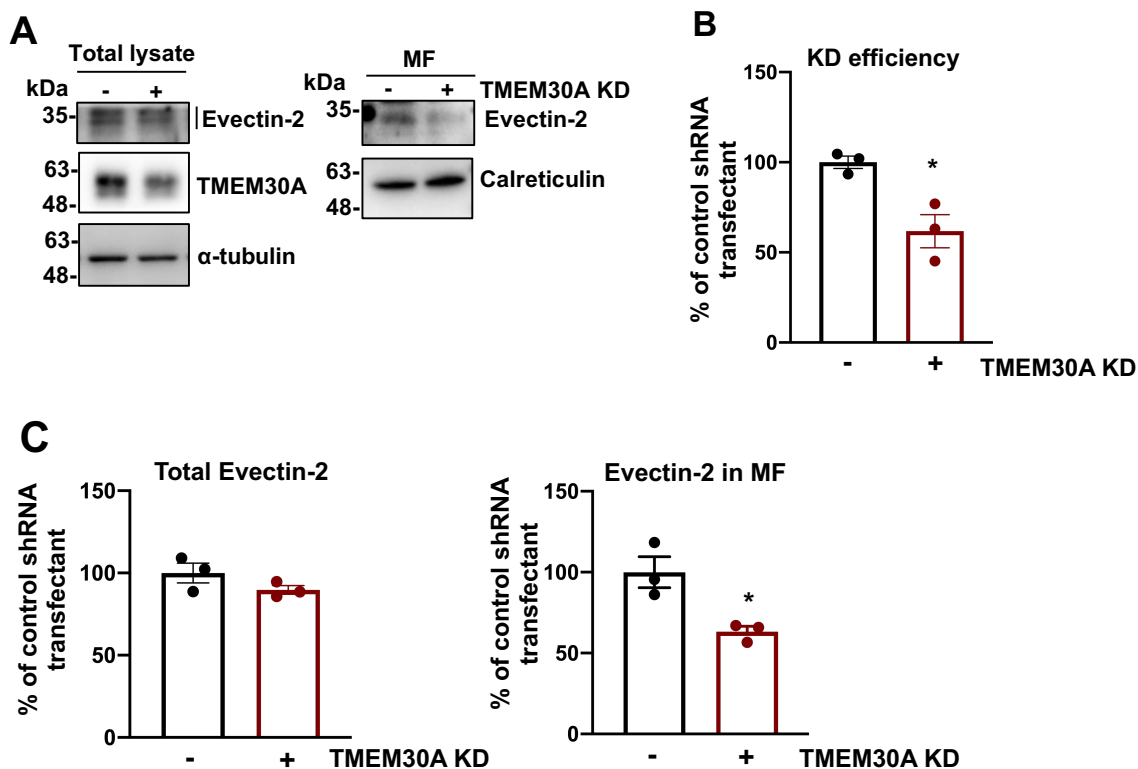
B : A における ATP8A1 のタンパク質量を定量化した. One-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test (n=3). * p <0.05, ** p <0.01. data mean \pm s.e.m.

C : Calreticulin, α -tubulin をそれぞれ膜画分, 細胞質画分のマーカーとして用い, A における膜画分の精製を確認した. 検出は各タンパク質の特異的抗体を用いた. PNS: post nuclear supernatant, MF: membrane fraction.

3-3-2. リピッドフリッパーゼの活性変化

続いて、エンドソームにおけるリピッドフリッパーゼ活性の測定を試みた。ATP8A1を含むリピッドフリッパーゼは、エンドソームにおいて、ホスファチジルセリン (PS) などのリン脂質を細胞質側に輸送する (Andersen *et al.*, 2016)。Evectin-2 などの膜の budding (屈曲) を行うタンパク質は、細胞質側 PS に結合し、膜の切断・出芽を促進することで小胞輸送に関与する (Arumugam and Kaur, 2017)。このことから、ATP8A1 の活性が低下すると、Evectin-2 による膜画分やエンドソームへの移行が減少することが予想された。そこで、エンドソームにおけるリピッドフリッパーゼの活性を測定する方法として、膜画分及びエンドソームにおける Evectin-2 の局在量について解析することを利用した。

初めに、TMEM30A をノックダウンすることにより (Fig. 22A, B), リピッドフリッパーゼ活性の低下が予想される場合において、膜画分における Evectin-2 の局在が有意に減少することを確認した (Fig. 22A, C)。この時、TMEM30A ノックダウンにより Evectin-2 のタンパク質量は変化しなかった (Fig. 22A, C)。これらの結果から、リピッドフリッパーゼの活性低下により、Evectin-2 の膜移行性が減少することが示唆された。次に、SH-control, SH-BACE1 において、膜画分における Evectin-2 の存在量を検討した結果、BACE1 恒常発現細胞において低下し、さらに、BACE1 阻害薬処理により有意に回復した (Fig. 22D, E)。尚、SH-control, SH-BACE1 における Evectin-2 のタンパク質量は変化しなかった (Fig. 22D, E)。このことから、Evectin-2 の膜移行性は BACE1 恒常発現により減少し、BACE1 活性依存的に変化することが示唆された。



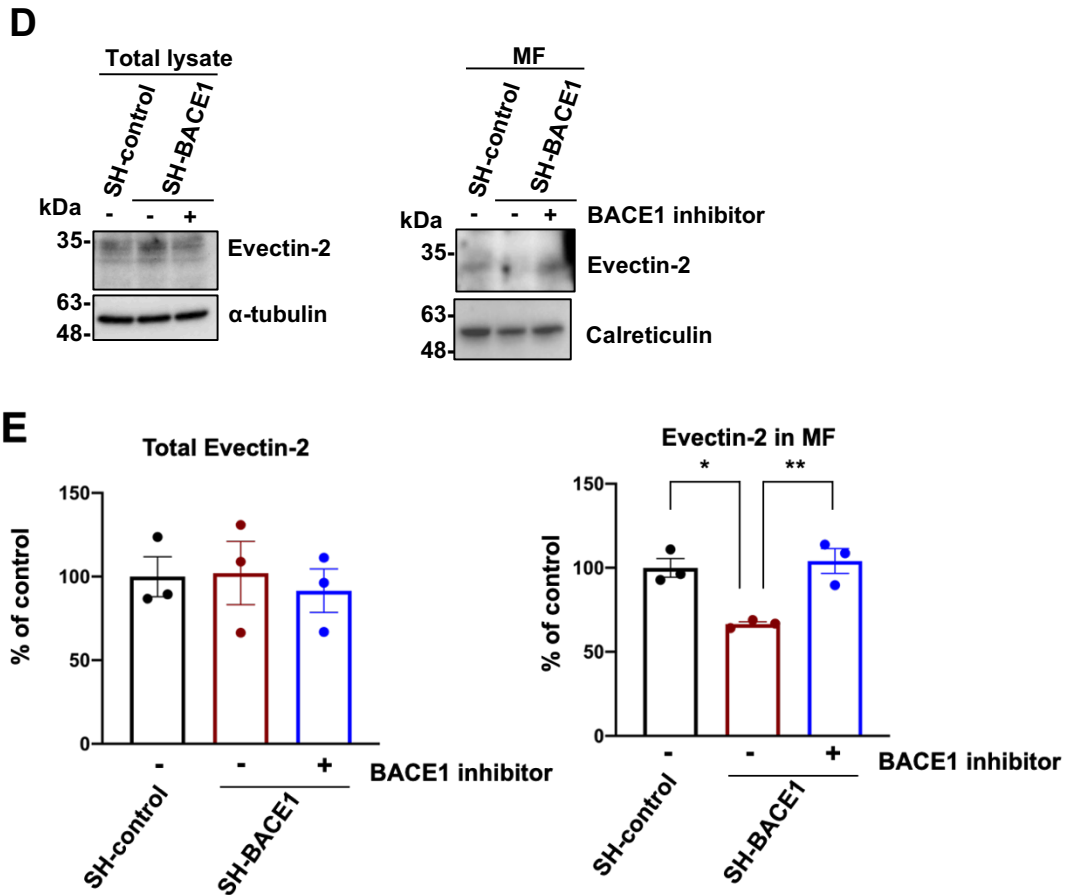
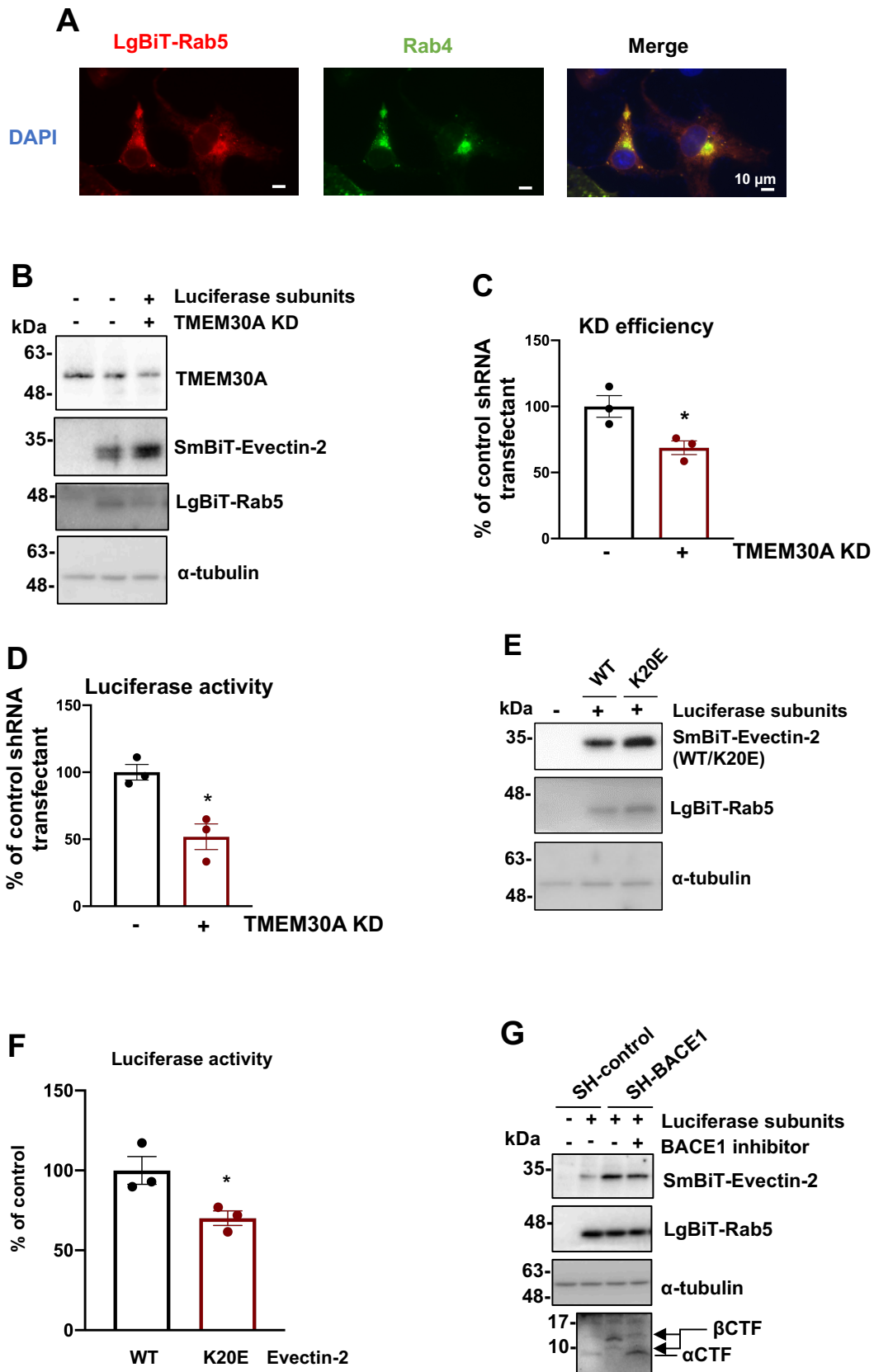


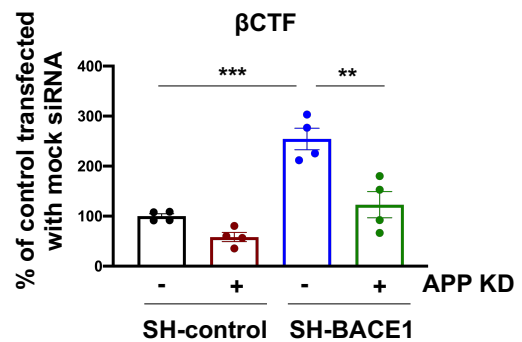
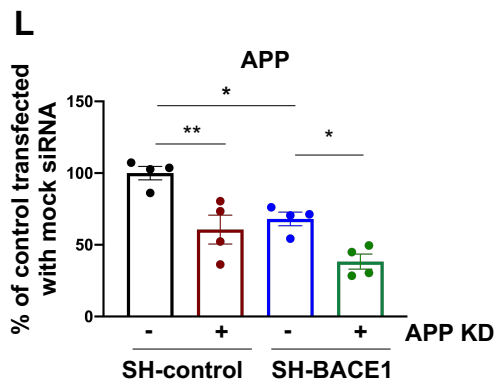
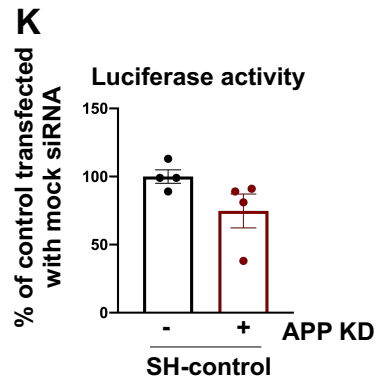
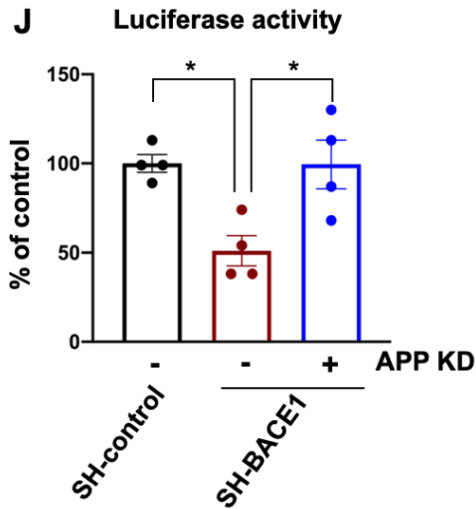
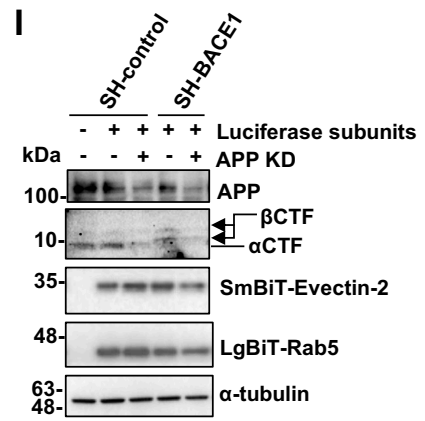
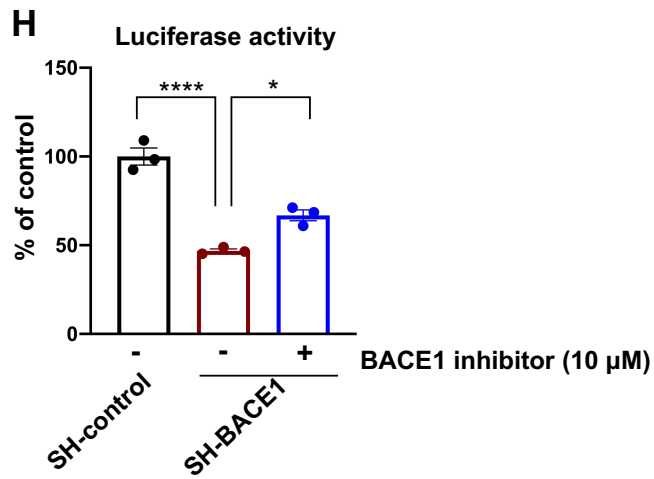
Fig. 22 Evecitin-2 膜移行性の変化

- A : SH-SY5Y (WT) において TMEM30A のノックダウン (KD) を行い, 72 時間後に WCL (total lysate, 左) 又は膜画分 (MF, 右) を回収し, WB に供した. 各タンパク質は特異的抗体により検出した. Loading control (WCL): α -tubulin; MF: Calreticulin
- B : A における TMEM30A のタンパク質量を定量化した. Two-tailed Student's t test (n=3). * p <0.05. data mean \pm s.e.m.
- C : A における total Evecitin-2 及び, 膜画分における Evecitin-2 のタンパク質量を定量化した. Two-tailed Student's t test (n=3). * p <0.05. data mean \pm s.e.m.
- D : SH-control, SH-BACE1 及び BACE1 inhibitor (10 μ M) を 48 時間処理した SH-BACE1 の WCL (total lysate, 左) 又は膜画分 (MF, 右) を WB に供した. 各タンパク質は特異的抗体により検出した. Loading control (WCL): α -tubulin; MF: Calreticulin.
- E : D における total Evecitin-2 及び, 膜画分における Evecitin-2 のタンパク質量を定量化した. One-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test (n=3). * p <0.05, ** p <0.01. data mean \pm s.e.m.

ここまで、Evectin-2 の膜移行性について検討したが、この評価系の問題として、エンドソーム以外の膜画分を含むことである。そこでよりエンドソーム特異的な局在を検討するため、luciferase subunits である LgBiT, SmBiT を Rab5, Evectin-2 に融合し、両者の接近による luciferase activity を測定した (3-2-4 参照)。初めに、LgBiT-Rab5 (赤) の蛍光シグナルとエンドソームマーカーである Rab4 (緑) の蛍光シグナルが一致し、黄色の蛍光シグナルが検出されたことから、両者が共局在することが確認された (Fig. 23A)。このことから、LgBiT-Rab5 がエンドソームに移行することが示唆された。次に、TMEM30A をノックダウンすることにより、リピッドフリッパーゼの活性が低下する場合において、luciferase activity の変化を検討した。初めに、TMEM30A のノックダウンを確認した (Fig. 23B, C)。その結果、LgBiT と SmBiT の結合による luciferase activity が有意に減少した (Fig. 23B, D)。このことから、リピッドフリッパーゼの活性が低下すると、SmBiT-Evectin-2 の LgBiT-Rab5 陽性エンドソームへの移行が減少することが示唆された。さらに、ホスファチジルセリン (PS) 結合性が低下する Evectin-2 の脂質結合ドメインの変異体 (K20E) (Matsudaira *et al.*, 2017) を発現させ、WT と比較した結果、luciferase activity が K20E 変異体において有意に減少した (Fig. 23E, F)。このことから、Evectin-2 と PS の結合に依存して、LgBiT と SmBiT の結合が生じることが示唆された。以上のことから、本測定系はリピッドフリッパーゼの活性変化に伴う Evectin-2 のエンドソーム移行性を評価し、間接的にリピッドフリッパーゼの活性を測定するツールとして用いることができるのではないかと考えた。

実際に本評価系を適用したところ、SH-BACE1 細胞において、luciferase activity が減少し (Fig. 23G, H)、Evectin-2 のエンドソーム移行性が減少することが示唆された。また、BACE1 阻害薬処理により luciferase activity が有意に回復し (Fig. 23G, H)、Evectin-2 のエンドソーム移行性は BACE1 の活性に依存することが示唆された。BACE1 の基質は APP 以外にも存在するため、次に、Evectin-2 のエンドソーム移行性が APP に依存しているかを検討するため、APP ノックダウンによる影響を解析した。その結果、BACE1 恒常発現により減少した luciferase activity は、APP ノックダウンにより有意に回復した (Fig. 23I, J)。一方で、SH-control 細胞における luciferase activity は、APP ノックダウンにより変化しなかった (Fig. 23K)。なお APP ノックダウンによる、APP, β CTF, α CTF 量が有意に減少することを確認している (Fig. 23L)。以上の結果から、BACE1 恒常発現により APP の切断が増加することで、Evectin-2 のエンドソーム移行性が減少することが示唆された。さらに、人工的な β CTF である SC100 恒常発現細胞においては、luciferase activity が有意に減少した (Fig. 23M, N)。以上 Evectin-2 の膜移行性及びエンドソーム移行性の結果から、 β CTF の増加により、Evectin-2 のエンドソーム移行性が減少することが明らかとなり、リピッドフリッパーゼによる細胞質側への PS の輸送が低下することが示唆された。





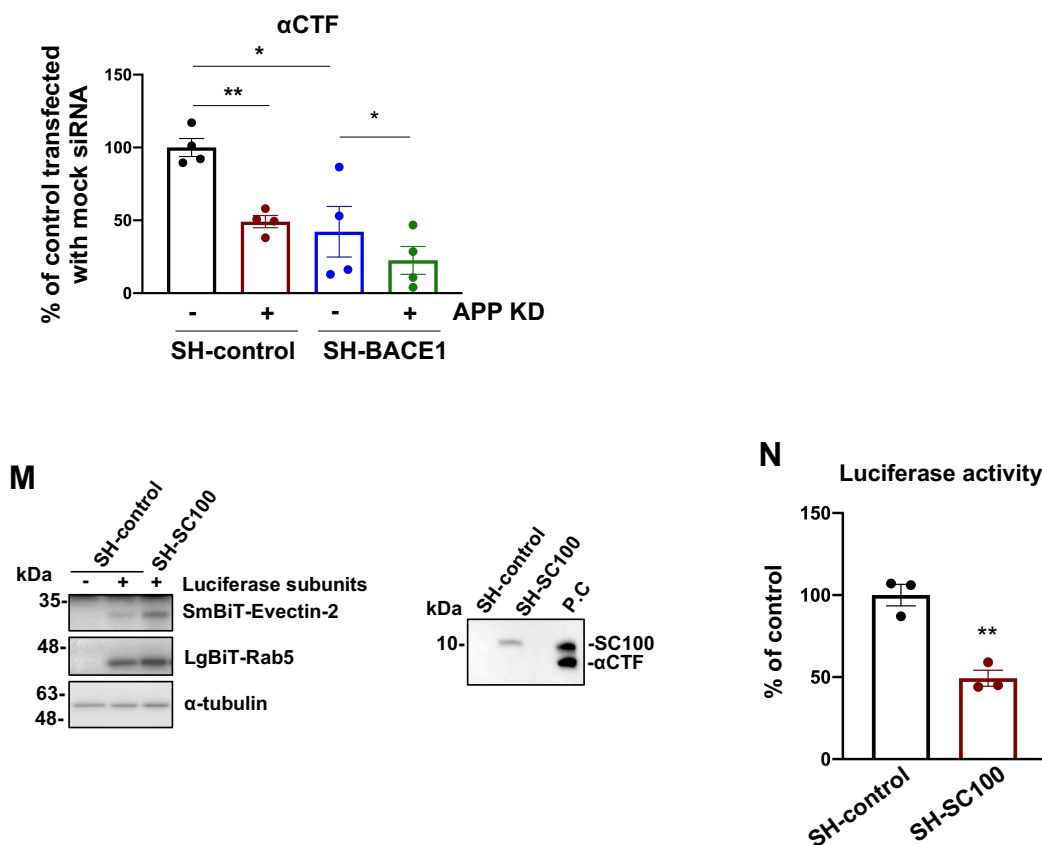


Fig. 23 Split-luciferase を利用した Evectin-2 エンドソーム移行性の変化

- A : COS-7 に LgBiT-HA-Rab5 を発現させ、その 24 時間に後に HA 抗体、Rab4 抗体を用いて共免疫染色を行なった。青色 (DAPI) は核を示す。画像は 1.7 倍拡大したものである。Scale: 10 μ m
- B : SH-SY5Y において shTMEM30A, luciferase subunits を発現させ、48 時間後に luciferase activity を測定し、cell lysate を WB に供した。LgBiT は HA 抗体、SmBiT は FLAG-HRP 抗体により、TMEM30A は特異的抗体により検出した。Loading control: α -tubulin
- C : B における TMEM30A のタンパク質量について定量化した。Two-tailed Student's t test (n=3). * p <0.05. data mean \pm s.e.m.
- D : B における luciferase activity (LgBiT-Rab5 と SmBiT-Evectin-2 の結合) について定量化した。Two-tailed Student's t test (n=3). * p <0.05. data mean \pm s.e.m.
- E : COS-7 に WT-SmBiT-Evectin-2 又は、K20E-SmBiT-Evectin-2 を LgBiT-Rab5 と発現させ、48 時間後に luciferase activity を測定し、cell lysate を WB に供した。検出は B と同様。Loading control: α -tubulin
- F : E における luciferase activity について定量化した。Two-tailed Student's t test (n=3). * p <0.05. data mean \pm s.e.m.

- G : SH-control, SH-BACE1 に luciferase subunits を発現させ, 24 時間後に BACE1 inhibitor (10 μ M) を処理し, その 48 時間後に luciferase activity を測定した. その cell lysate を WB に供した. LgBiT, SmBiT は B と同様に, α CTF, β CTF は APP C 末端抗体により検出した. Loading control: α -tubulin
- H : G における luciferase activity について定量化した. One-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test (n=3). * p <0.05, **** p <0.0001. data mean \pm s.e.m.
- I : SH-control, SH-BACE1 に APP siRNA を導入し, 24 時間後に luciferase subunits を発現させ, ノックダウンから 72 時間後に luciferase activity を測定し, cell lysate を WB に供した. LgBiT, SmBiT は B と同様に, APP, α CTF, β CTF は APP C 末端抗体により検出した. Loading control: α -tubulin.
- J : I における luciferase activity について定量化した. One-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test (n=4). * p <0.05. data mean \pm s.e.m.
- K : SH-control において, APP ノックダウン (KD) による luciferase activity を定量化した. Two-tailed Student's t test (n=3). data mean \pm s.e.m.
- L : I における APP, β CTF, α CTF のタンパク質量について定量化した. One-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test (n=4). * p <0.05, ** p <0.01. data mean \pm s.e.m.
- M : SH-control, SH-SC100 に luciferase subunits を発現させ, 48 時間後に luciferase activity を測定し, cell lysate を WB に供した. LgBiT, SmBiT は B と同様に, SC100 (β CTF) は APP C 末端抗体により検出した. Loading control: α -tubulin.
- N : M における luciferase activity について定量化した. Two-tailed Student's t test (n=3). ** p <0.01. data mean \pm s.e.m.

3-4. 考察

本章では、TMEM30A/ β CTF 複合体形成による小胞輸送障害のメカニズムを解析するため、TMEM30A の機能変化に着目した。TMEM30A は P4-ATPase ファミリータンパク質と結合し、リピッドフリッパーゼを構成する。P4-ATPase の中でも脳内で多く発現し、エンドソームに局在する P4-ATPase として ATP8A1 が知られている。本解析により、BACE1 恒常発現細胞において、TMEM30A と ATP8A1 の結合が減少し、BACE1 阻害薬処理により、その結合は有意に回復した (Fig. 21A, B)。このことから、BACE1 の活性依存的に、リピッドフリッパーゼの形成が阻害されることが示唆された。TMEM30A と ATP8A1 の結合は、ATP8A1 の活性維持に必須である (Andersen *et al.*, 2016)。ATP8A1 を含むリピッドフリッパーゼは、エンドソームにおいて、ホスファチジルセリン (PS) などのリン脂質を細胞質側に輸送する。そのため、TMEM30A と ATP8A1 の結合が低下した、BACE1 恒常発現細胞においては、リピッドフリッパーゼの活性が低下することが予想された。リピッドフリッパーゼの活性測定には、いくつか既知の方法が存在する。例えば、蛍光標識色素 nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole (NBD) を融合したリン脂質 (PL) を細胞に処理し、細胞内に取り込まれた NBD-PL の蛍光強度を測定することで評価できる (Takada *et al.*, 2018)。しかし、培養細胞における従来の方法は、形質膜のリピッドフリッパーゼ活性を標的としており、エンドソームにおける評価は困難であった。

そこで、エンドソームにおけるリピッドフリッパーゼの機能、細胞質側 PS 量を測定するため、細胞質側 PS 依存的にエンドソームに移行する Evectin-2 に着目した。Evectin-2 は細胞質側 PS と結合し、膜の budding (屈曲) を誘導することで、膜の切断・出芽を促進し、小胞輸送に関与する (Arumugam and Kaur, 2017)。実際に TMEM30A をノックダウンすることで、リピッドフリッパーゼの活性を低下させると、膜画分における Evectin-2 の局在が有意に減少した (Fig. 22A-C)。このことから、リピッドフリッパーゼの活性が低下すると、Evectin-2 の膜移行性が減少することが考えられた。実際に BACE1 恒常発現細胞においても、膜画分における Evectin-2 の局在が減少し、リピッドフリッパーゼの活性が低下している可能性が示された (Fig. 22D, E)。さらに、BACE1 阻害薬処理により Evectin-2 のエンドソーム移行性が有意に回復したことから、BACE1 の活性依存的に Evectin-2 の膜移行性が減少することが示唆された (Fig. 22D, E)。なおこれら膜画分における Evectin-2 の局在減少は、そのタンパク質発現量が減少した影響によるものではないことが考えられた (Fig. 22A-E)。しかし、膜画分における Evectin-2 の局在解析についてはいくつか欠点がある。一つ目として、細胞を破碎後超遠心法により膜画分を WB に供しているが、膜画分の精製過程において、全てのエンドソームが二重膜を保持したまま単離されているかについては不明であるため、正確に細胞質側 PS と Evectin-2 の結合を反映しているとは言えない。二つ目として、膜画分は小胞体など、エンドソーム以外の膜成分を含むことから、正確にエンドソーム膜における局在を反映していない。本章では異なる実験系からエンドソームにおける Evectin-2 の局在をさらに検証した。

NanoBiT 法はスプリットルシフェラーゼの原理を利用しており、ルシフェラーゼの部分構造が接近することで、結合し発光する仕組みである。本章で用いた LgBiT 及び SmBiT は、深海エビ (*Oplophorus gracilirostris*) 由来のルシフェラーゼをもとに開発された分子量約 19kDa のルシフェラーゼ部分構造である (Dixon *et al.*, 2016)。このルシフ

ェラーゼはホタルやウミシイタケのものより高感度で、より持続的な発光を可能とする基質を用いている (Dixon *et al.*, 2016).

本章では Evectin-2 を SmBiT, Rab5 (エンドソームマーカータンパク質) を LgBiT と融合し、エンドソームにおける Evectin-2 の局在変化を解析した。本系は、LgBiT と SmBiT の結合が可逆的で、親和性が低いため ($K_d=190 \mu\text{M}$)、過剰発現のみでは両者が結合して発光する可能性が低く、Evectin-2 がエンドソームに移行した時に、両者が接近し発光することが予想された。さらに生細胞のまま解析できるため、エンドソーム構造を大きく変化させることなく、細胞質側 PS と Evectin-2 の局在を検討できると考えた。

初めに、LgBiT-Rab5 がエンドソームに移行することが確認された (Fig. 23A)。次に、リピッドフリッパーゼの活性低下を伴うと考えられる TMEM30A のノックダウンにより、luciferase activity は有意に減少した (Fig. 23B-D)。さらに、PS との結合性が低下する変異体 (K20E) では、luciferase activity が有意に減少したことから (Fig. 23E, F)、本系は、Evectin-2 と細胞質側 PS の結合変化を反映しており、リピッドフリッパーゼの活性変化に伴う細胞質側 PS の局在を間接的に測定できることが示唆された。

実際に本系を用いた結果、BACE1 恒常発現細胞において発光強度が減少し、BACE1 阻害薬処理により有意に回復したことから (Fig. 23G, H)、Evectin-2 のエンドソーム移行性は BACE1 の活性に依存することが示唆された。一方で、有意な回復ではあったものの顕著でなかったことに関しては、BACE1 阻害薬によるリピッドフリッパーゼの活性回復は時間を要する可能性が予想される。或いは、BACE1 切断における基質選択性の問題が挙げられる。BACE1 の基質として APP 以外に Neuregulin-1 (NRG1) などが存在し、これら基質に作用する可能性は否定できない。

そこで、Evectin-2 のエンドソーム移行性が APP の切断に依存するのか、APP ノックダウン実験で検討した結果、BACE1 恒常発現細胞において発光強度が有意に回復した (Fig. 23I, J, L)。一方で、 βCTF の発現レベルが低い control 細胞においては APP ノックダウンによる luciferase activity が変化しなかった (Fig. 23I, K)。これらの結果は、Evectin-2 のエンドソーム移行性が BACE1 による APP 切断に強く依存することを示唆している。さらに、 βCTF を過剰発現した場合においては、Evectin-2 のエンドソーム移行性が有意に減少し、BACE1 による APP 代謝物の中で βCTF の蓄積量に依存していると考えられた (Fig. 23M, N)。

以上、膜画分における Evectin-2 の局在解析及び、NanoBiT 法によるエンドソーム移行性の解析の結果、BACE1 恒常発現細胞において、 βCTF が蓄積することで、リピッドフリッパーゼの活性が低下し、細胞質側 PS の局在が減少することが示唆された。

本解析では、リピッドフリッパーゼの活性評価として Evectin-2 の膜及び、エンドソーム移行性に着目しているが、いずれも間接的にリピッドフリッパーゼの活性を測定しているため、今後は人工リポソームにリピッドフリッパーゼを組み込み、*in vitro* による直接的な活性測定系 (Coleman, Kwok and Molday, 2009) を用いて評価する必要がある。また、PS の局在変化は細胞内 PS 量にも依存することが考えられ、total PS 量を薄層クロマトグラフィー (TLC) などの従来手法により測定することも、本研究結果を補強するためには重要であると考えられる。

本章及び第 2 章の結果から、TMEM30A/ βCTF 複合体形成に伴うエンドソームの肥大

化は、リピッドフリッパーゼの活性低下を介していることが示唆された。

実際にこれまで、線虫において TMEM30A ファミリータンパク質である CHAT-1 や P4-ATPase ファミリータンパク質である TAT-1 の機能低下型変異体では、膜の出芽を低下し、Rab5 陽性 puncta の肥大化が観察されている (Chen *et al.*, 2010; Ruaud *et al.*, 2009)。さらに、COS-1 細胞における ATP8A1 のノックダウンにより、膜の切断・出芽が抑制されることも示されている (Lee *et al.*, 2015)。これらの知見は、リピッドフリッパーゼの機能不全が、直接エンドソームの肥大化に寄与する我々の仮説を支持していると考えられる。

一方で、 β CTF の蓄積によりエンドソームが肥大化するメカニズムとして、Rab5 の異常な活性化が関与することも考えられる。これまで、Rab5 の常時活性型 (Q79L: Wegener *et al.*, 2010) をマウス脳内神経細胞や (Pensalfini *et al.*, 2020)、培養細胞 (Dinneen and Ceresa, 2004; Aikawa *et al.*, 2006) に発現させると、エンドソームの肥大化を示すことが報告されている。また AD 患者脳内では、 β CTF が Rab5 のエフェクタータンパク質 APPL1 と結合し、Rab5 の活性化を介してエンドソームの肥大化に寄与することが示唆されている (Kim *et al.*, 2016)。本研究第 2 章においても、BACE1 恒常発現により Rab5 と β CTF が通常とは異なる画分で共局在し、Rab5 陽性エンドソームの形態変化が観察されていた (Fig. 17B, 18A)。これらのことから、エンドソーム肥大化のメカニズムとして、リピッドフリッパーゼの機能不全に加え、 β CTF とエフェクタータンパク質の結合による Rab5 の異常な活性化を介しているかどうかを解析する必要がある。具体的には、活性型 Rab5 (GTP 結合型) を認識する抗体や、エフェクタータンパク質を用いた Pull-down 法 (Qi *et al.*, 2015) を利用し、活性型 Rab5 の検出を行うことが有効であると考えられる。

本章で用いた NanoBiT 法は、小分子のルシフェラーゼ部分構造を用いており、これらを融合したタンパク質は元来の局在に大きな影響を及ぼさないことが予想される。そのため、Rab5 だけでなく、Rab7 (後期エンドソームマーカー) や Rab11 (リサイクリングエンドソームマーカー) など種々のオルガネラマーカーにも応用できる可能性があり、今後小胞輸送を定量的に測定できるツールとして利用できる可能性が考えられる。

第4章 AD モデルマウスの解析

4-1. 目的

第3章では、TMEM30A/ β CTFの複合体形成によるエンドソーム肥大化のメカニズムを解析した。その結果、両者の結合により、エンドソームにおけるリピッドフリップアーゼの活性が低下し、細胞質側ホスファチジルセリン (PS) の局在が減少することが示唆された。本章ではまず、ADモデルマウスを用いて、前章までのモデル細胞における解析結果が再現されるかどうかを明らかにすることを目指した。

エンドソームの肥大化は、 $A\beta$ の沈着が認められていないAD初期の患者において報告されており、小胞輸送障害は $A\beta$ 蓄積以前の初期病態として指摘されている (Cataldo *et al.*, 2002)。そのため二つ目の目的として、リピッドフリップアーゼの機能低下が、 $A\beta$ 蓄積以前に生じるのかどうか及び、加齢依存的な病態形成を解析することを目指した。多くのADモデル動物は家族性AD変異を持つAPPを過剰発現しており早い月齢から $A\beta$ の沈着を認める (Alzforum HP: <https://www.alzforum.org/research-models/alzheimers-disease>)。そのため、 $A\beta$ 沈着と β CTF蓄積の時期が近く、両者による病態形成の差別化が困難である。そこで、本章では、比較的遅い月齢から (約9ヶ月~12ヶ月にかけて) $A\beta$ が脳皮質で沈着するADモデル動物 (Yamada *et al.*, 2009) を用いた。

A7は他のモデルマウスに比べ、APPの発現レベルが低いマウスではあるが (ヒトAPPが内在性マウスAPPに対し1.4倍)、過剰発現によるアーチファクトが表現型に影響する可能性は完全に否定できない。近年、マウスAPPの $A\beta$ 配列をヒト化し、家族性AD変異を導入したモデルマウスが作成され、内因性と同レベルの発現により、これまで問題となっていたアーチファクトを克服できるモデルとして広く使用されている (Saito *et al.*, 2014)。そこで本章ではさらに、APPノックインマウスの解析も行なった。

4-2. 実験方法

4-2-1. ADモデルマウス

A7マウスは神経細胞において、家族性AD変異 (K670N、M671L、T714I) を有するヒトAPP695をThy1.2プロモーターの制御下で過剰発現するモデルマウスである (Yamada *et al.*, 2009)。App^{NL-G-F/NL-G-F}は、ヒトの家族性AD変異 (K670N、M671L、I716F、E693G) をマウス遺伝子にknock-inし、 $A\beta$ 配列をヒト化したモデルマウスである (Saito *et al.*, 2014)。なお、モデル動物は、東京大学医学系 (A7) 及び、薬学系研究科 (App^{NL-G-F/NL-G-F}) 倫理委員会の承認のもと (A7: 18-P-108; App^{NL-G-F/NL-G-F}: P31-11)、適切な環境下で飼育されたマウスを使用した (A7: Hashimoto *et al.*, 2020; App^{NL-G-F/NL-G-F}: Kidana *et al.*, 2018)。

4-2-2. マウス脳における膜画分の調製

-80°Cで凍結したマウスの半球 (小脳は除く) にHomogenize buffer (HB: 0.32 M sucrose, 10 mM HEPES pH 7.4, 1 mM EDTA, PI) を1gあたり8 ml加え、ダウンスホモジナイザー (15 strokes) で破碎後、遠心 (1500 g, 10 min, 4°C) を2回行った。得られたペレットに対し、ホモジナイズから遠心までのステップを繰り返した後、その上清を

post nuclear supernatant (PNS) として回収した。PNS から、3-2-1 と同様の方法により粗膜画分を得た後、膜画分の共免疫沈降を行なった。

4-2-3. 膜画分を用いた共免疫沈降法

脳の膜画分を、lysis buffer (50mM HEPES pH 7.4, 150mM NaCl, 1% CHAPSO, PI) 50 μ l で懸濁し、21G syringe x 20 strokes 及び 4°C, 1 h, rotate により可溶化した。その後遠心 (15000 rpm, 4°C, 1 min) (Rotor No: MA-2024, KUBOTA) により不溶性画分を除いた。得られた上清は、20 μ l の Protein G Sepharose beads と混合し、4°C, 1 h, rotate により非特異的な吸着を除いた。遠心 (15000 rpm, 4°C, 1 min) により得られた上清を回収し、BCA 法によりタンパク定量を行なった。そして各サンプルのタンパク質濃度を同一になるよう調製し、Input sample を回収した。残った上清に、1 μ g の TMEM30A 抗体または、control IgG 抗体を加え、4°C, 2 h, rotate により反応させた。その後、予め 1% BSA/PBS でブロッキングした Protein G Sepharose beads を、抗体が含まれているサンプルに等量ずつ加え、4°C, o/n で反応させた。翌日、lysis buffer 800 μ l を用いて、遠心 (15000 rpm, 4°C, 1 min) により 5 回 beads を洗浄した。得られた beads に 2x sample buffer を加え、PNS サンプルと共に 50°C, 30 min により熱処理を行なった後、WB に供した。

4-2-4. ウェスタンブロット (WB)

上記で得られた PNS, 膜画分の Input 及び免疫沈降 (IP) サンプル (20~40 μ g) をそれぞれ 1-2-8 と同様の手法で SDS-PAGE に供し、目的タンパク質に対する特異的 1 次抗体、そして Horseradish peroxidase (HRP) 標識の 2 次抗体 (1 次抗体の宿主に対する抗体; 使用抗体一覧参照) を反応させ、HRP 基質 (ImmunoStar LD/zeta) を加えた後、C hemiDoc (Bio-Rad) により検出した。Fig. 24E では、内因性 Evectin-2 より分子量が約 5 kDa (3xFLAG-SmBiT 分) 大きい 3xFLAG-SmBiT-Evectin-2 をトランスフェクションしたサンプルを分子量マーカーとして用い、分子量の違いから内因性 Evectin-2 のバンドを判断した。なお、内因性 Evectin-2 と 3xFLAG-SmBiT-Evectin-2 の分子量が近い理由から、トランスフェクションサンプルにおいては 3xFLAG-SmBiT-Evectin-2 のみを検出するため、内在性 Evectin-2 が検出できない程度の少量 (2~8 μ g) をアプライした。そして、1-2-8 と同様の方法で転写したメンブレンを Evectin-2 に対する 1 次抗体、2 次抗体と反応させた後 TBS-T で洗浄、ブロッキング後、さらに FLAG-HRP 抗体 (2 次抗体不要) と反応させ、TBS-T による洗浄の後、検出を行なった。(* Evectin-2 は rabbit 由来、FLAG-HRP 抗体は mouse 由来であり、認識配列も内因性由来及び外因性由来で異なるため、互いの反応に影響を及ぼさないと考える; https://www.cytivalifesciences.co.jp/newletter/protein_sciences/faq/faq0802.html)。定量法は 1-2-8 と同様である。

4-2-5. 統計解析

本章における全てのデータは、平均値 (mean) \pm s.e.m で表示した。また N 数は解析した動物の数を示す。統計解析は、GraphPad Prism8 ソフトウェアを用いて Two-tailed Student's t test または、One-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test を適用した。* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.0001。

4-3. 実験結果

4-3-1. 3ヶ月齢のA7マウスにおける解析

TMEM30A/ β CTF 複合体形成によるリピッドフリッパーゼの機能不全が $A\beta$ 蓄積以前に生じるのかを検討するため、初めに 3ヶ月齢のモデルマウスにおいて脳の膜画分を精製し、TMEM30A 抗体または control IgG により共免疫沈降を行なった。その結果、ネガティブコントロールである IgG 処理では、WT, A7 (Tg) マウスにおいて β CTF が共沈しなかったが、TMEM30A 抗体処理では、A7 マウスにおいて、 β CTF のシグナルが顕著に増加し、TMEM30A と β CTF の共沈降が確認された (Fig. 24A, B)。同様に、ATP8A1 についても IgG 処理では共沈しなかった (Fig. 24A)。一方で、TMEM30A 抗体処理で、WT と A7 マウスにおいて共沈降された ATP8A1 のシグナル強度に変化は認められなかった (Fig. 24A, C)。またリピッドフリッパーゼの機能変化を調べるため、Evectin-2 の膜移行性について検討した。その結果、WT と A7 マウスにおいて、膜画分における Evectin-2 のシグナルは変化しなかったことから (Fig. 24A, D)、その膜移行性は変化しないことが示唆された。尚、内在性 Evectin-2 のバンドの位置を検討するため、約 5kDa の 3 x FLAG-SmBiT を融合した 3 x FLAG-SmBiT-Evectin-2 を発現させ、分子量マーカーとして用いた。そして、動物サンプルについては内在性 Evectin-2 を、トランスフェクションサンプルにおいては 3xFLAG-SmBiT-Evectin-2 のみを検出するため、トランスフェクションサンプルを内在性 Evectin-2 が検出できない程度少量 (2~8 μ g) アプライし、Evectin-2 抗体で反応後続けて FLAG 抗体で反応させた。その結果、内在性 Evectin-2 のバンドは、35 kDa よりも約 5 kDa 小さい分子量の位置のバンドであることが確認された (Fig. 24E)。さらに、後述する APP ノックインマウスにおいて、Evectin-2 は 35 kDa より小さい分子量の位置に一本のバンドとして検出され、A7 マウス同様その膜移行性が低下している。そのため、Fig. 24E で示す Evectin-2 に関して、35 kDa より小さい分子量の位置のバンドは内在性である可能性が高い。一方で、A7 マウスにおける 35k Da 付近のバンドについては、ノックインマウスで認められなかったため、非特異的シグナルの可能性が高いと考えるが、修飾や isoform の可能性もあるため、異なる抗原認識部位を有する Evectin-2 抗体により明らかにする必要がある。

以上の結果から、3ヶ月齢の時点で TMEM30A と β CTF の結合は形成されるが、リピッドフリッパーゼの形成・機能は変化しないと考えられた。

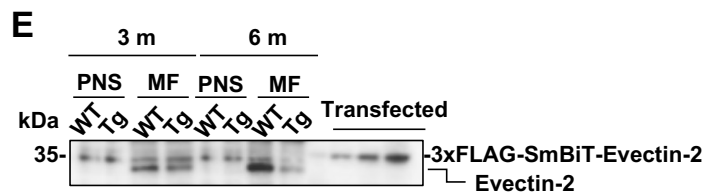
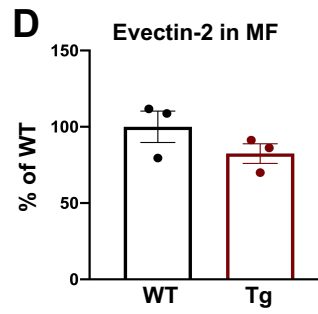
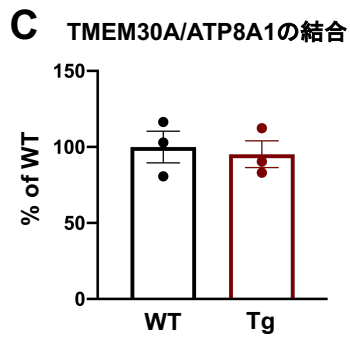
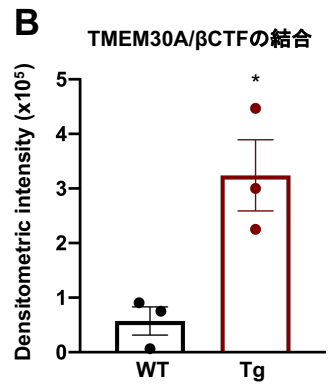
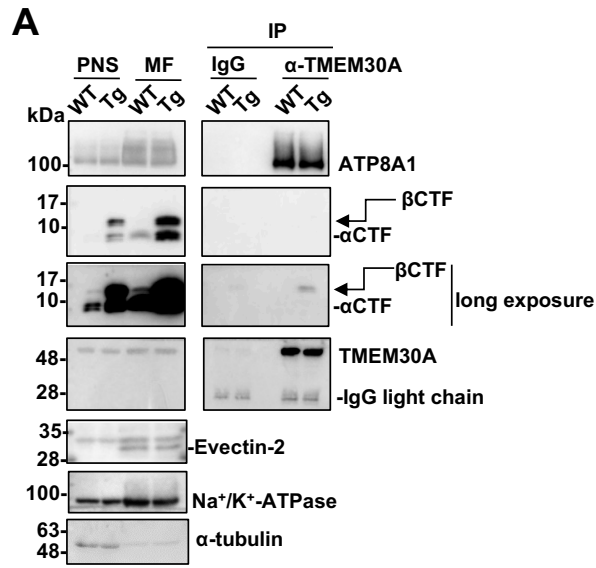


Fig. 24 3ヶ月における TMEM30A/ β CTF 複合体形

- A : 3ヶ月齢の WT 及び A7 マウスにおいて、脳の膜画分を精製し TMEM30A 抗体または control IgG により共免疫沈降を行い、WB に供した。各タンパク質のバンドは特異的抗体により検出した。 α CTF, β CTF は APP C 末端抗体により検出した。 Na^+/K^+ -ATPase は膜画分, α -tubulin は細胞質画分のマーカーとして使用し、共に膜画分の精製を示すコントロールである。
- B : A における β CTF のタンパク質量を定量化した。 Two-tailed Student's t test (N=3). * p <0.05. data mean \pm s.e.m.
- C : A における ATP8A1 のタンパク質量について定量化した。 Two-tailed Student's t test (N=3). data mean \pm s.e.m.
- D : A における Evectin-2 のタンパク質量について定量化した。 Two-tailed Student's t test (N=3). data mean \pm s.e.m. MF: membrane fraction
- E : 3xFLAG-SmBiT-Evectin-2 (35 kDa) を分子量マーカーとして利用し、分子量の違いからマウスにおける内在性 Evectin-2 のバンドの位置を確かめた。 Evectin-2 及び 3xFLAG-SmBiT-Evectin-2 は内在性 Evectin-2 の特異的抗体 (rabbit) 及び, FLAG-HRP (mouse) 抗体により同時に検出した (4-2-4 参照)。 PNS: post nuclear supernatant, MF: membrane fraction.

4-3-2. 6ヶ月齢の A7 マウスにおける解析

次に、6ヶ月齢のモデルマウスについて同様の解析を行なった。その結果、ネガティブコントロールである IgG 処理では、WT, A7 (Tg) マウスにおいて β CTF が共沈しなかったが、TMEM30A 抗体処理では、3ヶ月同様 A7 マウスにおいて、TMEM30A 及び β CTF の共沈降が確認された (Fig. 25A, B)。ATP8A1 についても IgG 処理では共沈せず (Fig. 25A), TMEM30A 抗体処理により、A7 マウスにおいて共沈降された ATP8A1 のシグナルが WT と比べ有意に減少した (Fig. 25A, C)。このことから、TMEM30A と ATP8A1 の結合が減少し、リピッドフリッパーゼの形成が抑制されることが示唆された。これに伴い、A7 マウスにおいて膜画分における Eevctin-2 の存在量も有意に減少したことから (Fig. 25A, D), 6ヶ月齢においては TMEM30A/ β CTF 複合体形成により、リピッドフリッパーゼの機能が低下することが示唆された。

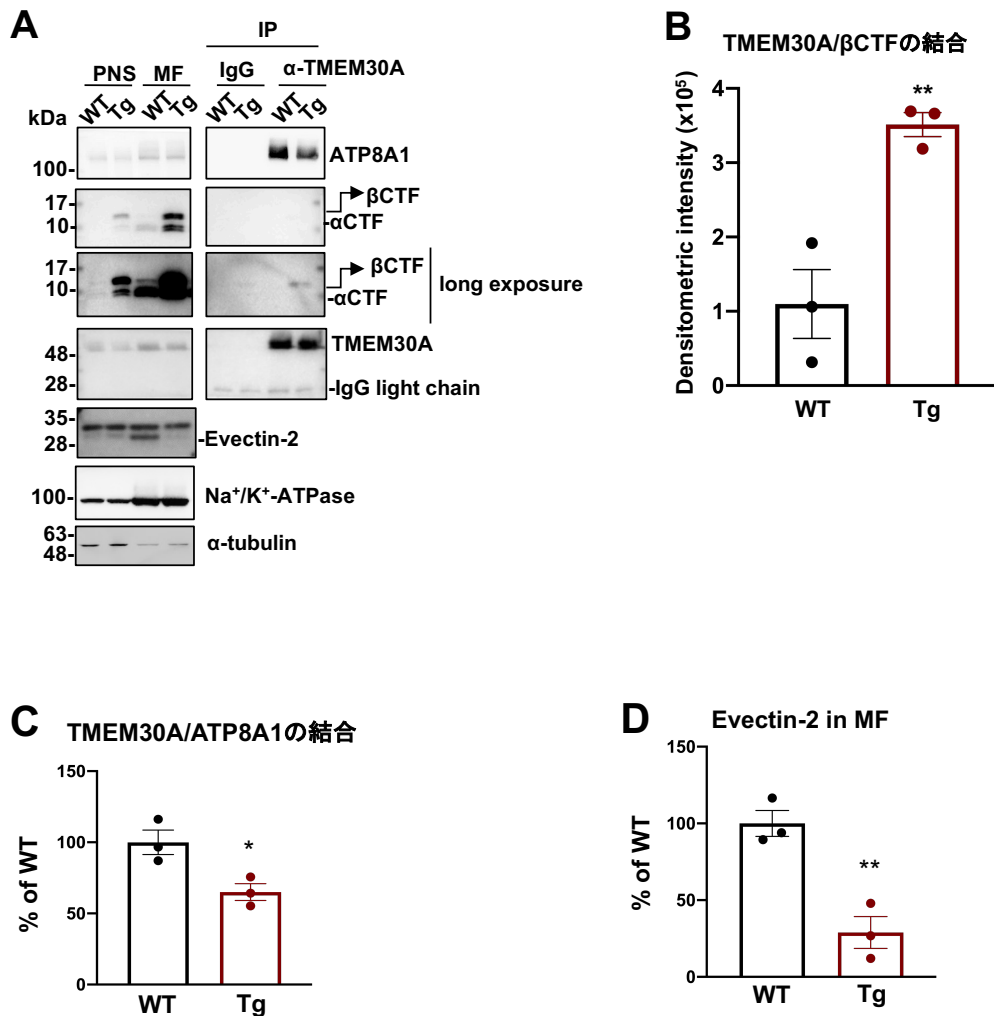


Fig. 25 6ヶ月におけるリピッドフリッパーゼの機能変化

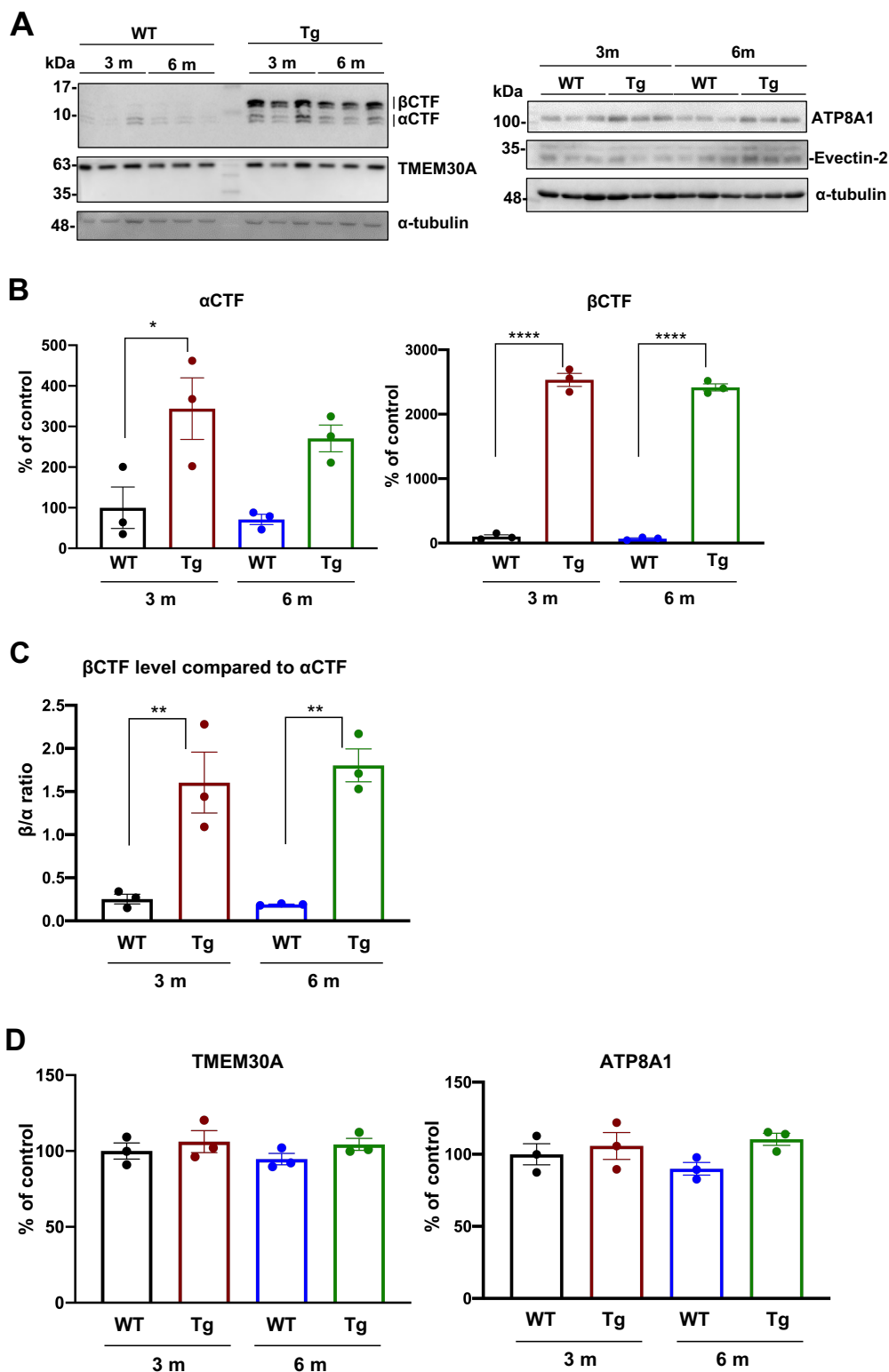
A: 3ヶ月齢と同様に、6ヶ月齢の WT 及び A7 マウスにおいても、脳の膜画分を精製し TMEM30A 抗体または control IgG により共免疫沈降を行い、WB に供した。検出は Fig. 24A と同様。Na⁺/K⁺-ATPase は膜画分、α-tubulin は細胞質画分のマーカーとして使用し、共に膜画分の精製を示すコントロールである。

B: A における βCTF のタンパク質量を定量化した。Two-tailed Student's t test (N=3). ***p*<0.01. data mean ± s.e.m.

C: A における ATP8A1 のタンパク質量について定量化した。Two-tailed Student's t test (N=3). **p*<0.05. data mean ± s.e.m.

D: A における Evecin-2 のタンパク質量について定量化した。Two-tailed Student's t test (N=3). ***p*<0.01. data mean ± s.e.m. MF: membrane fraction

リピッドフリッパーゼの形成・機能について、3ヶ月及び6ヶ月齢間の違いに関しては、各月齢のタンパク質発現量（リピッドフリッパーゼ構成因子及び Evecin-2）の違いや、 β CTF の蓄積量の変化によるものであるかを調べたが、A7 マウスにおいて3ヶ月及び、6ヶ月との間で有意な変化は認められなかった (Fig. 26A-E).



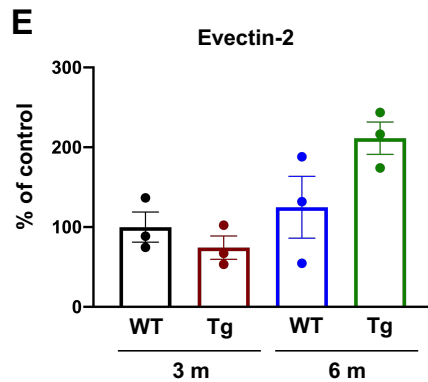


Fig. 26 3ヶ月及び6ヶ月におけるタンパク質発現量

- A : 3ヶ月・6ヶ月齢の WT 及び A7 マウスにおける脳の Homogenate (PNS) を WB に供し、各タンパク質発現量について特異的抗体を用い確認した。
Loading control: α -tubulin
- B : A における α CTF 及び β CTF のタンパク質量について定量化した。One-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test (N=3). $*p < 0.05$, $****p < 0.0001$. data mean \pm s.e.m.
- C : A において α CTF に対する β CTF のタンパク質量の比率を定量化した。One-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test (N=3). $**p < 0.01$. data mean \pm s.e.m.
- D : A における TMEM30A と ATP8A1 のタンパク質量について定量化した。One-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test (N=3). data mean \pm s.e.m.
- E : A における Evectin-2 のタンパク質量について定量化した。One-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test (N=3). data mean \pm s.e.m.

さらに、以前の知見において、小胞輸送障害に関与する因子として β CTF 以外に、APP や $A\beta$ オリゴマー（細胞内 $A\beta$ 凝集体）の関与が指摘されており (Xu *et al.*, 2016; Umeda *et al.*, 2015), 6 ヶ月齢において TMEM30A と APP 及び $A\beta$ オリゴマーとの結合を調べた結果, A7 マウスにおいていずれの場合についても, TMEM30A との共沈降は認められなかった (Fig. 27A, B). このことから, 6 ヶ月齢において TMEM30A は主に β CTF と結合することが示唆された.

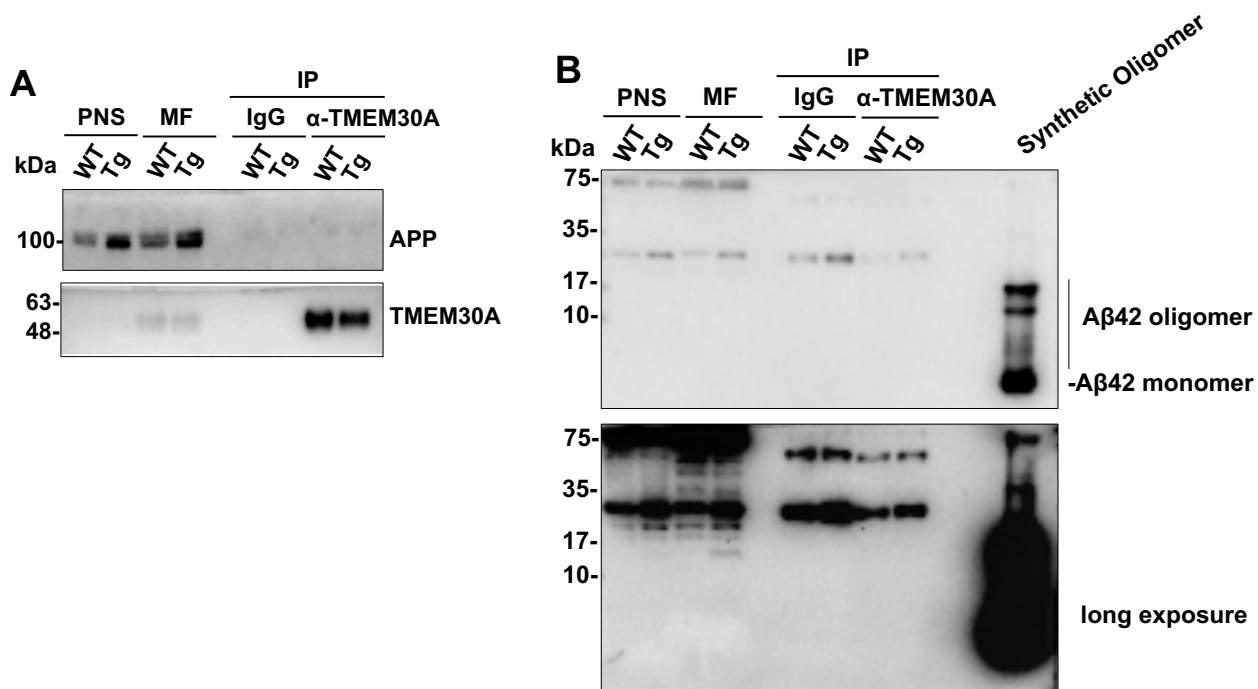


Fig. 27 APP 及び $A\beta$ oligomer と TMEM30A の結合解析

A, B : 6 ヶ月齢の WT 及び A7 マウスにおいて, F と同様に TMEM30A 抗体または control IgG により共免疫沈降を行い, WB に供した. APP, $A\beta$ モノマー, オリゴマーは 6E10 抗体により検出した. TMEM30A は特異的抗体により検出した. Synthetic $A\beta$ oligomer サンプル (Mamada *et al.*, 2015) は $A\beta$ モノマー及びオリゴマー検出のポジティブコントロールとして用いた.

4-3-3. App^{NL-G-F/NL-G-F} マウスにおける解析

続いて、他の AD モデルマウス (App^{NL-G-F/NL-G-F} knock-in) についても同様の解析を行なった。App^{NL-G-F/NL-G-F} は、マウス APP 遺伝子について、A β 配列をヒト型に変換し、さらに APP695 の家族性 AD 変異 (K670N, M671L, I716F, E693G) を knock-in したマウスである。本モデルは野生型と同程度の APP 発現量を示すため、過剰発現によるアーチファクトを除外できると考えた。3 ヶ月齢の本モデルマウスを用いて A7 マウスと同様の解析を行なった。その結果、ノックインマウスにおいても、TMEM30A と β CTF の共沈降が観察され (Fig. 28A, B), 両者が結合することが示唆された。これに付随して、TMEM30A と共沈降された ATP8A1 量はノックインマウスにおいて減少し (Fig. 28A, C), リピッドフリッパーゼの形成が抑制されることも再現された。さらに、統計的に有意な差として認められなかったものの、ノックインマウスにおいて膜画分における Evc2 の存在量も減少する傾向が得られた (Fig. 28A, D)。

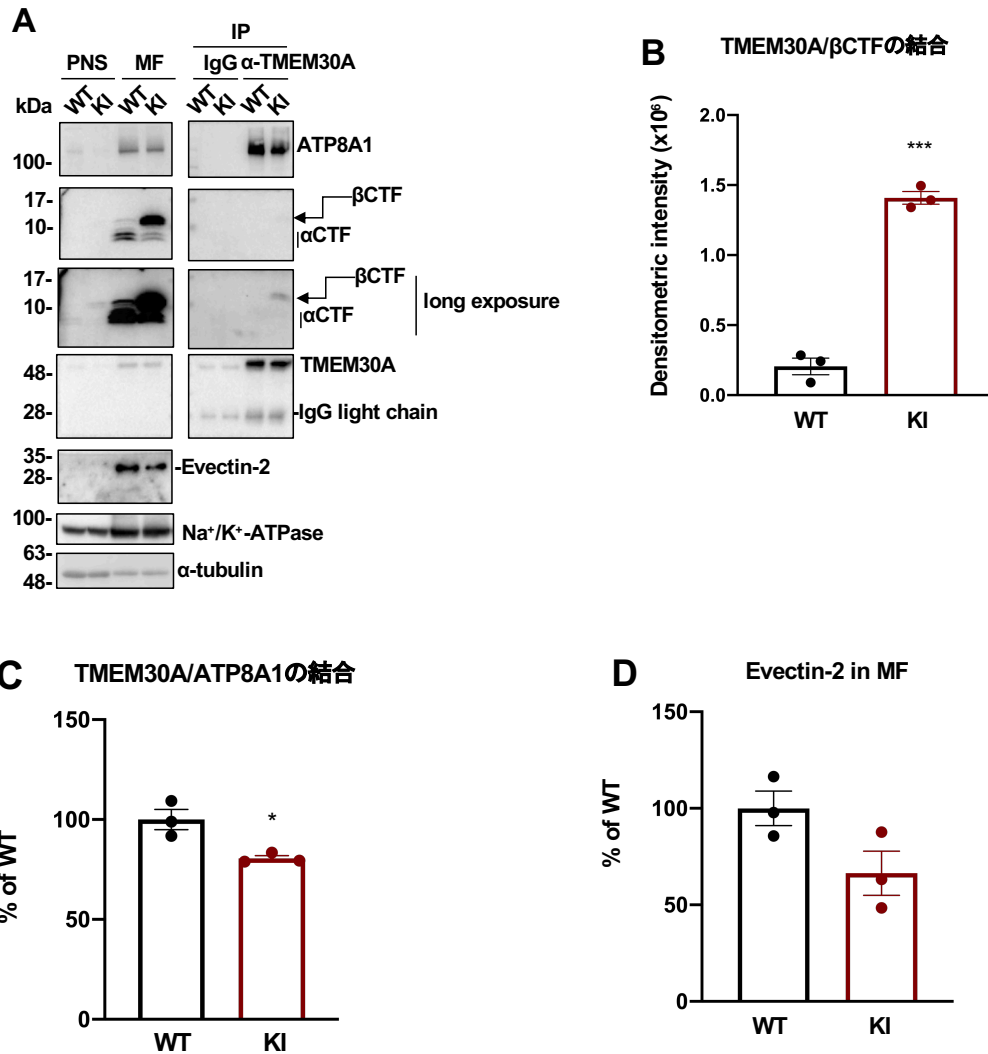


Fig. 28 App^{NL-G-F/NL-G-F} マウスでの TMEM30A/βCTF 複合体形成及び
リピッドフリッパーゼの機能不全

A : 3 ヶ月齢の WT 及び App^{NL-G-F/NL-G-F} マウスにおいて、脳の膜画分を精製し TMEM30A 抗体または control IgG により共免疫沈降を行い、WB に供した。各タンパク質のバンドは、特異的抗体により検出した。αCTF, βCTF は APP C 末端抗体により検出した。Na⁺/K⁺-ATPase は膜画分、α-tubulin は細胞質画分のマーカーとして使用し、共に膜画分の精製を示すコントロールである。

B : A における βCTF のタンパク質量を定量化した。Two-tailed Student's t test (N=3). ****p*<0.001. data mean ± s.e.m.

C : A における ATP8A1 のタンパク質量について定量化した。Two-tailed Student's t test (N=3). **p*<0.05. data mean ± s.e.m.

D : A における Eevctin-2 のタンパク質量について定量化した。Two-tailed Student's t test (N=3). *p*=0.08. data mean ± s.e.m. MF: membrane fraction.

4-4. 考察

本章では、TMEM30A/ β CTF 複合体形成によるリピッドフリッパーゼの機能不全が A β 蓄積以前の現象であるかを検証した。そこで、AD モデルマウスの中でも比較的遅い月齢 (9 ヶ月~12 ヶ月) から A β が沈着する A7 マウスに着目した。その結果、TMEM30A と β CTF が結合することで、加齢依存的にリピッドフリッパーゼの機能が低下することが示唆され (Fig. 24, 25), モデル細胞における解析結果がモデル動物においても確認された。また TMEM30A/ β CTF 複合体形成によるリピッドフリッパーゼの機能低下は、脳内で A β が沈着する以前の月齢で認められたことから、A β 沈着に先行して生じる可能性が考えられた。3 ヶ月と 6 ヶ月におけるリピッドフリッパーゼの形成、Evectin-2 の膜移行性の加齢依存的な変化については、関連タンパク質の発現量に有意な変化は認められず (Fig. 26), その発現量変化による影響は少ないと考える。 β CTF の蓄積量に関しても変化は認められなかったが (Fig. 26), 2 章の考察で述べたように、ラフト画分への移行によりホモジェナイズバッファーで可溶化しきれていない可能性もあるため、RIPA など強い界面活性剤を用いて今後さらに解析する必要はあると考える。

他の可能性として、 β CTF の蓄積により、TMEM30A/ β CTF 複合体も蓄積することで、長期的に ATP8A1 の結合に必要な TMEM30A が不足し、リピッドフリッパーゼの機能低下につながったのではないかと考察する。一方で、3 ヶ月と 6 ヶ月における、TMEM30A/ β CTF 複合体形成の量的な変化が関与している可能性も考えられる。今後は、3 ヶ月と 6 ヶ月における両者の結合量の違いについて、共免疫沈降法のみならず、近接ライゲーションアッセイ (Kuwahara *et al.*, 2020) など、より感度が高く、定量性のある実験系も用いて解析する必要がある。

また A7 マウス 6 ヶ月において、リピッドフリッパーゼの形成に比べ、膜画分における Evectin-2 の存在量が顕著に減少したことについては (Fig. 25C, D), ATP8A1 以外の P4-ATPase の関与も推察される。ATP8A2 は ATP8A1 と同じ Class 1 P4-ATPase であり、脳内で多く発現し、エンドソームに局在する (Wang *et al.*, 2018)。またその活性維持には TMEM30A との結合が必要である (Coleman *et al.*, 2011)。そのため 6 ヶ月において、ATP8A2 と TMEM30A によるリピッドフリッパーゼの形成も減少することで、膜画分における Evectin-2 局在が顕著に減少したのではないかと考える。今後は、ATP8A2 をはじめとした TMEM30A に結合する他の P4-ATPase についても、 β CTF が蓄積した際、TMEM30A との結合を検証する必要がある。

本章では A7 マウス以外に、APP のノックインマウスについても解析を行なった。ノックインマウスは APP を過剰発現していないため、より内在的な発現レベルでの APP 由来の変化を捉えることが可能である (Saito *et al.*, 2014)。本解析の結果、APP ノックインマウスにおいても、TMEM30A と β CTF の結合が観察され、さらに、リピッドフリッパーゼの形成が抑制されることが示唆された (Fig. 28A-C)。一方で、Evectin-2 の膜移行性については統計的に有意な差として認められなかったが、減少する傾向が得られた (Fig. 28A, D)。本結果に関しては、今回用いた月齢が 3 ヶ月であったため、より高齢のマウスで解析を行うことで加齢依存的な変化を観察する必要があると考える。以上 A7 マウス及び、App^{NL-G-F/NL-G-F} マウスの解析から、リピッドフリッパーゼの機能不全は APP の過剰発現による影響ではなく、蓄積した β CTF と TMEM30A の結合による影

響であることが示唆された。

一方で、本章におけるリピッドフリッパーゼの活性評価については懸念点がある。それは、リピッドフリッパーゼの機能変化として Evectin-2 の膜移行性を評価する際、膜画分がエンドソーム膜以外の膜成分も含んでいることである。そのため今後はエンドソーム画分を精製し、Evectin-2 の存在量を解析する必要があるだろう。

これまで小胞輸送障害の原因として、 β CTF の蓄積以外に APP や $A\beta$ オリゴマーの蓄積も報告されている (Xu *et al.*, 2016; Umeda *et al.*, 2015)。しかし、これらは TMEM30A と結合しなかった (Fig. 27)。また、AD 患者由来の iPS 細胞から分化した神経における解析では、 $A\beta$ ではなく β CTF の蓄積がエンドソームの肥大化に寄与することが示されている (Kwart *et al.*, 2019)。もちろん病態の進行とともに APP や $A\beta$ オリゴマーが小胞輸送障害に関与する可能性は残されているが、AD 病態初期の小胞輸送障害に関与する因子としては TMEM30A と β CTF の寄与が高い可能性がある。

本章では、リピッドフリッパーゼの機能不全が $A\beta$ 蓄積以前に生じる可能性を示したが、実際にエンドソームの肥大化に寄与するののかについては、免疫組織染色や電子顕微鏡などにより、エンドソームの形態変化を観察する必要がある。また、これまで Rab5 の異常な活性化 (GTP 型 Rab5 の増加) はエンドソーム肥大化のマーカーとして用いられており (Kim *et al.*, 2016)、活性型 Rab5 の検出を行うなど、異なる実験系からエンドソームの肥大化を評価する必要がある。

第5章 Aβ/βCTF 結合性ペプチド T-RAP による エンドソーム肥大化の改善

5-1. 目的

第4章までの解析から、Aβ蓄積以前に TMEM30A/βCTF 複合体形成によるリピッドフリッパーゼの機能不全が示唆され、初期病態であるエンドソームの肥大化に寄与する可能性が示された。このことから、TMEM30A と βCTF の結合を阻害することで、リピッドフリッパーゼの機能低下及び、初期病態であるエンドソームの肥大化を改善できることが予想された。

当研究室では、TMEM30A がその細胞外領域を介して βCTF の Aβ 配列と結合することを見出している (Takasugi *et al.*, 2018)。また、βCTF との結合部位をさらに探索するため、TMEM30A の細胞外領域を段階的に切断した変異体を作製し、βCTF との結合を検討した。その結果、種間で保存され、機能的な構造 (α-helix, β-sheet; Raptor X 解析) を持つ T-RAP 配列が重要であることを見出した (高杉展正 准教授 指針; Fig. 29A)。実際に、T-RAP は Aβ 配列を介して βCTF と結合することが示されている (今岡亮介 修士論文, 2017; Fig. 29B)。そのため、合成 T-RAP ペプチドは、TMEM30A と βCTF の結合を阻害できるのではないかと考え、T-RAP ペプチドによるリピッドフリッパーゼの機能不全及び、エンドソームの肥大化に対する影響を解析した。

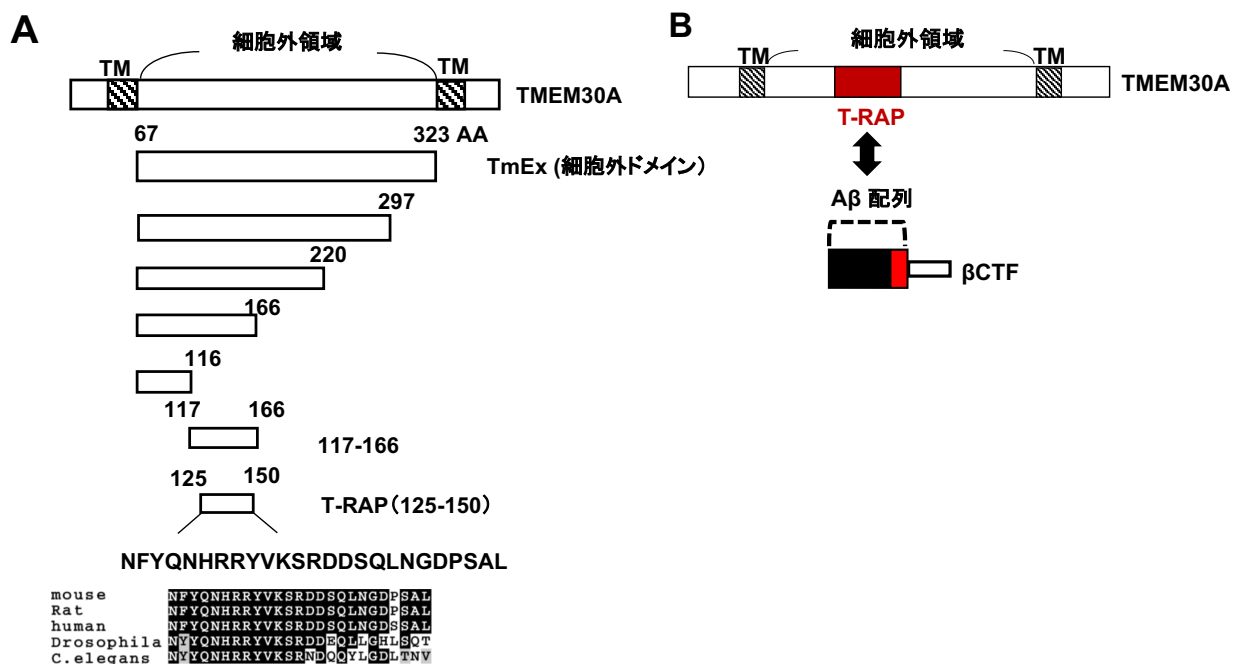


Fig. 29 T-RAP 配列の同定及び βCTF との結合

A : TMEM30A の細胞外領域を段階的に切断した変異体と T-RAP 配列を示す概略図である。TmEx は TMEM30A の細胞外領域である。
B : βCTF の Aβ 配列と T-RAP の結合 (模式図)

5-2. 実験方法

5-2-1. T-RAP, TAT-T-RAP によるリピッドフリッパーゼ活性への影響

T-RAP, TAT-T-RAP の合成は Genscript 社に委託した。また、ペプチドは MilliQ に溶かした。TAT はヒト免疫不全ウイルス (HIV) 由来のタンパク質, Trans-Activator of Transcription (TAT) のことで, 細胞膜を透過する性質がある (Richard *et al.*, 2003)。本解析では以前の知見を参考に (Shoji-Kawata *et al.*, 2013), TAT の後ろにリンカー領域として 2 アミノ酸 (GG) を融合した, TAT-GG-T-RAP (TAT-T-RAP) を使用した。24 well plate に SH-control と SH-BACE1 細胞を翌日 60% の割合になるよう播種後, luciferase subunits (各 plasmid 1 : 1) を total DNA 量 1 μ g になるよう導入した。その 6 時間後に MilliQ (vehicle), T-RAP (10 μ M) または, TAT-T-RAP (50 μ M) を処理した。各ペプチドを処理した 48 時間後に Nano-Glo live cell assay kit (N2011, Promega) を用いて, 3-2-4 と同様の方法により, integration time 0.3 s または 0.5 s, RT の条件下で luciferase activity を測定し, RLU を算出した。

5-2-2. T-RAP によるエンドソーム形態変化の観察

COS-control と COS-BACE1 細胞を播種した翌日に MilliQ または, T-RAP (10 μ M) を処理し, その 48 時間後に 2-2-6 と同様の方法で免疫蛍光染色を行なった。

5-2-3. T-RAP による細胞毒性への影響

SH-SY5Y 細胞に T-RAP (10 μ M), vehicle である MilliQ を処理し, また細胞死のポジティブコントロールとして純度 100% EtOH を処理した。48 時間後に Alamar blue を最終濃度 1/10 倍になるよう加えた培地で, 37°C, 1 時間インキュベーションした。また, Alamar blue を含む培地のみで同様のインキュベーション操作を行いバックグラウンドサンプルとした。その後培地を回収し, GloMax®-Multi+ Detection System (Promega) を用いて, 励起波長 (excitation) 530 nm, 蛍光波長 (emission) 590 nm で測定した。得られた数値についてバックグラウンドサンプルの値を減算して測定値として解析した。

5-2-4. ウェスタンブロット (WB)

細胞を 100 μ l 以上の RIPA buffer で溶解し, sonication (hand pulse: 4~6) を行い, タンパク質の抽出を行なった。その後 2 x sample buffer を加え, 95°C, 3 min 間熱処理を行なった。サンプルを 1-2-8 と同様の方法で SDS-PAGE に供し, 目的タンパク質に対する特異的 1 次抗体, そして Horseradish peroxidase (HRP) 標識の 2 次抗体 (1 次抗体の宿主に対する抗体; 使用抗体一覧参照) を反応させ, HRP 基質 (ImmunoStar LD/zeta) を加えた後, ChemiDoc (Bio-Rad) により検出した。定量法は, 1-2-8 と同様である。

5-2-5. 統計解析

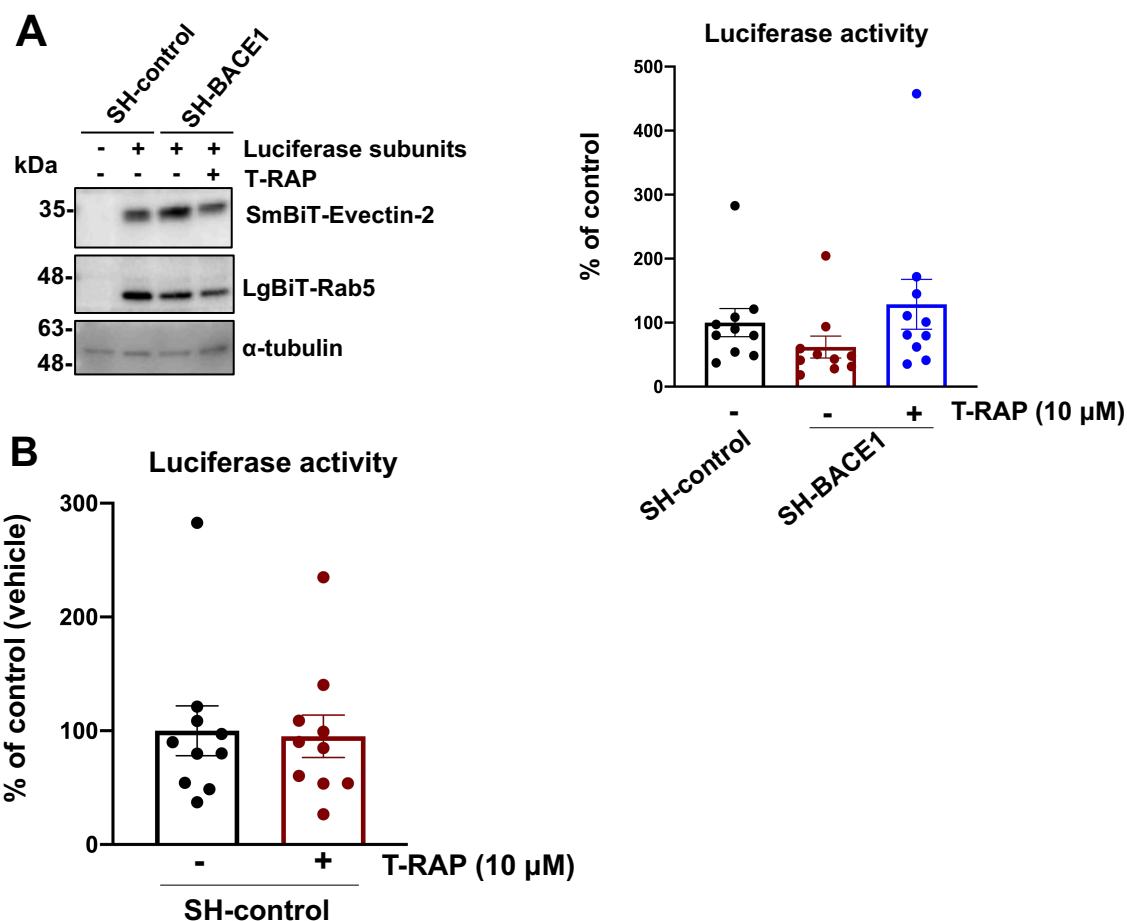
Rab5 陽性 puncta の面積については box plot で示しており, 中央値 (median), 最小値 (min), 最大値 (max) を表示した。それ以外のデータについては, mean \pm s.e.m で表示した。統計解析は, GraphPad Prism8 ソフトウェアを用い, パラメトリック検定として One-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test を, ノンパラメトリック検

定として Mann-Whitney U test または, Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparisons test を適用した. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

5-3. 実験結果

5-3-1. T-RAPによるリピッドフリッパーゼ活性に対する影響

初めに、T-RAPによるリピッドフリッパーゼ活性への影響を調べるために、3-2-4のNanoBiT法を用いて、Evetin-2のエンドソーム移行性を検討した。その結果SH-BACE1細胞において、T-RAP (10 μ M) 処理により LgBiT と SmBiT の結合による luciferase activity が増加する傾向が得られた (Fig. 30A)。このことから、T-RAP 処理により Evecin-2 のエンドソーム移行性が増加する可能性が考えられた。一方で、SH-control 細胞では T-RAP 処理によりルシフェラーゼ活性が変化しなかったことから (Fig. 30B)、Evecin-2 のエンドソーム移行性は変化しないことが示唆された。なお、今回用いている濃度 (10 μ M) において、Alamar blue 測定法を用い細胞生存性を評価した結果 (Fig. 30C)、T-RAP による毒性は認められなかった。また、Evecin-2 のエンドソーム移行性について、膜透過ペプチドである Trans-Activator of Transcription Protein (TAT) を融合した T-RAP (50 μ M) 処理では、Evecin-2 のエンドソーム移行性が有意に回復したことから (Fig. 30D)、細胞内に高濃度で取り込まれると、安定的にリピッドフリッパーゼの活性が回復することが考えられた。



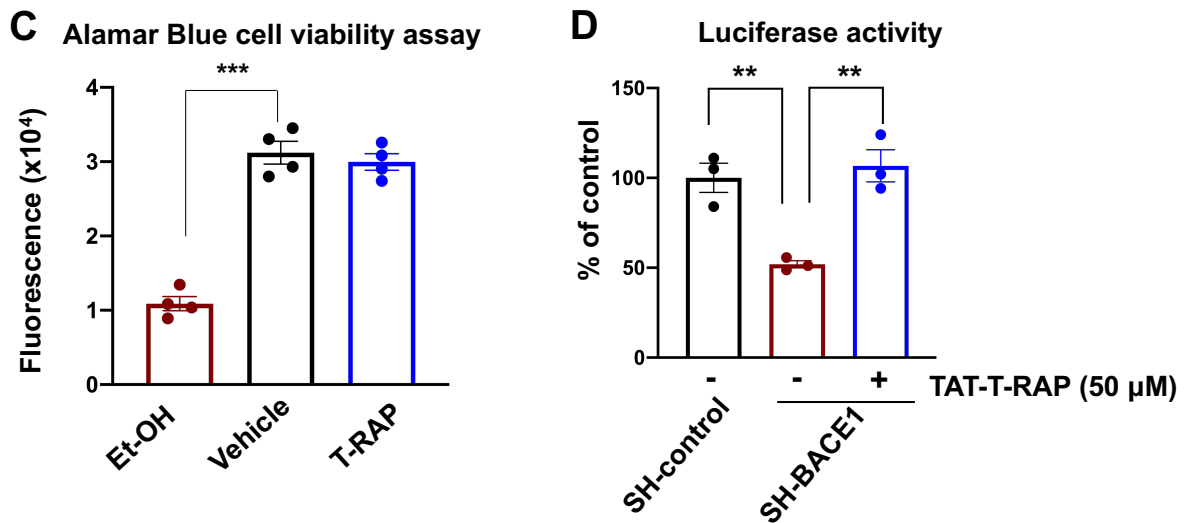
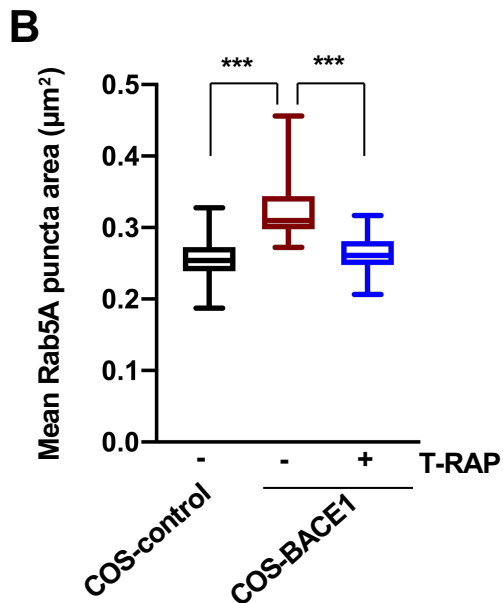
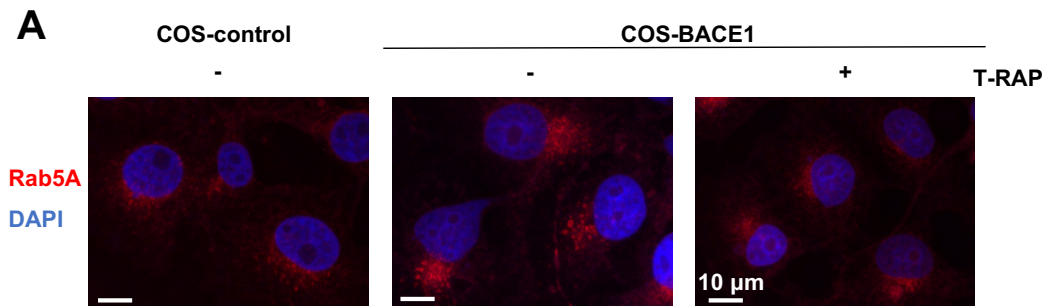


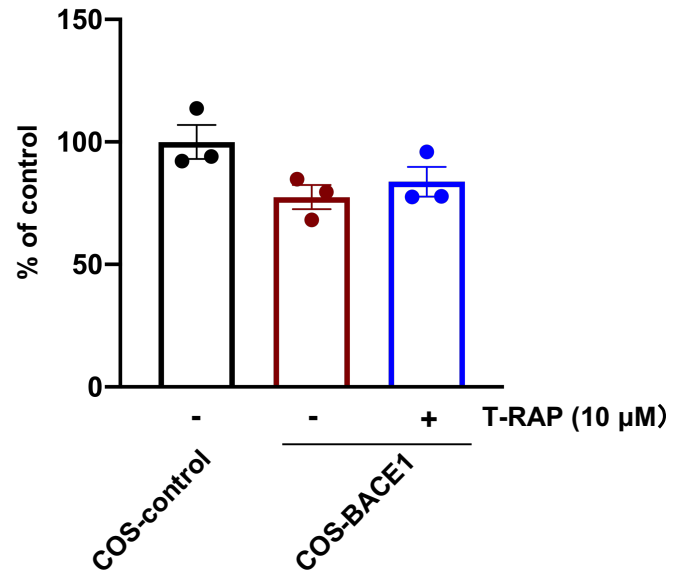
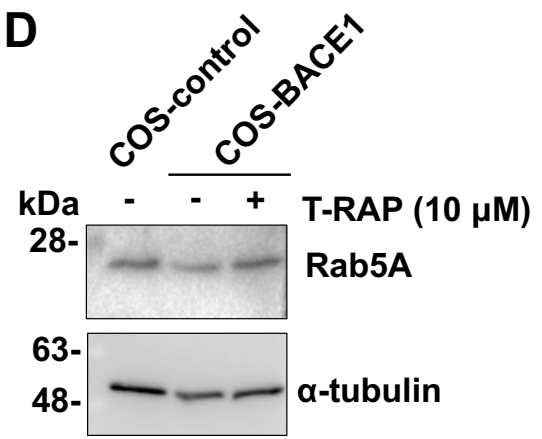
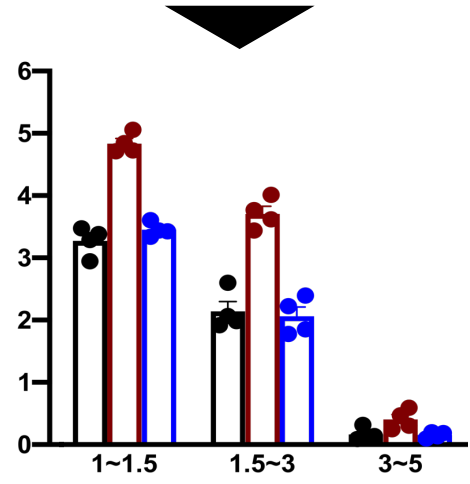
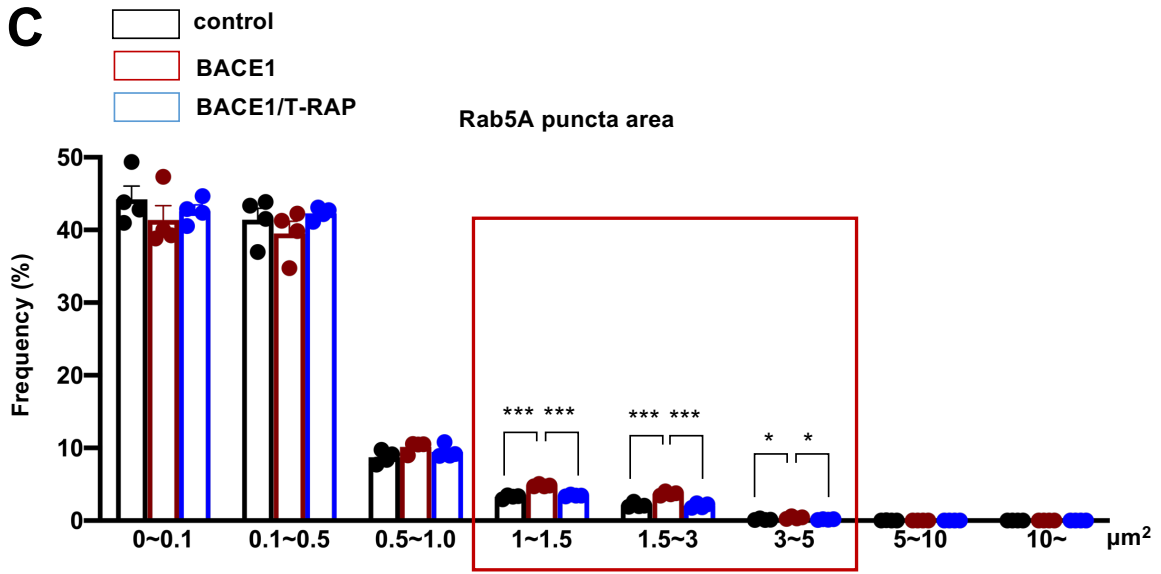
Fig. 30 T-RAPによるリポッドフリッパーゼ活性の回復

- A : SH-control, SH-BACE1 に luciferase subunits を発現させ, 6 時間後に MilliQ (vehicle) または, T-RAP (10 μM) を処理し, その 48 時間後に luciferase activity を測定した. その cell lysate を WB に供した (左). SmBiT-Evectin-2 は FLAG-HRP 抗体を, LgBiT-Rab5 は HA 抗体を用いて検出した. Loading control; α -tubulin. また, luciferase activity について定量化した (右). Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparisons test (n=10), data mean as \pm s.e.m. SH-control vs SH-BACE1: $p=0.17$; SH-BACE1 vs SH-BACE1 (T-RAP): $p=0.1$.
- B : SH-control において A と同様に T-RAP を処理後, luciferase activity を測定し, 定量化した. Mann-Whitney U test (n=10). data mean \pm s.e.m.
- C : SH-SY5Y 細胞に, vehicle, 100%EtOH (細胞死のポジティブコントロール) または T-RAP を処理し 48 時間後に Alamar blue を用いて細胞毒性を検証し, 定量化した. One-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test (n=4). *** $p<0.001$, data mean \pm s.e.m.
- D : A と同様の方法で TAT-T-RAP (50 μM) を処理後, luciferase activity を測定し, 定量化した. One-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test (n=3). ** $p<0.01$, data mean \pm s.e.m.

5-3-2. T-RAPによるエンドソームの肥大化、 β CTFの蓄積に対する影響

次に、T-RAPによるエンドソームの形態変化を観察するため、Rab5Aについて免疫蛍光染色を行なった。その結果、COS-BACE1細胞で増加したRab5陽性エンドソームの平均面積は、T-RAP処理により有意に減少した (Fig. 31A, B)。また、肥大化したエンドソーム ($1.0\sim 5.0\ \mu\text{m}^2$) の割合も有意に減少した (Fig. 31C)。一方で、T-RAP処理により、輝度に変化している傾向が観察されたため、発現量の減少による影響であるかを検討した結果、そのタンパク質発現量は変化しなかった (Fig. 31D)。また、エンドソーム肥大化の原因分子である β CTFのタンパク質量についてWBにより解析した結果、T-RAP処理により有意に減少することが明らかとなった (Fig. 31E, F)。さらに、BACE1によるAPPのN末端切断物であるsAPP β のタンパク質量も有意に減少した (Fig. 31E, G)。一方で、 β CTFの直接的な前駆体であるAPP及び、TMEM30Aのタンパク質量に有意な変化は認められなかった (Fig. 31E, H, I)。





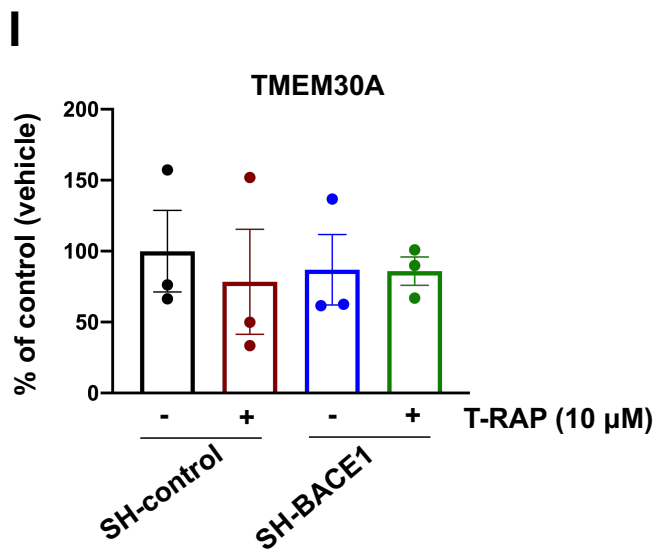
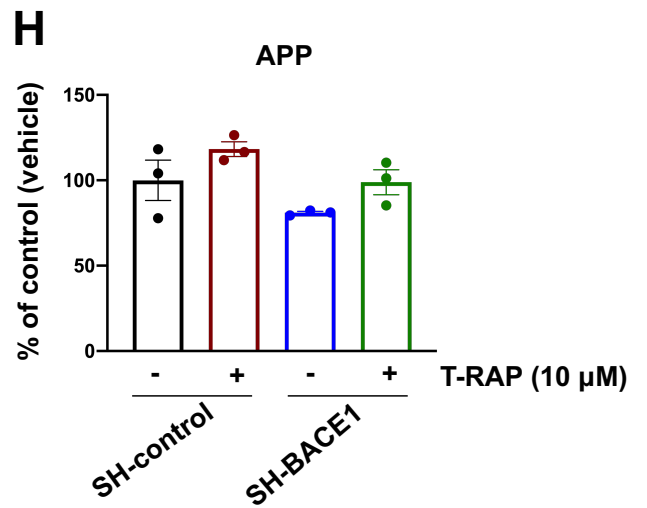
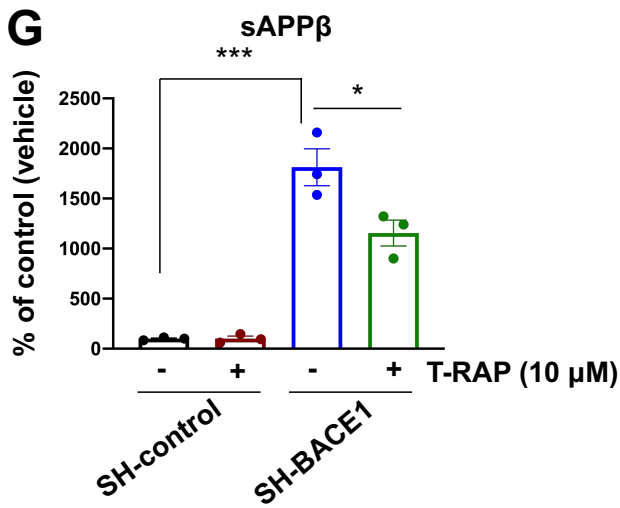
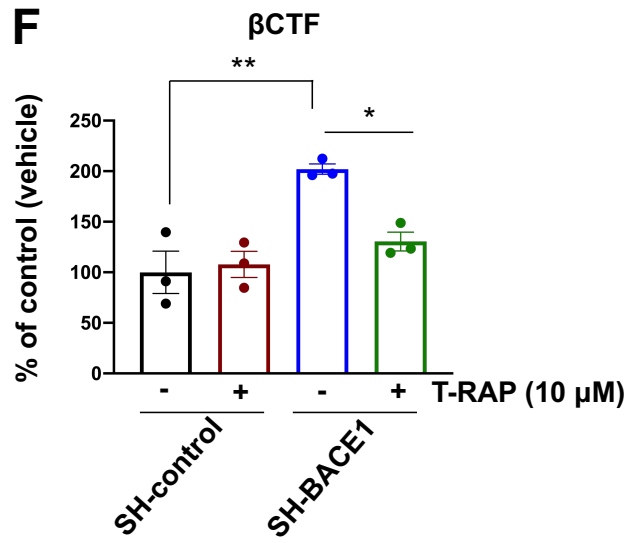
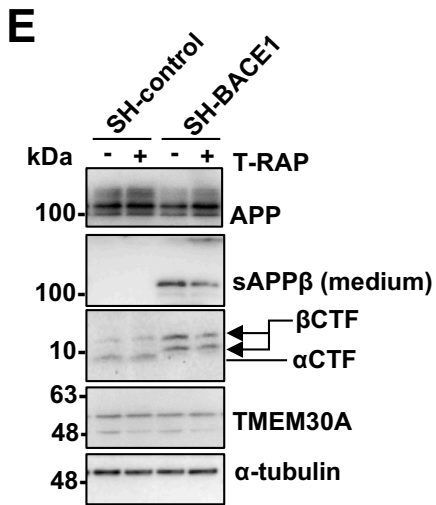


Fig. 31 T-RAP によるエンドソーム肥大化の改善及び β CTF 量の減少

- A : COS-control, COS-BACE1 において, T-RAP (10 μ M) を処理し 48 時間後に Rab5A に対する特異的抗体を用いて, 免疫蛍光染色を行なった. 図は 60 倍の油浸対物レンズで撮影し, 2.6 倍に拡大したものである. Scale: 10 μ m.
- B : A において, 各サンプルにつき解析した全視野 (n=40; 10 fields x 4 trials) における, 単一 Rab5A 陽性 puncta の平均面積を定量化した. One-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test. *** p <0.001. The bar in the box: median; whiskers: Min to Max.
- C : A における Rab5A 陽性 puncta について, サイズごとの存在割合を表している. 縦軸は, 全体の puncta 数に対する各サイズ puncta の割合を示す. 矢印の下は, 1~5 μ m² の面積の割合について図を拡大したものである. One-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test (n=4). * p <0.05, *** p <0.001, data mean \pm s.e.m.
- D : T-RAP 処理 (10 μ M) による WCL を WB に供し, Rab5A のタンパク質量を特異的抗体により検出し (左), 定量化した (右). One-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test (n=3). data mean \pm s.e.m. Loading control: α -tubulin
- E : SH-control, SH-BACE1 に T-RAP (10 μ M) を処理し, 48 時間後に WCL または medium を WB に供し, 各タンパク質に対する特異的抗体により検出した. APP, α CTF, β CTF は APP C 末端抗体により検出した. Loading control: α -tubulin
- F-I : E における β CTF, sAPP β , APP, TMEM30A 量を定量化した. One-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test (n=3). * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001. data mean \pm s.e.m.

5-4. 考察

本章では、 β CTF に結合するペプチド T-RAP が (Fig. 29), TMEM30A/ β CTF 複合体形成を阻害することで、リピッドフリッパーゼの機能不全及び、エンドソームの肥大化を改善するののかについて検討した。その結果、T-RAP ペプチドは、リピッドフリッパーゼの機能を回復させる可能性が示された (Fig. 30A, B)。一方で、コントロール細胞では T-RAP 処理によるリピッドフリッパーゼの活性が変化しなかったため (Fig. 30B), β CTF の蓄積がない通常状態では、T-RAP はリピッドフリッパーゼ活性に影響を与えないことが示唆された。本解析で、T-RAP はリピッドフリッパーゼの活性回復傾向を示したが、統計的に有意ではなかった。その理由として、細胞内導入効率や安定性が十分に担保されていない可能性が考えられる。そのため、本章での BACE1 恒常発現細胞における 48 時間処理時には、一度回復したリピッドフリッパーゼの活性が、T-RAP の効果消失により再び失われ始めているかもしれない。今後は、T-RAP を繰り返し処理することや恒常発現系の構築など、安定的かつ持続的に効果が期待できる条件を検討する必要があると考える。また実際に、T-RAP が細胞内に導入されているのかについて、T-RAP に対する特異的抗体や、FLAG などのタグを融合した精製ペプチドを利用することで明らかにする必要がある。一方で、膜透過ペプチドを融合した TAT-T-RAP の高濃度処理において、リピッドフリッパーゼの活性が有意に回復した (Fig. 30D)。そのため、T-RAP も高濃度で細胞内に導入すれば、安定的にリピッドフリッパーゼの活性を回復できる可能性がある。

また、T-RAP は BACE1 恒常発現細胞におけるエンドソームの肥大化を改善すると共に (Fig. 31A, B), 肥大化したエンドソームの数も有意に減少させた (Fig. 31C)。T-RAP 処理により、Rab5A のタンパク質発現量に変化はなく (Fig. 31D), 面積の測定時に撮像画像を 2 値化しているため、これらエンドソーム面積の増大は、発現量の違いや輝度の影響を受けにくいと考える。

さらに、エンドソーム肥大化の原因分子である β CTF 量や BACE1 切断による APP の分泌物 sAPP β 量についても、T-RAP 処理により有意に減少した (Fig. 31E-G)。 β CTF や sAPP β が減少した理由として、二つの可能性が考えられる。

一つは、小胞輸送障害に伴うエンドソームの肥大化が改善され、小胞輸送が促進することで、APP や BACE1 など基質と酵素の集積がなくなり、 β CTF, sAPP β の産生が低下することによって考えられる。実際に、小胞輸送を非選択的に促進し、APP のエンドソームからゴルジ体への輸送を促進する薬理的シャペロンと呼ばれる化合物群をプライマリーニューロンに処理すると、エンドソームにおける BACE1 切断が抑制され、 β CTF, A β 産生が減少することが報告されている (Mecozzi *et al.*, 2014)。また、小胞輸送が促進すると、 β CTF, sAPP β がリソソームへ輸送され、分解される可能性も考えられる。

もう一つの可能性としては、T-RAP が BACE1 の切断活性を阻害することである。例えば T-RAP が A β 配列を有する APP に結合し、BACE1 による APP の切断を阻害する場合や、BACE1 の活性を直接制御する場合がある。今後は T-RAP 存在下において、*in vitro* による BACE1 活性の測定や、BACE1 の他の基質である Neuregulin-1 (NRG1) についても解析していく必要がある。

β CTF による小胞輸送障害は AD 初期病態として注目されているため、小胞輸送障害

を治療標的とすることは、当該分野において重要な位置づけとなりうる。そのため、BACE1 阻害薬は、 β CTF の産生を抑制するという点において、初期病態を改善し得る治療薬候補であるが、これまでの知見から、副作用の問題が指摘されている。実際に、BACE1 のノックアウトマウスなどにおいては、基質の一つである NRG1 の切断が起きず、NRG1 を介したシグナルによる抑制性神経のシナプス形成が阻害され、統合失調症様の表現型が観察されている (Vassar, 2014; Savonenko *et al.*, 2008)。一方で、T-RAP は、親和性の検証などさらなる解析は必要だが、 β CTF に結合することで、TMEM30A/ β CTF 複合体形成という病態特異的な標的を阻害する可能性がある。そのため、今後は AD モデル動物に応用し同様の改善効果及び、認知機能の改善効果を検討することで、治療候補分子として利用できるかを検証していく必要がある。また、T-RAP のように β CTF と結合する化合物なども β CTF による毒性を抑制する可能性がある。例えば、ウコンの成分であるクルクミンは、 $A\beta$ 配列と結合することが報告されており (Tang and Taghibiglou, 2017)、実際に $A\beta$ 配列を介して β CTF と結合し、 β CTF と TMEM30A の結合を阻害することを当研究グループでは見出している (特許 6391318: アルツハイマー病予防治療薬のスクリーニング法)。将来的には、第 3 章の NanoBiT 法を利用して、その他の β CTF 結合性化合物によるリピッドフリッパーゼの活性変化をスクリーニングする際、T-RAP を指標として利用できることも期待される。

終章 (第2章～5章)

第2章～5章では AD 初期病態である小胞輸送障害のメカニズム解明を目的に研究を行い、以下の知見を得た。

BACE1 の活性化により、 β CTF が増加することで、

1. 内因性 TMEM30A と β CTF が結合し、両者が通常とは異なるエンドソーム画分で共局在する
2. リピッドフリッパーゼの活性が低下し、細胞質側ホスファチジルセリン (PS) の局在が減少する
3. エンドソームが肥大化する

AD モデルマウスにおいて、脳内 $A\beta$ が沈着する以前に、

1. TMEM30A と β CTF が結合する
2. 加齢依存的にリピッドフリッパーゼの機能が低下する

$A\beta/\beta$ CTF 結合性ペプチド T-RAP は、

1. リピッドフリッパーゼの機能を回復する可能性がある
2. エンドソームの肥大化、 β CTF の蓄積を改善する

これまで、AD 初期において β CTF の蓄積が小胞輸送障害 (エンドソームの肥大化) を引き起こすメカニズムは明らかでなく、小胞輸送障害に対する有効な測定系も存在していなかったことから、治療薬の開発が困難であった。

本研究から、TMEM30A と β CTF の複合体形成により、リピッドフリッパーゼの機能が低下し、エンドソームにおける細胞質側 PS の局在が減少することが示唆された。その結果、小胞輸送に必要なタンパク質が PS に結合できず、小胞輸送障害を引き起こす可能性が示された (Fig. 32)。また、AD モデル動物において、 $A\beta$ 蓄積以前に TMEM30A/ β CTF 複合体形成により、リピッドフリッパーゼの機能不全が示され、AD 初期病態形成に関与することが示唆された。さらに、T-RAP ペプチドは、 $A\beta$ 配列を介して β CTF と結合することで、TMEM30A/ β CTF 複合体形成を抑制することが推察された。その結果、リピッドフリッパーゼの活性が回復し、エンドソームの肥大化が改善することが示唆された (Fig. 32)。

本研究は、今後 AD 患者由来の iPS 細胞や脳サンプルなどを利用し、より AD 病態に即した小胞輸送障害の解析を行う必要があると考える。そして、間接的なリピッドフリッパーゼの活性測定系として用いた NanoBiT 法は、さらなる検証の上、輸送障害を定量できるツールとして確立するとともに、今後 T-RAP など β CTF 結合性分子に着目し、輸送障害を改善出来る候補化合物のスクリーニングに応用できるのではないかと考える。以上のことを実現することで、将来的に輸送障害を標的とした新規治療薬の開発が期待される。

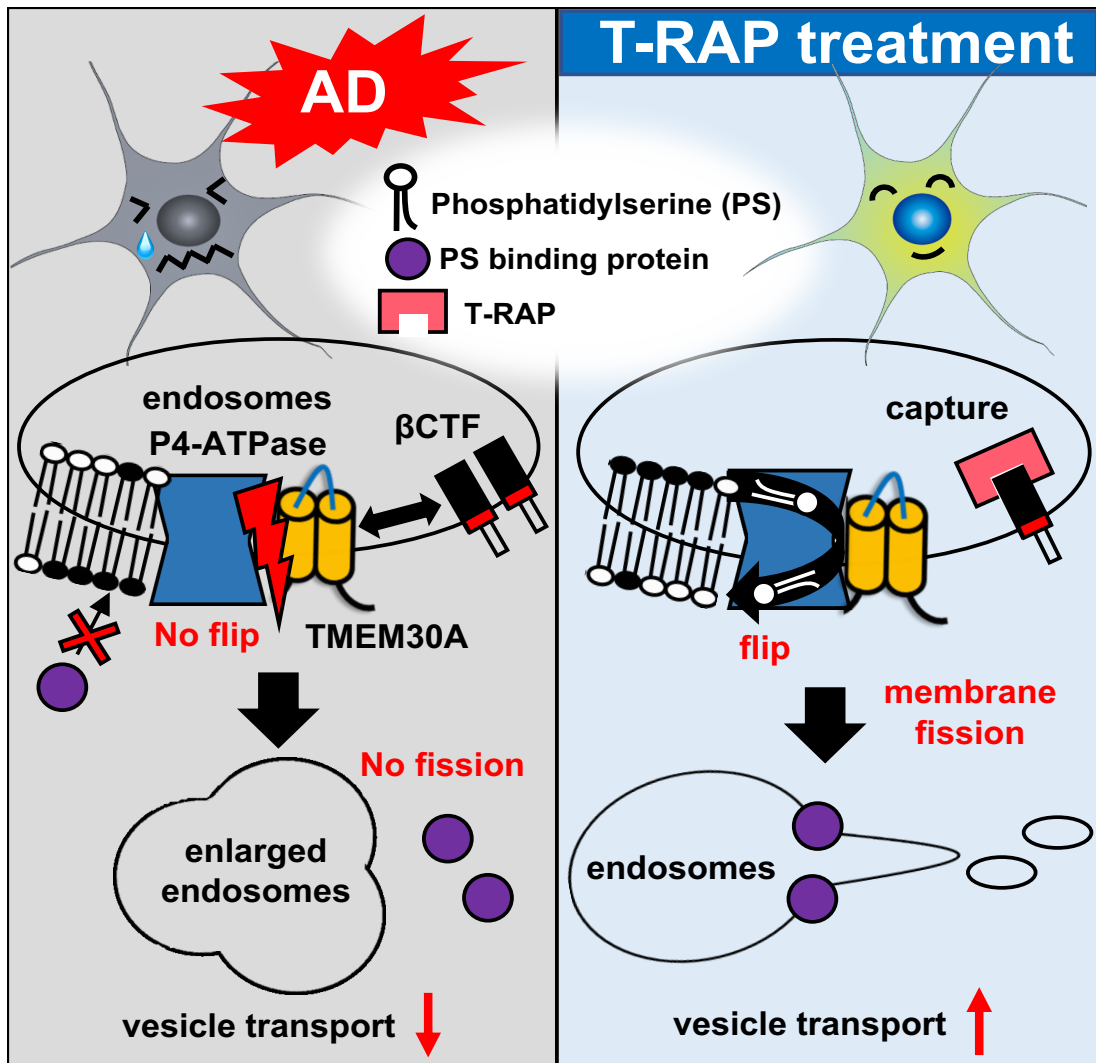


Fig. 32 Hypothetic model

引用文献

- Ahmed, R. R. *et al.* (2010) 'BACE1 and BACE2 enzymatic activities in Alzheimer's disease', *Journal of Neurochemistry*, 112(4), pp. 1045–1053. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06528.x.
- Aikawa, Y. *et al.* (2006) 'A Second SNARE Role for Exocytic SNAP25 in Endosome Fusion', *Molecular Biology of the Cell*, 17(5), pp. 2113–2124. doi: 10.1091/mbc.E06-01-0074.
- Ancolio, K. *et al.* (1999) 'Unusual phenotypic alteration of β amyloid precursor protein (β APP) maturation by a new Val-715 \rightarrow Met β APP-770 mutation responsible for probable early-onset Alzheimer's disease', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(7), pp. 4119–4124. doi: 10.1073/pnas.96.7.4119.
- Andersen, J. P. *et al.* (2016) 'P4-ATPases as Phospholipid Flippases—Structure, Function, and Enigmas', *Frontiers in Physiology*, 7, pp. 275. doi: 10.3389/fphys.2016.00275.
- Arumugam, S. and Kaur, A. (2017) 'The Lipids of the Early Endosomes: Making Multimodality Work', *ChemBioChem*, pp. 1053–1060. doi: 10.1002/cbic.201700046.
- Barrett, P. J. *et al.* (2012) 'The amyloid precursor protein has a flexible transmembrane domain and binds cholesterol', *Science*, 336(6085), pp. 1168–1171. doi: 10.1126/science.1219988.
- Bateman, R. J. *et al.* (2012) 'Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease', *The New England Journal of Medicine*, 367(9), pp. 795–804. doi: 10.1056/NEJMoa1202753.
- Berger-Sweeney, J. *et al.* (1999) 'Impairments in learning and memory accompanied by neurodegeneration in mice transgenic for the carboxyl-terminus of the amyloid precursor protein', *Molecular Brain Research*, 66(1-2), pp. 150–162. doi: 10.1016/s0169-328x(99)00014-5.
- Cataldo, A. M. *et al.* (2000) 'Endocytic pathway abnormalities precede amyloid β deposition in sporadic Alzheimer's disease and Down syndrome: Differential effects of APOE genotype and Presenilin mutations', *American Journal of Pathology*, 157(1), pp. 277–286. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64538-5.
- Chen, B. *et al.* (2010) 'Endocytic sorting and recycling require membrane phosphatidylserine asymmetry maintained by TAT-1/CHAT-1', *PLoS Genetics*. Public Library of Science, 6(12), pp. 1–19. doi: 10.1371/journal.pgen.1001235.
- Coleman, J. A., Kwok, M. C. M and Molday, R. S. (2009) 'Localization, purification, and functional reconstitution of the P4-ATPase Atp8a2, a phosphatidylserine flippase in photoreceptor disc membranes', *Journal of Biological Chemistry*, 284(47), pp. 32670–32679. doi: 10.1074/jbc.M109.047415.
- Coleman, J. A. and Molday, R. S. (2011) 'Critical Role of the β -Subunit CDC50A in the Stable Expression, Assembly, Subcellular Localization, and Lipid Transport Activity of the P4-ATPase ATP8A2', *Journal of Biological Chemistry*, 286(19), pp. 17205–17216. doi: 10.1074/jbc.M111.229419.
- DeTure, M. A. and Dickson, D. W. (2019) 'The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease', *Molecular Neurodegeneration*, 14(1), 32. doi: 10.1186/s13024-019-0333-5.

- Deyts, C., Thinakaran, G. and Parent, A. T. (2016) ‘APP Receptor? To Be or Not to Be’, *Trends in Pharmacological Sciences*, pp. 390–411. doi: 10.1016/j.tips.2016.01.005.
- Deng, Y. *et al.* (2013) ‘Amyloid- β protein (A β) Glu11 is the major β -secretase site of β -site amyloid- β precursor protein-cleaving enzyme 1 (BACE1), and shifting the cleavage site to A β Asp1 contributes to Alzheimer pathogenesis’, *European Journal of Neuroscience*, 37(12), pp. 1962–1969. doi: 10.1111/ejn.12235.
- Dinneen, J. L. and Ceresa, B. P. (2004) ‘Continual Expression of Rab5(Q79L) Causes a Ligand-Independent EGFR Internalization and Diminishes EGFR Activity’, *Traffic*, 5(8), pp. 606–615. doi: 10.1111/j.1398-9219.2004.00204.x.
- Dixon, A. S. *et al.* (2016) ‘NanoLuc Complementation Reporter Optimized for Accurate Measurement of Protein Interactions in Cells’, *ACS Chemical Biology*, 11(2), pp. 400–408. doi: 10.1021/acscchembio.5b00753.
- Haass, C. *et al.* (1992) ‘Targeting of cell-surface β -amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments’, *Nature*, 357(6378), pp. 500–503. doi: 10.1038/357500a0.
- Hardy, J. and Selkoe, D. J. (2002) ‘The Amyloid Hypothesis of Alzheimer’s Disease: Progress and Problems on the road to therapeutics’, *Science*, 297(5580), pp. 353–356. doi: 10.1126/science.1072994.
- Hashimoto, T. *et al.* (2020) ‘Collagenous Alzheimer amyloid plaque component impacts on the compaction of amyloid- β plaques’, *Acta Neuropathologica Communications*, 8(1), 212. doi: 10.1186/s40478-020-01075-5.
- Herrup, K. (2015) ‘The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis’, *Nature Neuroscience*, 18(6), pp. 794–799. doi: 10.1038/nn.4017.
- Holstege, H. *et al.* (2020) ‘Exome sequencing identifies rare damaging variants in ATP8B4 and ABCA1 as novel risk factors for Alzheimer’s Disease’, *medRxiv*. doi: 10.1101/2020.07.22.20159251.
- Huang, L. K., Chao, S. P. and Hu, C. J. (2020) ‘Clinical trials of new drugs for Alzheimer disease’, *Journal of Biomedical Science*, 27(1), 18. doi: 10.1186/s12929-019-0609-7.
- Iwata, H. *et al.* (2001) ‘Subcellular Compartment and Molecular Subdomain of β -Amyloid Precursor Protein Relevant to the A β 42-promoting Effects of Alzheimer Mutant Presenilin 2’, *Journal of Biological Chemistry*, 276(24), pp. 21678–21685. doi: 10.1074/jbc.M007989200.
- Jäämsä, A. *et al.* (2011) ‘BACE-1 inhibition prevents the γ -secretase inhibitor evoked A β rise in human neuroblastoma SH-SY5Y cells’, *Journal of Biomedical Science*, 18(1), 76. doi: 10.1186/1423-0127-18-76.
- Kanatsu, K. *et al.* (2014) ‘Decreased CALM expression reduces A β 42 to total A β ratio through clathrin-mediated endocytosis of γ -secretase’, *Nature Communications*, 5, 3386. doi: 10.1038/ncomms4386.
- Kaneshiro, N. *et al.* (2018) ‘Functional analysis of juxta- and intra-membrane domains of murine APP by genome editing in Neuro2a cells’, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 501(4), pp. 1023–1028. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.05.102.

- Kaneshiro, N. *et al.* (2022) ‘Lipid flippase dysfunction as a therapeutic target for endosomal anomalies in Alzheimer’s disease’, *iScience*, *in press*, doi: 10.1016/j.isci.2022.103869.
- Kienlen-Campard, P., *et al.* (2008) ‘Amyloidogenic processing but not amyloid precursor protein (APP) intracellular C-terminal domain production requires a precisely oriented APP dimer assembled by transmembrane GXXXG motifs’, *Journal of Biological Chemistry*, 283(12), pp. 7733–7744. doi: 10.1074/jbc.M707142200.
- Kim, S. *et al.* (2016) ‘Evidence that the rab5 effector APPL1 mediates APP- β CTF-induced dysfunction of endosomes in Down syndrome and Alzheimer’s disease’, *Molecular Psychiatry*, 21(5), pp. 707–716. doi: 10.1038/mp.2015.97.
- Kimura, N. *et al.* (2009) ‘Dynein dysfunction induces endocytic pathology accompanied by an increase in Rab GTPases: a potential mechanism underlying age-dependent endocytic dysfunction’, *Journal of Biological Chemistry*, 284(45), pp. 31291–31302. doi: 10.1074/jbc.M109.012625.
- Kimura, N. and Yanagisawa, K. (2018) ‘Traffic jam hypothesis: Relationship between endocytic dysfunction and Alzheimer’s disease’, *Neurochemistry International*, 119, pp. 35–41. doi: 10.1016/j.neuint.2017.07.002.
- Kinada, K. *et al.* (2018) ‘Loss of kallikrein-related peptidase 7 exacerbates amyloid pathology in Alzheimer’s disease model mice’, *EMBO Molecular Medicine*, 10(3). doi: 10.15252/emmm.201708184.
- Kuwahara, T. *et al.* (2020) ‘Roles of lysosomotropic agents on LRRK2 activation and Rab10 phosphorylation’, *Neurobiology of Disease*, 145. doi: 10.1016/j.nbd.2020.105081.
- Kwak, Y. D. *et al.* (2006) ‘Amyloid precursor protein regulates differentiation of human neural stem cells’, *Stem Cells and Development*, 15(3), pp. 381–389. doi: 10.1089/scd.2006.15.381.
- Kwart, D. *et al.* (2019) ‘A Large Panel of Isogenic APP and PSEN1 Mutant Human iPSC Neurons Reveals Shared Endosomal Abnormalities Mediated by APP β -CTFs, Not A β ’, *Neuron*, 104(2), pp. 256-270.e5. doi: 10.1016/j.neuron.2019.07.010.
- Lane, C. A., Hardy, J. and Schott, J. M. (2018) ‘Alzheimer’s disease’, *European Journal of Neurology*, 25(1), pp. 59–70. doi: 10.1111/ene.13439.
- Lauritzen, I. *et al.* (2012) ‘The β -secretase-derived C-terminal fragment of β APP, C99, but not A β , is a key contributor to early intraneuronal lesions in triple-transgenic mouse hippocampus’, *Journal of Neuroscience*, 32(46), pp. 16243–16255. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2775-12.2012.
- Lee, S. *et al.* (2015) ‘Transport through recycling endosomes requires EHD 1 recruitment by a phosphatidylserine translocase’, *The EMBO Journal*, 34(5), pp. 669–688. doi: 10.15252/embj.201489703.
- Levano, K. *et al.* (2012) ‘Atp8a1 deficiency is associated with phosphatidylserine externalization in hippocampus and delayed hippocampus-dependent learning’, *Journal of Neurochemistry*, 120(2), pp. 302–313. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07543.x.
- Li, X. *et al.* (2007) ‘The transmembrane domain of TACE regulates protein ectodomain shedding’, *Cell Research*, 17(12), pp. 985–998. doi: 10.1038/cr.2007.98.

- Mamada, N. *et al.* (2015) 'Amyloid β -protein oligomers upregulate the β -secretase, BACE1, through a post-translational mechanism involving its altered subcellular distribution in neurons', *Molecular Brain*, 8(1). doi: 10.1186/s13041-015-0163-5.
- Mathews, P. M. *et al.* (2002) 'Calpain activity regulates the cell surface distribution of amyloid precursor protein. Inhibition of calpains enhances endosomal generation of beta-cleaved C-terminal APP fragments', *Journal of Biological Chemistry*, 277(39), pp. 36415–36424. doi: 10.1074/jbc.M205208200.
- Matsudaira, T. *et al.* (2017) 'Endosomal phosphatidylserine is critical for the YAP signalling pathway in proliferating cells', *Nature Communications*, 8(1), 1246. doi: 10.1038/s41467-017-01255-3.
- Mecozzi, V. J. *et al.* (2014) 'Pharmacological chaperones stabilize retromer to limit APP processing', *Nature Chemical Biology*, 10(6), pp. 443–449. doi: 10.1038/nchembio.1508.
- Miyagawa, T. *et al.* (2016) 'BIN1 regulates BACE1 intracellular trafficking and amyloid- β production', *Human Molecular Genetics*, 25(14), pp. 2948–2958. doi: 10.1093/hmg/ddw146.
- Montague, T. G. *et al.* (2014) 'CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing', *Nucleic Acids Research*, 42(1), pp. 401–407. doi: 10.1093/nar/gku410.
- Morohashi, Y. *et al.* (2006) 'C-terminal Fragment of Presenilin Is the Molecular Target of a Dipeptidic γ -Secretase-specific Inhibitor DAPT (N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-Butyl Ester)', *Journal of Biological Chemistry*, 281(21), pp. 14670–14676. doi: 10.1074/jbc.M513012200.
- Nierzwicki, Ł. and Czub, J. (2015) 'Specific Binding of Cholesterol to the Amyloid Precursor Protein: Structure of the Complex and Driving Forces Characterized in Molecular Detail', *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 6(5), pp. 784–790. doi: 10.1021/acs.jpcclett.5b00197.
- Obici, L. *et al.* (2005) 'A novel A β PP mutation exclusively associated with cerebral amyloid angiopathy', *Annals of Neurology*, 58(4), pp. 639–644. doi: 10.1002/ana.20571.
- Oster-Granite, M. L. *et al.* (1996) 'Age-dependent neuronal and synaptic degeneration in mice transgenic for the C terminus of the amyloid precursor protein', *Journal of Neuroscience*, 16(21), pp. 6732–6741. doi: 10.1523/JNEUROSCI.16-21-06732.1996.
- Podlisny, M. B. Tolan, D. R. and Selkoe, D. J. (1991) 'Homology of the amyloid beta protein precursor in monkey and human supports a primate model for beta amyloidosis in Alzheimer's disease', *The American Journal of Pathology*, 138(6), pp. 1423–1435. PMID: 1905108.
- Qi, Y. *et al.* (2015) 'Determination of Rab5 activity in the cell by effector pull-down assay', *Methods in Molecular Biology*, 1298, pp 259-270. doi: 10.1007/978-1-4939-2569-8_22.
- Richard, J. P. *et al.* (2003) 'Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake', *Journal of Biological Chemistry*, 278(1), pp. 585–590. doi: 10.1074/jbc.M209548200.
- Rockenstein, E. *et al.* (2005) 'High β -secretase activity elicits neurodegeneration in transgenic mice despite reductions in amyloid- β levels: implications for the treatment of Alzheimer disease', *Journal of Biological Chemistry*, 280(38), pp. 32957–32967. doi: 10.1074/jbc.M507016200.

- Rosa, M. L. *et al.* (2005) 'Restraint stress induces β -amyloid precursor protein mRNA expression in the rat basolateral amygdala', *Brain Research Bulletin*, 65(1), pp. 69–75. doi: 10.1016/j.brainresbull.2004.11.011.
- Ruaud, A. F. *et al.* (2009) 'The *C. elegans* P4-ATPase TAT-1 regulates lysosome biogenesis and endocytosis', *Traffic*, 10(1), pp. 88–100. doi: 10.1111/j.1600-0854.2008.00844.x.
- Saito, T. *et al.* (2014) 'Single App knock-in mouse models of Alzheimer's disease', *Nature Neuroscience*, 17(5), pp. 661–663. doi: 10.1038/nn.3697.
- Sakurai, T. *et al.* (2008) 'Membrane microdomain switching: A regulatory mechanism of amyloid precursor protein processing', *Journal of Cell Biology*, 183(2), pp. 339–352. doi: 10.1083/jcb.200804075.
- SS, Sisodia. (1992) 'Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(13), pp. 6075–6079, doi: 10.1073/pnas.89.13.6075.
- Savonenko, A. V *et al.* (2008) 'Alteration of BACE1-dependent NRG1/ErbB4 signaling and schizophrenia-like phenotypes in BACE1-null mice', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(14), pp. 10–15.
- Scheltens P. *et al.* (2021) 'Alzheimer's disease', *Lancet*, 397(10284), pp. 1577–1590. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32205-4.
- Scopa, C. *et al.* (2020) 'Impaired adult neurogenesis is an early event in Alzheimer's disease neurodegeneration, mediated by intracellular A β oligomers', *Cell Death & Differentiation*, 27(3), pp. 934–948. doi: 10.1038/s41418-019-0409-3.
- Segawa, K. Kurota, S. Nagata, S. (2017) 'The CDC50A extracellular domain is required for forming a functional complex with and chaperoning phospholipid flippases to the plasma membrane', *Journal of Biological Chemistry*, 293(6), pp. 2172–2182. doi: 10.1074/jbc.RA117.000289.
- Shoji-Kawata, S. *et al.* (2013) 'Identification of a candidate therapeutic autophagy-inducing peptide', *Nature*, 494(7436), pp. 201–206. doi: 10.1038/nature11866.
- Takada, N. *et al.* (2018) 'Phospholipid-flipping activity of P4-ATPase drives membrane curvature', *The EMBO Journal*, 37(9). doi: 10.15252/embj.201797705.
- Takasugi, N. *et al.* (2003) 'The role of presenilin cofactors in the γ -secretase complex', *Nature*, 422(6930), pp. 438–441. doi: 10.1038/nature01506.
- Takasugi, N. *et al.* (2011) 'BACE1 activity is modulated by cell-associated sphingosine-1-phosphate', *Journal of Neuroscience*, 31(18), pp. 6850–6857. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6467-10.2011.
- Takasugi, N. *et al.* (2018) 'TMEM30A is a candidate interacting partner for the β -carboxyl-terminal fragment of amyloid- β precursor protein in endosomes', *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0200988.
- Tanaka, J. *et al.* (1999) 'Construction of Epstein-Barr virus-based expression vector containing mini-OriP', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 264(3), pp. 938–943. doi: 10.1006/bbrc.1999.1617.

- Tang, M. and Taghibiglou, C. (2017) 'The Mechanisms of Action of Curcumin in Alzheimer's Disease', *Journal of Alzheimer's Disease*, 58(4), pp. 1003–1016. doi: 10.3233/JAD-170188.
- Umeda, T. *et al.* (2015) 'Intracellular amyloid β oligomers impair organelle transport and induce dendritic spine loss in primary neurons', *Acta neuropathologica communications*, 3, p. 51. doi: 10.1186/s40478-015-0230-2.
- Van Acker, Z. P., Bretou, M. and Annaert, W. (2019) 'Endo-lysosomal dysregulations and late-onset Alzheimer's disease: impact of genetic risk factors', *Molecular Neurodegeneration*, 14(1), 20. doi: 10.1186/s13024-019-0323-7.
- Vassar, R. *et al.* (1999) ' β -Secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE', *Science*, 286(5440), pp. 735–741. doi: 10.1126/science.286.5440.735.
- Vassar, R. (2014) 'BACE1 inhibitor drugs in clinical trials for Alzheimer's disease', *Alzheimer's Research and Therapy*, 6(9), pp. 1–14. doi: 10.1186/s13195-014-0089-7.
- Vetrivel, K. S. *et al.* (2009) 'Alzheimer disease A β production in the absence of S-palmitoylation-dependent targeting of BACE1 to lipid rafts', *Journal of Biological Chemistry*, 284(6), pp. 3793–3803. doi: 10.1074/jbc.M808920200.
- Vetrivel, K. S. *et al.* (2011) 'Loss of cleavage at β' -site contributes to apparent increase in β -amyloid peptide (A β) secretion by β -secretase (BACE1)-glycosylphosphatidylinositol (GPI) processing of amyloid precursor protein', *Journal of Biological Chemistry*, 286(29), pp. 26166–26177. doi: 10.1074/jbc.M111.260471.
- Wang, J. *et al.* (2018) 'Proteomic Analysis and Functional Characterization of P4-ATPase Phospholipid Flippases from Murine Tissues', *Scientific Reports*, 8(1), p. 10795. doi: 10.1038/s41598-018-29108-z.
- Wegener, C. S. *et al.* (2010) 'Ultrastructural characterization of giant endosomes induced by GTPase-deficient Rab5', *Histochemistry and Cell Biology*, 133(1), pp. 41–55. doi: 10.1007/s00418-009-0643-8.
- Wirhbs, O. (2017) 'Altered neurogenesis in mouse models of Alzheimer disease', *Neurogenesis (Austin)*. doi: 10.1080/23262133.2017.1327002.
- Xiao, Q. *et al.* (2012) 'Role of phosphatidylinositol clathrin assembly lymphoid-myeloid leukemia (PICALM) in intracellular amyloid precursor protein (APP) processing and amyloid plaque pathogenesis', *Journal of Biological Chemistry*, 287(25), pp. 21279–21289. doi: 10.1074/jbc.M111.338376.
- Xu, W. *et al.* (2016) 'Amyloid precursor protein-mediated endocytic pathway disruption induces axonal dysfunction and neurodegeneration', *Journal of Clinical Investigation*, 126(5), pp. 1815–1833. doi: 10.1172/JCI82409.
- Yamada, K. *et al.* (2009) 'A β immunotherapy: Intracerebral sequestration of A β by an anti-A β monoclonal antibody 266 with high affinity to soluble A β ', *Journal of Neuroscience*, 29(36), pp. 11393–11398. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2021-09.2009.
- Young-Pearse, T. L. *et al.* (2007) 'A critical function for β -amyloid precursor protein in neuronal migration revealed by in utero RNA interference', *Journal of Neuroscience*, 27(52), pp. 14459–14469. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4701-07.2007.

Zetterberg, H. *et al.* (2008) 'Elevated cerebrospinal fluid BACE1 activity in incipient alzheimer disease', *Archives of Neurology*, 65(8), pp. 1102–1107. doi: 10.1001/archneur.65.8.1102.

Zhang, X. H. *et al.* (2015) 'Off-target effects in CRISPR/Cas9-mediated genome engineering', *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. doi: 10.1038/mtna.2015.37.

Zhang, Y. W. *et al.* (2013) 'APP regulates NGF receptor trafficking and NGF-mediated neuronal differentiation and survival', *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0080571.

Zhang, X. and Song, W. (2013) 'The role of APP and BACE1 trafficking in APP processing and amyloid- β generation', *Alzheimer's Research & Therapy*, 5(5), 46. doi: 10.1186/alzrt211.

Zhu, X. *et al.* (2012) 'Mutations in a P-type ATPase gene cause axonal degeneration', *PLoS Genetics*. doi: 10.1371/journal.pgen.1002853.

未公刊資料

今岡亮介 (2017) 'APP- β CTF 結合タンパク質 TMEM30A による小胞輸送障害機構の解析', 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科修士論文.

参考文献

本研究内容は原著論文及び共著論文として，以下のように発表した。

- 1) Lipid flippase dysfunction as a therapeutic target for endosomal anomalies in Alzheimer's disease.
N. Kaneshiro., M. Komai., R. Imaoka., A. Ikeda., Y. Kamikubo., T. Saito., T.C. Saido., T. Tomita., T. Hashimoto., T. Iwatsubo., T. Sakurai., T. Uehara., N. Takasugi.
iScience (in press), 2022. doi: 10.1016/j.isci.2022.103869.
- 2) TMEM30A is a candidate interacting partner for the β -carboxyl-terminal fragment of amyloid- β precursor protein in endosomes.
N. Takasugi., R. Araya., Y. Kamikubo., N. Kaneshiro., R. Imaoka., H. Jin., T. Kashiyama., Y. Hashimoto., M. Kurosawa., T. Uehara., N. Nukina., T. Sakurai.
PLoS One, 2018. doi: 10.1371/journal.pone.0200988.
- 3) Functional analysis of juxta- and intra-membrane domains of murine APP by genome editing in Neuro2a cells.
N. Kaneshiro., R. Imaoka., M. Komai., T. Kashiyama., T. Sakurai., T. Uehara., N. Takasugi.
Biochem Biophys Res Commun, 2018. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.05.102.

謝辞

終りに臨み、本研究の遂行に際してご指導およびご鞭撻を賜りました、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 薬効解析学教室 上原 孝 教授，ならびに本研究科 薬効解析学教室 高杉 展正 准教授に心より謝意を表します。

本論文を審査していただき、有益な助言を賜りました、本研究科 構造生物薬学分野 山下 敦子 教授，生体物理化学分野 須藤 雄気 教授，生体膜生理化学分野 表 弘志 准教授に厚く御礼申し上げます。

また、APP, TMEM30A 抗体をご提供頂きました、順天堂大学医学部 薬理学講座 櫻井 隆 教授，並びに A7 モデルマウスのサンプルをご提供頂きました、東京大学医学研究科 神経病理学教室 橋本 唯史 准教授，App^{NL-G-F/NL-G-F} ノックインマウスをご提供頂きました、東京大学薬学研究科 機能病態学教室 富田 泰輔 教授に厚く御礼申し上げます。

加えまして、研究生生活の中で有力なご助言・ご討論をいただき、時には多大なるご協力をいただきました薬効解析学教室の先輩方，同期生，また，私の拙い指導を真摯に受け止め研究活動を円滑に手助けしてくださった後輩に感謝申し上げます。

最後になりましたが、博士後期課程での研究生生活を支えてくれた両親，家族に深く感謝し，私の謝辞とさせていただきます。

令和4年3月3日 金城 那香