

博士論文

新規 A β 産生阻害薬の創製を目的とした
 γ セクレターゼ結合タンパク質の探索と評価

2018 年 3 月

静岡県立大学大学院

薬学研究院

井上 満博

博士論文

新規 A β 産生阻害薬の創製を目的とした
 γ セクレターゼ結合タンパク質の探索と評価

本論文は静岡県立大学大学院薬学研究院
博士論文である

Doctoral Thesis

Exploration and validation of γ -secretase associated
proteins for discovery of novel A β production inhibitors

井上 満博
Mitsuhiro Inoue

March, 2018

目次

緒論	1
第 1 章 Proximity ligation assay を用いた γ セクレターゼおよび活性型 γ セクレターゼの可視化	10
第 1 節 序論	10
第 2 節 材料および実験方法	10
第 3 節 実験結果	14
第 4 節 考察	21
第 2 章 神経細胞選択的に γ セクレターゼとの相互作用を示す GSAPs の探索	24
第 1 節 序論	24
第 2 節 材料および実験方法	24
第 3 節 実験結果	28
第 4 節 考察	36
第 3 章 アルツハイマー病において発現が増加する MAO-B は γ セクレターゼと相互作用することで神経細胞における $A\beta$ 量を制御する	39
第 1 節 序論	39
第 2 節 材料および実験方法	39
第 3 節 実験結果	43
第 4 節 考察	55
第 4 章 HCN2 は APP プロセッシングと γ セクレターゼを制御する	58
第 1 節 序論	58
第 2 節 材料および実験方法	58
第 3 節 実験結果	59
第 4 節 考察	65
総括	67
謝辞	69
参考文献	70

略語一覧

A β	Amyloid beta
AD	Alzheimer's disease
ADAM	A disintegrin and metalloprotease
AICD	APP C 末端細胞内ドメイン (APP intracellular domain)
Aph-1	Anterior pharynx-defective 1
APLP1	APP-like protein 1
APLP2	APP-like protein 2
APP	アミロイド前駆体タンパク質 (Amyloid precursor protein)
APP-CTF	Amyloid precursor protein C-terminal fragment
APP-NTF	Amyloid precursor protein N-terminal fragment
ATP9A	ATPase phospholipid transporting 9A
BACE1	β -Site APP cleaving enzyme 1
CHAPSO	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propanesulfonate
C83	83 個のアミノ酸からなる C 末端膜貫通フラグメント (C-terminal fragment of APP consisting of 83 amino acids)
C99	99 個のアミノ酸からなる C 末端膜貫通フラグメント (C-terminal fragment of APP consisting of 99 amino acids)
CNTNAP1	Contactin associated protein 1
CTCF	Corrected total cell fluorescence
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
DMEM	ダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium)
DRMs	Detergent resistant membranes
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Endoplasmic reticulum
FAD	家族性 AD (Familial alzheimer's disease)
FLOT2	Flotillin-2
FL-APP	全長 APP (Full length-APP)
GAP43	Growth associated protein 43
GCB	γ -Secretase inhibitor with Cleavable Biotin group
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GSAPs	γ -Secretase associated proteins
GTB	γ -Secretase inhibitor with a transferrable biotin group

HCN2	Potassium/sodium hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated ion channel 2
HEK	Human embryonic kidney
HIV-1	Human immunodeficiency virus-1
HTRF	Homogeneous time resolved fluorescence
KO	ノックアウト (Knock out)
LC-MS-/ MS	Liquid chromatography - tandem mass spectrometry
LF	Lipofectamine
MAMs	ER-ミトコンドリア間膜(Mitochondria-associated ER membranes)
MAO-B	Monoamine oxidase B
MOI	Multiplicity of infection
mRNA	messenger RNA
Nct, NCT	ニカストリン (Nicastrin)
Nct-CTF	Nicastrin C-terminal fragment
NDUFS7	NADH dehydrogenase (ubiquinone) iron-sulfur protein 7
NFT	神経原繊維変化 (Neurofibrillary tangle)
NICD	Notch 細胞内ドメイン (Notch intracellular domain)
NMDAr2B	N-Methyl-D-aspartate receptor 2B
NotchΔE	細胞外ドメイン欠失 Notch (Notch construct with a deleted ectodomain)
PBS	Phosphate buffered saline
PEG	Polyethylene glycol
Pen-2	Presenilin enhancer 2
PLA	Proximity ligation assay
PS	プレセニリン (Presenilin)
PS1	Presenilin 1
PS1-CTF	PS1 C-terminal fragment
PS1-NTF	PS1 N-terminal fragment
PS2	Presenilin 2
PVDF	Polyvinylidene difluoride
RIPA	Radioimmunoprecipitation
ROI	Region of interest
sAPP α	可溶性 (Soluble) APP α
sAPP β	可溶性 (Soluble) APP β

SD	標準偏差 (Standard deviation)
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate poly acrylamide gel electrophoresis
SEM	標準誤差 (Standard error of the mean)
siRNA	Small interfering RNA
SLC2A13	Solute carrier family 2 member 13
SLC2A3	Solute carrier family 2 member 3
STXBP1	Syntaxin-binding protein 1
Trk-B	Tropomyosin receptor kinase B
UV	紫外線 (Ultraviolet)
VDAC-1	Voltage-dependent anion-selective channel 1
¹¹ C-DED	¹¹ C-重水素-L-デプレニル (¹¹ C-Deuterium-L-deprenyl)

緒論

アルツハイマー病 (AD) の概要

アルツハイマー病 (AD) は、1907 年にドイツの精神科医 Alois Alzheimer が 51 歳女性患者の脳組織における病理学的変化に関連する病状を進行性痴呆であると診断したとして初めて報告され[1]、現在ではすべての認知症症例の約半数を占めるといわれている進行性の神経変性疾患である。新規エピソードに関する記憶の障害が主な症状であり、病気が進行するにつれて患者の生活の質 (Quality of life) が低下する。AD の推定有病率は、60 歳人口の 5.6% から 7.6% にも及び[2]、認知症の罹患者数は 2015 年では世界中で 4680 万人に上り、この数字は寿命の延長等により 2050 年には約 3 倍 (1 億 3,150 万人) になると予測されている。また、特に中低所得者層が多い発展途上国における罹患率が高いことも報告されている。したがって、AD が今後全世界において現在以上に深刻な社会問題の一つになることは想像に難くない。

AD 患者の脳では組織の萎縮が認められ、前頭皮質や海馬において神経細胞の脱落や変性が認められる[3]。また、脳組織内ではアミロイドプラークおよび細胞内神経原線維変化 (NFT) の沈着が観察される[4]。アミロイドプラークは主に辺縁系や新皮質に、NFT は主に前頭皮質や頭頂皮質等、嗅内皮質、海馬および扁桃体に投射する皮質下核において認められる[5]。アミロイドプラークの構成分子は毒性の強い 42 または 43 アミノ酸残基からなるアミロイド β ($A\beta_{42}$ 、 $A\beta_{43}$) であり[6]、NFT のそれは不溶性で過剰にリン酸化されている微小管関連タンパク質 (Tau) である[7]。

AD はその発症年齢により大きく 2 つに分けられ、その大多数は 65 歳以上で発症しそのほとんどが孤発性である。一方、約 5% は 65 歳以前 (若年性) に発症し、その多くは家族性 AD (FAD) である[8]。FAD は常染色体優性疾患であり、21 番染色体上のアミロイド前駆体タンパク質 (APP) [9]、14 番染色体上のプレセニリン 1 (PS1) および 1 番染色体上のプレセニリン 2 (PS2) の各遺伝子変異が原因として報告されている[10, 11]。現在では、51 の APP ミスセンス変異が 121 の AD ファミリーにおいて同定されており、480 のファミリーにおいて 219 の AD 関連変異が PS1 遺伝子に同定されている。PS2 遺伝子に関しては 16 の変異が 34 のファミリーにおいて同定されている (Alzheimer Disease & Frontotemporal Dementia Mutation Database)。これら APP およびプレセニリン (PS) の変異により $A\beta_{42}$ 産生や $A\beta_{42}$ / $A\beta_{40}$ 比が増加することが報告されている[12]。

アミロイド仮説

AD の原因としては、Tau 仮説、プレセニリン仮説、カルシウム仮説、アミロイド仮説など様々な仮説が提唱されており[13]、各仮説に基づいて数多くの研究が進められて

いる。実際には各仮説の一部または全てがそれぞれに複雑に関連しながら AD という病態を作り出していると考えられるが、その中においても脳内におけるアミロイド β ($A\beta$)の蓄積が AD を引き起こす主要な原因であるとの考えに基づくアミロイド仮説は現在でも AD 研究において有力な仮説である。 $A\beta$ の産生と代謝とのバランスが崩れることにより Tau の過剰リン酸化や蓄積等の他の疾患表現型が顕在化し、その結果神経変性および認知障害につながると考えられている[14]。FAD における変異が、 $A\beta$ の元である APP または $A\beta$ 産生に関わる γ セクレターゼ複合体(後述)の中心構成分子である PS 遺伝子に認められることも、本仮説の根拠の一部となっている。また、APP 遺伝子を有する 21 番染色体が 1 本多いダウン症候群患者では、若年期にアミロイドプラークが発現し、40 歳以上のほぼすべての患者が AD と診断される[15]。この結果は、APP の過剰発現により $A\beta$ の沈着が誘導され AD を発症する可能性を示している。つまり、 $A\beta$ の産生と代謝とのバランスが崩れることに起因して神経が変性し認知症に至る可能性が考えられるということである。

アミロイド前駆体タンパク質 (APP) とアミロイドベータペプチド ($A\beta$)

$A\beta$ は APP が分解されることにより産生される[16]。APP は細胞外領域、疎水性膜貫通領域、および C 末端細胞内ドメイン (AICD) から成る I 型の膜タンパク質であり[17]、APP ノックアウト (KO) マウスは神経や筋肉の機能障害によると考えられる歩行運動能力および握力の低下を示す[18]。一方、変異型 APP 遺伝子を有するトランスジェニックマウスの脳においては目立った表現型は認められないが、これには APP の類縁タンパク質である APP-like protein 1 (APLP1)および APP-like protein 2 (APLP2)が補填的に機能していることが示唆されている[19]。実際、KO マウス (APP / APLP2 ダブル KO、APLP1 / APLP2 ダブル KO、APP / APLP1 / APLP2 トリプル KO) は出生直後に死亡し[19, 20, 21]、これらのマウスの発生期において末梢および中枢神経系に異常が認められる[22, 23, 24]。このことは APP およびその類縁タンパク質が発生期において重要な役割を担っていることを示唆している。他にも APP が初代培養ニューロンの神経突起伸長、細胞接着および細胞増殖を促進していることや、発生期の神経細胞前駆体が皮質側へ移動することに APP が必要であるなど、APP が神経の分子生物学的な側面にも影響を与えていることを示唆する報告も複数ある[25, 26]。

APP の代謝は $A\beta$ 産生の有無により 2 つの経路に分けられる (図 1)。非 $A\beta$ 産生経路では、APP はまず α セクレターゼ (後述) により $A\beta$ ペプチド配列内の 17 番目のアミノ酸で切断され、分泌型の可溶性 APP α (sAPP α) および 83 アミノ酸からなる C 末端膜貫通フラグメント (C83) を産生する。C83 はさらに γ セクレターゼ (後述) によって切断され、P3 および AICD を産生する。そのため $A\beta$ は産生されない。一方、 $A\beta$ 産生経

路では、APP は A β ペプチド配列の主に第 1 残基で β セクレターゼ（後述）により切断され、分泌型の可溶性 APP β (sAPP β) および 99 アミノ酸からなる C 末端膜貫通フラグメント (C99) を産生する。C99 はさらに γ セクレターゼによって切断され、AICD および A β (A β 40、A β 42 等) を産生する[27]。切り出された A β は重合して可溶性オリゴマーとなり、可溶性オリゴマーが凝集すると不溶性のプラークとなり沈着する。A β 42 は A β 40 より重合しやすく、また他の A β の適正なフォールディングに影響を与える性質がある[28]。プラークを形成する前の可溶性 A β オリゴマーの段階から学習および記憶に関連するシナプス可塑性に影響があることが報告されており[29]、APP トランスジェニックマウスを用いた研究では、プラーク沈着やニューロン脱落とは無関係に 12 ペプチドの可溶性 A β オリゴマーにより記憶が障害されることが報告された[30]。他にも、ヒト脳脊髄液から抽出された A β 二量体がラット海馬の長期増強を阻害することが報告されている[31]。このように、ヒトにおいても可溶性 A β オリゴマーと記憶障害とが関連する可能性が考えられる。

α セクレターゼと β セクレターゼ

非 A β 産生経路に関わる α セクレターゼは、A disintegrin and metalloprotease (ADAM) ファミリーに属するタンパク質である ADAM9、ADAM10 および ADAM17 が α セクレターゼ様活性を有することが報告されている[32, 33, 34]。

一方、A β 産生経路に関わる β -site APP cleaving enzyme 1 (β セクレターゼ、BACE1) は、I 型膜貫通アスパルチルプロテアーゼであり[35, 36, 37]、主にエンドソームおよびトランスゴルジ等に局在する。BACE1 は脳神経細胞において最も高発現しており[38, 39]、BACE1 KO マウスでは脳内の β セクレターゼ活性が消失する[40]。また、BACE1 KO マウスにおいて、A β レベルと記憶障害との間に負の相関があることが示唆されていることから、BACE1 が AD の治療標的と成り得る可能性が考えられる[41]。しかし、BACE1 KO マウスは、海馬のシナプス可塑性の変化（プレシナプスの異常）や、認知機能低下および情動行動に異常を示し[42]、これは電位依存性ナトリウムチャネル β 2 サブユニットおよびニューレギュリン 1 といった APP 以外の BACE1 基質の生理機能によって引き起こされた可能性が考えられる[43, 44]ことから、AD の治療戦略として BACE1 阻害剤を進めるためには、BACE1 阻害により起こりうる副作用を回避するため方策を考える必要がある。

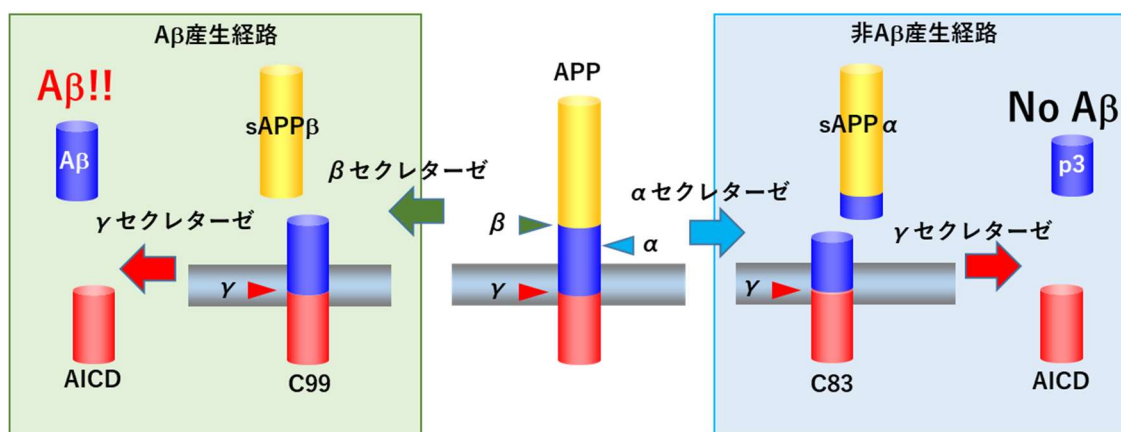


図 1 : APP プロセッシング経路

A β 産生経路では、APP は、A β ペプチド配列の第 1 残基で β セクレターゼによって切断され、分泌型の細胞外ドメインである sAPP β および C99 を産生する。C99 はさらに γ セクレターゼによって切断され、AICD および A β を産生する。非 A β 産生経路では、APP は α セクレターゼにより A β ペプチド配列内で切断され、分泌型の細胞外ドメインである sAPP α および C83 を産生する。C83 はさらに γ セクレターゼによって切断され、P3 および AICD を産生する。そのため A β は産生されない。

γ セクレターゼ

α または β セクレターゼによって産生された APP の C 末端膜貫通領域(C83, C99)は、さらに P3 または A β と AICD とに切断される(図 1)。 γ セクレターゼはこの切断を触媒するアスパルチルプロテアーゼであり[45]、プレセニリン (PS)、ニカストリン (Nct)、Presenilin enhancer 2 (Pen-2) および Anterior pharynx-defective-1 (Aph-1) の 4 分子の複合体として活性を持つ[15]。

PS は 9 つの膜貫通ドメインを有するタンパク質であり[46] (図 2)、 γ セクレターゼ複合体として形成される際 6 番目と 7 番目の膜貫通領域の間にある細胞質内ループ構造中で N 末端断片と C 末端断片とに切断される(膜内配列切断)[47]。PS1 および PS2 が知られており、前述の通り共に分子内の変異が FAD の病因であることが報告されている。PS1 の膜貫通領域中にある 2 つのアスパラギン酸残基(Asp257 および Asp385)は膜内配列切断や γ セクレターゼ活性に必要であることが報告されており[45, 48, 49]、N 末端断片と C 末端断片が相互作用することによって活性部位を構成することが示唆されている[50, 51]。

Nct は大きな細胞外領域を有する I 型膜貫通タンパク質である(図 2) [52, 53]。PS と複合体を形成することに加えて、細胞外領域内 333 番目のグルタミン酸残基を介して直接 APP および Notch と相互作用することが報告されており[54, 55]、このグルタミン酸残基の変異により A β 産生および Notch プロセッシングに影響を与えることが報告されている[56, 57]。このことは PS だけでなく Nct も γ セクレターゼの活性に影響を

及ぼすことを示唆している。Nct は上記の通り APP や Notch といった基質を認識することから受容体として作用している可能性が考えられる。

Aph-1 および Pen-2 は γ セクレターゼ活性およびその複合体形成に必要な因子として同定された[58]。Aph-1 は細胞質内に C 末端、細胞外に N 末端を有する 7 回の膜貫通型タンパク質であり[59]、Pen-2 は N 末端および C 末端が共に細胞外に位置する 2 回膜貫通型タンパク質である[60] (図 2)。Aph-1 は Nct と相互作用することで γ セクレターゼ複合体への足場タンパク質としての機能する[60, 61, 62]。Pen-2 は過剰発現させると膜内配列切断された PS1 の産生が促進される一方、Pen-2 をノックダウンすると、PS1 の膜内配列切断が抑制されることが明らかとなっている。また、Aph-1 を過剰発現させると、Pen-2 を介した PS1 の膜内配列切断が促進される。以上のことから Aph-1 は γ セクレターゼ複合体の形成を調節し、Pen-2 は PS1 の膜内配列切断に関与していると考えられる[63]。

上述の通り、 γ セクレターゼは上記 4 分子が複合体となり機能する。まず、Nct と Aph-1 が相互作用することで足場を形成し、次いで PS1 が結合、そして Pen-2 も組み入れられる。Pen-2 により PS1 の膜内配列切断が起こり、これにより活性型の γ セクレターゼ複合体となる[62, 64, 65] (図 2)。4 分子いずれをノックダウンした場合においても、APP や Notch の切断活性が低下する[58]ことから、 γ セクレターゼが機能するためには 4 分子全てが必要であると考えられる。

γ セクレターゼは主に細胞膜上に局在することが知られているが[66]、それ以外にもゴルジ、ER、エンドソームおよびリソソームにも局在することが知られている[67]。

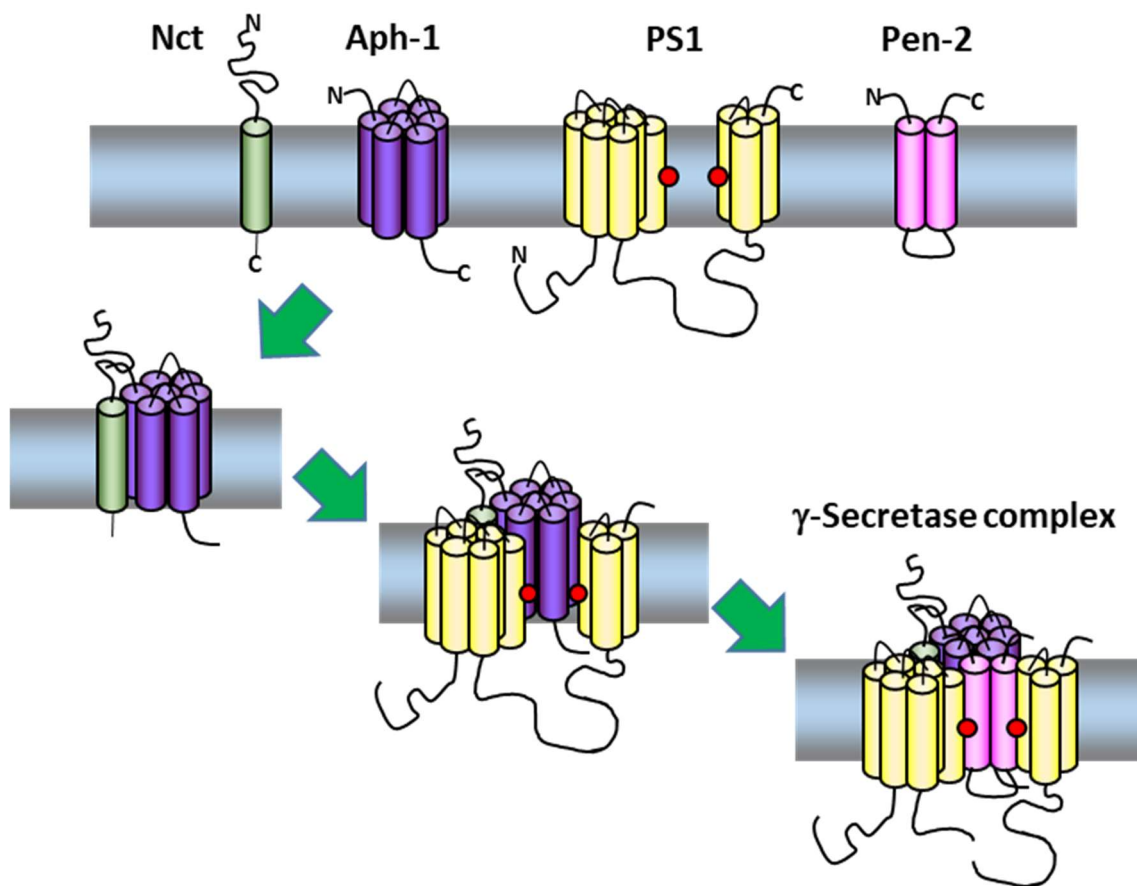


図 2 : γ セクレターゼの模式図

γ セクレターゼを構成する 4 つの分子が複合体を形成することで活性を有する。赤色○は活性部位とされている Asp257 および Asp385 を示す。

γ セクレターゼの基質

γ セクレターゼは多くの基質を有するが[68]、その中でも APP および Notch に関して多くの報告がある。

APP の膜貫通領域内の少なくとも 3 ヶ所において γ セクレターゼにより切断されることが知られており、それぞれガンマ、イプシロン、ゼータ切断と呼ばれ[69, 70, 71, 72]、 $A\beta_{49}-A\beta_{46}-A\beta_{43}-A\beta_{40}-A\beta_{37}$ および $A\beta_{48}-A\beta_{45}-A\beta_{42}-A\beta_{38}$ の 2 経路に沿って順次切断される[73]ことにより 37-49 残基の $A\beta$ を産生する。また、 γ セクレターゼにより $A\beta$ と共に産生される AICD は、孤発性 AD 患者の脳組織のみならず健常者の脳組織においても検出され、アポトーシスの正の調節因子として作用することが知られているが、AICD が過剰に産生されると $A\beta_{42}$ オリゴマーが毒性化し病態の進行が加速する可能性が報告されている[74]。

一方、Notch は γ セクレターゼにより切断され細胞内ドメイン (NICD) を産生する。NICD は核内に移行し、細胞の分化や増殖等の発生期に重要な遺伝子を活性化させる

[75, 76]。PS KO マウス、Nct KO マウス、Aph-1 KO マウスの胚と Notch KO マウスの胚とでは類似した体節や分節の異常等の表現型が認められる[77, 78, 79, 80]。また、マウスにおいて γ セクレターゼ阻害により Notch シグナル阻害に伴うと考えられるリンパ球産生や腸細胞分化等への影響が認められる[81]。以上の結果は、 γ セクレターゼによる Notch のプロセッシングは特に発生期において非常に重要な役割を果たしていることを示している。

AD 治療薬の開発

現在の AD 治療薬として、コリンエステラーゼ阻害剤（ドネペジル、リバスチグミン、ガランタミン）およびグルタミン酸受容体アンタゴニスト（メマンチン）が使用されているが、これらの薬物は症状の進行を遅延させることができるものの、疾患自体を治癒することはできず、現時点では AD の根本治療薬は創出されていない。AD の根本治療薬開発における戦略の一つとして γ セクレターゼ阻害が考えられるが、前述の通り γ セクレターゼには APP 以外にも多くの基質があり、特に Notch プロセッシングの阻害に伴う副作用が懸念される[82, 83]。実際、 γ セクレターゼ阻害剤の臨床試験においては主に Notch プロセッシング阻害によると考えられるリンパ系や消化器の副作用が報告されている[84]。 γ セクレターゼ阻害剤の臨床使用には本酵素阻害に伴うこれらの副作用の回避が必要不可欠であり、選択的に A β 産生を抑制する γ セクレターゼ阻害剤の開発にはさらなる研究が必要である。そのような阻害剤を見出すためには、 γ セクレターゼを直接阻害するのではなく、 γ セクレターゼ複合体と相互作用することでその活性を調節し得るような分子をターゲットとすることが一つの方策として考えられる。

γ -Secretase associated proteins (GSAPs)

γ セクレターゼを構成する 4 分子以外にも、 γ セクレターゼと相互作用する分子（ γ セクレターゼ結合タンパク質 (GSAPs)）の存在が報告されている。例えば CD147、TMP21、テトラスパニンウェブ、PION が GSAPs として報告されており[85, 86, 87, 88]、TMP21 の場合はその遺伝子ノックダウンにより Notch プロセッシングや AICD 産生には影響がない一方で A β 産生が増加することが報告されている[86]。ただ、この例も含め先行研究の多くは細胞株を用いた評価によるものであり、実際の生体内（脳内）において γ セクレターゼ活性がどのように制御されているかについてはほとんど明らかにされていない。

筆者の研究グループでは、実際の脳サンプルを用いて γ セクレターゼの発現が確認されている様々な画分を調製し、 γ セクレターゼ阻害剤を用いたアフィニティ精製をベースとした方法により網羅的に新規の GSAPs を探索しこれまでに複数の GSAPs を同定

した[89, 90, 91, 92, 93]。その一部については Notch プロセッシングに影響を与えることなく A β 産生を調節している可能性についても明らかにしている。

本論文の目的と概略

AD の病態には A β の重合・凝集による神経細胞への毒性作用が関与していると考えられているため、A β の産生を抑制することが治療戦略の一つと成り得る。 γ セクレターゼは APP から A β を産生する最終工程に関与する酵素であり、本酵素を阻害することにより A β 産生量を抑制することが理論上可能と考えられるが、APP 以外の γ セクレターゼ基質である Notch のプロセッシングも阻害することによると考えられる副作用が臨床試験において認められる。したがって、A β 産生を選択的に抑制する γ セクレターゼ阻害薬の創製が望まれる。筆者の研究グループにおいて、最近 γ セクレターゼと相互作用する複数の GSAPs が同定された。A β 産生選択的に関与する GSAPs を見出すことができれば副作用の懸念が少ない新たな AD 治療薬のターゲットと成り得る。したがって本論文は以下の 4 項目について評価・検討を実施した。

第 1 章ではまずは γ セクレターゼと GSAPs との近接相互作用を評価できる Proximity Ligation Assay (PLA) を整備した。 γ セクレターゼの主要構成分子である PS1 および Nct に対する抗体を用いた PLA により γ セクレターゼを細胞上で高感度に可視化可能にした。また、 γ セクレターゼの活性部位を特異的に認識する γ -secretase inhibitor with a transferable biotin group (GTB) を設計し、これを用いた PLA により活性型 γ セクレターゼを可視化可能にした。

第 2 章では新たな GSAPs を同定すると共に、以前の研究により同定された GSAPs [89, 90, 91, 93]を含め、神経細胞と非神経細胞を用いて PLA により GSAPs と γ セクレターゼとの近接相互作用における細胞選択性を評価した。12 個の GSAPs を評価した結果、10 個が神経細胞において近接相互作用することを見出した。その 10 個全てについては、非神経細胞での相互作用よりも程度が高かったことから、神経細胞により選択的な相互作用であることが示唆された。神経細胞選択的に相互作用する GSAPs は、脳神経変性疾患である AD の治療薬ターゲットと成り得る可能性があると考えられた。

第 3 章では神経細胞選択的に γ セクレターゼと相互作用することを見出した GSAPs のうち、monoamine oxidase B (MAO-B) に着目した研究を実施した。AD 患者脳において MAO-B 活性が増加していたことや、FAD 患者脳において MAO-B の PET リガンド結合量が増加していた等の報告があり、以前より AD との関連が指摘されていることから、さらなる詳細な検討を実施した。マウス初代皮質ニューロンを用いた単一細胞における遺伝子ノックダウン検討の結果、MAO-B が A β 42 産生に影響を及ぼすことを見出した。また MAO-B 遺伝子をノックダウンしても副作用につながる Notch プロセッ

シングには影響しないことを確認した。さらに AD 患者の脳皮質や海馬において免疫組織化学染色や PLA を実施した結果、MAO-B は主に残存する神経細胞や一部アストロサイトに発現しており、マウス海馬ニューロン、マウス脳スライス(海馬・脳皮質)、そして AD 患者脳皮質においても活性型 γ セクレターゼと近接相互作用していることを見出した。以上の結果から、MAO-B と γ セクレターゼとの相互作用を阻害することが AD 治療の有用なターゲットに成り得る可能性が考えられた。

第 4 章では potassium/sodium hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated ion channel 2 (HCN2)に着目した研究を実施した。HCN2 は神経伝達物質放出の調節等、神経系において重要な機能を果たすカリウムチャネルであり、同じ HCN ファミリーに属する HCN1 が APP と結合することや AD 患者においててんかん併発が認められるがてんかん患者において HCN 発現が変動している等の報告があることから AD との関連が考えられるため、さらなる詳細な検討を実施した。培養細胞において HCN2 をノックダウンした結果、 $A\beta_{42}$ および APP の一次分解産物である sAPP レベルが減少することを見出した。また、HCN 阻害剤である ZD7288 処理した際も、同様に $A\beta_{42}$ および sAPP レベルの減少が認められた。さらに、HCN2 と γ セクレターゼがマウス海馬ニューロンにおいて近接相互作用していることを確認した。以上のことから、APP プロセッシングを阻害することを目的とした場合、HCN2 がターゲットと成り得る可能性が考えられた。

第1章 Proximity ligation assay を用いた γ セクレターゼおよび活性型 γ セクレターゼの可視化

第1節 序論

γ セクレターゼは AD の病因として考えられている $A\beta$ を産生する酵素として長年研究されているが、活性部位が膜内にあるため、複合体の構造を維持した状態での機能解析が困難であり、その構造に関する報告はほとんどないのが現状である。電子顕微鏡による低解像度の報告が存在する[94, 95, 96]が、結晶構造に関してはいまだ報告がない。したがって、 γ セクレターゼの構造と機能の関連を明らかにする手法を構築することは、 γ セクレターゼをターゲットとする研究において非常に重要であると考えられる。

強力な γ セクレターゼ阻害剤であり活性型 γ セクレターゼ選択的に結合する L-685,458 [51]は γ セクレターゼ研究において有用なツールであり、筆者の研究グループでは以前に本阻害剤を基に設計した分子を用いて γ セクレターゼおよびその結合タンパク質をアフィニティ精製した[89]。この分子は L-685,458 に疎水性リンカー、ジスルフィド結合およびビオチン基を結合させたもので、 γ -secretase inhibitor with a cleavable biotin group (GCB) と名付けられた。本研究では GCB にさらに光反応基を組み込み、紫外線 (UV) 照射により隣接する分子に共有結合することを可能にした。これにより、染色等の洗浄工程を多数含む評価系においても結合がかい離するリスクを最小限に抑えることができる。この分子を GTB と名付け、本研究では GTB を用いた Proximity ligation assay (PLA) を確立し[97]、活性型の γ セクレターゼを可視化することを可能にした。また、 γ セクレターゼの主要構成分子である PS1 と Nct に対する抗体が PLA に使用できるものであることも合わせて確認した。

第2節 材料および実験方法

抗体

γ セクレターゼの評価には以下に示す抗体を使用した。それ以外の使用抗体については各方法項に記載した。

- ✓ マウス抗 PS1 loop モノクローナル抗体 (MAB5232, Millipore, ヒト PS1 の 263-378 アミノ酸残基が抗原、以下 PS1-CTF)
- ✓ ウサギ抗 PS1 NTF ポリクローナル抗体 (529591, Calbiochem, ヒト PS1 の 1-65 アミノ酸残基が抗原)
- ✓ マウス抗 Nct モノクローナル抗体 (MAB5556, Millipore, マウス Nct の C 末端 18 アミノ酸残基が抗原、以下 Nct-CTF)
- ✓ ウサギ抗 Nct ポリクローナル抗体 (24741, Abcam, N 末端の 103-124 アミノ酸残基を認識、以下 Nct-NT)

- ✓ 抗 Nct 抗体 (N1660, Sigma, ヒト Nct の C 末端の 603-709 アミノ酸残基が抗原)
- ✓ Aph-1aL (PRB-550P; COVANCE, ヒト Aph-1aL の C 末端領域が抗原)
- ✓ UD1 (Dr. Jan Naˆslund より供与、Pen-2 の N 末端の 6-14 アミノ酸残基が抗原)

GTB の合成

GTB は γ セクレターゼ阻害剤である L-685,458 に、polyethylene glycol (PEG) リンカー、ジスルフィド結合、光反応基、そしてビオチン基を鎖状に付加した構造を有する (図 3A)。合成は Chemilia AB (Sweden) に依頼した。GTB の γ セクレターゼ阻害活性は後述の通り実施した。

細胞株の培養

PS1 と PS2 を共に欠損 (BD8) する胚性幹細胞由来細胞株[78]、および BD8 細胞に PS1 を安定発現させた細胞 (BD8-PS1) [98]を培養した。培地は 10% (v/v) のウシ胎児血清、1 mM のピルビン酸ナトリウム、0.1 mM の β メルカプトエタノール、および非必須アミノ酸を添加したダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) を用いた。

γ セクレターゼ活性評価

BD8 細胞および BD8-PS1 細胞から 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propanesulfonate (CHAPSO) に可溶性膜画分を単離し、37°C で 16 時間 L-685,458 (Sigma-Aldrich) や GTB の存在下または非存在下で反応させた。radioimmunoprecipitation buffer (RIPA, 0.1% SDS, 1.0% NP40, 0.5% Sodium deoxycholate, 50 mM Tris (pH8.0), 150 mM NaCl) を添加し 5 分間煮沸することによって反応を停止させた。サンプルを 10,000 \times g で遠心分離し、上清中の A β 40 を Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA, 和光純薬) により測定した。10 μ M の L-685,458 存在下でのシグナルをバックグラウンドとして差し引いた。GraphPad Prism 4.02 ソフトウェア (GraphPad Software) を用いて IC₅₀ (nM) 値を計算した [89]。

可溶化 γ セクレターゼの調製およびアフィニティ精製

Sprague-Dawley ラット (B&K Universal) 脳をバッファーA (20 mM Hepes, 50 mM KCL, 2 mM EGTA, pH 7.5) 内でホモジナイズし、遠心 (1,000 \times g) により沈殿した核画分を除去した。残った上清をさらに遠心 (10,000 \times g) し沈殿したミトコンドリア画分を除去した。残った上清を遠心 (100,000 \times g) し、沈殿したミクロソーム画分を 1% CHAPSO を含むバッファーA で再懸濁した [89]。不溶成分を遠心 (100,000 \times g) で取

り除き、上清の可溶性 γ セクレターゼを、CHAPSO を含まないバッファーA で 2 倍希釈した。そのサンプルにストレプトアビジン結合磁気ビーズ (Invitrogen) を添加し内在性のビオチン化タンパク質を結合させ、 $1,000 \times g$ で 5 分間の遠心分離によって上清のみを回収した。そのサンプルを室温で 10 分間、競合阻害剤として $10 \mu M$ の L-685,458 の存在下または非存在下で反応し、次いで室温で 30 分間、 $100 nM$ の GTB と共に反応した。サンプルを氷上で 7 cm の距離から 10 分間 UV (365 nm) 照射してから、RIPA で溶解した。GTB 標識されたサンプルをストレプトアビジン結合磁気ビーズと反応し、RIPA で 3 回洗浄した後、トリシン SDS 緩衝液中で 3 分間煮沸することによりビーズ樹脂から溶出した。

SDS-PAGE およびウェスタンブロッティング

Sodium dodecyl sulfate poly acrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) およびウェスタンブロッティングは、以前の研究において実施したに沿って実施した[89]。すなわち、タンパク質サンプルを 10-20% トリシンゲル (Invitrogen) 上で分離し、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Bio-Rad) にトランスファー後、それぞれの抗体で反応した。サンプルのシグナルは Super Signal West Dura enhanced chemiluminescence (Pierce) によって視覚化した。Hyperfilm ECL (GE Healthcare) で露光し、露出したフィルムを AGFA Duoscan を用いてスキャンした。

マウス初代海馬ニューロンの培養、固定化および透過化

胎生 16.5 日齢の C57BL/6 マウスより脳海馬神経細胞を単離し、以前の研究において実施した方法に沿ってポリ-D-リシンでコーティングしたガラス底培養皿 P35G-0-10-C (MatTek corporation) で培養した[99]。海馬細胞増殖に必要な成長因子を添加し、皮質細胞をプレート外側部分のプラスチックに付着させ、海馬細胞は内側 10 mm のガラスマイクロウェル上に播種した。 $2\% B27$ (Invitrogen) および $1\% L$ -グルタミン (Invitrogen) を含有する Neurobasal 培地で 14 日間培養・増殖させた。細胞を phosphate buffered saline (PBS) で洗浄し、 4% ホルムアルデヒド (Sigma) により $4^{\circ}C$ で 10 分間固定した。PBS で洗浄した後、 $0.4\% CHAPSO$ により $4^{\circ}C$ で 10 分間透過処理し、PLA または免疫細胞化学染色に供した。

マウス初代海馬ニューロンにおける PLA

マウス初代海馬ニューロンを培養したプレート上で PLA 反応を実施した。原則的にはメーカーのプロトコールにしたがって実施した。細胞をブロッキング試薬 (Olink Bioscience) により $37^{\circ}C$ で 1 時間ブロッキング処理し、2 種類の一次抗体または 1 種類

の 1 次抗体と GTB を用いて 1 時間 37℃で反応させた。洗浄液 A（組成非開示、Olink Bioscience）で洗浄した後、MINUS および PLUS のオリゴヌクレオチド鎖をコンジュゲートした二次抗体（それぞれ、PLA プローブ MINUS および PLUS、Olink Bioscience）、または先述の二次抗体の片方とオリゴヌクレオチド PLUS または MINUS のヌクレオチド鎖をコンジュゲートしたストレプトアビジンの組み合わせを含有する溶液で反応させた。洗浄液 A で洗浄した後、ライゲーション（37℃、30 分）、増幅（37℃、100 分）、検出（Detection reagents far red、Olink Bioscience）の工程を順次実施した。最後に、洗浄液 B（組成非開示、Olink Bioscience）で洗浄した後、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)を含む封入剤で包埋した。

PLA による抗体の検証

PLA に使用する γ セクレターゼ構成分子の抗体は、抗体単体の特異的結合を PLA で確認することにより検証した。標識されていない一次抗体で反応させた後、共にその一次抗体を認識する PLA プローブ MINUS および PLA プローブ PLUS を使用した。他の工程は先述の手順にしたがって実施した。

PLA を用いたタンパク質 - タンパク質相互作用評価

PS1 と Nct との間の近接相互作用は、抗 PS1-NTF 抗体、マウス抗 Nct-CTF 抗体を一次抗体として、オリゴヌクレオチドで標識された PLA マウス PLUS および PLA ウサギ MINUS を二次抗体として用いた。他の工程は先述の手順にしたがって実施した。

GTB を用いた PLA

活性型 γ セクレターゼと相互作用する分子を見出すため、活性型 γ セクレターゼを認識する GTB を PLA に用いた。GTB が持つビオチン基を認識するオリゴヌクレオチド標識したストレプトアビジンを用いた。ストレプトアビジンによる細胞中の非特異的なシグナルを除去するため、ブロッキング工程の前に細胞を室温で 15 分間アビジンと反応させ、PBS で 2 回洗浄した後、ビオチンと 15 分間反応させ、再度 PBS で 2 回洗浄する工程を追加した。その後、細胞を 200 nM の GTB および PS1 または Nct を認識する一次抗体とともに反応させた。陰性対照として 50 倍過剰（10 μ M）の γ セクレターゼ阻害剤 L-685,458 を含む溶液でブロッキングするサンプルを設定した。氷上で 10 分間 UV 照射した後、PS1 抗体または Nct 抗体を認識するオリゴヌクレオチド標識二次抗体と、GTB のビオチン基を認識するオリゴヌクレオチド標識ストレプトアビジンとを含む溶液中で反応させた。他の工程は先述の手順に従った。

画像の可視化と処理

PLA サンプルはレーザー走査共焦点顕微鏡 (LSM 510 META、ZEISS) を用いて検鏡し撮影した。PLA シグナルは Duolink Image Tool ソフトウェア (Olink Bioscience) を用いて定量した。PLA 試験は抗体の組み合わせ 1 組につき 3~4 回実施し、各実験において各サンプル中の 3~5 細胞の PLA シグナルを算出した。データは平均値±標準誤差 (SEM) で示した。

第 3 節 実験結果

GTB の特性

GTB は以前に設計した GCB と類似しているが[89]、光反応基が含まれているという違いがある。UV 照射により光反応基が近接する分子に共有結合することで容易に洗浄されなくなるため、複数回の洗浄工程を有するアッセイにおいて有用である。GTB の化学構造を図 3A に示す。BD8-PS1 細胞からのミクロソーム膜中の A β 40 産生を ELISA で測定することにより IC₅₀ 値を算出した結果、GTB (11.3 nM) は L-685,458 (10.3 nM) や GCB (13.1 nM) とほぼ同等の阻害活性を示した[89]。

GTB による γ セクレターゼ構成分子のアフィニティ精製

γ セクレターゼの局在が報告されている細胞膜、ゴルジ、ER 等を含むラット脳ミクロソーム膜画分より GTB を用いて γ セクレターゼ構成分子を調製した。UV 照射により結合したタンパク質をストレプトアビジン結合磁気ビーズ (Invitrogen) を用いて分離した。GTB 濃度を 3 nM から 1000 nM まで検討し、アフィニティ精製の有効性を Nct および PS1-NTF のウェスタンブロッティングで評価した結果、GTB の濃度依存的に Nct および PS1-NTF が精製され (図 3B)、100~300nM で飽和したため、以降の試験では 100 nM の GTB を用いた。100 nM の GTB により PS1-NTF、PS1-CTF、Nct および Aph-1 が精製され、過剰量の阻害剤 L-685,458 (10 μ M) により競合されることを確認した (図 3C)。 γ セクレターゼ構成分子の内、Pen-2 のみ検出されなかったが、他の γ セクレターゼ構成分子に比べて分子量が小さいため検出できなかった可能性が考えられた。今回の GTB によるアフィニティ精製においては以前の GCB で実施した結果と比較して 10 分の 1 以下の量しか γ セクレターゼ構成分子が精製されなかった。この結果はアーチファクトが少なく、光反応基を有する GTB に直接結合したタンパク質のみが検出されたことによると考えられる。

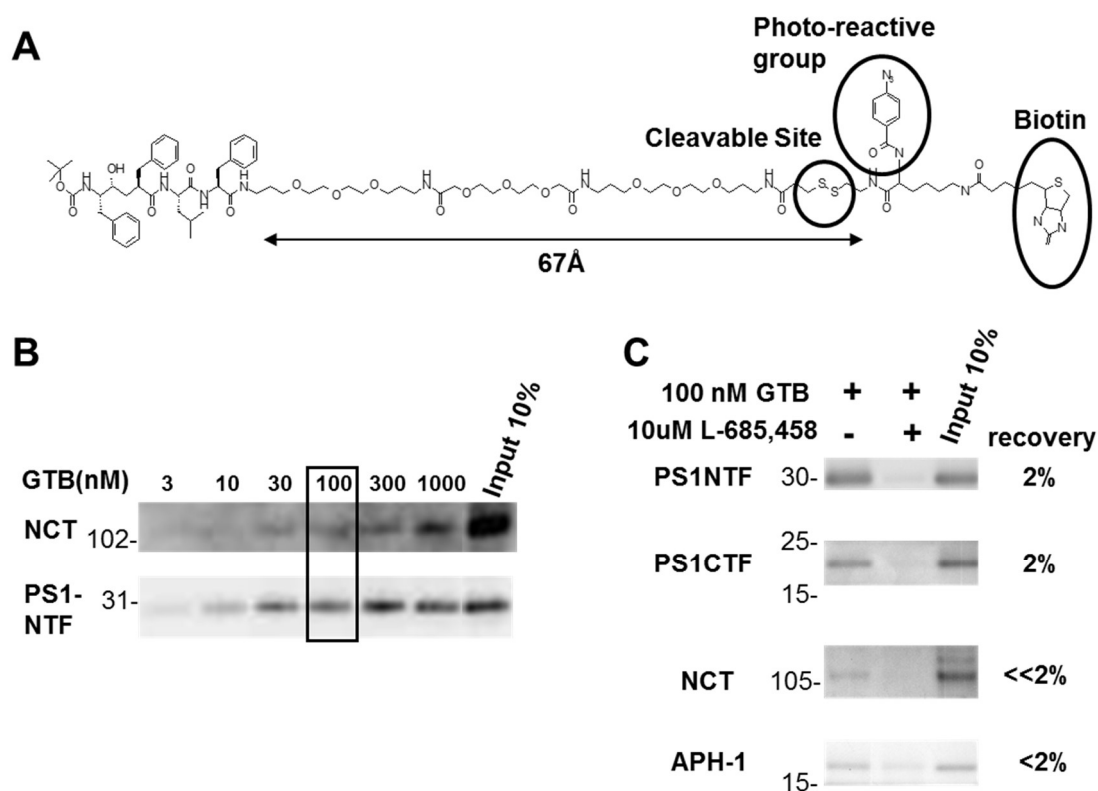


図 3 : GTB の構造と特徴

(A) γ セクレターゼ阻害剤と PEG リンカー・光反応基・ジスルフィド結合・ビオチン基を組み合わせた GTB の構造。阻害剤部分とビオチン基とは約 67 Å の距離である (3D ChemDraw (CambridgeSoft)により計算)。(B)ラット脳サンプルより調製した可溶性 γ セクレターゼを各濃度条件の GTB と反応させ、ストレプトアビジンビーズで分離精製した後、SDS サンプルバッファーで溶出し、ウェスタンブロッティングにより γ セクレターゼの各構成分子を検出した。(C)B と同じ試験を GTB 100 nM を用いて実施し、L-685,458 の存在下においては γ セクレターゼの各構成分子が検出されないことを確認した。

PLA およびウェスタンブロッティングによる抗体の検証

2 種類の抗 PS1 抗体および 2 種類の抗 Nct 抗体を、マウス初代海馬ニューロンにおいて PLA を用いて評価した (図 4A~C)。抗 PS1-NTF 抗体 (図 4D および G)、抗 PS1-CTF 抗体 (図 4E および H) および抗 Nct-CTF 抗体 (図 4F および I) では、多数の PLA シグナルが全ニューロンにわたって検出された。抗 Nct-NTF 抗体のみ PLA シグナルが微弱であったため、以降は抗 Nct-NT 抗体以外の 3 種類の抗体を使用した。

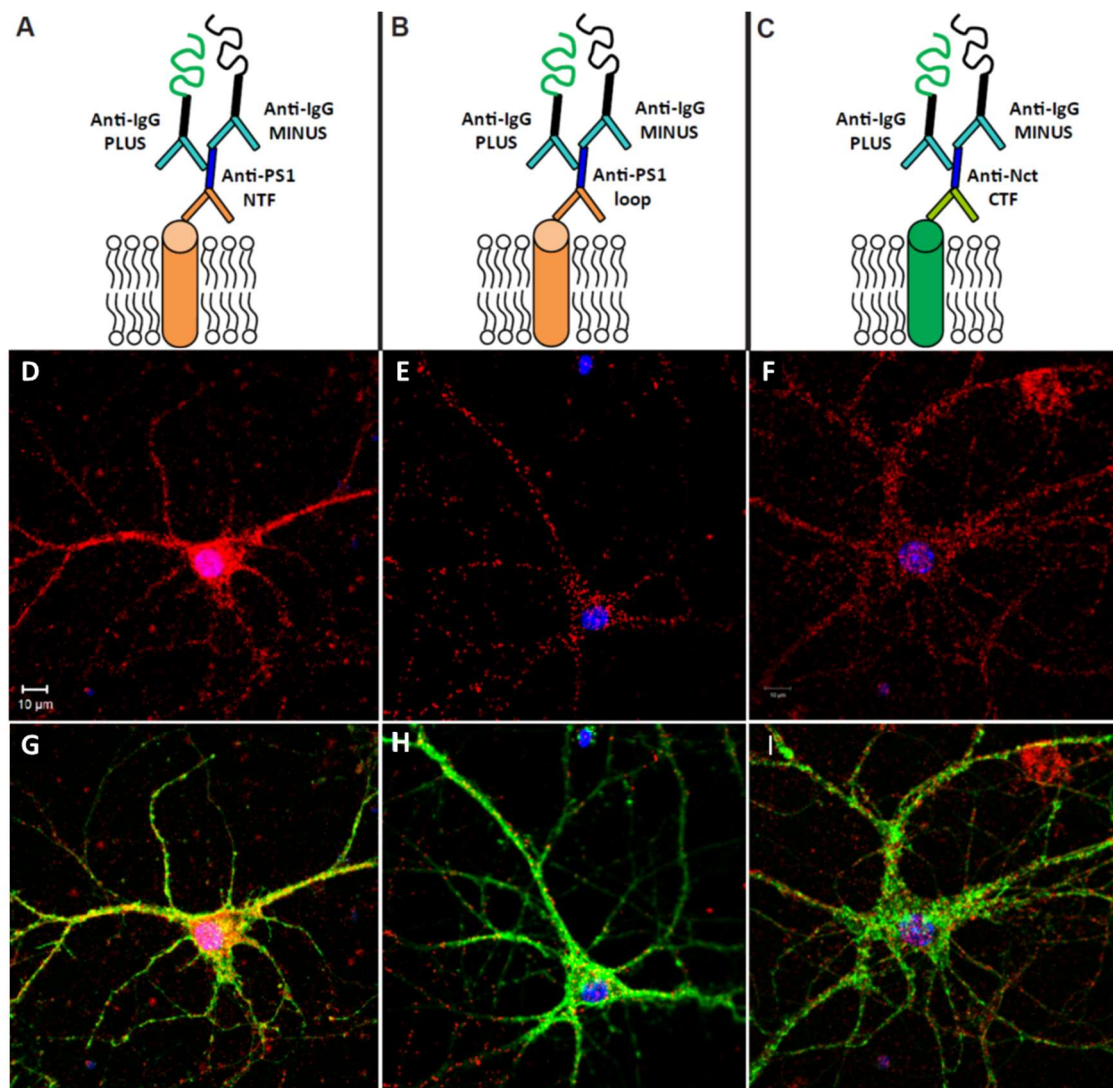


図 4 : γ セクレターゼ構成分子の抗体評価

γ セクレターゼ構成分子に対する抗体をマウス初代海馬神経細胞を用いて PLA により検証した。検証評価の模式図を A,B,C に示す。抗 PS1-NTF 抗体、抗 PS1-CTF 抗体、および抗 Nct-CTF 抗体の PLA シグナル（赤）を D, E, F に示した。G, H, I にはそれぞれ D, E, F に対する DAPI による核染色（青）および抗ファロイジン抗体によるアクチン染色（緑）との共染色像を示した。

マウス初代海馬ニューロンにおける PLA によるタンパク質-タンパク質相互作用評価

神経細胞における γ セクレターゼを検出するため、簡便に入手・調製が可能なマウス初代海馬ニューロンを用いて PS1 と Nct との相互作用を図 5A に示す PLA 条件設定にしたがって実施した。抗体は PS1-NTF および Nct-CTF に対する抗体を用いた。PLA シグナルは、細胞体から神経突起の遠位部分までニューロン全体にわたって認められ（図 5B）、細胞体（図 5C）および神経突起（図 5D）の両方において、他の領域よりも濃い染色像を含む部位が認められた。PLA シグナルの定量結果は、それぞれ片方の一

次抗体を含めずに反応を実施した 2 種類の陰性対照におけるシグナル数の合計に対する倍数で示し、以後の試験においても同様の方法で示した（図 5E）。検出試薬のみの陰性対照（すなわち、両方の一次抗体を含めずに反応を実施したサンプル）における PLA シグナルの数は極少数であったため、以後の PLA 試験では実施しなかった。PLA シグナルの総数は実験間で異なったが、その倍数値は約 40 倍程度で安定した。以上のことから、本 PLA 法によりニューロンにおける in situ での PS1 と Nct との相互作用を評価できることが示された。

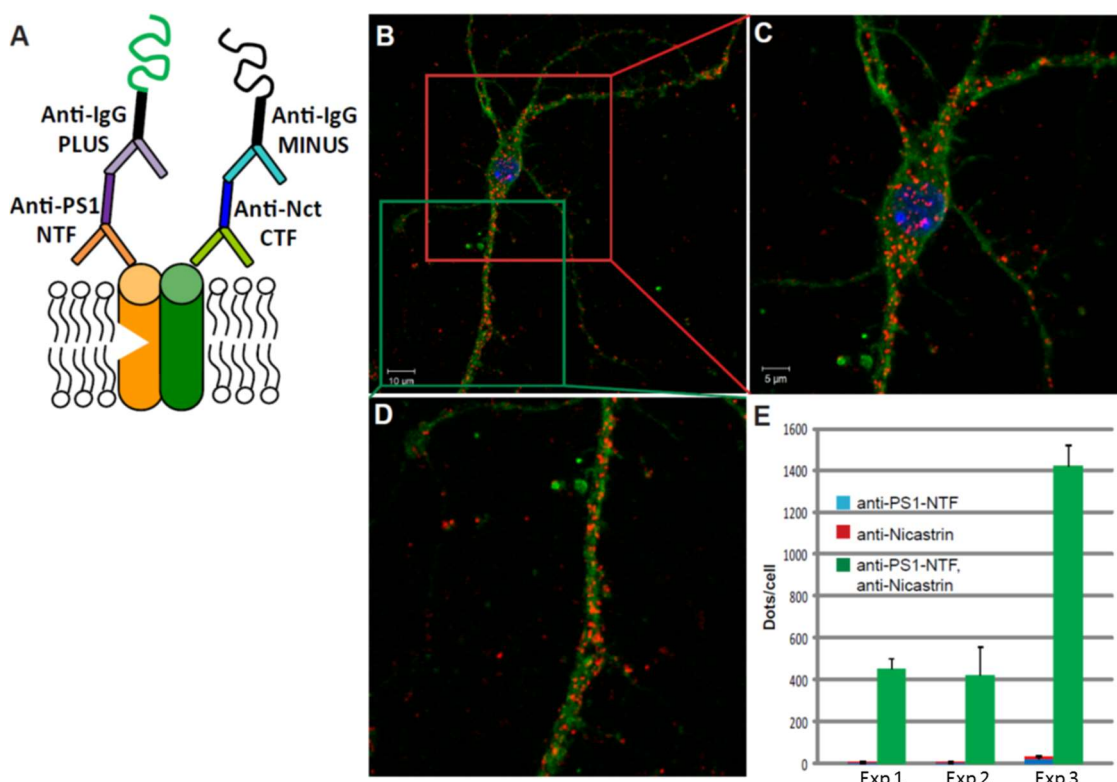


図 5：マウス初代海馬ニューロンにおける従来法による PLA

試験は模式図 A に示す通り実施した。PLA シグナルは赤、DAPI による核染色像は青、そして抗ファロイジン抗体によるアクチン染色像は緑で示した（B, C, D）。B の写真のうち細胞体およびその周辺を拡大したもの（赤枠）を C に、神経突起を拡大したもの（緑枠）を D に示した。PLA シグナル数を測定した結果を E に示した（平均値±SEM）。

マウス初代海馬ニューロンにおける GTB を用いた PLA

活性化状態の γ セクレターゼを評価するため、GTB を用いた PLA 法を確立した。図 6A, E に示される PLA 条件設定に従い、 γ セクレターゼ阻害剤 L-685,458 の存在下または非存在下で抗 PS1 抗体および GTB を用いて評価した。抗 PS1 抗体および GTB は同じタンパク質（PS1）に結合するが、GTB は活性型（切断された PS1）にのみ結合するため、活性型 γ セクレターゼのシグナルのみが検出される。まず、抗 PS1-NTF 抗体およ

び GTB を用いた PLA を実施した (図 6B-D)。海馬ニューロンを GTB のみまたは抗 PS1-NTF 抗体のみで反応させたサンプルを陰性対照とした。また、阻害剤である L-685,458 を GTB 濃度に対して 50 倍過剰量添加したサンプルをもう一つの陰性対照とした (図 6F-H)。PLA シグナルを定量化した結果、2 つの異なる方法で実施した。合計 171 個の PLA シグナル (陰性対照と比較して 4.2 倍の増加) を示し、L-685,458 の存在下で 85% のシグナルが消失した (図 6I)。このことから GTB を用いた PLA 法は有用であり活性型への選択性も有している可能性が考えられた。阻害剤である L-685,458 によりシグナルが消失することもこの結論を支持するものである。

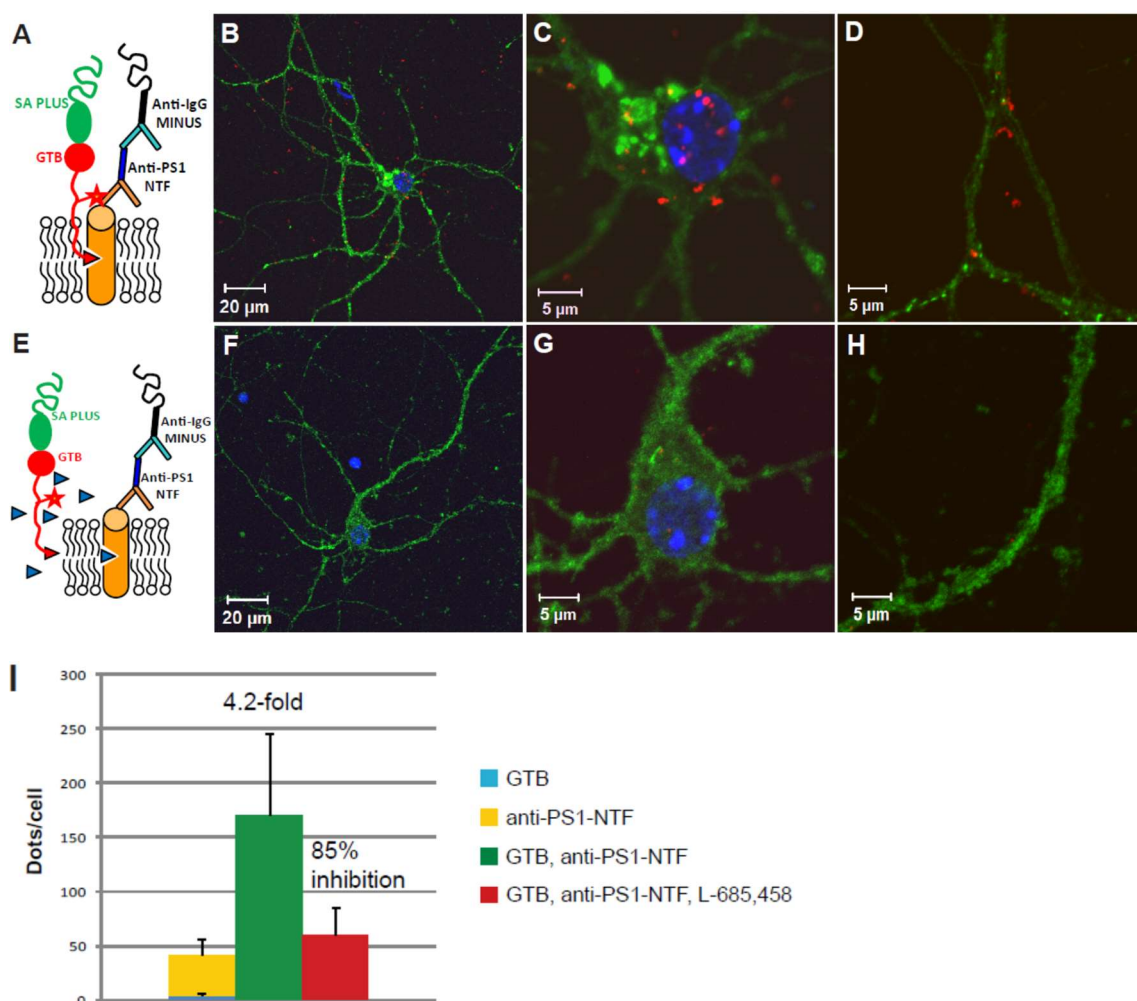


図 6 : GTB および抗 PS1-NTF 抗体を用いた PLA

PLA は競合阻害剤である L-685,458 の非存在下(A)または存在下(E)で実施した。それぞれの代表的な結果を B, C, D および F, G, H に示した。PLA シグナルは赤、DAPI による核染色像は青、そして抗ファロイジン抗体によるアクチン染色像は緑で示した (B - H)。B, F の写真のうち細胞体およびその周辺を拡大したものを C, G に、神経突起を拡大したものを D, H に示した。また、PLA シグナル数を測定した結果を I に示した。各実験間の平均値 ± SEM で示す。

次に、抗 PS1-NTF 抗体の代わりに PS1 の細胞質内ループ構造を認識する抗 PS1-CTF 抗体を使用し同様の条件（図 7A, E）で PLA を実施した。L-685,458 の非存在下（図 7B-D）または存在下（図 7F-H）における抗 PS1-CTF 抗体および GTB を用いた際の PLA の結果、PLA シグナルは 41 シグナル/細胞となり、これは陰性対照の和の 5.3 倍に相当した。これらのシグナルの 55% が L-685,458 の存在下で消失した（図 7I）。PLA シグナル総数は、抗 PS1-CTF 抗体（41/細胞）よりも抗 PS1-NTF 抗体（171/細胞）が高かったが、倍数值は抗 PS1-CTF 抗体（5.3 倍）が抗 PS1-NTF 抗体（4.2 倍）よりも高かった。しかしながら、L-685,458 による PLA シグナルの阻害は、抗 PS1-CTF 抗体（55%）よりも抗 PS1-NTF 抗体（85%）が高かった。おそらく抗 PS1-NTF 抗体がより高い親和性を有するため、抗 PS1-NTF 抗体はこのアッセイにおいてより適切であると考えられた。あるいは、PS1 の細胞質ループ構造を認識する抗 PS1-CTF 抗体は、GTB の PS1 への結合を立体的に阻害するか、または活性部位の立体配座に影響を及ぼしている可能性も考えられた。

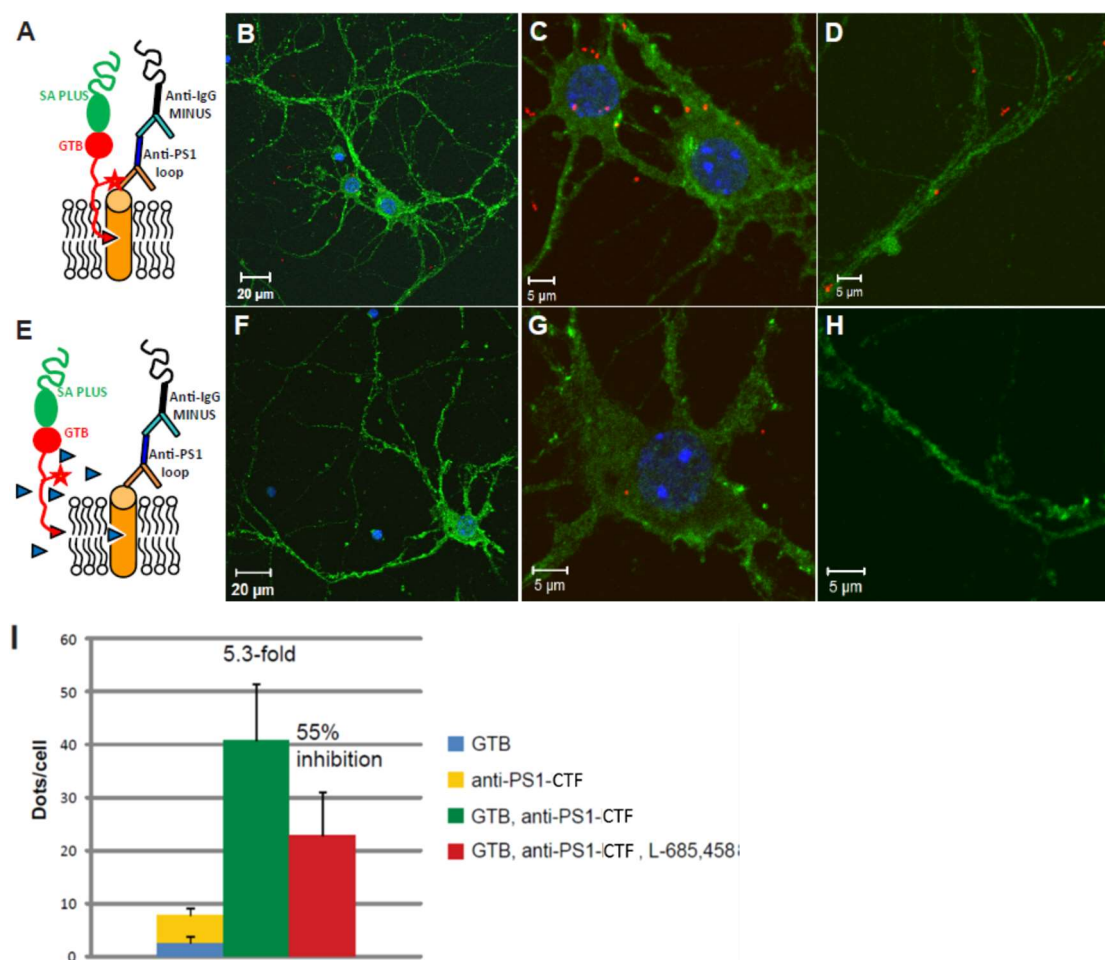


図 7：GTB および抗 PS1-CTF 抗体を用いた PLA

PLA は競合阻害剤である L-685,458 の非存在下(A)または存在下(E)で実施した。それ

それぞれの代表的な結果を B, C, D および F, G, H に示した。PLA シグナルは赤、DAPI による核染色像は青、そして抗ファロイジン抗体によるアクチン染色像は緑で示した (B-H)。B, F の写真のうち細胞体およびその周辺を拡大したものを C, G に、神経突起を拡大したものを D, H に示した。また、PLA シグナル数を測定した結果を I に示した。各実験間の平均値 \pm SEM で示した。

最後に、図 8A および図 8E に示される PLA 条件にしたがって、GTB および抗 Nct - CTF 抗体を用いて活性部位の検出を検討した。L-685,458 非存在下 (図 8B-D) または存在下 (図 8F-H) の PLA を実施した結果、214 シグナル/細胞となり、これは陰性対照の和の 4.5 倍であり、L-685,458 により 76% が消失した (図 8I)。値は、抗 PS1-NTF 抗体と GTB を用いた PLA 結果 (4.2 倍および 85% 阻害) と同等であった。これは、PS1 および Nct の両方が活性型 γ セクレターゼに必須であることと整合性がある。

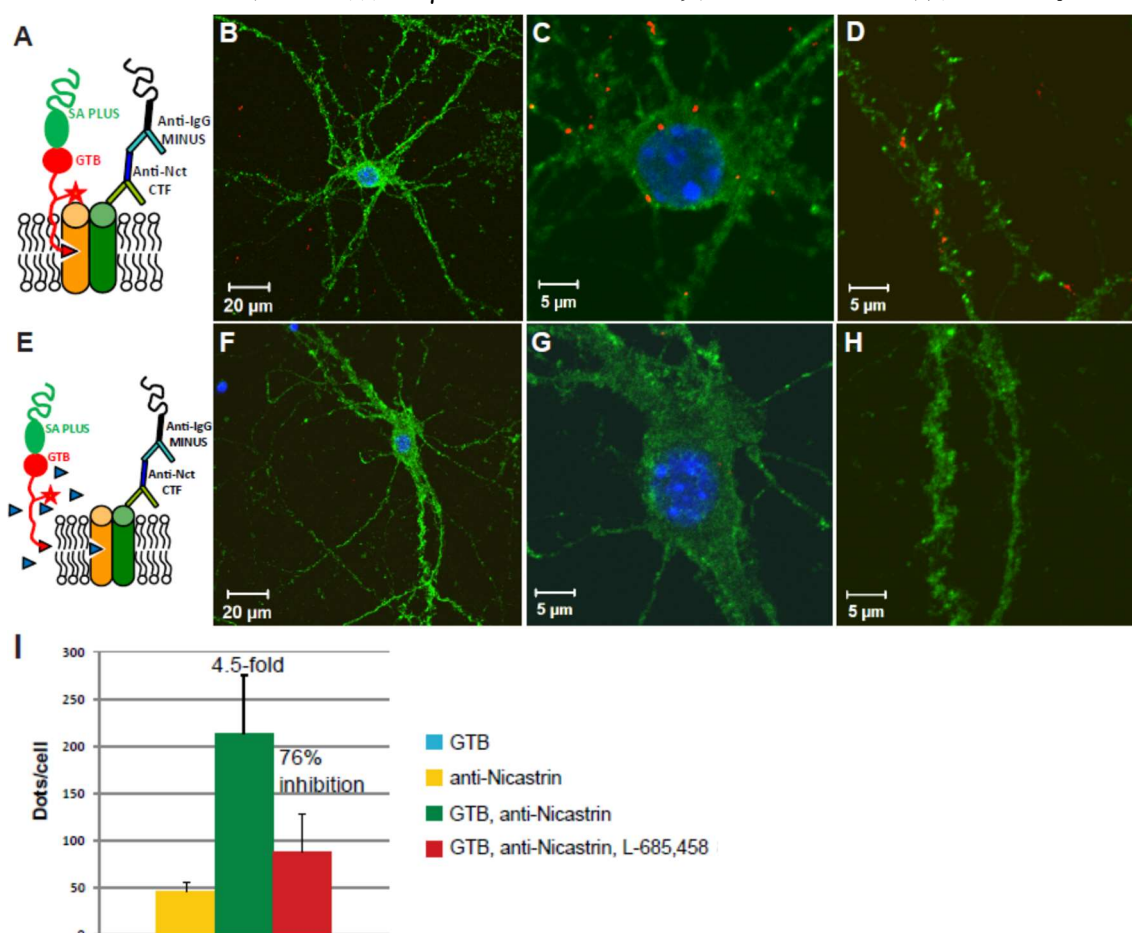


図 8 : GTB および抗 Nct-CTF 抗体を用いた PLA

PLA は競合阻害剤である L-685,458 の非存在下(A)または存在下(E)で実施した。それぞれの代表的な結果を B, C, D および F, G, H に示した。PLA シグナルは赤、DAPI による核染色像は青、そして抗ファロイジン抗体によるアクチン染色像は緑で示した (B-H)。B, F の写真のうち細胞体およびその周辺を拡大したものを C, G に、神経突起を拡大したものを D, H に示した。また、PLA シグナル数を測定した結果を I に示した。各実験間の平均値 \pm SEM で示す。

第4節 考察

γ セクレターゼは APP を切断することにより神経毒性を有する A β ペプチドを産生する作用を有することから、AD 治療薬のターゲットと成り得る。しかし、 γ セクレターゼ阻害剤に関する臨床試験は、 γ セクレターゼが例えば Notch のような APP 以外の基質のプロセッシングを阻害することにより引き起こされる副作用のため、現在まで期待はずれの結果に終わっている。したがって、 γ セクレターゼ阻害による AD 治療薬を創製するには酵素活性の基質選択性が必要不可欠である。 γ セクレターゼ活性を調節する要因が何であり、また細胞内のどこで作用しているのかについてより詳細な解析が必要と考えられる。つまり細胞内における特定の部位での γ セクレターゼ活性を阻害する必要があると考えられる。

本研究では、活性型および非活性型 γ セクレターゼを識別できるよう高感度な評価手法の確立を試みた。そのため、活性型 γ セクレターゼにのみ結合する阻害剤を基に、PLA により可視化できるような置換基をコンジュゲートさせた GTB を設計した。GTB の A β 産生阻害 IC₅₀ 値は 11.3 nM であり、L-685,458 (10-20 nM) と近似した数値であった[89, 100]。このことは GTB の阻害活性は、コンジュゲートした置換基の導入による影響を受けないことを示唆している。同様に、PS1-CTF、PS1-NTF、Nct および Aph-1 が GTB を用いた免疫沈降で検出されたことは、GTB が効率的に活性型 γ セクレターゼに結合することを示している。GTB は UV 照射により隣接するタンパク質に共有結合される光反応基を含む設計になっているため、複数の反応および洗浄工程を有する PLA に用いても当初の結合が維持される。本方法は、PS1 と Nct の 2 種類の一次抗体を用いた従来の方法と、GTB および抗 Nct 抗体を用いた方法とで、全ての γ セクレターゼと活性型 γ セクレターゼとを比較することにより検証した。

γ セクレターゼ構成分子間やその細胞内局在を PLA により検討した研究は本研究が初めてである。本研究では、以下の 3 つの異なる PLA 条件を可能とした。

- i) 単一分子を認識する条件では抗体の検証やタンパク質の分布が評価できる。
- ii) 2 つの異なる一次抗体を用いたタンパク質-タンパク質間相互作用を検討できる。
- iii) GTB を使用することにより活性型酵素タンパク質の相互作用を検討できる。

PLA による PS1 と Nct 抗体の検討により、各抗体が海馬神経細胞内において γ セクレターゼの構成分子 (PS1、Nct) に結合しているか否か、および神経細胞内において PS1、Nct がどのような分布を示すか、の両方が評価できた。神経細胞全体に渡り PLA シグナルが高密度に検出されたことは、 γ セクレターゼが核膜、endoplasmic reticulum (ER) /ゴルジ体、ER-ミトコンドリア間膜 (MAMs)、シナプス小胞、エンドソームおよび原形質膜等、細胞内の様々な部位に発現するという以前の報告とも一致する[101, 102, 103]。核内もまた PLA シグナルが検出されたことはやや意外であったが、以前に

PS1 は、マウス脳において発達期の特定の段階では核にも局在していることが示唆されている[104]。また、PLA は単一分子を高感度に検出できるため、従来の免疫染色法では検出できなかった微量のタンパク質も検出できる可能性もある。

従来の PLA 条件では、2 つの一次抗体に加え 2 つの PLA プローブを使用しており、抗体およびオリゴヌクレオチドプローブのサイズに基づいて、40 nm 以下の距離にある分子同士の結合（相互作用）を検出することが報告されている[105]。一方で GTB を用いた新法では 30 nm 以下の距離にある分子同士の相互作用を検出する。3 次元構造解析によると γ セクレターゼ複合体の大きさは 7-12 nm [94, 95, 96]であるので、抗体のみを用いた従来の PLA、および GTB を用いた新しい PLA とともに、 γ セクレターゼ複合体内部での分子間相互作用が検出可能である。

GTB の結合選択性について γ セクレターゼおよび他のプロテアーゼの IC_{50} 値を比較すると、同じアスパルチルプロテアーゼである Human immunodeficiency virus-1 (HIV-1)に比べて約 60 倍、さらに他の種類のプロテアーゼに対しても少なくとも約 60 倍以上の差があった[100]。本研究で確立した GTB を用いた PLA は、2 種類の検出プローブを使用するという特性上、従来の免疫化学染色を用いたタンパク質検出と比較して特異性が高まっている。片方の検出プローブは GTB を、もう一方の検出プローブは PS1 または Nct に対する一次抗体を認識させることにより、GTB に含有される γ セクレターゼ阻害剤の特異性が加味され、検出特異性が担保される。

抗 PS 抗体および抗 Nct 抗体の組み合わせで用いた場合の PLA シグナルが細胞あたり約 900 であったことに對し、抗 PS1 抗体を GTB に置き換えた際の PLA シグナルは細胞あたり約 200 であったが、L-685,458 により競合されたシグナルは細胞あたり約 150 であり、この数値が活性型を含む γ セクレターゼ複合体を示していると考えられる。したがって、PS1-Nct で検出される γ セクレターゼの内 17%程度が活性型を含む γ セクレターゼ複合体であると考えられた。ニューロンは穏やかな条件下で固定し（4%ホルムアルデヒドにより室温で 10 分間）透過処理（0.4%CHAPSO により室温で 10 分間）しており、これにより γ セクレターゼの活性は維持されたとの報告があるが[106]、実際に GTB の結合が検出されたことで γ セクレターゼの複合体形成および活性が維持されていると考えられた。しかしながらホルムアルデヒド固定の影響がゼロではないと考えられることから、全体に対する活性型 γ セクレターゼ複合体の割合が過小評価されている可能性がある。

また、PS1 および Nct に対する抗体を用いた PLA と比較して、抗 Nct 抗体と GTB を使用した PLA において核および核周辺領域における PLA シグナルが少なかった。活性型 γ セクレターゼが PS1-Nct 相互作用の総量の一部のみであったことと、GTB アッセイによって検出される PLA シグナルが抗体のみを用いた PLA でのシグナルと比

較してより核を離れた部位に位置していたことは、 γ セクレターゼが活性型になるには複合体形成が必要であるという報告[64]とも整合する。 γ セクレターゼが細胞内のどの部位で複合体を形成するかは解明されていないが、本研究の GTB を用いた PLA 法により、核周囲の ER からさらに遠位であることが示唆される結果が得られた。

第2章 神経細胞選択的に γ セクレターゼとの相互作用を示す GSAPs の探索

第1節 序論

世界中では 4500 万人以上の人々が認知症を患っており、その大部分が未だ根本治療法が確立されていない AD である。その原因として考えられている $A\beta$ の産生を触媒する γ セクレターゼは、発生および神経新生において重要な機能を有する。PS1 KO マウスは出生直後に死ぬが、これは γ セクレターゼ基質の 1 つである Notch プロセッシングが阻害されることによるものであると考えられる。現在までに数多くの γ セクレターゼ阻害剤が臨床試験されてきたが、Notch シグナル伝達の障害に起因すると考えられる副作用等により現時点で上市されたものはない。このことは、APP 以外の基質のプロセッシングを阻害することなく APP 切断を選択的に阻害する γ セクレターゼが必要であることを示唆するものである。筆者の研究グループでは γ セクレターゼの基質選択性を調節する GSAPs に関する研究により、Notch プロセッシングには影響せず APP プロセッシング ($A\beta$ 産生) 選択的に影響を及ぼす GSAPs を複数同定した[90, 91, 92, 93]。本研究ではこれらの GSAPs と γ セクレターゼとの相互作用に関して、さらなる詳細な検討を実施した。また、以前の研究において、ラットおよびヒトの脳からの detergent resistant membranes (DRMs) に γ セクレターゼが含有されることを示されており[90]、今回 DRMs より新たに 4 つの GSAP を同定した。また GSAPs と γ セクレターゼとの相互作用に関する特性を評価することにより、それらが γ セクレターゼ活性にどのように影響するかを理解することが可能となり、それにより神経毒性を有する $A\beta$ の産生を減少させる新しい方法を見出すための有用なツールとなると考えられる。そのため、第1章で構築した in situ PLA を用いて γ セクレターゼと GSAPs との相互作用を評価した。

第2節 材料および実験方法

GSAPs の同定

Sprague-Dawley ラット (B&K Universal) 脳より第1章の材料と実験方法「可溶性 γ セクレターゼの調製およびアフィニティ精製」に記載した方法でミクロソーム画分を調製した。ミクロソーム画分を 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2.0% CHAPSO を含むバッファーで懸濁し、4°C で 20 分間 rotator を用いて可溶化した。サンプルをショ糖密度勾配遠心法 (100,000 $\times g$, 16 時間) により分離し、5%と 35% ショ糖の境界面に得られた画分を DRMs 画分とした[90]。DRMs 画分に CHAPSO (最終濃度 0.5%) を添加し、ストレプトアビジン結合磁気ビーズ (Invitrogen) を用いて内在性のビオチン化タンパク質を除去した。次いで 200 nM の GCB を添加して反応させたのち、ストレプトアビジン結合磁気ビーズを用いて回収し、100 mM dithiothreitol を含む SDS サンプルバッファーで γ セクレターゼ複合体を溶出した[89, 90, 91]。そのサ

サンプルを Liquid chromatography - tandem mass spectrometry (LC-MS / MS)にかけ SPECTRUMMILL ソフトウェア (Agilent Technologies、Stockholm、Sweden) を用いて、新規の GSAPs を同定した。MS / MS スペクトルは、SpectrumMill Proteomics Workbench (バージョン A.03.03.078) を用いてすべての実験から抽出した。見出した分子はタンパク質データベース SwissProt (www.expasy.org/) を検索することによって同定した。ヒットクライテリアはスコア > 10 およびピーク強度 > 70% に設定した。siRNA トランスフェクションによる GSAP のノックダウン時に、a) 70%以上の遺伝子がノックダウンされ、b) 細胞生存率が 70%を超え、c) A β 産生を 30%低下させ、d) Notch プロセッシングに対する影響が少なかったものをさらなる研究に供した。

抗体

γ セクレターゼおよび GSAPs の評価には以下に示す抗体および第 1 章に記載の抗体を使用した。それ以外の使用抗体については各方法項に記載した。

- ✓ ウサギ抗 HCN2 ポリクローナル抗体 (OB1390, Sumitomo Dainippon Pharma)
- ✓ ウサギ抗 HCN2 ポリクローナル抗体 (APC-030, Alomone)
- ✓ ウサギ抗 ATP9A ポリクローナル抗体 (OB1391, Dainippon Sumitomo Pharma)
- ✓ ウサギ抗 FLOT2 ポリクローナル抗体 (F1805, Sigma-Aldrich)
- ✓ ウサギ抗 TrK-B ポリクローナル抗体 (WH0004915M1, Sigma-Aldrich)
- ✓ ウサギ抗 TrK-B ポリクローナル抗体 (TA500386, Origene)
- ✓ ウサギ抗 SLC2A13 ポリクローナル抗体 (OB1417, Dainippon Sumitomo Pharma)
- ✓ ウサギ抗 SLC2A13 ポリクローナル抗体 (BMP026, Nordic BioSite)
- ✓ ウサギ抗 GAP43 ポリクローナル抗体 (OB1415, Dainippon Sumitomo Pharma)
- ✓ ウサギ抗 GAP43 ポリクローナル抗体 (75810, Abcam)
- ✓ ウサギ抗 SLC2A3 ポリクローナル抗体 (OB1392, Dainippon Sumitomo Pharma)
- ✓ ウサギ抗 SLC2A3 ポリクローナル抗体 (20403-1, Proteintech)
- ✓ ウサギ抗 STXBP1 ポリクローナル抗体 (OB1414, Dainippon Sumitomo Pharma)
- ✓ ウサギ抗 STXBP1 ポリクローナル抗体 (116002, Synaptic Systems)
- ✓ ウサギ抗 MAO-B ポリクローナル抗体 (OB1418, Dainippon Sumitomo Pharma)
- ✓ ウサギ抗 MAO-B ポリクローナル抗体 (M1821, Sigma-Aldrich)
- ✓ ウサギ抗 NDUFS7 ポリクローナル抗体 (OB1417, Dainippon Sumitomo Pharma)
- ✓ ウサギ抗 NDUFS7 ポリクローナル抗体 (15728-1, Proteintech)
- ✓ ウサギ抗 VDAC1 ポリクローナル抗体 (sc-8828, Santa Cruz Biotechnology)
- ✓ ウサギ抗 CNTNAP1 ポリクローナル抗体 (ab34151, Abcam)

細胞株の培養

APP695 を安定に過剰発現する HEK-293 細胞 (HEK-APP 細胞) は、Eirikur Benedikz 博士 (University of Southern Denmark, Denmark) から供与された[107]。細胞外ドメインを欠失したヒト Notch を発現させた HEK 細胞 (HEK-Notch Δ E 細胞) は Helena Karlstrom 博士 (Karolinska Institutet, Sweden) から供与された。

細胞はポリ-D-リシンでコーティングした 8 ウェルチャンバースライド上にウェル当たり 7000 細胞の密度で播種し 10% (v/v) ウシ胎仔血清を添加した DMEM 中で接着させた。細胞を PBS で洗浄し、4%ホルムアルデヒド (Sigma) により 4°C で 10 分間固定した。さらに PBS で洗浄した後、0.4%CHAPSO により 4°C で 10 分間透過処理し、PLA または免疫細胞化学染色に供した。

遺伝子ノックダウンによる A β および Notch プロセッシングに与える影響

各 GSAPs に対する siRNA は以下のものを購入して用いた。

Number1 FLOT2 (Life Technologies) :

センス鎖 siRNA (AGAUUGAGAUUGAGGUUGUGC)

アンチセンス鎖 siRNA (ACAACCUCAAUCUCAAUCUCU)

Number2 FLOT2 (Ambion, ID s5284) :

センス鎖 siRNA (CCAAGAUUGCUGACUCUAAtt)

アンチセンス鎖 siRNA (UUAGAGUCAGCAAUCUUGGtg)

Number3 FLOT2 (Ambion, ID s5285) :

センス鎖 siRNA (ACAGUAAGGUCACAUCAGAtt)

アンチセンス鎖 siRNA (UCUGAUGUGACCUUACUGUtg)

Number4 STXBP1 (Ambion, ID s13601) :

センス鎖 siRNA (CCUUAUAUCUCUACCCGUUtt)

アンチセンス鎖 siRNA (AACGGGUAGAGAUUAUAAGGgt)

Number5 STXBP1 (Ambion, ID s13602) :

センス鎖 siRNA (GGUGGACUCCGAUUAUCAAtt)

アンチセンス鎖 siRNA (UUGAUAAUCGGAGUCCACCgt)

Number6 SLC2A3 (Ambion, ID s129331) :

センス鎖 siRNA (GUUAUUAAGGAUAACUAUtt)

アンチセンス鎖 siRNA (AUAGUUAUCCUUUAUAACaa)

Number7 GAP43 (Ambion, ID s5570) :

センス鎖 siRNA (UGAACAAGAUGGUAUCAAAtt)

アンチセンス鎖 siRNA (UUUGAUACCAUCUUGUUCAat)

Number8 GAP43 (Ambion, ID s5569) :

センス鎖 siRNA (AGGCUGAAGCUAAUAAGAAAtt)

アンチセンス鎖 siRNA (UUCUUAUUAGCUUCAGCCUca)

HEK-APP 細胞に LF RNAiMAX (Invitrogen、Thermo Fisher Scientific) を用いて各 siRNA をトランスフェクトした。messenger RNA (mRNA) レベルでのノックダウン効率をリアルタイム PCR (7500 Fast Real Time PCR システム; Ambion) により測定した[90]。細胞培養上清中に放出された A β 40 および A β 42 はサンドイッチ ELISA (Immuno-Biological Laboratories、和光純薬) により定量した。培養上清は、HEK-APP 細胞に siRNA トランスフェクションし 24 時間後に回収した[90, 91]。Notch シグナルに対する効果は、Notch Δ E 細胞を用いたウェスタンブロッティングによって、NICD を定量した[90, 91]。A β および NICD 評価における細胞生存率は Alamar Blue (Biosource Europe) により測定した。結果は平均値 \pm 標準偏差 (SD) で示し、スチューデント T 検定により Lipofectamine (LF) コントロールに対する有意性を検定した。

免疫沈降

ヒトの脳から調製したミクロソーム膜画分[93]を、1%CHAPSO を含むバッファーA (20 mM Hepes, 50 mM KCl, 2 mM EGTA, pH 7.5) に可溶化し免疫沈降試験に供した。サンプルは予めプロテイン A-Dynabeads (Invitrogen) と混合し、非特異的な吸着を除外した。ウサギ抗 GSAP 抗体または非免疫化ウサギ由来の IgG 抗体 (Sigma) を添加し 4°C で一晩反応させた。また、抗体は添加するがミクロソーム画分を含まないサンプルを別のコントロールとして設定した。次いでプロテイン A-Dynabeads を添加しさらに 2 時間反応させた。続いて、ビーズをバッファーA 中の 1%CHAPSO で 3 回洗浄した後、50 mM dithiothreitol を含む NuPAGE LDS サンプル緩衝液 (Invitrogen、Thermo Fischer Scientific) で溶出した。最後に PS1-CTF および Nct に対する抗体を用いたウェスタンブロッティングにより定量した。

ヒト組織における GSAPs の発現

ヒト組織における GSAP 遺伝子の発現レベルは、Taqman Gene Expression Cells-to-CT キット (Life Technologies) を用い、メーカーのプロトコールにしたがって作製した cDNA を TaqMan gene expression assays (Life Technologies) を用いたリアルタイム PCR 法により評価した。各組織特異的にプールされたヒト cDNA のパネル [ヒト多組織 cDNA パネル I (#636742) およびヒト多組織 cDNA パネル II (#636743)] は Clontech から購入した。

HEK-APP 細胞およびマウス初代海馬ニューロンにおける PLA

マウス初代海馬ニューロンまたは HEK-APP 細胞を培養したプレートまたはチャンバースライド上で PLA 反応を実施した。原則的にはメーカーのプロトコールにしたがって実施した。詳細は第 1 章の材料と実験方法に記載した。結果は平均値±SEM で示し、スチューデント T 検定により陰性対照の和に対する有意性を検定した。

第 3 節 実験結果

新たな GSAPs の同定

GCB を用いて、DRMs から γ セクレターゼおよび GSAPs をアフィニティ精製し、以前の報告の通り LC-MS / MS による GSAPs の同定を行い[90]、FLOT2、SLC2A3、STXBP1 および GAP43 の 4 分子が新たな GSAPs として見出した。以降の評価に含まれる以前の報告で同定されているその他の GSAPs [90, 91, 93]の概要を表 1 に示した。

表 1 : PLA で評価した GSAPs 一覧

Abbreviation	Protein name
Trafficking proteins	
FLOT2	Flotillin-2/epidermal surface antigen (endocytosis related protein, participates in caveolae formation)
STXBP1	Syntaxin-binding protein 1/MUNC18-1 N-Sec1 (essential for neurotransmission, binds to SNARE)
Transporter and channel proteins	
SLC2A3	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter) member 3/GLUT3 (glucose transporter)
SLC2A13	Proton myo-inositol co-transporter HMIT/solute carrier family 2 member 13 (myo-inositol transporter)
ATP9A	Probable phospholipid-transporting ATPase IIA/ATPase class II type 9A (ATP-dependent phospholipid transporter)
HCN2	Potassium/sodium hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated ion channel 2 (contributes to the native pacemaker currents in heart and neurons)
VDAC-1	Voltage-dependent anion channel 1 (channel in the mitochondrial outer membrane and the plasma membrane)
Enzymes	
MAO-B	Monoamine oxidase B (degrades monoamines such as serotonin)
NDUFS7	NADH dehydrogenase (ubiquinone) iron-sulfur protein 7/complex I 20 kDa (subunit of complex I of the mitochondrial respiratory chain)
Signaling proteins	
Trk-B	BDNF/NT-3 growth factors receptor/GP145-TrkB (receptor tyrosine kinase involved in nervous system development)
GAP43	Neuromodulin/growth-associated protein 43 (involved in axonal and dendritic filopodia induction)
CNTNAP1	Contactin-associated protein 1 (subunit of the contactin complex)

GSAPs の siRNA による遺伝子ノックダウンが A β 産生および Notch プロセッシングに及ぼす影響

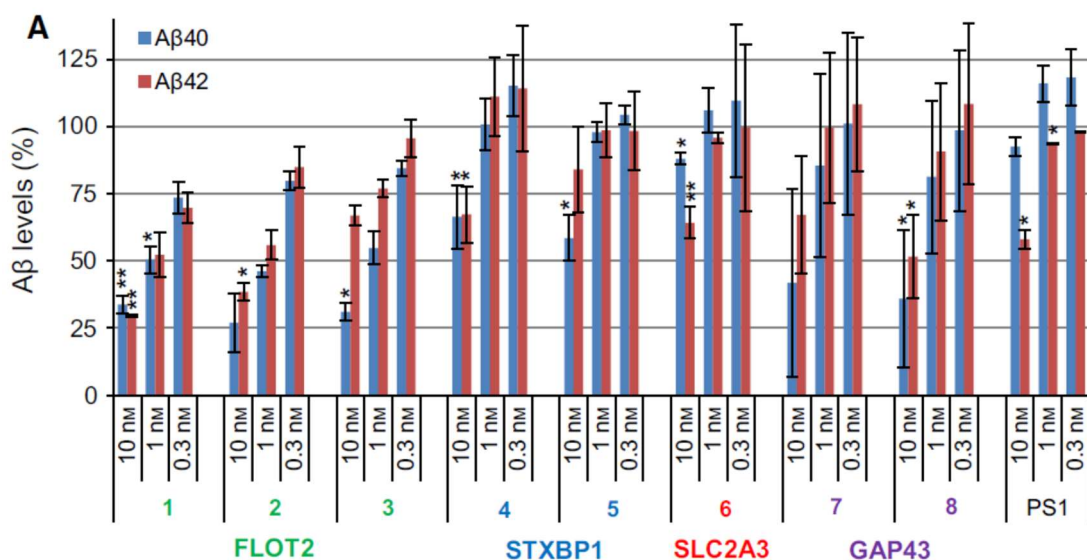
A β 産生および Notch プロセッシングに対する GSAPs の siRNA による遺伝子ノックダウンの影響を、HEK-APP 細胞および Notch Δ E 細胞において検討した。用いた全ての siRNA は、逆転写およびリアルタイム PCR によって高いノックダウン効率 (71~

98%) を示すことを確認した (表 2)。

表 2 : GSAPs の siRNA による遺伝子ノックダウン効率

Abbreviation	siRNA number	Percentage knockdown	
		10 nM	3 nM
FLOT2	1	96	84
STXBP1	4	78	75
	5	80	71
SLC2A3	6	86	87
GAP43	7	96	94
	8	98	93

PS1 (陽性対照) に対する siRNA により、A β 産生が用量依存的に減少した (図 9A)。また、A β 42 産生量の減少度合は A β 40 のそれよりも大きかった (図 9C) [93]。FLOT2、STXBP1、SLC2A3 および GAP43 の siRNA による遺伝子ノックダウンにより、A β 40 および A β 42 産生が用量依存的に減少した (図 9A)。PS1 の場合と同様に、SLC2A3 の遺伝子ノックダウンにより、A β 40 の減少度合と比較して A β 42 の減少度合がより大きかった (図 9C)。PS1 に対する siRNA および STXBP1 に対する siRNA の 1 つを除いて、NICD 産生 (Notch プロセッシング) に対する siRNA 遺伝子ノックダウンの用量反応性は、ほとんどまたは全く観察されなかった (図 9B)。FLOT2 および SLC2A3 に関しては、遺伝子ノックダウンにより NICD 産生に比較して A β 産生量に対してより影響を及ぼし、GAP43 についても同様の傾向が観察された (図 9D)。



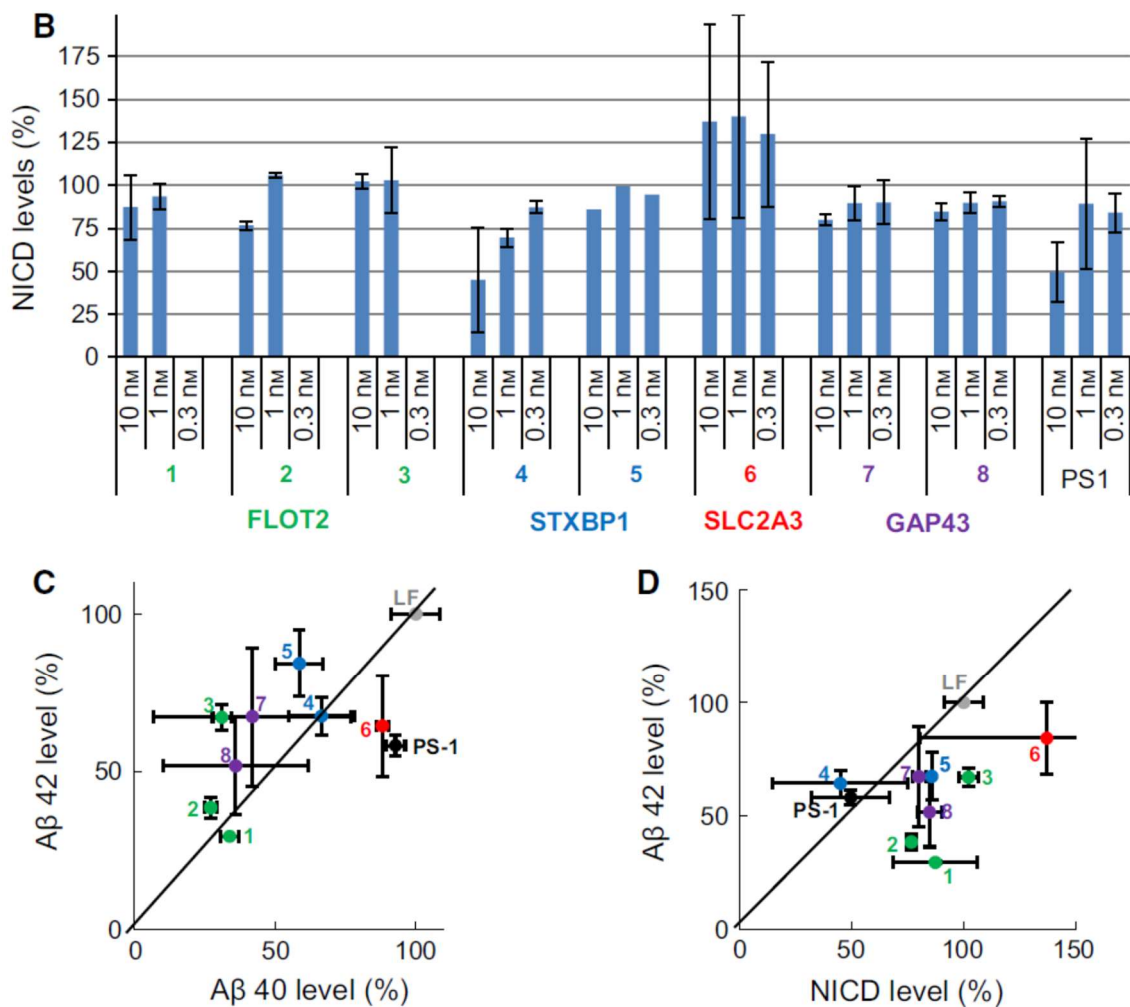


図 9 : siRNA による GSAPs 遺伝子ノックダウンが Aβ 産生および Notch プロセッシングに及ぼす影響

各 GSAPs をターゲティングした siRNA を HEK 細胞または HEK NotchΔE に添加し、24 時間後に培養上清中の Aβ40 および Aβ42、または NICD を ELISA (A) またはウェスタンブロッティング (B) により測定した。結果は LF コントロールを 100% としてそれに対する割合で示した (平均値 ± SD)。10 nM の siRNA を用いた際の Aβ40 および Aβ42 産生量のプロットを C に、NICD および Aβ42 産生量のプロットを D にそれぞれ示した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs LF コントロール

GSAPs に対する抗体を用いた γ セクレターゼ 構成分子の共免疫沈降

DRMs から同定された GSAPs と γ セクレターゼ との相互作用を、ヒト脳ミクロソーム膜画分を用いて共免疫沈降によって評価した。FLOT2、STXBP1、SLC2A3 および GAP43 をそれぞれの抗体で免疫沈降させ、そのサンプルを PS1 および Nct に対する抗体を用いたウェスタンブロッティングに供した。すべてのサンプルにおいて、PS1 および Nct は GSAPs と共免疫沈降が認められた (図 10)。

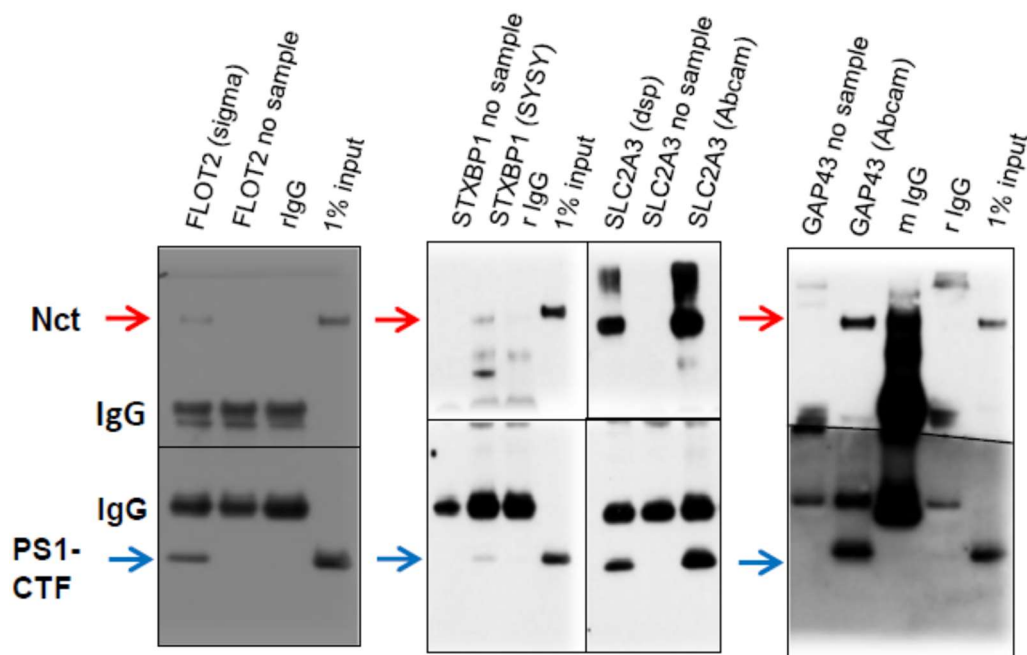


図 10：免疫沈降による GSAPs と γ セクレターゼ構成分子との相互作用

ヒト脳ミクロソーム画分を GSAPs に対する抗体を用いて免疫沈降し、 γ セクレターゼ構成分子に対する抗体を用いてウェスタンブロッティングを実施した。mIgG および rIgG はそれぞれ免疫していないマウスおよびウサギ血清より精製した IgG を示す。

HEK-APP 細胞における PLA

上記 DRMs から同定した 4 種、および以前の研究において同定された Notch プロセッシングに影響を与えないが $A\beta$ 産生に影響を与える 8 種の GSAPs[90, 91, 93]、合わせて 12 種について組織上で近接相互作用を評価した。PLA では細胞や膜を破壊することによって生じるアーチファクトを回避でき、細胞内での相互作用部位を視覚化できる。そこで GSAPs および PS1 に対する抗体を用いて非神経細胞株 (HEK-APP 細胞) において PLA を実施した。PLA シグナルは共焦点顕微鏡法によって赤色シグナルとして観察された (図 11A, B 右側大写真)。結果は、細胞あたりのシグナルの数として示し、2 つの陰性対照 (一方の抗体のみで一次反応を実施、図 11A, B 左側小写真) におけるシグナルの和と比較した。多くの抗 GSAP 抗体はウサギで産生したため、GSAP-PS1 相互作用を評価にはマウス抗 PS1-CTF 抗体との組み合わせで実施した。Trk-B はマウス由来の抗体を使用したため、ウサギ抗 PS1-NTF 抗体と組み合わせたが、陰性対照におけるシグナル (バックグラウンド) が多く検出された (図 11C)。9 つの GSAPs は陰性対照と比較して PLA シグナルが統計的に有意に増加した (図 11C)。

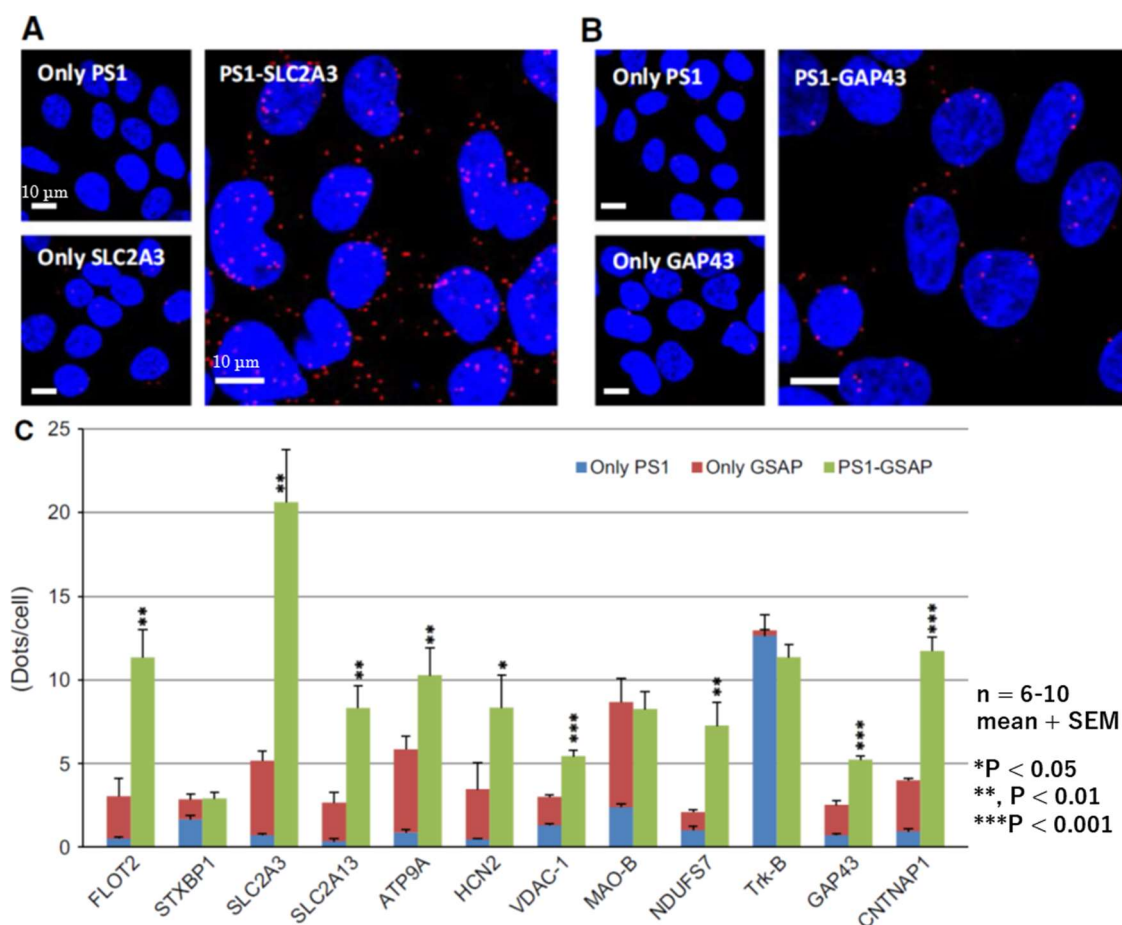


図 11 : HEK-APP 細胞における PLA

SLC2A3 (A)および GAP43 (B)の代表的な画像を示す。A, B 共に左側の小さい画像はそれぞれ PS1 または GSAPs に対する抗体のみで一次反応を実施した陰性対照を示し、右側の大きい画像は両抗体存在下で一次反応を実施したサンプルの結果である。PLA シグナルは赤、DAPI による核染色は青で示した。PLA を実施した 12 種の GSAPs のそれぞれの結果をグラフ化したものを C に示した。結果は 1 細胞当たりの PLA シグナルの平均値 \pm SEM で示した。

マウス初代海馬ニューロンにおける PLA

神経細胞における GSAPs と PS1 との相互作用を評価するために、マウス初代海馬ニューロンで PLA を実施した。結果、多くの GSAPs (STXBP1、SLC2A3、SLC2A13、ATP9A、HCN2、VDAC-1、MAO-B、NDUFS7 および CNTNAP1) においては、陰性対照と比較して 2 倍を超える統計学的に有意なシグナルの増加を示した (図 12)。HEK-APP 細胞での PLA 結果と海馬ニューロンでの PLA 結果をプロットし比較した (図 13) ところ、多くの GSAPs は HEK-APP 細胞よりも海馬ニューロンにおいて PS1 とより相互作用していることが分かった。FLOT2 は HEK-APP 細胞よりも海馬ニューロンにおける相互作用が少なかった。HEK-APP 細胞においてほとんど相互作用を示さなかった (2 倍未満) 4 つの GSAPs (ATP9A、STXBP1、MAO-B および VDAC-1)、特に MAO-

B および VDAC-1 は海馬ニューロンにおいて明確な相互作用の増加が認められた。これらの 2 つのタンパク質はヒト組織中にユビキタスに発現しており、脳よりも他の組織においてより高い発現を有する (図 14A)。一方、STXBP1 は脳において最も高く発現していた (図 14A)。また HCN2、GAP43、CNTNAP1 は神経細胞・非神経細胞に関わらず γ セクレターゼと相互作用するが、脳における発現が最も高かった (図 14B)。その他の GSAPs については脳以外の組織においても発現量が多く (図 14A, B, C)、神経細胞・非神経細胞に関わらず γ セクレターゼと相互作用する。

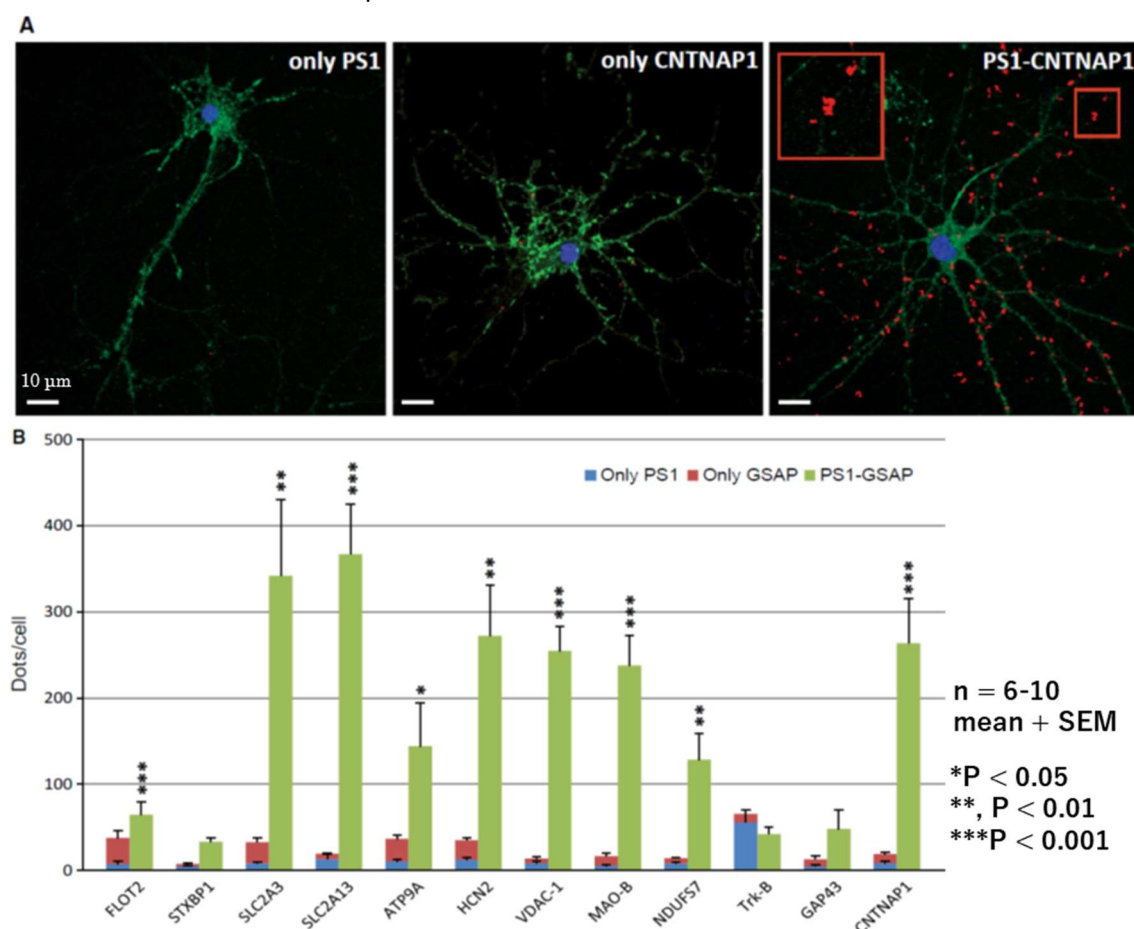


図 12 : マウス初代海馬ニューロンにおける PLA

CNTNAP1 (A)の代表的な画像を示す。左側および中央の画像はそれぞれ PS1 または CNTNAP1 に対する抗体のみで一次反応を実施した陰性対照を示し、右側の画像は両抗体存在下で一次反応を実施したサンプルの結果である。PLA シグナルは赤、DAPI による核染色は青、アクチンは緑で示した。PLA を実施した 12 種の GSAPs のそれぞれの結果をグラフ化したものを B に示した。結果は 1 細胞当たりの PLA シグナルの平均値 \pm SEM で示した。

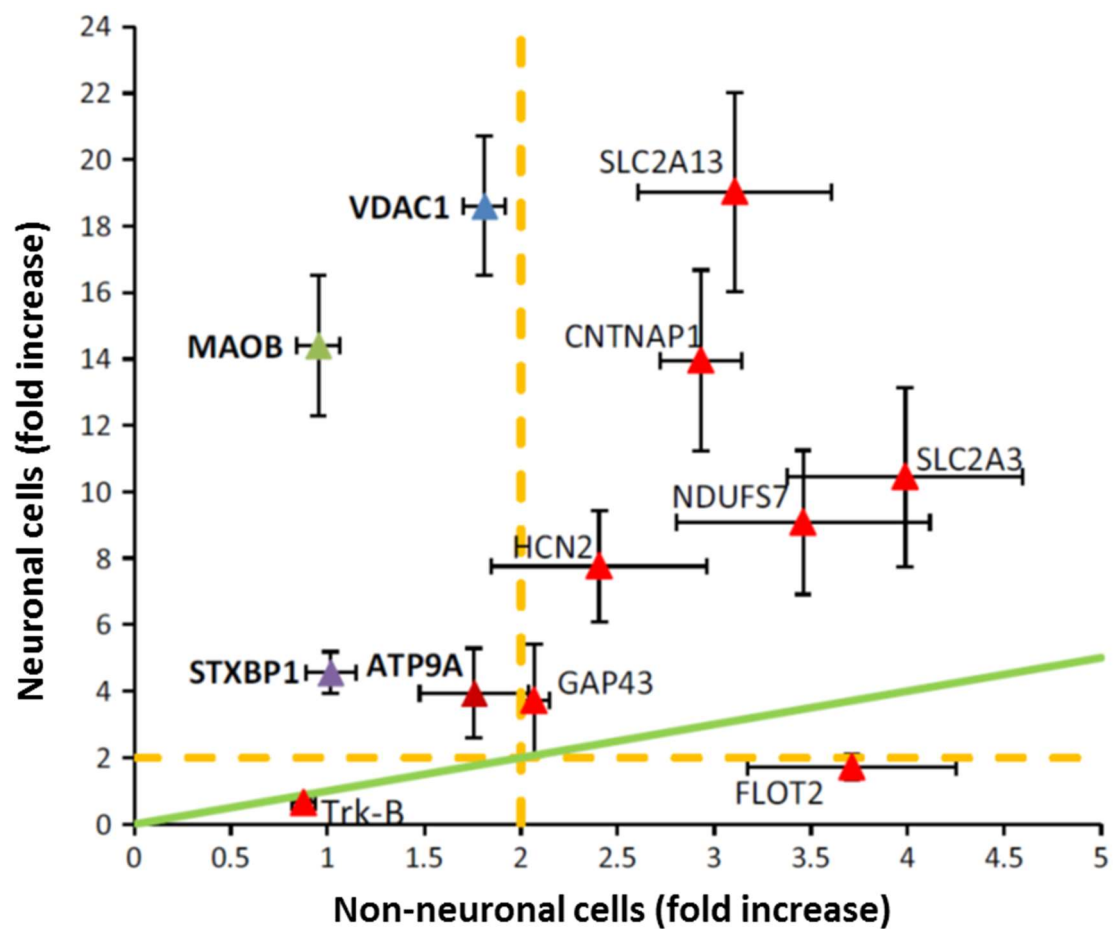


図 13：神経細胞と非神経細胞における PLA 結果の比較

陰性対照における PLA シグナル和に対する、評価サンプルの PLA シグナルの倍数を、縦軸に神経細胞、横軸に非神経細胞の結果をプロットした。誤差範囲は SEM を示す

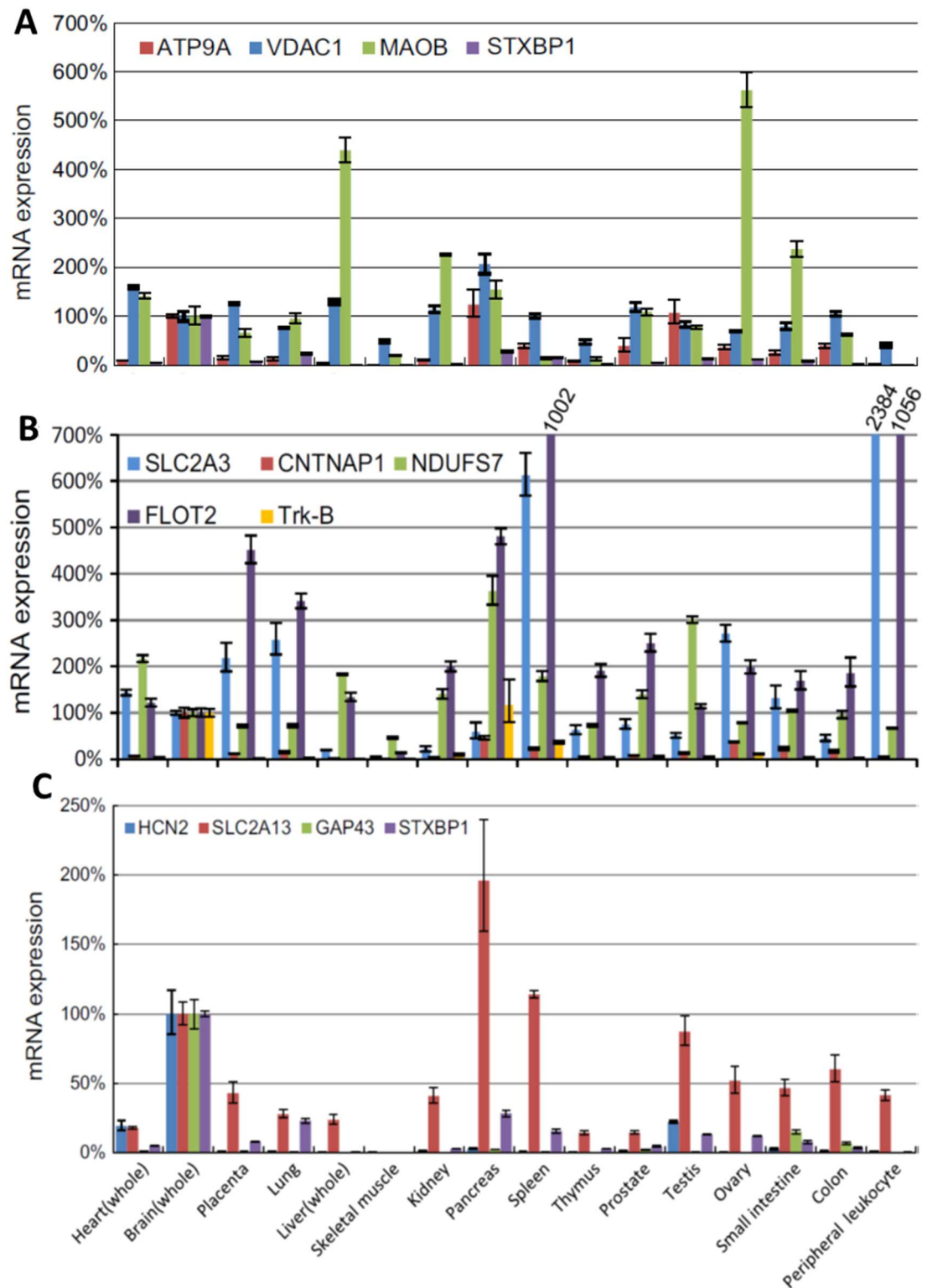


図 14 : 各 GSAP のヒト組織における mRNA 発現量

(A, B, C)各 GSAPs のヒト組織における mRNA の発現量を示した。誤差範囲は RQ_{max} (上側) および RQ_{min} (下側) を示す。

第4節 考察

本研究において、脳から調製された DRM_s において、4つの新規 GSAP_s (FLOT2、STXBP1、SLC2A3 および GAP43) を同定し、これらの GSAP_s の遺伝子ノックダウンが A β 産生に影響を及ぼすことを示した。また、NICD 産生に対する影響、逆転写およびリアルタイム PCR による脳における発現量、共免疫沈降による γ セクレターゼとの相互作用について検討した。より詳細な近接相互作用を評価するため、脳から調製された DRM_s、ミクロソーム、シナプス膜およびシナプス小胞から同定された他の GSAP_s も含めて PLA を実施した[90, 91, 93]。HEK 細胞および初代海馬ニューロンにおける GSAP_s と γ セクレターゼとの相互作用を比較した結果、多数の GSAP_s が初代海馬ニューロンにおいてより有意に相互作用することを見出した。

γ セクレターゼと相互作用するいくつかのタンパク質は以前にも報告されており[85, 86, 88, 108]、 γ セクレターゼの機能的複合体の形成には4つの主要構成分子が必要かつ十分であるものの、GSAP_s は γ セクレターゼ活性および基質特異性において重要な役割を果たす可能性が考えられた。例えば、TMP21、CD147、テトラスパニンウェブ、PION は γ セクレターゼと相互作用し、その活性に影響を及ぼすことが報告されている[85, 86, 88, 108]。ただ、細胞の種類によってタンパク質発現量およびタンパク質機能を調節に関与する他の因子が異なるため、どのタイプの細胞にどのように作用するかを明確にするためのさらなる研究が必要であり、ADにおけるGSAP_sの役割を解明するためには、脳、特にニューロン内でのGSAP_sの機能を明確にする必要がある。

筆者の研究グループでは最近、GCB を用いてヒトおよびラット脳から調製した膜画分、DRM_s、シナプス小胞およびシナプス膜を用いて活性 γ セクレターゼと相互作用するGSAP_sをアフィニティ精製することで、複数の新規GSAP_sを同定した[89, 90, 91, 92, 93]。その中でGSAP_s遺伝子をsiRNAでノックダウンすることにより、 γ セクレターゼ阻害剤の臨床試験において最も重篤な副作用を引き起こすNotchのプロセッシングに影響を与えることなくA β 産生を減少させるGSAP_sが複数見出された。今回、同様の方法によりDRM_sから新たに4つのGSAP_s (FLOT2、STXBP1、SLC2A3 および GAP43) を同定した。DRM_sにおいてAPPプロセッシングが起こることについては複数の報告があり、以前の研究においても活性型 γ セクレターゼがDRM_sに多く発現していることが示されている[103]。膜貫通タンパク質の中にはパルミトイル化されることでDRM_sに対する親和性が上昇することでDRM_sに局在することが報告されており[109]、事実APPはパルミトイル化されることで、DRM_sにおけるプロセッシングが増強される[110]。GAP43 および FLOT2 はパルミトイル化されることでDRM_sに対する親和性が上昇し、APPプロセッシングに影響する可能性が考えられた。また、12回膜貫通型タンパク質であるSLC2A13は、ニューロンにおいて高発現するグルコーストラン

スポーターであり[111]、STXBP1 はシンタキシン存在下においてシナプス小胞のドッキングと融合に関与し神経伝達に必須であることが報告されている[112]。これらの GSAPs の機能を解明するために、 γ セクレターゼとの相互作用の詳細についてさらなる検討が必要と考えた。

ヒト脳膜サンプルを用いた共免疫沈降によって GSAPs が γ セクレターゼと相互作用することを示した[91]が、 γ セクレターゼ活性を維持できるような穏やかな界面活性剤条件下においては膜サンプルの溶解が不完全であること、およびサンプルのホモジネーションにより非特異的な相互作用が誘導され得ることから、共免疫沈降法は偽陽性の結果をもたらす可能性がある。このような問題を回避し、GSAPs と γ セクレターゼとの相互作用をより詳細かつ *in situ* で調べるため、2 つのタンパク質間の相互作用を視覚化できる PLA 法を用いた。以前の研究において、 $A\beta$ 産生に対する GSAPs の効果を検討する際に用いた HEK-APP 細胞を非神経細胞として用いて PLA により γ セクレターゼと GSAPs との相互作用を評価した。評価した 12 種の GSAPs のうち 7 種が陰性対照と比較して PLA シグナルが 2 倍以上増加し、HEK-APP 細胞において γ セクレターゼと実際に相互作用することを示した。全ての GSAPs は、活性部位に結合する γ セクレターゼ阻害剤を用いて単離精製され、共免疫沈降によりそのほとんどが PS1 と Nct の両方で共精製されていることから、GSAPs が活性型の γ セクレターゼと相互作用している可能性が示唆された。

次に、AD において実際に影響を受ける細胞（神経細胞）における γ セクレターゼと GSAPs との相互作用を検討するため、マウス初代海馬ニューロンにおいて γ セクレターゼと GSAPs との相互作用を評価した。結果、評価した 12 種の GSAPs のうち 9 種が γ セクレターゼと相互作用することが明らかとなった。神経細胞と非神経細胞とにおける相互作用と比較すると、ほとんどの GSAPs (HCN2、ATP9A、SLC2A13、GAP43、SLC2A3、STXBP1、MAO-B、NDUFS7、VDAC-1 および CNTNAP1) は、ニューロンにおいて 10 倍以上 PS1 と相互作用を示すことが明らかとなった。今回評価した全ての GSAPs はニューロンでの発現が確認されているが、ニューロン選択的に PS1 と相互作用する GSAPs (図 13A 左上の象限)、ニューロン、非ニューロンともに PS1 と相互作用する GSAPs (図 13A 右上の象限)、非ニューロン細胞選択的に PS1 と相互作用する GSAPs (図 13A 右下の象限)、そしていずれの細胞型においても PS1 と相互作用しない GSAPs (図 13A 左下の象限)、に分別されることを見出した。

γ セクレターゼ阻害による末梢性の副作用を回避するためには、その GSAP が脳特異的に発現していることが望ましいと考えられる。STXBP1 は、脳において最も高い発現量を示し、神経細胞選択的に PS1 との相互作用を示すが、Notch プロセッシングにも影響を与える可能性があることが明らかとなった。神経細胞および非神経細胞の両方

において γ セクレターゼと相互作用する GSAPs のうち、GAP43、CNTNAP1 および HCN2 の mRNA 発現量はヒトにおいて他の器官と比較し脳組織で最も高いことが示された。そして、MAO-B は最も顕著にニューロン選択的な PS1 との相互作用を示した。この結果は、MAO-B および、または γ セクレターゼの細胞内局在がニューロンと HEK-APP 細胞とで異なり、翻訳後修飾または他の細胞特異的因子が相互作用に影響を及ぼしている可能性が考えられた。

すなわち、本研究において γ セクレターゼとの相互作用およびヒト組織における各 GSAPs の発現量、そして各 GSAPs が A β 産生および Notch プロセッシングに与える影響を鑑みた結果、MAO-B、HCN2、GAP43、そして CNTNAP1 の 4 分子が、A β 産生選択的な γ セクレターゼ阻害薬としての AD 治療薬のターゲット候補となり得ると考えられた。

第3章 アルツハイマー病において発現が増加する MAO-B は γ セクレターゼと相互作用することで神経細胞における A β 量を制御する

第1節 序論

筆者の研究グループでは A β 産生を選択的にアップレギュレートするが、Notch プロセッシングには影響を与えない GSAPs を複数同定した[90, 91, 92, 93, 第2章]。また、第2章において AD 治療薬の標的として望ましいと考えられる神経細胞選択的に γ セクレターゼと相互作用する GSAPs の存在を明らかにした。その中で以前の研究において AD との関連が報告されているモノアミンオキシダーゼ B (MAO-B) に着目した。AD 患者脳海馬や皮質において MAO-B 活性が増加しセロトニン量が低下していることが以前に報告されており[113, 114]、また最近の PET 研究では、予後不良の FAD 症例において早期に MAO-B 特異的リガンド ^{11}C -重水素-L-デプレニル (^{11}C -DED) の結合が増加することが示されている[115]。さらには MAO-B 阻害剤を用いた臨床試験も実施されており、AD 症状の進行がわずかながらも抑制されたという報告もある[116]。しかしながら、当時はアミンの酸化を抑制することによる黒質・線条体ニューロン機能の増強や活性酸素の放出抑制といった程度のメカニズム予測しかなく、また検証もされていなかったため、MAO-B が AD の病因に影響を与えるメカニズムについては依然未知の部分が多い。したがって本研究では、MAO-B と AD との関連についての知見を見出すことを目的とした試験を実施した。まず、ヒト脳内における MAO-B の局在を検討した。次に、神経細胞内における A β レベルに与える MAO-B の影響を検討した。また、副作用につながると考えられる Notch プロセッシングへの影響についても検討した。そしてマウスやヒトの脳内における MAO-B と活性型 γ セクレターゼとの相互作用についても第1章で作製した GTB を用いて検討した。

第2節 材料および実験方法

細胞株の培養

詳細は第1章および第2章の材料と実験方法に記載した。

ヒト脳からの薄切片における免疫組織染色

免疫組織染色を、3例の健常者サンプル、2例の孤発性 AD 症例および1例の FAD 症例（表3）のサンプルにおいて、前頭皮質、海馬および嗅内皮質について実施した。脳ブロックを4%ホルムアルデヒド中で4週間固定し、パラフィンに包埋した。クライオスタットで7 μm 厚に薄切した脳サンプルは、オートクレーブ、脱パラフィンした後、抗ウサギ抗 MAO-B 抗体 (M1821) で一次抗体反応、抗ウサギ IgG で二次抗体反応を実施した。続いて ABC-Elite HRP (Vector Laboratories) で発色させた。染色したサ

サンプルを脱水し、DPX (BDH Prolabo) でマウントした。脳薄切サンプルはヘマトキシリンで対比染色した。一次抗体を省略した陰性対照サンプルも作製した。

表 3：ヒト脳サンプルの背景

ID	Sex	Diagnosis	Heredity	Age at onset	Reached age	Braak stage	Known mutation
28	M	ND	na	na	78	na	na
84	M	ND	na	na	66	na	na
29	M	ND	na	na	86	na	na
11	M	FAD	Yes	47	68	V-VI	PS1
96	M	AD	No	55	64	V	na
40	F	AD	Yes	72	89	VI	na

F female, M male, na not applicable, ND no detectable AD pathology

マウス初代海馬ニューロンにおける免疫細胞染色

ニューロンにおける MAO-B の発現部位は、免疫細胞染色によって評価した。固定および透過処理を施したマウス初代海馬ニューロンを 10% 正常ヤギ血清 (NGS) により室温で 15 分間ブロックし、ウサギ抗 MAO-B 抗体 (OB1418) またはマウス抗 NMDAr2B 抗体 (610416, BD Transduction Laboratories) を用いて 4℃ で一晩反応させた。それぞれ PBS で 5 分間 2 回洗浄した後、Alexa Fluor 488 結合マウスモノクローナル抗 Tau-1 IgG (MAB 3420A4; Millipore)、AbberiorSTAR635 結合抗ウサギ IgG (2-0012-007-2; Abberior)、TRITC 結合 Phalloidin (P1951; Sigma-Aldrich) AbberiorSTAR635 結合抗マウス IgG (2-0002-002-0; Abberior) または Alexa Fluor 488 結合抗ウサギ IgG (A11034; Life Technologies) を用いて 37℃ で 1 時間反応させた。二次抗体のみを用いた陰性対照サンプルも作製した。最後の洗浄工程は、0.1% の Tween-20 を含む PBS を用いて、5 分間を 3 回実施した。細胞を ProLong 金退色防止リジェント (P36930; Life Technologies) でマウントし検鏡するまで 4℃ で保存した。

マウス初代海馬ニューロンの培養、固定化、透過化および PLA

詳細は第 1 章の材料と実験方法に記載した。結果は平均値 ± SEM で示し、スチューデント t 検定により陰性対照の和や阻害剤添加時の値に対する有意性を検定した。

マウス脳切片の作製

海馬および皮質ニューロンの初代培養に用いた胎児の母親マウスの脳より冠状切片を作製した。すなわち摘出した脳を 4℃ で 24 時間以上 4% ホルムアルデヒドにより固定し、次いで 10~20~30% スクロース / PBS 中に段階的に 1 日間ずつ浸漬した。その後

クライオスタットを用いて 10 μm 厚の脳冠状切片を作成し、実験に供するまで-20°Cで保存した。

マウス脳における PLA

上述の通り作製したマウス脳切片を、0.4%CHAPSO を用いて室温で 10 分間透過処理した。PLA の実施方法は、原則的にマウス海馬由来初代培養ニューロンを用いた方法と同様に実施した。GTB を用いた PLA を実施した切片については、通常のプロッキングの前にアビジンおよびビオチン (Vector Laboratories) を用いたプロッキングを実施した。ウサギ抗 MAO-B 抗体およびマウス抗 PS1-CTF 抗体を一次抗体とし、二次抗体として PLA プローブ抗マウス MINUS および抗ウサギ PLUS を用いる一般的な PLA 法と、GTB およびウサギ抗 MAO-B 抗体でのインキュベーションを一次反応とし、UV 照射した後、二次反応としてオリゴヌクレオチド MINUS プローブをコンジュゲートしたストレプトアビジンと PLA プローブ抗ウサギ PLUS でインキュベーションする GTB-PLA 法を実施した。ライゲーション、増幅、検出の工程は、上述の通りメーカーの説明書 に沿って実施した。

ヒトの脳における PLA

上述の“マウス脳における PLA”と同様にヒト脳についても PLA を実施したが、GTB を用いた PLA についてはオリゴヌクレオチドを直接コンジュゲートした抗 MAO-B 抗体を使用した (図 18A)。最初に、パラホルムアルデヒドで固定しパラフィン包埋されたヒト前頭皮質を 10 μm に薄切後、脱パラフィン、水和さらにエピトープ露出のため 20 分間 120°C で DIVA Decloaker (Histolab) 中でオートクレーブした。室温まで冷却後、切片を水道水で 5 分間洗浄した。GTB を用いた PLA を実施した切片については、アビジンおよびビオチン (Vector Laboratories) を用いたプロッキングを実施し、他の工程は上述の“マウス脳における PLA”と同様に実施した。最後の洗浄ステップ後、切片を Alexa Fluor 488 コンジュゲート FluoroPan ニューロンマーカー抗体 (Merck Millipore) 又は Alexa Fluor 594 コンジュゲート抗 Glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体 (ThermoFisher Scientific) を用いて 4°C で一晩反応させた。PBS で洗浄したスライドを暗所で乾燥させ、DAPI を含む封入剤で包埋した。

HEK 細胞における遺伝子ノックダウンによる A β および NICD の測定

MAO-B の siRNA は以下のものを購入して用いた。

✓ MAO-B siRNA1 (Ambion, ID s8493) :

センス鎖 siRNA (GGACUUACACUCUUAGGAAtt) および

アンチセンス鎖 siRNA (UCCUAAGAGUGUAAGUCctg)

✓ MAO-B siRNA2 (Ambion, ID s8494) :

センス鎖 siRNA (GGACCAACCCAGAAUCGUAtt) および

アンチセンス鎖 siRNA (UACGAUUCUGGGUUGGUCCaa)

方法の詳細は第 2 章の材料と実験方法に記載した。

HepG2 細胞における MAO-B の過剰発現の A β 産生に与える効果

MAO-B の内因性発現量は低く、形質導入が容易である HepG2 細胞を培養し、20 MOI (multiplicity of infection) の C99 (APP の断片であり、 γ セクレターゼの直接の基質となる) を含有する BacMam ウイルス (BacMam-C99) または 25、50 および 100 MOI の MAO-B (BacMam-MAO-B) により形質導入した[93]。その培養上清を 24 時間後に回収し、fluorescence resonance energy transfer をベースとした均一時間分解蛍光 (HTRF) アッセイ (Cisbio) を用いて A β 40 産生量を測定した[93]。細胞生存率は WST8 アッセイ (JM-K302; MBL) により評価した。細胞の相対的生存率は評価サンプルのデータをコントロール BacMam 導入サンプルのデータで除した。結果は平均値 \pm SD で示し、スチューデント t 検定によりコントロールに対する有意性を検定した。

siRNA による皮質ニューロンにおける遺伝子ノックダウン

7 日間培養したマウス初代培養皮質ニューロンにおいて、内因性 MAO-B 遺伝子をサイレンシングした。より長期間培養したニューロンと比較してトランスフェクション効率および細胞生存率が高かったため、培養 7 日目のニューロンを用いた。MAO-B siRNA2 およびコントロール siRNA (All Stars Negative siRNA; Qiagen) は 1 または 0.1 μ M の濃度 に希釈し、Opti-MEM 中で MAO-B siRNA2 またはコントロール siRNA とリポフェクタミン (LF) 3000 (Invitrogen) との複合体を形成させ (室温で 20 分間) た。皮質神経細胞に siRNA を 2 用量に分けて (最終濃度として 0.36 または 2.9 nM) トランスフェクトし、CO₂ インキュベーター内において 37°C で 30 時間培養した。細胞を室温で 10 分間 4%ホルムアルデヒドにより固定し、PBS で洗浄した後、PLA および染色に供するまで 4°C で保存した。神経細胞への siRNA の取り込み/トランスフェクション効率を評価するため、同じ濃度および条件で、蛍光標識したコントロール siRNA (All Stars Negative siRNA-AF488 (1027280; Qiagen)) を用いた実験も実施した。

siRNA 処理したニューロンの PLA および免疫細胞化学

siRNA 処理後の神経細胞内における MAO-B の可視化および定量化を目的として、従来の免疫組織化学と比較して特異性および感度が向上した PLA 法を用いた。PLA によ

り、シグナルが過飽和になる核内やシグナルが微小である小さな神経突起上での検出も可能となった。本試験では PLA を用いた MAO-B の定量と一般的な免疫細胞化学を用いた A β 42 の定量を組み合わせで評価した。PLA はタンパク質相互作用を検出する方法ではあるが、1 種類の抗 MAO-B 抗体と、2 つの異なるオリゴヌクレオチド鎖 (PLUS および MINUS) をコンジュゲートした二次抗体を用いることで MAO-B のみを検出することが可能となる[第 1 章、第 2 章]。以下簡潔に方法を記す。siRNA 処理、4%ホルムアルデヒド固定、0.4%CHAPSO 透過処理した細胞をブロッキング溶液 (Olink Bioscience) により 37°C で 30 分間反応させた。ウサギ抗 MAO-B (OB1418) 抗体およびマウス抗 A β 42 抗体 (clone G2-11, No. MABN12, Millipore) で一次抗体反応を実施した (37°C で 1 時間)。二次抗体反応、ライゲーシオン反応、増幅反応および Duolink™ II far red (Olink Bioscience) はメーカーの説明書 に従った。PLA の工程終了後、TRITC 結合ファロイジン (P1951, Sigma-Aldrich) および抗マウス IgG Alexa Fluor 488 結合抗体 (A11001, Invitrogen) を添加し 4°C で一晩反応させた。最後に PBS で洗浄し、DAPI 含有マウントメディウムで包埋した。

MAO-B 遺伝子ノックダウン後のニューロン中 MAO-B および A β 42 の定量

ニューロンの奥行き・深さについての評価は、Z スタッキングを用いた。各サンプルにつきトランスフェクション実験を 2 回繰り返し、少なくとも 5 つの領域をランダムに選択 (224.8 μ m \times 224.8 μ m) した。画像処理は、ImageJ 1.47 ソフトウェア (NIH) を用いた。個々のニューロンを含む領域 (ROI) は、ファロイジン染色像に基づいて選択した。0.54 μ m の間隔で Z スタックスキャンによって撮影した画像の平均強度で表される Z-projections を、MAO-B の PLA シグナルおよび個々の ROI 内における A β 42 染色の定量化に使用した。MAO-B および A β 42 シグナルの補正総細胞蛍光 (CTCF) は以下の式にしたがって算出した: $CTCF = \text{集積密度} - (\text{選択されたセルの面積} \times \text{バックグラウンド蛍光の平均})$ 。CTCF 値はコントロール siRNA 処理したサンプルから得た CTCF 値を 1.0 と設定し補正した。結果は平均値 \pm SEM で示し、スチューデント t 検定によりコントロールに対する有意性を検定した。

第 3 節 実験結果

MAO-B のヒト脳内ニューロンでの発現と、AD 脳内における増加

AD 患者および健常対照者の脳において MAO-B が発現する細胞等に差異があるかどうかを検討するため、前頭皮質、海馬 CA1 および嗅内皮質から作製した薄切片を、抗 MAO-B 抗体を用いて免疫組織化学染色した。前頭皮質層 I-VI および白質における MAO-B の代表的な染色像を、健常対照者、AD 患者、そして FAD 患者からそれぞれ 1 例ずつ示す (図 15A)。他の健常対照者、AD 患者においても同様の染色像が認められ

た。また AD 患者と FAD 患者では健常対照者と比較して明らかな皮質の萎縮が認められ、第 I-IV 層が薄くなっていた。皮質領域全体において細胞内の MAO-B 発現は、健常対照者と比較して AD および FAD 患者でより強かった。AD および FAD 患者の皮質第 I-II 層においてプラークの染色像が認められた (図 15B)。皮質第 III 層の錐体ニューロンにおいては、細胞体および樹状突起が染色されていたが、これは健常対照者よりも AD および FAD 患者において顕著に強かった (図 15C)。AD および FAD 患者では白質においてアストロサイトおよびミクログリアの染色が増加しており (図 15D)、またプラーク周囲には MAO-B 陽性細胞が AD および FAD 患者の両方で認められ (図 15E)、その大部分は、アストロサイト様の形態を示した。海馬 CA1 領域では、ニューロンおよびグリア細胞は MAO-B 陽性であり、AD 患者では健常対照者よりも強く染色された (図 16A)。AD 患者ではニューロンの脱落が認められ、CA1 に残存する変性ニューロンでは細胞体、樹状突起および軸索において強い MAO-B 染色が認められた (図 16B)。嗅内皮質についても、健常対照者と比較して AD 患者ではグリア細胞およびニューロンに強い染色を示し、また AD 患者ではニューロンの大幅な脱落が認められた (図 16C)。

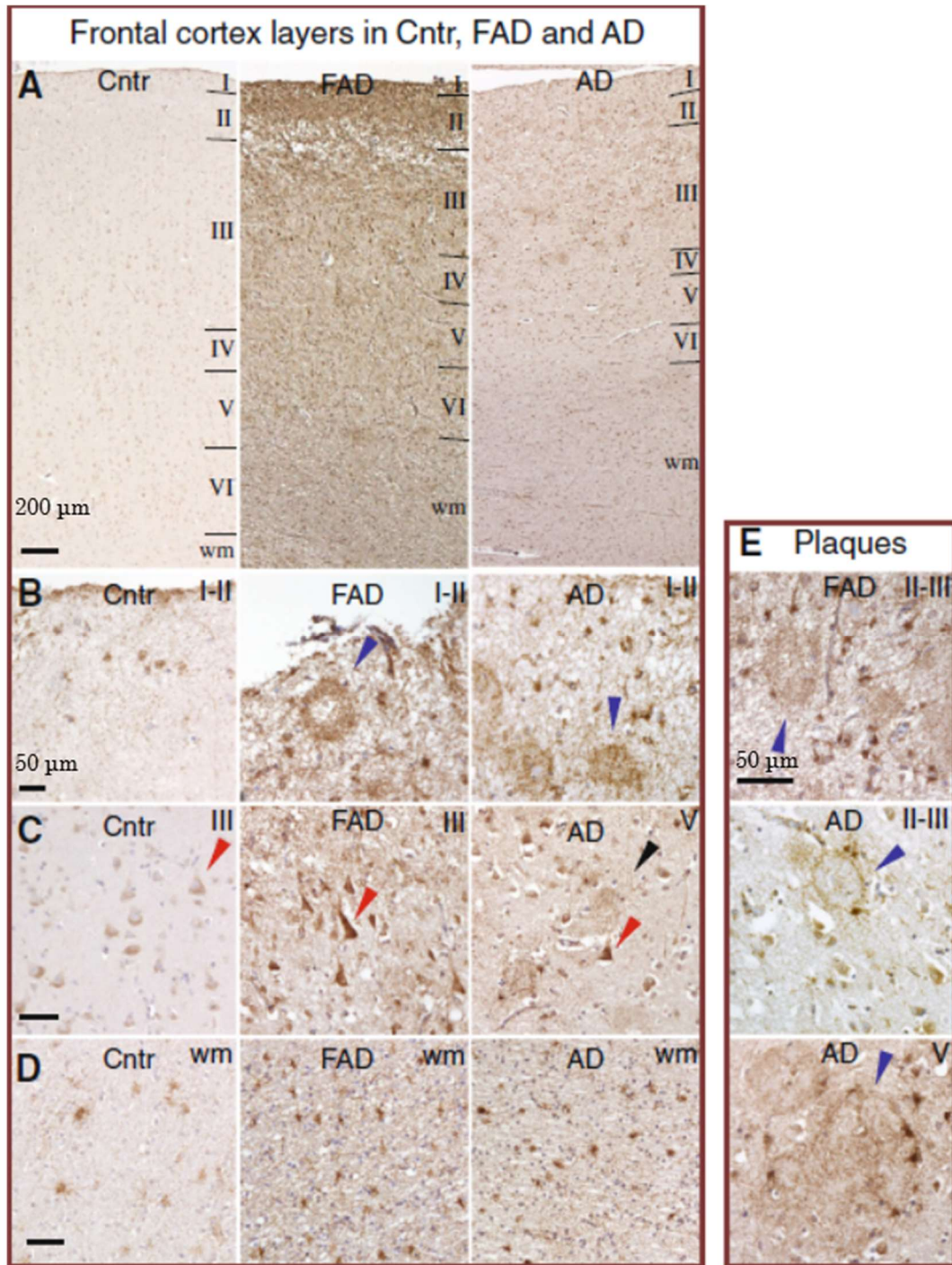


図 15 : ヒト大脳皮質における MAO-B の免疫組織化学染色

(A) 健常者(Cntr)、FAD 患者、AD 患者大脳皮質の代表的な染色像。(B) FAD および AD 患者大脳皮質第 I~II 層のアミロイドプラーク (青矢印) を含む染色像。(C) 大脳皮質第 III~IV 層における FAD および AD 患者の錐体細胞の強い染色像 (赤矢印) および神経突起 (黒矢印)。(D) 白質におけるアストロサイト様の染色像。健常者と比較して FAD や AD 患者において強い染色像が認められる。(E) 大脳皮質第 II~III および第 IV 層におけるアミロイドプラーク (青矢印) の染色像。

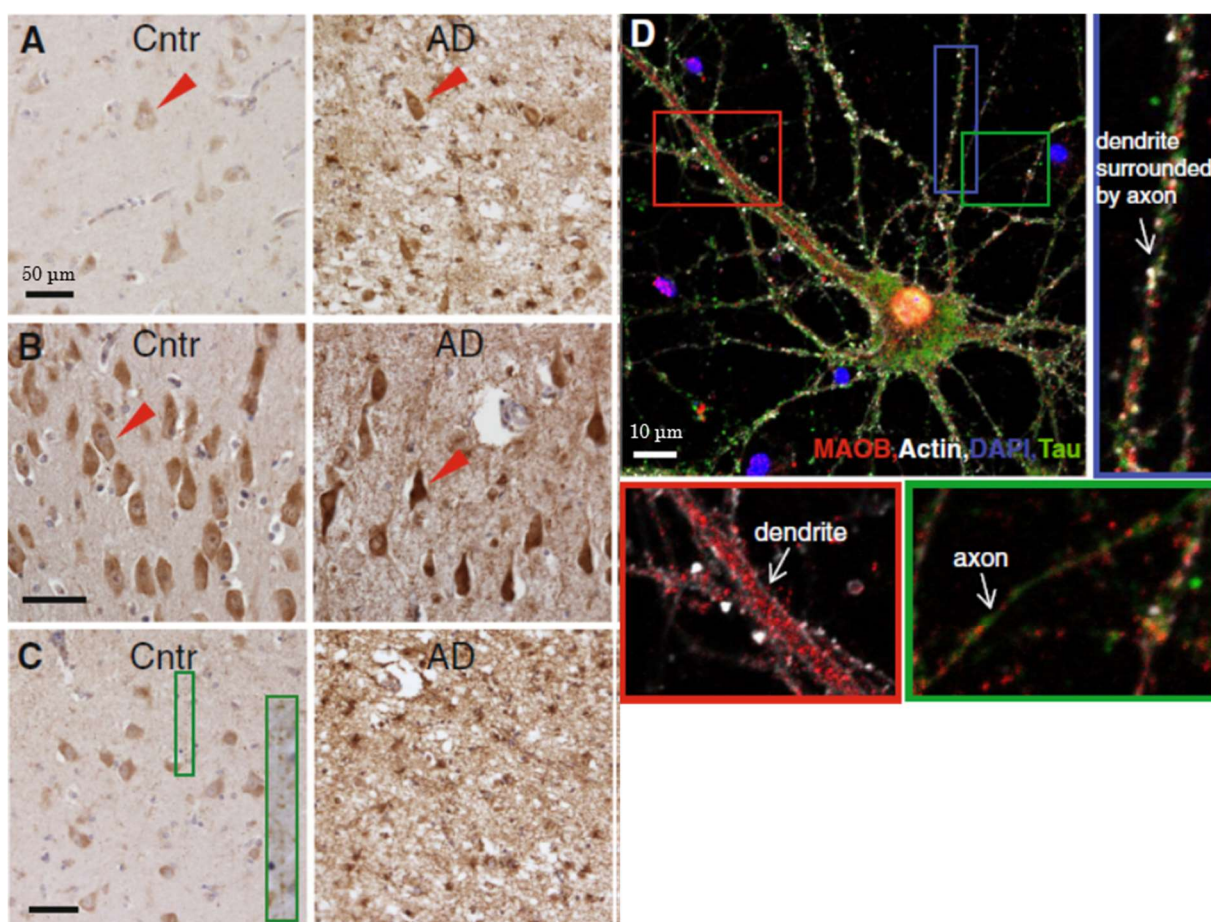


図 16：ヒト海馬および嗅内皮質における MAO-B の免疫組織化学染色、およびマウス初代海馬ニューロンにおける MAO-B の免疫細胞化学染色

(A)健常者(Cntr)および AD 患者海馬 CA1 領域における MAO-B の染色像。AD 患者では神経脱落が認められる一方、残存神経においては強い染色像が認められ、繊維やアストロサイト様の染色像も認められる。(B)海馬 CA1 錐体細胞層における MAO-B 染色の強拡大像。健常者と比較して AD 患者では細胞間で染色強度にバラツキがある。赤矢印は錐体細胞の一例を示す。(C)嗅内皮質第 II 層における MAO-B の染色像。緑枠内は軸索の染色像を強拡大したもの。(D)マウス初代海馬ニューロンにおける MAO-B の免疫細胞化学染色像。赤枠は太い樹状突起を、青枠は細い樹状突起を、緑枠は軸索を示す。

MAO-B の初代海馬ニューロンにおける細胞体、樹状突起および軸索での発現

MAO-B のニューロン内発現分布をさらに詳細に検討するため、マウス初代海馬ニューロンで免疫細胞化学染色を実施した。軸索マーカーとして抗 Tau-1、アクチンに結合するファロイジン、および核マーカーとして DAPI を用いて染色した。MAO-B は細胞体、樹状突起および軸索での発現が認められた (図 16d)。マウス初代海馬ニューロンは樹状突起周囲や樹状突起間に軸索が存在し、MAO-B がこれらの両方に存在することが示された。MAO-B がシナプスに近接して局在するかどうかを検討するため、MAO-B および NMDAr2B、DAPI およびファロイジンの各抗体を用いた染色を実施した。

NMDAr2B は NMDA 受容体のグルタミン酸結合サブユニットであり、その大部分はグルタミン酸作動性シナプスのシナプス後細胞膜中に存在する[117]。ほぼ全ての錐体ニューロンは NMDAr2B を発現しており（図 17A）、樹状突起上の多くのスパインにおいて NMDAr2B の濃い染色像が認められた。MAO-B の染色もまた NMDAr2B 含有スパイン近傍の軸索において観察された（図 17B）。

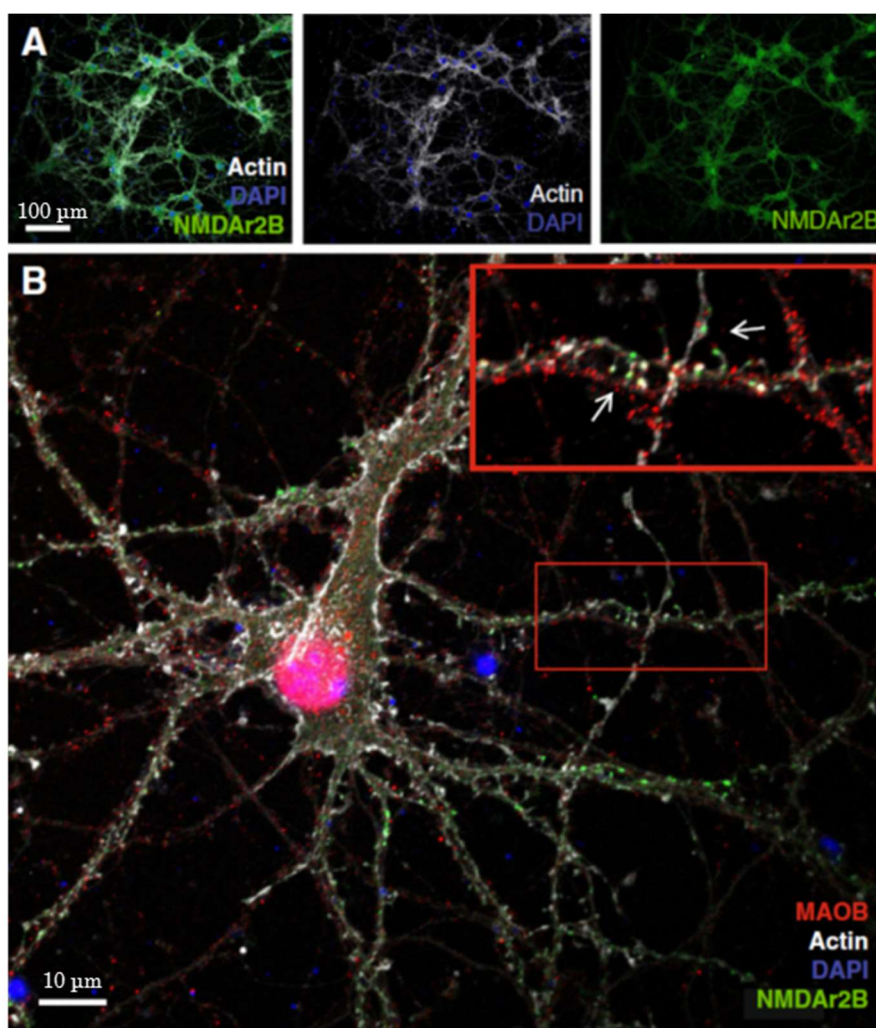


図 17：マウス初代海馬ニューロンにおける MAO-B の免疫細胞化学染色

(A)弱拡大の染色像。ほとんど全てのニューロンが NMDAr2B を発現していることが分かる。(B)強拡大の染色像。赤枠は NMDAr2B を多く含むスパインと対側の軸索に含まれる MAO-B を示す。

初代海馬ニューロンにおける MAO-B と γ セクレターゼとの相互作用

免疫組織化学および免疫細胞化学による検討により、MAO-B が錐体ニューロンに発現しており、また健常対照者と比較して AD 患者脳では MAO-B の染色強度が増加していることが明らかとなったため、初代海馬ニューロンを用いて PLA 法によるより近接な相互作用を検討した。以前の報告において、MAO-B と PS1 は初代海馬ニューロンに

において抗体を用いた PLA により近接相互作用することが既に示されている[第 2 章]が、ここでは活性型 γ セクレターゼを認識する GTB とオリゴヌクレオチドプローブを直接コンジュゲートした抗 MAO-B 抗体を用いた PLA を実施した。図 18A に試験条件を示し、過剰量の γ セクレターゼ阻害剤により競合させる陰性対照も実施した(図 18D)。結果、PLA シグナルが検出され(図 18B、C)、阻害剤によりシグナルが消失することが確認された(図 18E、F)。PLA シグナル数は、陰性対照の和よりも相互作用試料 6.5 倍多く(図 18G)、このことから MAO-B が活性型 γ セクレターゼと近接相互作用していることが確認された。

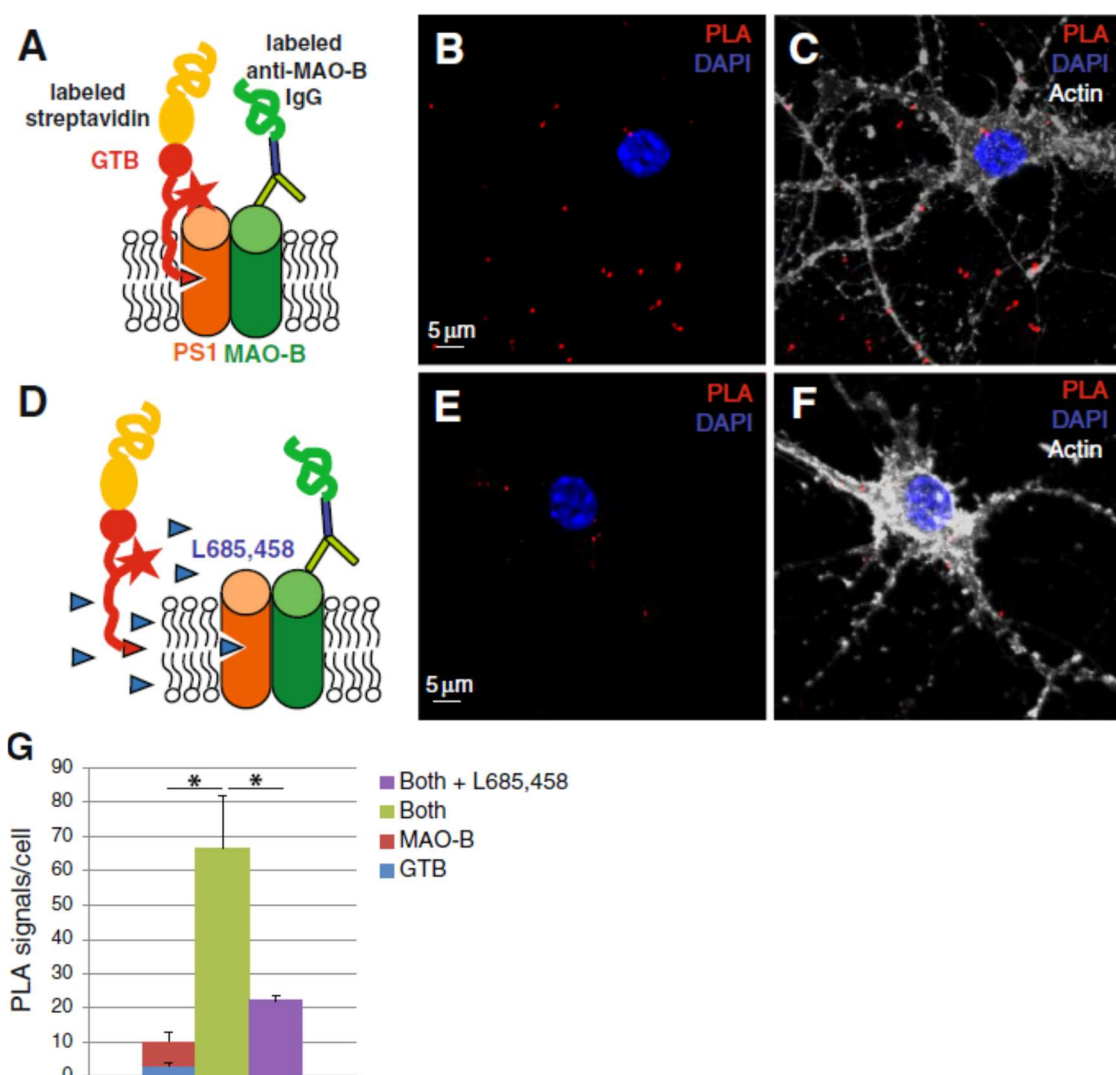
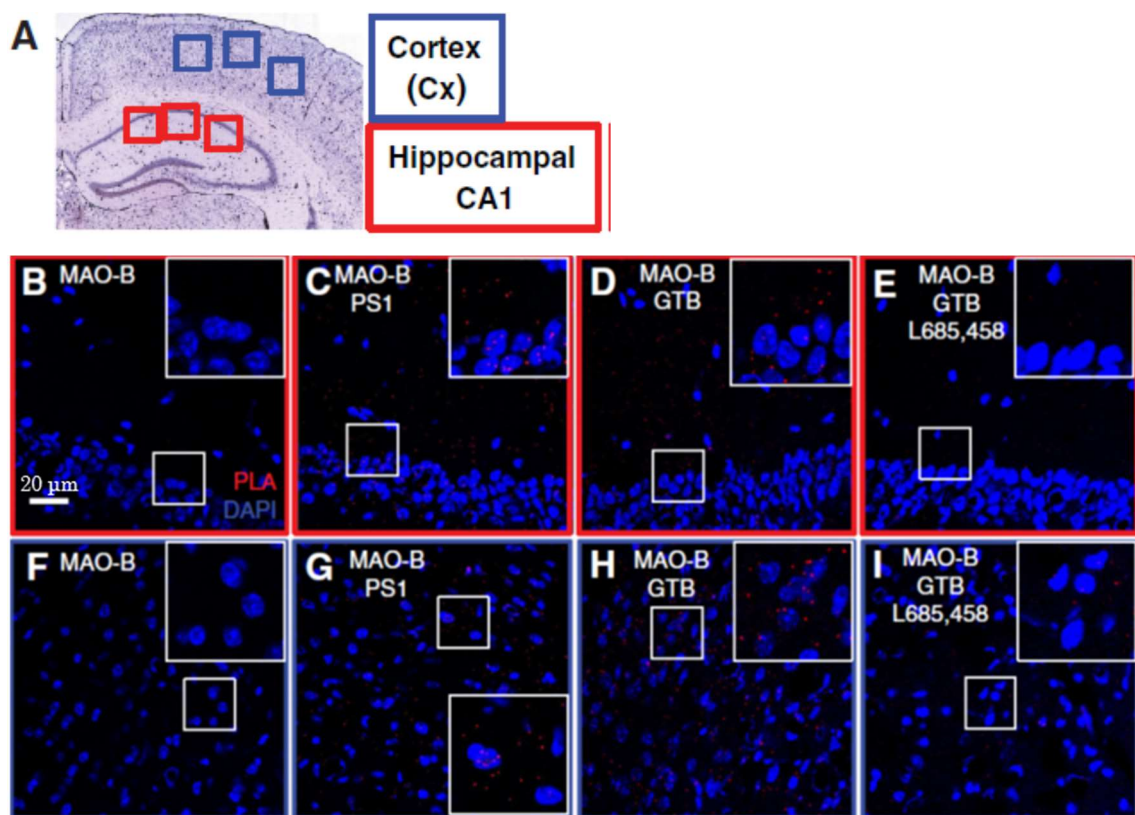


図 18 : PLA を用いたマウス初代海馬ニューロンにおける MAO-B と γ セクレターゼとの近接相互作用評価

(A, D)GTB とオリゴヌクレオチドプローブをコンジュゲートした抗 MAO-B 抗体を用いた PLA の模式図。L685,458 非存在下(A)および存在下(D)で比較した。代表的な画像を B, C, E, F に示す。(G)1 細胞当たりの PLA シグナルを定量した結果をグラフ化したものを少なくとも 3 細胞以上の平均値 \pm SEM で示す。* $P < 0.05$

マウス脳における MAO-B と γ セクレターゼとの相互作用

様々な脳領域における γ セクレターゼと MAO-B との相互作用を評価するため、マウス脳の大脳皮質および海馬 CA1 領域由来の薄切片を用いた PLA を実施した(図 19A)。陰性対照サンプルではほとんどシグナルは検出されなかった(海馬: 図 19B、大脳皮質: 図 19F)。MAO-B および PS1 に対する抗体を用いた PLA では、海馬(図 19C) および大脳皮質(図 19G) 両方において近接相互作用が確認された。加えて、活性型 γ セクレターゼを認識する GTB と抗 MAO-B 抗体を用いた PLA によっても、海馬(図 19D) および大脳皮質(図 19H) における近接相互作用が確認された。GTB を用いた PLA では、PLA シグナルのほとんどが過剰量の γ セクレターゼ阻害剤 L-685,458 によって消失することも確認された(図 19E、I)。PLA シグナルは、各試験それぞれ少なくとも 3 枚以上画像より定量した(図 19J、K)。GTB を用いた PLA では、検出されたシグナルが陰性対照の和と比較して 14 倍(海馬) および 7 倍(大脳皮質) に増加しており、従来の抗体のみを用いた PLA でのシグナル数が陰性対照の和に対して 10 倍(海馬) および 8 倍(大脳皮質) 増加していたことを鑑みると、少なくとも同等以上のシグナルが検出できていることから、成熟マウス脳内において MAO-B と PS1 との近接相互作用は、その大半が活性型 γ セクレターゼ上で起こっていることが示唆された。



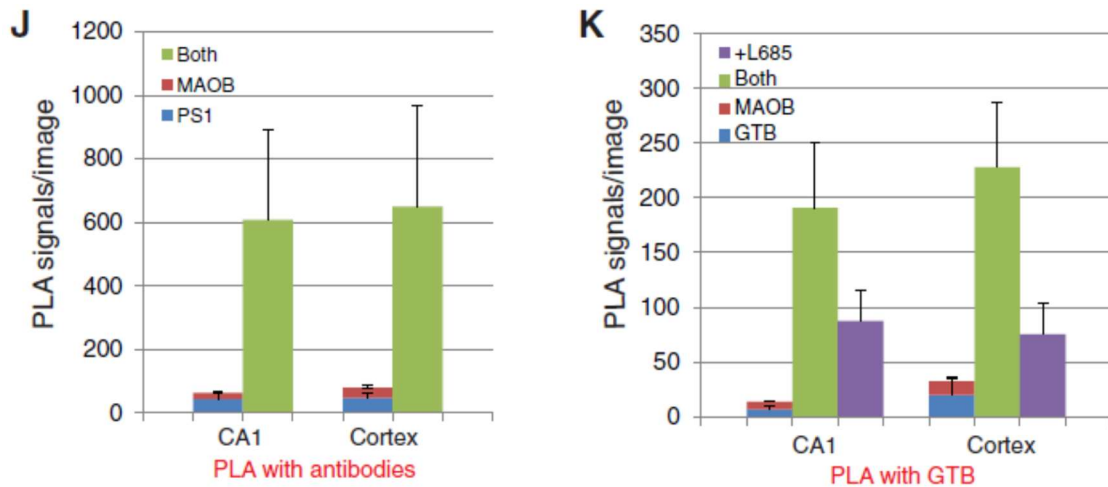


図 19 : PLA を用いたマウス大脳皮質および海馬における MAO-B と γ セクレターゼとの近接相互作用評価

(A)PLA 画像の取得エリアを青枠（大脳皮質）、赤枠（海馬 CA1）で示す。(B-E)代表的な PLA 画像を示す。B, C, F, G は従来法で実施した PLA 画像で、D, E, H, I は GTB を用いた PLA 画像。B, F は抗 MAO-B 抗体のみで一次反応を実施した陰性対照サンプル。C, G, D, H は実際の評価サンプル。E, I は過剰量の L-685,458 存在下で反応させた競合阻害サンプル。それぞれの方法で実施した PLA シグナルの定量結果を J, K に示す。データは 3 試験以上の平均値 \pm SEM で示す。

ヒト前頭皮質切片における MAO-B と γ セクレターゼとの相互作用

次に、健常対照者および AD 患者の脳内における MAO-B と γ セクレターゼとの近接相互作用を PLA により検討した。MAO-B および PS1 に対する抗体を用いた従来の PLA と、GTB を用いた PLA の両方を実施した。健常対照者脳（図 20A, C）および AD 患者脳（図 20B, D）において従来の PLA 法によりシグナルが検出された。シグナルは、主に神経細胞（図 20A-D）で検出されたが、一部はアストロサイトマーカーである GFAP 陽性の細胞においても検出された（図 20E）。検出された PLA シグナルは、陰性対照の和と比較して数倍の増加が認められた（図 20F）。ヒトの脳における PLA シグナル数にはバラツキが大きく、健常対照者脳と AD 患者脳との間に統計学的に有意な差を検出できなかった。従来の PLA と同様に、GTB を用いた PLA においても健常対照者脳（図 20G, I）および AD 患者脳（図 20H, J）双方で、ニューロンおよびアストロサイトにシグナルが検出された。FluoroPan ニューロンマーカーおよびアストロサイトマーカー GFAP での染色により、AD 患者脳においては健常対照者脳と比較して正常ニューロンが脱落しており、反応性と考えられるアストロサイトも増加していた（図 20G-J）。

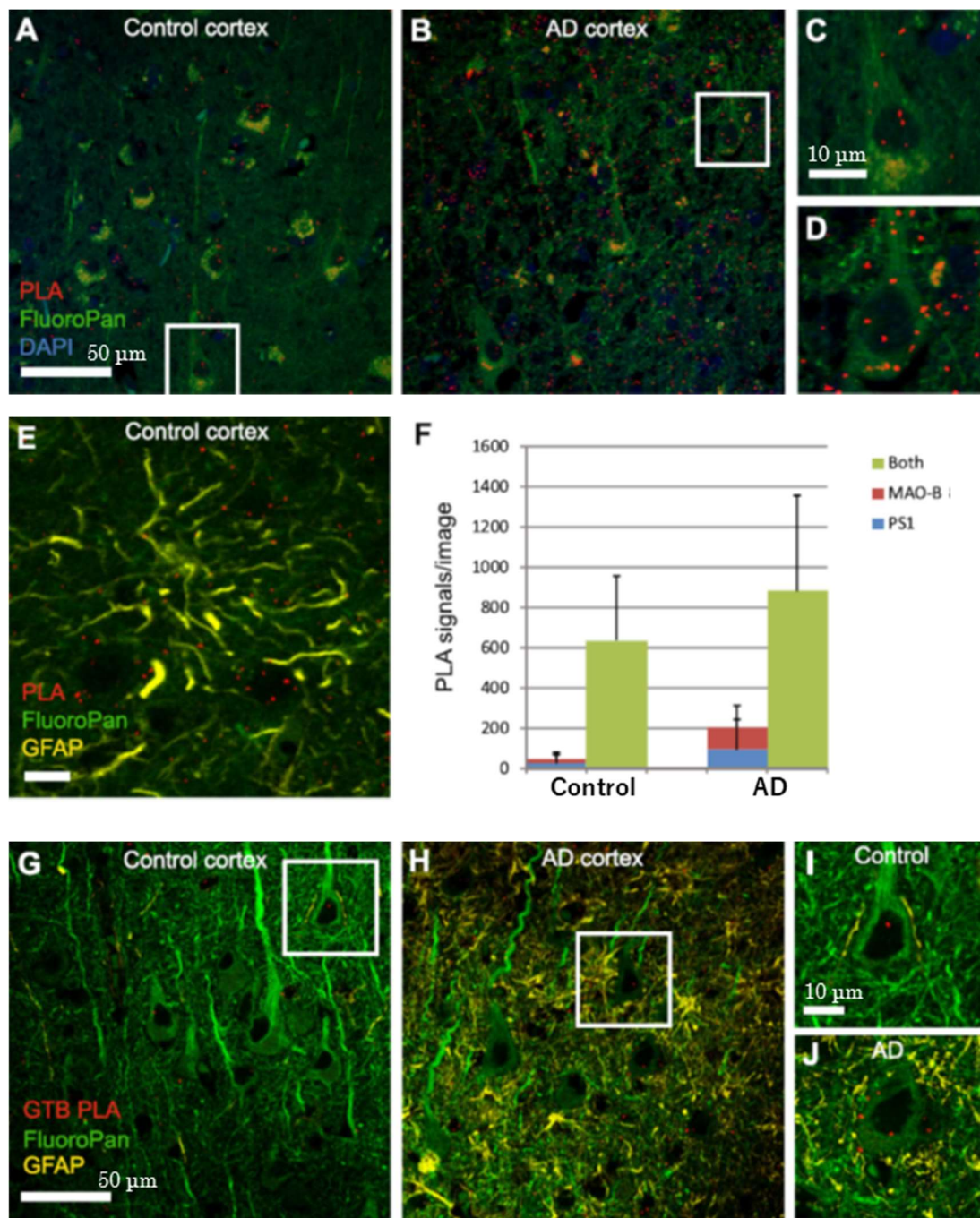


図 20 : PLA を用いたヒト死後脳大脳皮質における MAO-B と γ セクレターゼとの近接相互作用評価

従来法の PLA を用いた MAO-B と γ セクレターゼとの近接相互作用評価の代表的な画像を A-E に示す。A は健常者脳、B は AD 患者脳、C, D はそれぞれ A, B の白枠部分の強拡大像。健常者脳では PLA シグナルがニューロンだけではなくアストロサイトにも認められる(E)。従来法の PLA 結果をグラフ化し F に示す (平均値 \pm SEM)。GTB を用いた PLA による MAO-B と γ セクレターゼとの近接相互作用評価の代表的な画像を G-J に示す。G は健常者脳、H は AD 患者脳、I, J はそれぞれ G, H の白枠部分の強拡大像。

MAO-B ノックダウンによる A β 産生および Notch プロセッシングに与える影響

MAO-B と γ セクレターゼが相互作用していることが確認できたため、次に A β 産生や Notch プロセッシングに対する MAO-B の影響について検討した。まず、HEK-APP 細胞において MAO-B 発現をノックダウンし、A β 産生量を ELISA によって、また Notch 切断産物である NICD 産生量をウェスタンブロッティングにより検討した。A β 測定には HEK-APP 細胞を、NICD 測定には Notch Δ E 細胞を使用した。MAO-B に対する二種類の siRNA を使用し、ノックダウン効率は 1.8 pmol で共に 93% であり 6.0 pmol で 95-96% であることを確認した（データ省略）。また全ての試験（3~4 回）において、細胞生存率はコントロールサンプルの 88% 以上であることを確認した（データ省略）。結果、A β の産生量は A β 40 および A β 42 とともに有意ではなかったものの減少傾向が認められた（図 21A）。一方で、Notch プロセッシングに関しては、MAO-B ノックダウンによる NICD 産生量の変化は認められなかった（図 21B）。

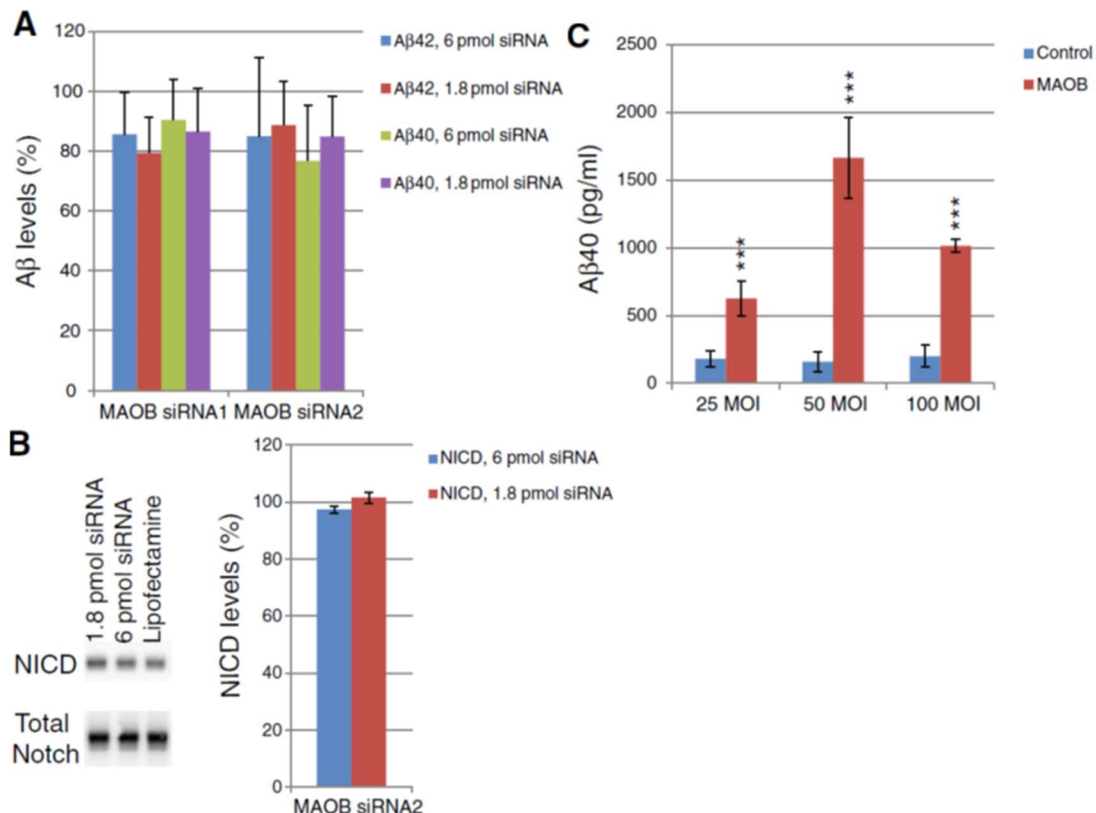


図 21: MAO-B のノックダウンと過剰発現による A β 産生および Notch プロセッシングへの影響

HEK-APP 細胞に MAO-B に対する 2 種類の siRNA を導入した 24 時間後の培養上清における A β 40 および A β 42 レベルを ELISA で測定した(A)。Notch Δ E 細胞に MAO-B に対する siRNA を導入した 3 日後の細胞溶解液中の NICD レベルをウェスタンブロッティングにより測定した(B)。HepG2 細胞に MAO-B および C99 を過剰発現させた 24 時間後の培養上清における A β 40 レベルを HTRF アッセイで測定した(C)。グラフは全て平均値 \pm SEM (n = 8) で示す。*** P < 0.001 with t-test。

MAO-B 過剰発現による A β 産生量の増加

MAO-B の発現量増加が A β 産生量に与える影響を検討するため、MAO-B および C99 (APP の β セクレターゼ切断産物であり、 γ セクレターゼの基質) を過剰発現させた HepG2 細胞を用いて A β 40 量を測定した。HepG2 細胞は、MAO-B や APP の発現が低い肝臓由来細胞株であり、トランスフェクション効率が高いため本試験に適していることから本細胞を使用した。BacMam-C99 および BacMam-MAO-B を同時に感染させることにより各タンパク質を過剰発現させた。細胞生存率はウイルス処理によって変化しないことを確認し、HepG2 細胞ではほとんど発現していない MAO-B が発現していることをウェスタンブロッティングにより確認した (データ省略)。A β 40 は HTRF アッセイによって測定した (A β 42 は測定できなかった) [93]。結果、MAO-B の過剰発現により C99 存在条件下では A β 40 産生量も有意に増加した (図 21C)。

マウス初代ニューロンにおける MAO-B 遺伝子ノックダウンによる細胞内の A β 42 レベルの低下

HEK-APP 細胞においては MAO-B ノックダウンにより A β 産生の減少が顕著ではなかったが、これは HEK-APP 細胞における PS1 と MAO-B との相互作用の程度が低いことが要因である可能性が考えられた。一方、マウス初代海馬ニューロンにおいては PS1 と MAO-B との相互作用の程度が高かった[第 2 章]。AD 患者脳のニューロン内においては A β 42 レベルが上昇し、それが神経毒性作用を有すると考えられているため [118]、初代海馬ニューロン内において MAO-B をノックダウンすることにより A β レベルが顕著な影響を受けるかどうかを評価した。単一細胞内の MAO-B および A β 42 について蛍光強度を基に定量した。MAO-B のノックダウンにより、細胞形態への影響はないが (図 22A, B, E, F)、MAO-B タンパク質の発現レベルが顕著に低下し (図 22C, G, I, J)、それに伴い A β 42 レベルが有意に低下することが分かった (図 22D, H, I, J)。また、単一細胞における定量的分析により、MAO-B タンパク質および細胞内 A β 42 のレベルは siRNA 処理の有無に関わらず相関することが明らかになり (図 23)、このことにより内在性の MAO-B が A β 産生を調節している可能性が考えられた。

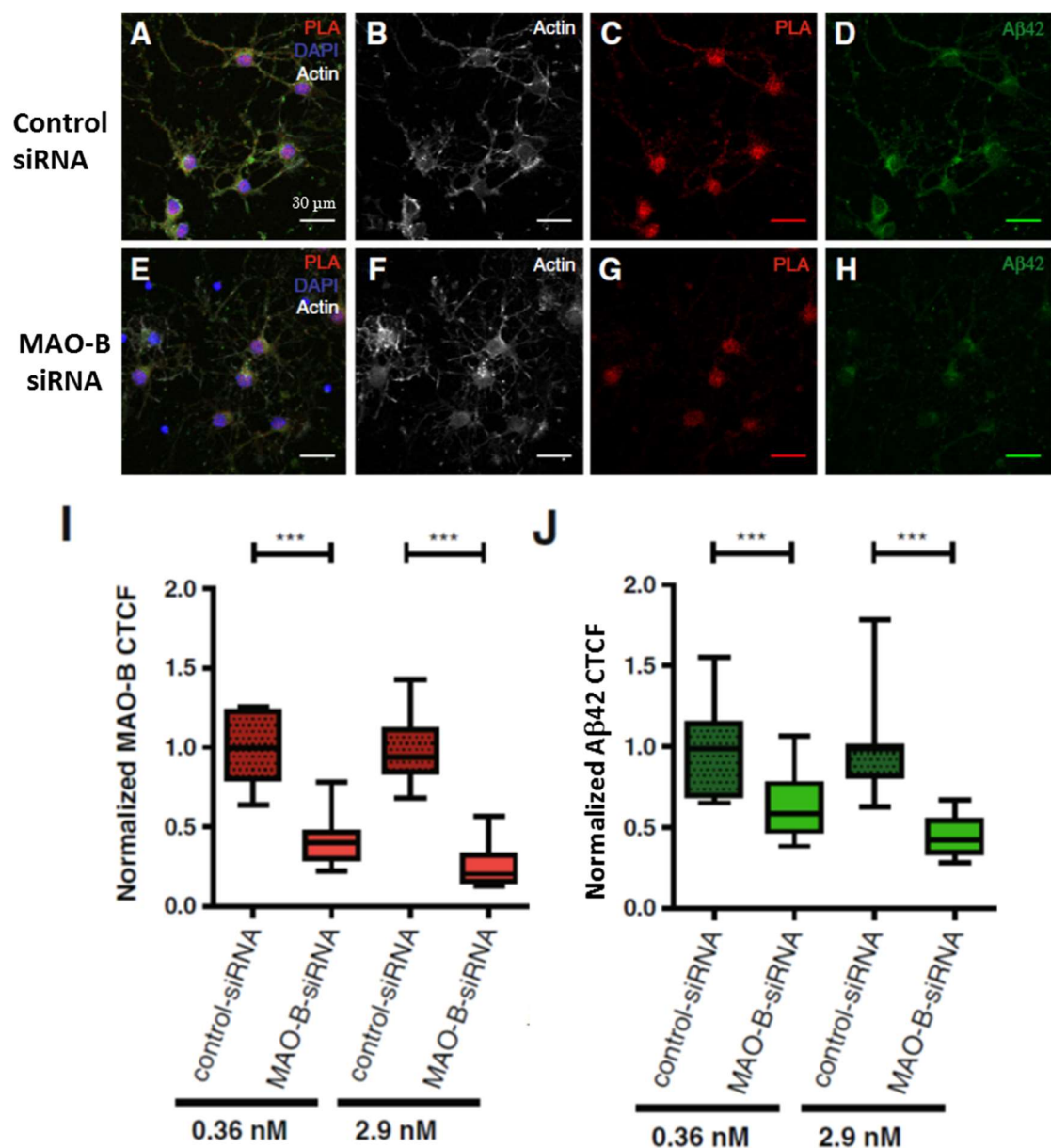


図 22 : MAO-B ノックダウンによる MAO-B および細胞内 Aβ42 レベル

Control siRNA (A)または 2.9 nM の MAO-B siRNA (E)処理をしたマウス初代皮質ニューロンに対し、抗 MAO-抗体のみを用いた PLA による MAO-B 染色 (赤、C, G)、抗 Aβ42 抗体を用いた免疫細胞化学染色 (緑、D, H)、抗ファロイジン抗体を用いたアクチン染色 (白、B, F)、および DAPI を用いた核染色 (青、A, E) を実施した。I, J では 2 濃度の siRNA 処理を評価し、コントロール siRNA 処理した染色像の蛍光強度を 1 として補正した結果を四分位グラフにて示した。I は MAO-B レベルを J は Aβ42 レベルを示した。*** P < 0.001 with t-test

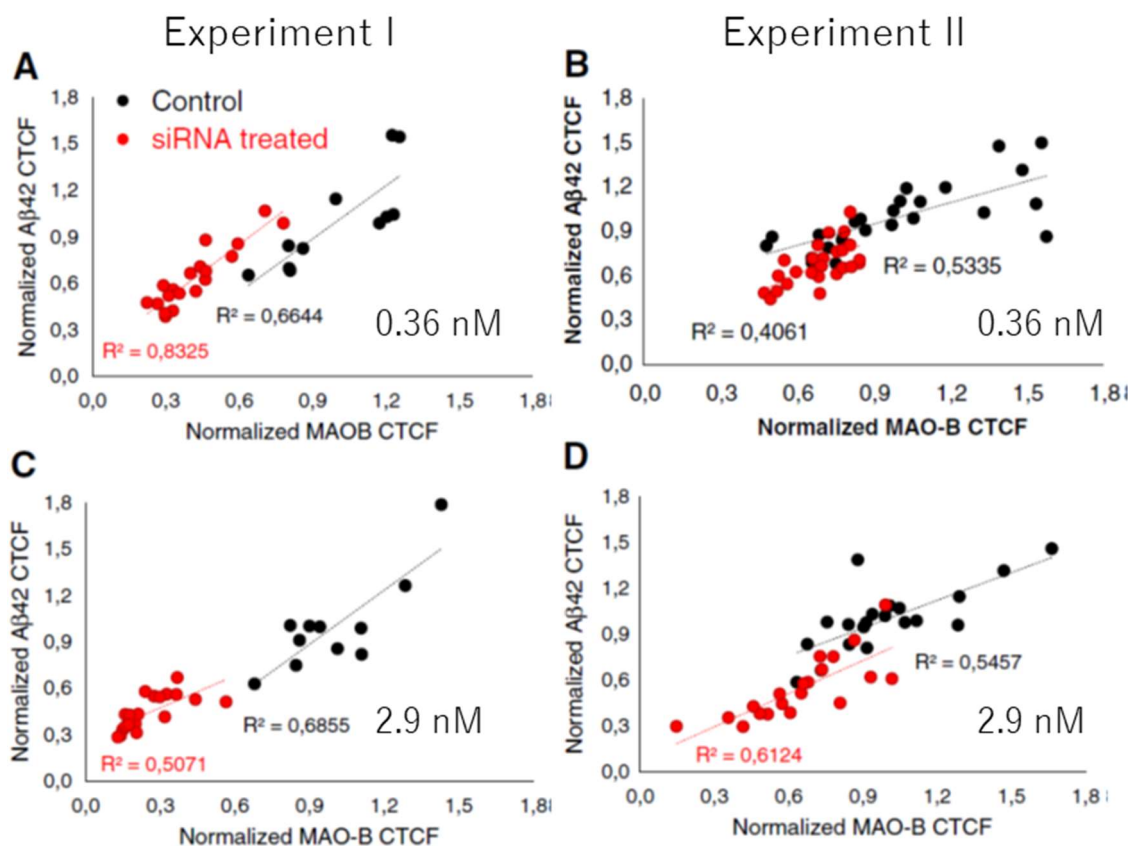


図 23 : マウス初代皮質ニューロンにおける MAO-B と細胞内 Aβ42 レベルとの相関

図 22 で示した MAO-B および Aβ42 レベルの結果を単一細胞毎にプロットした。A, C が 1 回目の実験結果であり、B, D が 2 回目の実験結果である。また A, B は 0.36 nM の siRNA 処理をした実験結果であり、C, D が 2.9 nM の siRNA 処理をした実験結果である。

第 4 節 考察

本研究では、MAO-B と γセクレターゼが近接相互作用し Aβ産生に影響を及ぼすことを明らかにした。この知見は、AD の病因に MAO-B が関与している可能性があるという以前の報告とも整合性がある。今回、前頭皮質、海馬および嗅内皮質中のニューロンおよびグリア細胞における MAO-B の免疫組織化学染色を実施し、健常対照者脳と比較して、孤発性 AD および FAD 患者脳において染色強度の上昇が認められた。アストロサイトにおいても MAO-B 染色が増加していること、および AD 患者脳内においてプラークを取り囲むように MAO-B 陽性アストロサイトが存在することは、以前の報告とも一致する[119, 120]。一方で、前頭前皮質錐体ニューロン、海馬 CA1、嗅内皮質において MAO-B レベルが上昇するという結果は、本研究において初めての見出した知見である。

MAO-B が GSAPs であることは、γセクレターゼ特異的なプローブを用いたアフィニティ精製によって見出され、その後、γセクレターゼ構成分子と MAO-B が共免疫沈降

されることが確認された。ニューロンにおける MAO-B 発現が AD 患者脳において増加しているという知見と合わせて考えた結果、MAO-B と γ セクレターゼとの関係についてニューロンや脳組織を用いてさらなる詳細な研究を実施した。タンパク質-タンパク質相互作用は PLA 法を用いて評価した。本研究においては 2 種類の抗体を用いる従来の PLA 法と γ セクレターゼ活性部位を特異的に認識する GTB を用いた GTB-PLA 法の両方を実施した[第 1 章、第 2 章]。GTB-PLA 法により、MAO-B が活性型 γ セクレターゼと近接相互作用することを確認し、マウス初代海馬ニューロンならびにマウス脳内の皮質および海馬、そしてヒト大脳皮質内においても近接相互作用することを確認した。また一部の相互作用はアストロサイトにおいても認められることを確認した。AD 患者脳においては健常対照者脳と比較して統計学的に有意ではなかったものの PLA シグナル強度の上昇傾向が認められた。AD 患者脳においてはニューロンの脱落割合がサンプル間で異なるため、残存ニューロンにおける PLA シグナルの増加作用がマスクされることによりバラつきが大きくなった可能性がある。

MAO-B は主にミトコンドリア外膜に局在すると考えられるが、ER およびリソソーム等他の細胞内器官においても発現が報告されている[120]。一方、 γ セクレターゼはゴルジ、ER、原形質膜、エンドソームおよびリソソームに主に局在すると考えられている[67]。このことから、ミトコンドリアに発現する MAO-B が γ セクレターゼと相互作用するには MAMs で相互作用している可能性がある。実際に γ セクレターゼが MAMs の ER 側に高発現しているという報告もある[121, 122]。また、MAO-A (MAO-B と一部共通の基質を持つアイソザイム) は PS1 と相互作用し、その相互作用は PS1 の細胞内ループ構造(基質結合部位)を介しているという報告がある[120]。MAO-B と MAO-A は約 70%の配列相同性があり、三次元構造も類似している[123]ことから、ともに γ セクレターゼに結合する可能性が考えられる。

細胞系を用いた評価においては、MAO-B 阻害剤が α セクレターゼ活性に影響を与えることが報告されており[124]、二次的にその後のシグナルにも影響を及ぼすことが示唆される。本研究では、MAO-B が γ セクレターゼに直接作用することで、細胞内 A β 42 量に影響することを示した。したがって、APP プロセッシング由来の分解断片タンパク質が、シグナル伝達の調節に関与しているかどうかの解明が期待される。マウスの脳においては、MAO-B 阻害剤のラサギリンおよび MAO-B 阻害作用とコリンエステラーゼ阻害作用を併せ持つラドスチギル (TV3326) だけでなく、TV3326 のエナンチオマーで MAO-B 阻害活性を有さない TV3279 もまた APP のレベルに影響を与えることが報告されている[125]。

GSAPs が γ セクレターゼ以外の酵素に作用する、あるいは細胞内輸送に作用することで間接的に A β 産生量を調節している可能性が考えられたため、 γ セクレターゼにとって

直接の基質である C99 (β セクレターゼにより切断された APP 断片) および MAO-B を過剰発現した条件における $A\beta$ 産生を評価した。その結果、 $A\beta$ 産生量は明確に増加した。このことは MAO-B が γ セクレターゼと相互作用することにより γ セクレターゼ活性を調節するという考えを支持するものである。100 MOI と比較して 50 MOI においてより強い効果が認められた背景には、過剰発現による補てん経路またはフィードバック効果が働いている可能性が考えられた。あるいは、過剰発現により細胞内の防御反応や過剰タンパク質の凝集が引き起こされた可能性も考えられた。

MAO-B と γ セクレターゼとの相互作用がニューロンにおいて認められたものの、非ニューロンである HEK-APP 細胞では認められなかったこと[第 2 章]、HEK 細胞においては MAO-B ノックダウンによる $A\beta$ 産生量への影響が限定的であったことから、次にニューロンでの $A\beta$ 産生に対する MAO-B ノックダウンの影響を検討した。siRNA ノックダウンの真の効果を評価するため、単一細胞ごとに細胞内 $A\beta_{42}$ レベルを定量することは有用であると考え、初代皮質ニューロンを用いて検討した。初代皮質ニューロンにおいて MAO-B をノックダウンすることにより、細胞内 $A\beta_{42}$ レベルが大幅に低下した。 $A\beta_{42}$ と MAO-B のシグナル強度がよく相関していたことも、内因性 MAO-B が $A\beta$ 産生を調節しているという考えと整合する。

最近の研究では、早期の AD 患者脳内において MAO-B のリガンドである ^{11}C -DED の結合が増加していることも報告されており[115, 126, 127]、このことは $A\beta$ 病理および MAO-B 発現量増加が AD の初期現象である可能性が考えられた。さらに、MAO-B 阻害剤の臨床試験において、AD 症状の進行が抑制されたという報告[116]も、MAO-B と AD との関連を支持するものである。臨床試験における MAO-B 阻害剤の効果は、酵素活性に対する影響だけでなく、活性酸素の放出にも影響していた可能性が考えられた[120]。このことは AD における $A\beta$ 病理と MAO-B との間に相関があることを示唆している。このように、これまでの報告と本研究における結果を総合的に鑑みると、MAO-B と γ セクレターゼとの相互作用と神経細胞における $A\beta$ レベルへの影響とは関連しており、MAO-B 自体や MAO-B と γ セクレターゼとの相互作用を適切に制御することにより、以前の臨床試験では見出せなかった明確な薬効を伴う AD 治療薬と成り得る可能性が考えられる。

第4章 HCN2はAPPプロセッシングと γ セクレターゼを制御する

第1節 序論

今までにも述べた通り、 γ セクレターゼ阻害剤を用いた複数の臨床試験は、おそらく Notch のような他の γ セクレターゼ基質のプロセッシング阻害によるものであると考えられる副作用等のため、未だ上市には至っていない。この問題を克服するために、APP プロセッシング選択的な阻害薬が必要と考えられる。筆者の研究グループでは A β 産生を選択的にアップレギュレートするが、Notch プロセッシングには影響を与えない GSAPs を複数同定した[90, 91, 92, 93, 第2章]。そして、第2章において AD 治療薬の標的として望ましいと考えられる神経細胞への選択性が高い GSAPs の存在を明らかにした。また第3章ではそれらの GSAPsの中から MAO-B について詳細なプロファイリングを実施し、AD 治療薬の標的としての可能性を示した。本章では、potassium/sodium hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated ion channel 2 (HCN2) に着目し、HCN2 の詳細なプロファイリングを実施することで AD 治療薬のターゲットとしての可能性を検証した。HCN2 は過分極時に活性化され神経伝達物質放出の調節等、神経系において重要な機能を果たすカチオンチャネルである。てんかん患者の脳内において HCN チャネルの発現が変化することが知られており、HCN2 の欠損は著しい自発的な欠神発作を誘発することが報告されている[128]。他の HCN ファミリーのメンバーである HCN1 が APP に結合することが示されていることに加えて、AD においてもてんかん発作のリスクが高まることが知られているため、本研究において HCN2 が APP プロセッシングに与える影響について検討を実施した。

第2節 材料および実験方法

siRNA および阻害剤による評価

HCN2 および Nct の siRNA は以下のものを購入して用いた。

HCN2 (Invitrogen, s1942)

センス鎖 siRNA (CGGCAUUGUGAUCGAGGACAA)

アンチセンス鎖 siRNA (UUGUCCUCGAUCACAAUGCCG)

Nct (Ambion, s23708)

センス鎖 siRNA (GACCUACAGUGGGUAUUGAtt)

アンチセンス鎖 siRNA (UCAAUACCCACUGUAGGUCct)

逆転写および LFRNAiMAX (Invitrogen、Thermo Fisher Scientific) を用い、HEK-APP 細胞に 3 または 10 nM の siRNA をトランスフェクトした。細胞を 37°C、5% CO₂ で 3 日間培養し、培地を Opti-MEM (Invitrogen、Thermo Fisher Scientific) に交換しさらに 24 時間培養した。あるいは、細胞を DMSO に溶解した 10 または 100

μM の HCN 阻害剤 ZD7288 (Sigma-Aldrich) で処理し 24 時間反応させた[129]。細胞生存率は alamar Blue (Biosource) を使用して評価した。培養上清を回収し、細胞を RIPA 緩衝液および等量のベンゾナーゼ溶液(25 U/ml ベンゾナーゼ、50 mM TrisHCl、4 mM MgSO_4 、pH8.0) で溶解した。タンパク質濃度は、Pierce BCA タンパク質アッセイキット (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。

A β 42 および APP 断片の産生量評価

細胞培養上清中および細胞中の A β 42 の産生量は、蛍光標識 Amplex UltraRed (Molecular Probes、Thermo Fisher Scientific) により感度を高めたサンドイッチ ELISA (Wako Pure Chemicals Ltd.) で評価した[118]。A β 42 量を細胞生存率により補正し、LF または DMSO のみで処理した細胞での A β 量を 100%とした。細胞溶解液中の全長 APP および APP-CTF レベルならびに細胞培養上清中の sAPP レベルを、ウェスタンブロッティングによって定量した。ローディング量は、細胞溶解液のタンパク質濃度および細胞生存率に応じて調整した。サンプルを 4~12%ポリアクリルアミドビストリスゲル (Invitrogen、Thermo Fisher Scientific) で泳動分離し、PVDF 膜に転写、抗体反応させた後、CCD カメラ (Fuji、LAS3000) および MultiGauge v 3.0 ソフトウェアを用いて定量した。複数用量のコントロールサンプル (LF または DMSO のみ)により引いた検量線を基にタンパク質定量を実施した。結果は平均値 \pm SD で示し、スチューデント t 検定によりコントロールに対する有意性を検定した。

免疫沈降

詳細は第 2 章の材料と実験方法に記載した。抗体はウサギ抗 HCN2 抗体を使用した。

細胞株およびマウス初代海馬ニューロンの培養、固定化、透過化および PLA

詳細は第 1 章および第 2 章の材料と実験方法に記載した。

第 3 節 実験結果

A β 産生に対する HCN2 ノックダウンの効果

HCN2 はラットの脳シナプス膜から GCB と γ セクレターゼ複合体とのアフィニティ精製、LC-MS/MS を用いて同定された GSAPs である[89]。A β 産生に対する HCN2 の影響を検討するため、HEK-APP 細胞中の HCN2 をノックダウンし、ELISA を用いて分泌型および細胞内 A β を測定した。結果を細胞生存率で補正し、LF のみで処置した HEK-APP 細胞での産生量を 100%として示した。siRNA により HCN2 がノックダウンされ (図 24A)、それに伴い分泌型 A β 42 レベルが 30%程度低下した (図 24B)。こ

の作用は、Nct をノックダウンした際とほぼ同等であった。A β 40 に対する作用も A β 42 に対する作用と同様であった（データ省略）。一方 HCN2 および Nct をノックダウンしても細胞内の A β 40、42 共に減少しなかった（図 24C）。

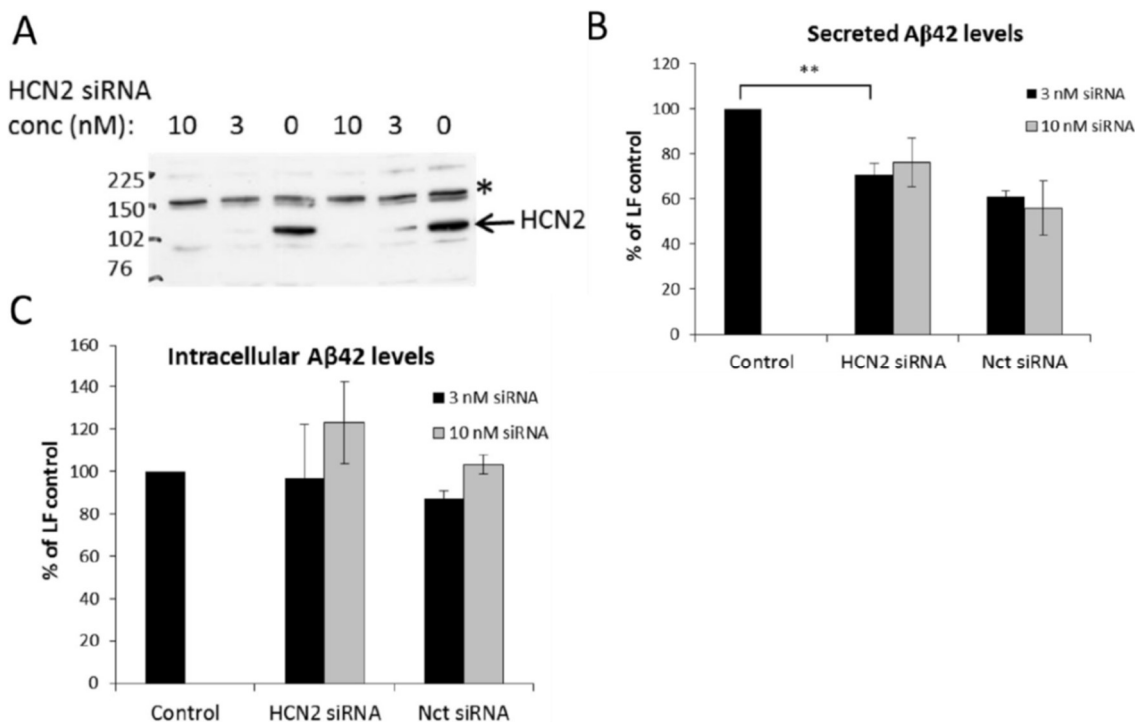


図 24 : HCN2 ノックダウンによる A β 産生への影響

HEK 細胞において HCN2 に対する siRNA 処理をした際のノックダウン効率をウェスタンブロッティングにより評価した(A)。*は非特異的バンドである。HCN2 または Nct に対する siRNA 処理をした際の培養上清 (B)または細胞内(C)の A β 42 レベルを ELISA で測定した。数値は LF コントロールを 100%とした際の割合で示し、3 回 (HCN2) または 2 回 (Nct) の平均値 \pm SD で示した。** P < 0.01 with t-test.

APP プロセッシングに対する HCN2 ノックダウンの影響

HCN2 ノックダウン時に A β 産生が減少する現象が APP プロセッシングのどの段階に作用しているのかを解明するため、ウェスタンブロッティングを用いて全長 APP (FL-APP)、C99 (APP-CTF)および分泌型 APP (sAPP) を定量した。細胞溶解液中における FL-APP および APP-CTF 量を測定し、培養上清中の sAPP を測定した (図 25A)。FL-APP は 2 つのバンドが検出されたが、脱グリコシル化酵素であるノイラミニダーゼおよび O-グリコシダーゼで細胞溶解物を処理すると、上方のバンドが下方のバンドへシフトしたことから、上方のバンドは糖鎖付加された APP であることが示唆された (図 25C)。総 FL-APP 量は、HCN2 のノックダウンによる有意な変化は認められなかった。しかしながら、糖鎖付加された APP は減少したが、糖鎖付加されていない APP 量は増加傾向であった (図 25A および D)。Nct のノックダウンにより、統計的に有意ではな

いものの、両方の FL-APP 量を増加させる傾向があった (図 25A)。次に、細胞溶解液および培養上清中の α および β セクレターゼ産物である APP-CTF および sAPP 量をそれぞれ定量した。APP-CTF (図 25A および E) および sAPP (図 25B および F) の両方において、HCN2 のノックダウンにより減少が認められた。 γ セクレターゼ構成分子である Nct をノックダウンした場合は、sAPP 量は有意ではなかったものの低下傾向を示し、APP-CTF は増加傾向を示した (図 25B および F)。結論として、HCN2 のノックダウンにより、A β 42、APP-CTF、sAPP および糖鎖付加された FL-APP 量が減少した。これは APP のグリコシル化や α セクレターゼおよび β セクレターゼ活性への影響が、APP プロセッシングにおける HCN2 の重要な作用点である可能性が示唆された。

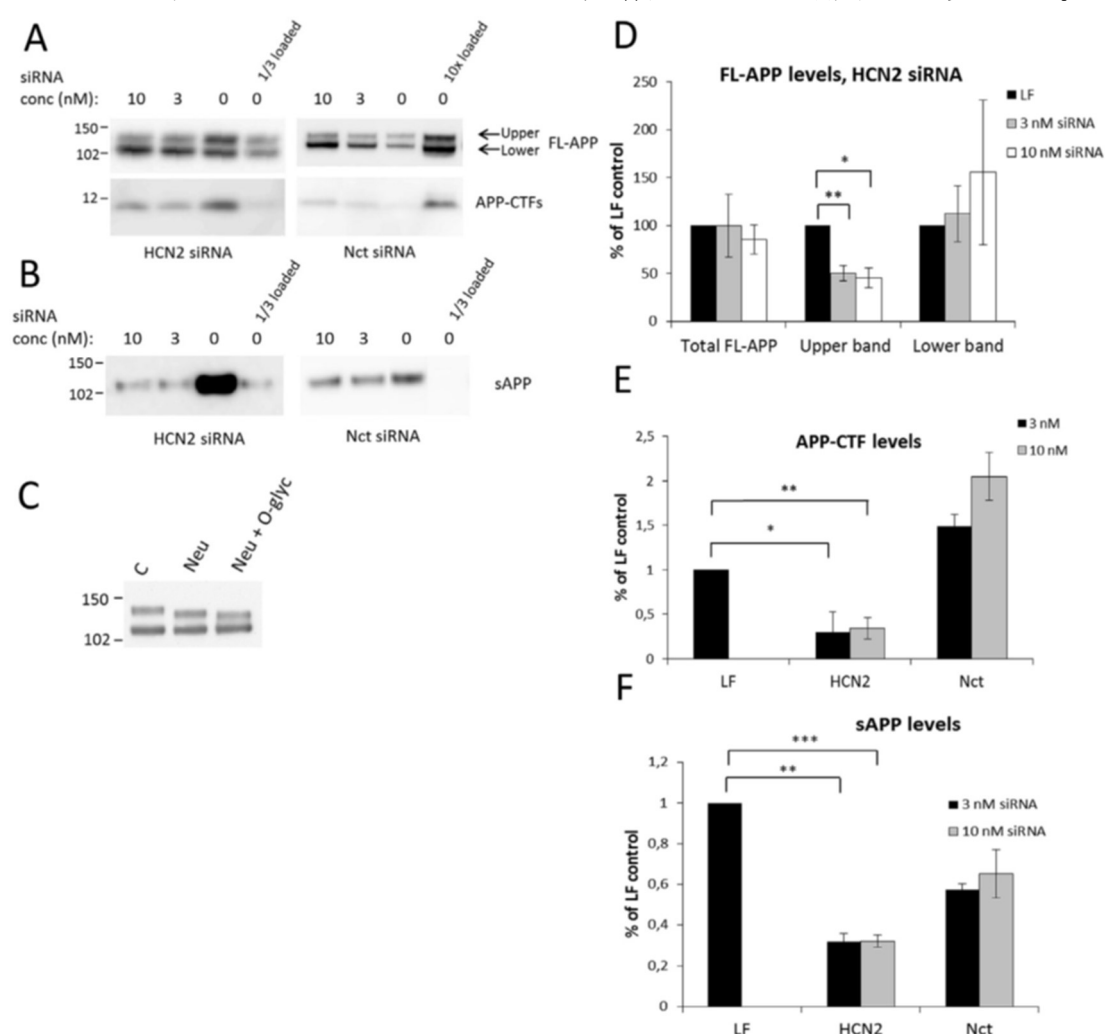


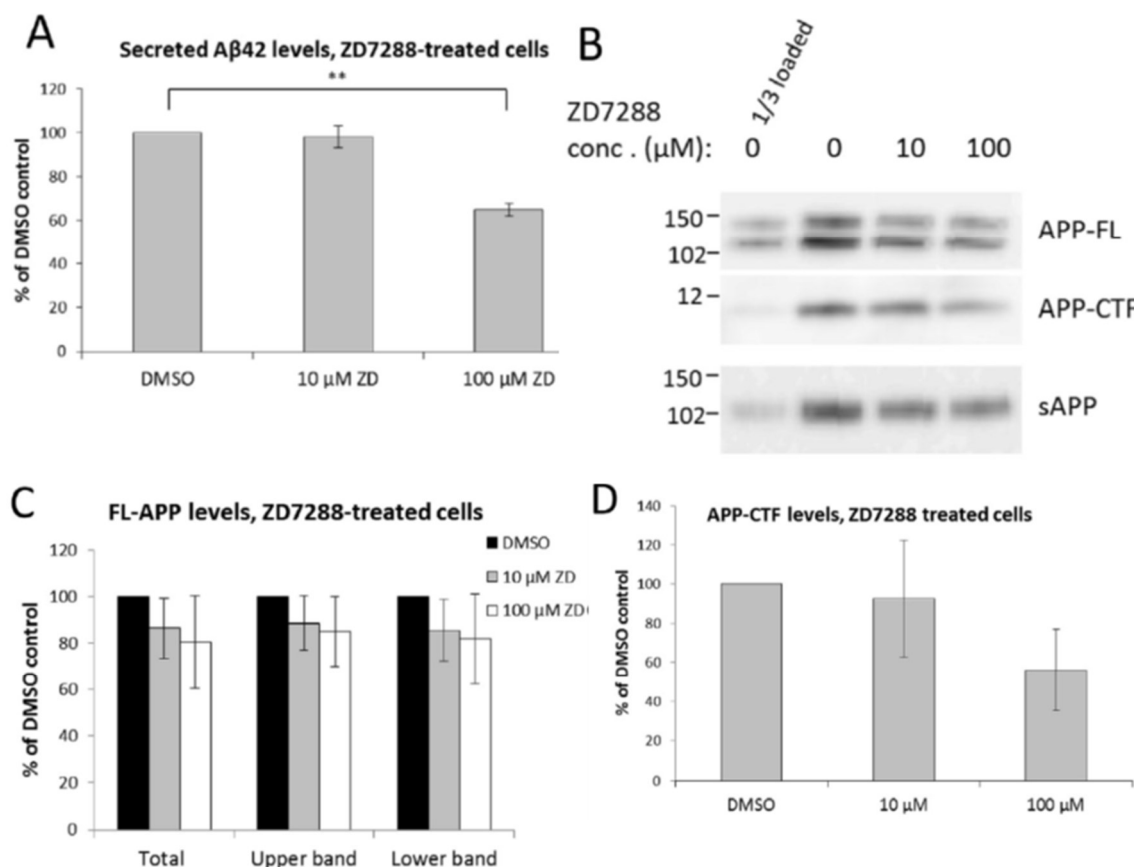
図 25 : HCN2 ノックダウンによる APP プロセッシングへの影響

HEK 細胞において HCN2 または Nct に対する siRNA 処理をした際の FL-APP, APP-CTFs, sAPP レベルをウェスタンブロッティングにより定量した(A, B)。FL-APP について、ノイラミニダーゼ (Neu) および O-グリコシダーゼ (O-glyc) 処理することにより、FL-APP の upper バンドが下にシフトした(C)。それぞれのウェスタンブロッティングの結果を LF コントロールの結果を 1 とした割合で数値化し D, E, F において 3 回 (HCN2) または 2 回

(Nct) の平均値±SD でグラフ化した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ with t-test.

APP プロセッシングに対する HCN2 阻害剤 ZD7288 の影響

一般的に遺伝的操作と比較して薬理的阻害は臨床において容易に実行可能であるため、HCN 阻害剤 ZD7288 が APP プロセッシングに与える影響を検討した。HEK-APP 細胞を 10 μM または 100 μM の ZD7288 で処理し、 $\text{A}\beta_{42}$ 、FL-APP、APP-CTF および sAPP 量を上記と同様に定量した。ZD7288 の全濃度において細胞生存率は対照の 90%以上であった。 $\text{A}\beta_{42}$ 量は 10 μM の ZD7288 では影響を受けなかったが、100 μM の ZD7288 で 35%程度減少した (図 26A)。HCN2 のノックダウン試験とは異なり、ZD7288 は FL-APP 量には糖鎖付加の有無に関わらず有意な作用は示さなかった (図 26C)。しかしながら、sAPP 量については、100 μM の ZD7288 で 44%減少し (図 3D)、APP-CTF 量の低下傾向も認められた (図 26E)。



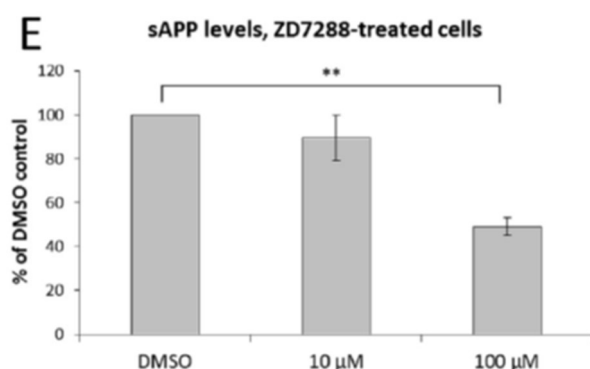
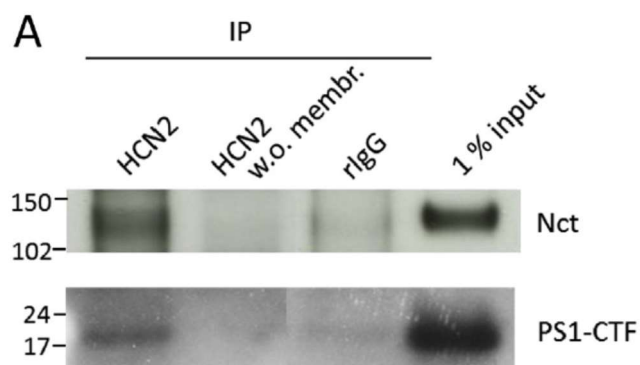


図 26 : HCN 阻害剤による APP プロセッシングおよび A β 産生への影響

HEK 細胞において HCN2 阻害剤である ZD7288 処理をした際の A β 42 レベルを ELISA で測定した(A)。また FL-APP, APP-CTFs, sAPP レベルをウェスタンブロッティングにより定量した(B)。それぞれのウェスタンブロッティングの結果を LF コントロールの結果を 100%とした割合で数値化し C, D, E において 3 回 (HCN2) または 2 回 (Nct) の平均値 \pm SD でグラフ化した。** $P < 0.01$ with t-test.

HCN2 と γ セクレターゼとの相互作用

HCN2 はアフィニティ精製により GSAPs として同定されたが、HCN2 と γ セクレターゼとの相互作用についてさらに検討した。AD 患者の脳皮質膜画分を HCN2 で免疫沈降したところ、 γ セクレターゼ構成分子である Nct および PS1 が検出された(図 27A)。ただホモジナイズサンプルではアーチファクトが検出されている可能性があるため、マウス初代海馬ニューロンにおける HCN2 と γ セクレターゼとの相互作用を PLA により検討した[97]。片方の一次抗体のみを用いた陰性対照ではシグナルはほとんど検出されなかったが(図 27B および C)、抗 HCN2 抗体および抗 PS1 抗体を組合せたサンプルでは多数のシグナルを生じた(図 27D)。このことから、マウス海馬ニューロンにおいて HCN2 と PS1 とは近接相互作用していることが示唆された。



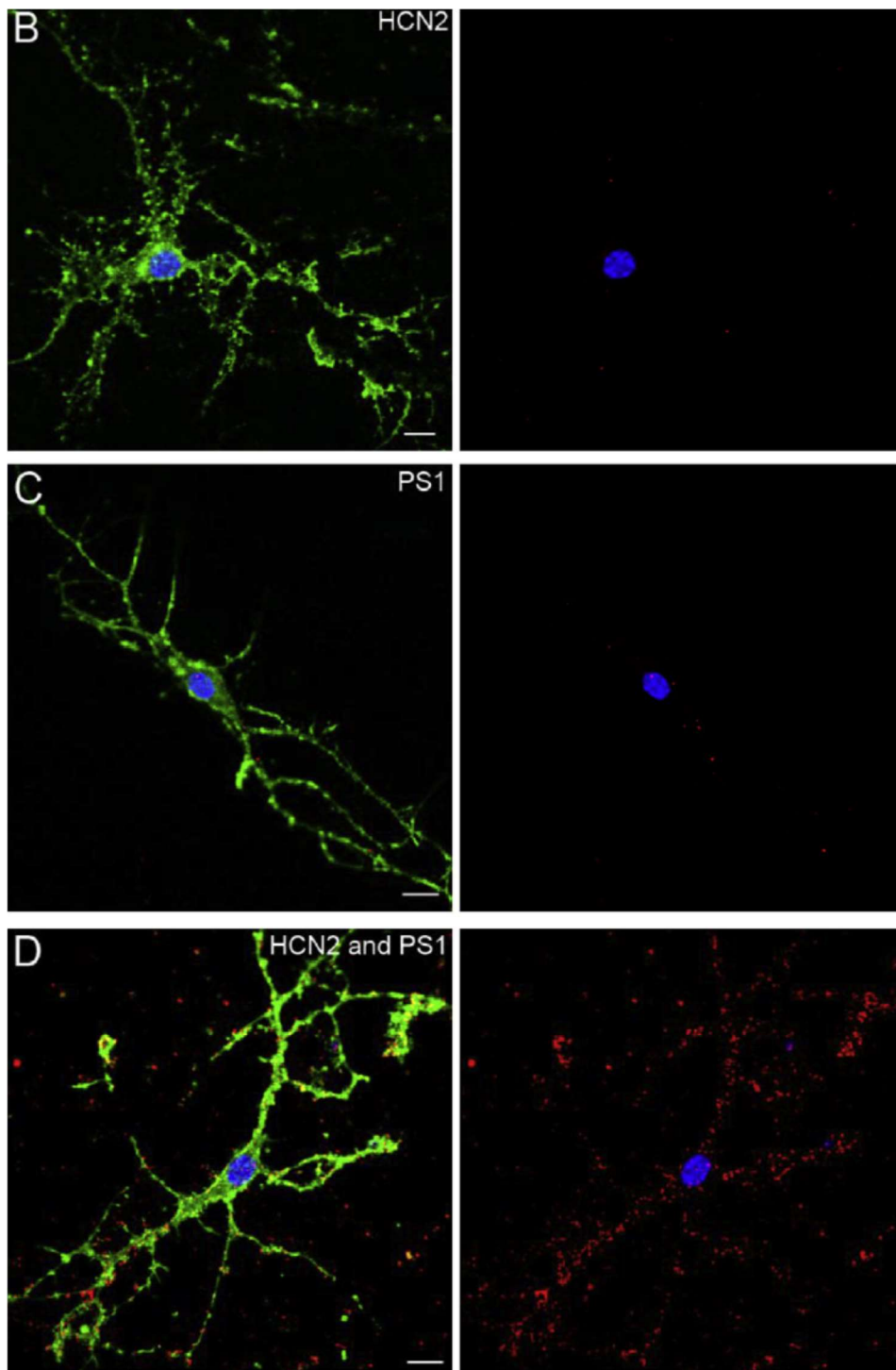


図 27 : HCN2 と γ セクレターゼとの近接相互作用 scale bar: 5 μ m

ヒト脳膜画分を抗 HCN2 抗体で免疫沈降し、抗 Nct 抗体または抗 PS1-CTF 抗体でウェスタンブロッティングした結果を示す(A)。膜画分無し (HCN2 w.o. membr.) および、コントロールラビット IgG (rIgG)抗体で免疫沈降したサンプルではバンドは検出されなかった。マウス初代海馬ニューロンを用いた PLA 結果を B-D に示した。B,C はそれぞれ抗 HCN2 抗体のみ、PS1 抗体のみで一次反応を実施した結果であり、PLA シグナルはほとんど検出されなかったのに対し、両抗体で一次反応を実施すると D のように多数の PLA シグナルが検出された。

第4節 考察

本研究では、神経細胞選択的に γ セクレターゼと近接相互作用することが示された GSAPs の中から HCN2 に焦点をあて、HCN2 を遺伝子的にノックダウンあるいは薬理的に阻害した際に、おそらくは APP の成熟および/または β セクレターゼによる APP 切断を抑制することに起因して、 $A\beta$ 産生を抑制することを明らかにした。

HEK-APP 細胞における HCN2 のノックダウンにより、分泌型 $A\beta$ 42 産生量が著しく減少した。しかしながら、細胞内 $A\beta$ 42 レベルは、HCN2 のノックダウンおよび γ セクレターゼ構成分子である Nct ノックダウンによっても影響を受けなかった。おそらくこれは長さの異なる $A\beta$ 産生経路の産生および分解における動態が異なることに起因する可能性、または細胞が $A\beta$ 42 の分泌を調節することにより細胞内 $A\beta$ 量を一定に維持することによる結果である可能性が考えられた。以前の研究においても、単離した神経終末を 37°C でインキュベートすることにより $A\beta$ 産生が誘導されるにも関わらず、細胞内 $A\beta$ レベルは変化せず分泌型 $A\beta$ のみが時間経過とともに増加することが明らかとなっている[130]。

分泌型 $A\beta$ レベルに対する効果とは別に、sAPP および APP-CTF レベルもまた HCN2 siRNA ノックダウンにより減少した。sAPP および APP-CTF レベルに対する効果は $A\beta$ に対する効果よりも大きかったが、これは前者の場合には sAPP α および CTF α の産生量も結果に含まれている可能性が考えられた。

APP プロセッシングは、O-グリコシル化を含む APP の成熟に依存することが見出されている。糖鎖付加は APP 輸送に影響を与え、つまり、APP のプロセッシング酵素との共局在化に影響を及ぼす可能性がある。一方、逆に糖鎖付加が輸送の影響を受けているという報告もある[131]。ウェスタンブロッティングにおいて検出される高分子量側のバンドは、一般的に糖鎖付加された APP であると考えられる。本研究において、APP の高分子量側のバンドが HCN2 のノックダウンにより有意に減少し、HCN2 が APP の糖鎖付加に影響を及ぼすことを示した。脱グリコシル化評価により高分子量側のバンドが実際に O-グリコシル化 (O-グリコシダーゼ添加により消失) およびシアル化 (ノイラミニダーゼ添加により消失) の両方によって糖鎖付加されることを確認した。したがって、HCN2 はおそらく APP 輸送への影響を介して APP の糖鎖付加に影響を及ぼし、または APP への糖鎖付加に対する影響を介して APP 輸送に影響を及ぼしていると考えられた。HCN2 同様 HCN ファミリーに属する HCN1 および APP の両方に結合することが見出された X11L[132]を過剰発現させることにより、APP の O-グリコシル化および APP-CTF 産生量が抑制されることが報告されている[133]。したがって、HCN2 もまた X11L に結合することによって APP の成熟化 (糖鎖付加) およびそのプロセッシングに影響を及ぼしている可能性が考えられた。

HCN2 ノックダウンおよび HCN 阻害剤 ZD7288 による薬理的阻害の両方において APP-CTF および sAPP レベルが顕著に減少した一方で、ZD7288 処置ではなく HCN2 ノックダウンにおいてのみ FL-APP の糖鎖付加を抑制されたことは、HCN2 の機能の一部は ZD7288 によって阻害することができないことを示唆する。ZD7288 が HCN ファミリーの他の分子を阻害し、それが逆の方向に作用するという報告もあり、HCN2 ノックダウンと薬理的阻害との結果の相違が説明できるかもしれない。

齋藤らは HCN1 が APP に結合することを報告しており[132]、本研究における結果とは対照的に、HCN1 の欠損により A β レベルが増加することを報告したが、これは HCN1 と HCN2 が APP プロセッシングに対して逆の作用を有することを示唆する。ただ、実験条件が異なるため結果が異なった可能性も否定できない。齋藤らは、10 μ M ZD7288 処理により A β レベルに変化が無かったと報告している[132]が、本研究では 100 μ M ZD7288 処理においては A β 42 レベルが低下していることを示した。しかしながら齋藤らはまた、HCN1 過剰発現細胞において減少が認められた A β 量は、ZD7288 10 μ M によってキャンセルされることも報告している[132]。HCN1 と HCN2 との ZD7288 に対する感受性の差異が、これら結果の相違を説明できる可能性がある。HCN1 および HCN2 がヘテロ二量体を形成し、HCN チャネルの過剰および過少な活性化がてんかんモデルにおいて認められていること[128, 134]は考察をより複雑にさせる。

上記の結果は、HCN2 のノックダウンが主に APP の成熟および、または α および β セクレターゼのプロセッシングに影響を及ぼしていることを示唆しているが、共免疫沈降および PLA によって示されたように HCN2 は γ セクレターゼと近接相互作用していることも見出された。これまでに、 α セクレターゼと β セクレターゼの両方が γ セクレターゼと複合体を形成することも報告されていることから[135, 136]、HCN2 は 3 つのセクレターゼすべてと相互作用するが、 α および β セクレターゼの機能に対してより大きな影響を及ぼす可能性がある。第 3 章では MAO-B が Notch のプロセッシングには影響を及ぼさないことを示したが、HCN2 についても予備的な結果として、Notch プロセッシングに対しては影響を及ぼさないことを示唆するデータを取得している（データ非開示）。これまでの報告と本研究における結果を総合的に鑑みると、HCN2 は APP 分解酵素に対して作用することにより A β 量に対して影響を与えている可能性考えられるため、AD 治療薬としての標的と成り得ると考えられた。

総括

AD の根本治療薬を目指す戦略の一つとして、 $A\beta$ 産生に関わる γ セクレターゼの活性を抑制することが考えられるが、 γ セクレターゼ阻害剤は実際に $A\beta$ 産生を抑制するものの Notch プロセッシングをも阻害することによる副作用の原因となる。したがって、より選択的に $A\beta$ 産生を阻害することが必要と考えられる。本研究において、今までに同定された、あるいは本研究において新たに同定した GSAPs のさらなるプロファイリングを実施し、その中から有望な創薬ターゲットと成り得る分子を見出した。

本研究における主な知見を以下に示す。

1. 活性型 γ セクレターゼを視覚化するための新しい PLA 法を確立し、従来の PLA 法と神経細胞を用いて比較することにより、活性型 γ セクレターゼを検出することが可能となった。本方法は高感度であり、また単一の複合体の検出が可能である。また、*in situ* で実施可能であるため、活性型酵素の細胞内位置の決定、ならびに他のタンパク質との相互作用を検出することも可能である。活性型酵素に対する特異性は、活性部位に対する阻害剤を併用することによって確認した。本方法は γ セクレターゼ複合体を認識し、かつ活性部位を認識するという二重の特異性を有する。本方法を用いることにより膜タンパク質の相互作用研究においてさらなる可能性を広げたとと言える。例えば、細胞内マーカー染色と GTB を用いた PLA を組み合わせることにより、活性型酵素複合体の細胞内局在の詳細な分析を行うことが可能となる。また、本方法を応用することにより、他の酵素に対しても、タンパク質-タンパク質相互作用や細胞内局在を評価することも可能となる。
2. 複数の GSAPs と γ セクレターゼとの近接相互作用を PLA により評価した。評価した 12 種の GSAPs のうち、MAO-B、VDAC-1、STXBP1 および ATP9A はニューロンにおいて相互作用を示したが HEK-APP 細胞では相互作用を示さないことを明らかにした。4 種の GSAPs (HCN2、GAP43、STXBP1 および CNTNAP1) は、ヒト脳における発現量が他の組織よりも高かった。以上のような GSAPs により脳選択的に γ セクレターゼ活性が上昇することで、 $A\beta$ の毒性が中枢神経系においてのみ問題となる部分的な要因と成り得ると考えられた。AD 治療の目的として $A\beta$ 42 の産生を抑制する戦略が考えられ、これを脳（ニューロン）選択的に起こすことにより、非神経組織における副作用のリスクを最小限に留めることが可能と成り得る。つまり、ニューロン選択的な γ セクレターゼと GSAP との相互作用が AD の治療標的と成り得ることを示唆している。MAO-B は最も顕著にニューロン選択的な PS1 との相互作用を示した。HCN2 はニューロン、非ニューロンにおいて共に PS1 との相互作用を示したが、他の組織と比較して脳における HCN2 の発現量が最も高かった。上記のような GSAPs は、その γ セクレターゼとの相互作用が神経毒性を有する

A β ペプチドの産生を減少させる標的と成り得ると考えられた。

3. 神経細胞内 MAO-B 発現量が AD 患者脳における前頭前皮質と海馬で増加していることを明らかにした。免疫沈降法や PLA 等の評価により MAO-B はヒト脳内において γ セクレターゼと近接相互作用していることを明らかにした。また MAO-B を過剰発現させると A β 産生が促進されることも明らかにした。さらに、MAO-B と皮質ニューロン内の A β 42 発現量との間に相関関係があり、これらのニューロンにおいて MAO-B 遺伝子をノックダウンすることにより細胞内 A β 42 レベルが減少することを明らかにした。一方、MAO-B 遺伝子のノックダウンにより、Notch プロセッシングは影響を受けないことも確認した。以上の結果から、MAO-B が γ セクレターゼ活性を調節することにより Notch 経路には影響を与えずに A β 産生量を制御していると考えられた。つまり、MAO-B と γ セクレターゼとの相互作用が AD 治療薬のターゲットと成り得る可能性を示した。
4. HCN2 を遺伝子的にノックダウンまたは薬理的に阻害することにより、APP の成熟およびプロセッシングが影響を受けることを明らかにした。また HCN2 と γ セクレターゼの活性中心である PS1 が神経細胞上で近接に相互作用することを確認した。したがって、HCN2 が APP プロセッシングを選択的に阻害することを目的とする際のターゲットと成り得ることを示した。

以上、A β 産生に関わる γ セクレターゼの活性を調節する GSAPs は AD 治療薬のターゲットと成り得る可能性があり、本研究において MAO-B および HCN2 にその可能性があることを見出した。今後、両分子および他の GSAPs についてのさらなる研究により、APP プロセッシングを選択的に阻害する γ セクレターゼモジュレーターが AD 患者の根本治療に貢献することが期待される。

謝辞

本論文を発表する機会を与えていただき、終始丁寧にご指導・ご助言いただきました静岡県立大学大学院薬学研究院医薬生命化学分野教授の**奥直人先生**に深く感謝の意を表します。また、本論文作成にあたりご指導・ご助言いただきました静岡県立大学薬学部統合生理学分野教授の**武田厚司先生**、衛生分子毒性学分野教授の**吉成浩一先生**、創薬探索センター教授の**浅井章良先生**に深く感謝いたします。静岡県立大学薬学部医薬生命化学分野准教授の**浅井知浩先生**、同分野助教の**小出裕之先生**、並びに同分野特任助教の**木村純子先生**には発表資料や本論文に対してご指導・ご助言をいただきましたことに厚く御礼申し上げます。

本論文に関する研究を実施する機会を与えていただきました、カロリンスカ医科学研究所の **Bengt Winblad 教授**、**Lars. O. Tjernberg 博士**には深謝いたします。主論文の研究に関わっていただきました **Sophia Schedin-Weiss 博士**、**Sussane Frykman 博士**、**Herena Kalrstrom 博士**、**Ji-Yeun Hur 博士**、**Birgitta Wiehager 氏**、**JoLanta Lundgren 博士**、**Nenad Bogdanovic 博士**、**Lenka Hromadkova 博士**、**Anna Sanderbring-Matton 博士**、寺西康博博士、山本・後藤奈津子氏、木原孝洋博士、池田篤史博士、石川泰三博士に深く感謝いたします。中でも **Lars**、**Sophia**、**Susanne**、**Ji-Yeun**、寺西氏、後藤氏におかれましては常に議論を重ねながら建設的なご助言をいただき心より感謝いたします。

その他のカロリンスカ医科学研究所のメンバーである **Inger**、**Inga**、**Huei-Hsin**、**Maria**、**Annelie**、**Pavel**、**Per**、**Annica**、**Lena**、**Lotta** そして **Gunilla** にも感謝いたします。

また大日本住友製薬株式会社において、カロリンスカ医科学研究所で研究する機会を、また本論文を発表する機会を与えていただきました**泰地睦夫博士**、**三浦義記博士**、**西村剛博士**、**志水勇夫博士**、**岸野晶祥博士**にも感謝いたします。

そして、本論文を発表するにあたり静岡県立大学大学院薬学研究院の**奥直人先生**に私をご紹介くださった**宮内政徳博士**に深く感謝いたします。

最後に、本論文に関する研究および本論文の作成にあたり常に協力的に私をサポートしてくれました**大切な家族**に心より感謝いたします。

参考文献

1. Alzheimer, A. (1907). "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde." *Allgemeine Z Psychiatrie Psychisch-Gerichtliche Med.* 64: 146-8.
2. Prince, M., Wimo, A., et al. (2015). "World Alzheimer Report 2015 The Global Impact of Dementia" Alzheimer's Disease International.
3. Wenk, G. L. (2003). "Neuropathologic changes in Alzheimer's disease." *J Clin Psychiatry* 64 Suppl 9: 7-10.
4. Selkoe, D. J. (1999). "Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease." *Nature* 399(6738 Suppl): A23-31.
5. Dickson, D. W. (1997). "The pathogenesis of senile plaques." *J Neuropathol Exp Neurol* 56: 321-39.
6. Welander, H., J. Franberg, et al. (2009). "Abeta43 is more frequent than Abeta40 in amyloid plaque cores from Alzheimer disease brains." *J Neurochem* 110: 697-706.
7. Goedert, M. (1993). "Tau protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease." *Trends Neurosci* 16: 460-5.
8. Bettens, K., K. Sleegers, et al. (2010). "Current status on Alzheimer disease molecular genetics: from past, to present, to future." *Hum Mol Genet* 19: R4-R11.
9. Goate, A., M. C. Chartier-Harlin, et al. (1991). "Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease." *Nature* 349: 704-6.
10. Sherrington, R., E. I. Rogaev, et al. (1995). "Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease." *Nature* 375: 754-60.
11. Levy-Lahad, E., W. Wasco, et al. (1995). "Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus." *Science* 269: 973-7.
12. Shioi, J., A. Georgakopoulos, et al. (2007). "FAD mutants unable to increase neurotoxic Abeta 42 suggest that mutation effects on neurodegeneration may be independent of effects on Abeta." *J Neurochem* 101: 674-81.
13. Sheng, M., B. Sabatine, et al. (2012) "Synapses and Alzheimer's Disease." *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4. pii: a005777.
14. Hardy, J. and D. J. Selkoe (2002). "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics." *Science* 297: 353-6.
15. Lott, I. T. and E. Head (2005). "Alzheimer disease and Down syndrome: factors in pathogenesis." *Neurobiol Aging* 26: 383-9.
16. Haass, C. (2004). "Take five--BACE and the gamma-secretase quartet conduct

- Alzheimer's amyloid beta-peptide generation." *EMBO J* 23: 483-8.
17. Kang, J., H. G. Lemaire, et al. (1987). "The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor." *Nature* 325: 733-6.
 18. Zheng, H., M. Jiang, et al. (1995). "beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity." *Cell* 81: 525-31.
 19. Heber, S., J. Herms, et al. (2000). "Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members." *J Neurosci* 20: 7951-63.
 20. von Koch, C. S., H. Zheng, et al. (1997). "Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice." *Neurobiol Aging* 18: 661-9.
 21. Herms, J., B. Anliker, et al. (2004). "Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members." *EMBO J* 23: 4106-15.
 22. Wang, P., G. Yang, et al. (2005). "Defective neuromuscular synapses in mice lacking amyloid precursor protein (APP) and APP-Like protein 2." *J Neurosci* 25: 1219-25.
 23. Yang, G., Y. D. Gong, et al. (2005). "Reduced synaptic vesicle density and active zone size in mice lacking amyloid precursor protein (APP) and APP-like protein 2." *Neurosci Lett* 384: 66-71.
 24. Wang, Z., B. Wang, et al. (2009). "Presynaptic and postsynaptic interaction of the amyloid precursor protein promotes peripheral and central synaptogenesis." *J Neurosci* 29: 10788-801.
 25. Annaert, W. and B. De Strooper (2002). "A cell biological perspective on Alzheimer's disease." *Annu Rev Cell Dev Biol* 18: 25-51.
 26. Young-Pearse, T. L., J. Bai, et al. (2007). "A critical function for beta-amyloid precursor protein in neuronal migration revealed by in utero RNA interference." *J Neurosci* 27: 14459-69.
 27. Zhang, H., Q. Ma, et al. (2011). "Proteolytic processing of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein." *J Neurochem* 120 Suppl 1: 9-21.
 28. Jarrett, J. T., E. P. Berger, et al. (1993). "The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease." *Biochemistry* 32: 4693-7.
 29. Walsh, D. M. and D. J. Selkoe (2004). "Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease." *Neuron* 44: 181-93.
 30. Lesne, S., M. T. Koh, et al. (2006). "A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory." *Nature* 440: 352-7.

31. Klyubin, I., V. Betts, et al. (2008). "Amyloid beta protein dimer-containing human CSF disrupts synaptic plasticity: prevention by systemic passive immunization." *J Neurosci* 28: 4231-7.
32. Buxbaum, J. D., K. N. Liu, et al. (1998). "Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor." *J Biol Chem* 273: 27765-7.
33. Koike, H., S. Tomioka, et al. (1999). "Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein." *Biochem J* 343 Pt 2: 371-5.
34. Lammich, S., E. Kojro, et al. (1999). "Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 3922-7.
35. Sinha, S., J. P. Anderson, et al. (1999). "Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain." *Nature* 402: 537-40.
36. Vassar, R., B. D. Bennett, et al. (1999). "Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE." *Science* 286: 735-41.
37. Yan, R., M. J. Bienkowski, et al. (1999). "Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity." *Nature* 402 533-7.
38. Vassar, R., D. M. Kovacs, et al. (2009). "The beta-secretase enzyme BACE in health and Alzheimer's disease: regulation, cell biology, function, and therapeutic potential." *J Neurosci* 29: 12787-94.
39. Cai, H., Y. Wang, et al. (2001). "BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons." *Nat Neurosci* 4: 233-4.
40. Roberds, S. L., J. Anderson, et al. (2001). "BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary beta-secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics." *Hum Mol Genet* 10: 1317-24.
41. Ohno, M., E. A. Sametsky, et al. (2004). "BACE1 deficiency rescues memory deficits and cholinergic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease." *Neuron* 41: 27-33.
42. Laird, F. M., H. Cai, et al. (2005). "BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid-beta amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions." *J Neurosci* 25: 11693-709.
43. Willem, M., A. N. Garratt, et al. (2006). "Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1." *Science* 314: 664-6.
44. Gersbacher, M. T., D. Y. Kim, et al. (2010). "Identification of BACE1 cleavage sites in

- human voltage-gated sodium channel beta 2 subunit." *Mol Neurodegener* 5: 61.
45. Wolfe, M. S., W. Xia, et al. (1999). "Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity." *Nature* 398: 513-7.
 46. Laudon, H., E. M. Hansson, et al. (2005). "A nine-transmembrane domain topology for presenilin 1." *J Biol Chem* 280: 35352-60.
 47. Thinakaran, G., D. R. Borchelt, et al. (1996). "Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo." *Neuron* 17: 181-90.
 48. Figueroa, D. J., J. A. Morris, et al. (2002). "Presenilin-dependent gamma-secretase activity modulates neurite outgrowth." *Neurobiol Dis* 9: 49-60.
 49. Ahn, K., C. C. Shelton, et al. (2010). "Activation and intrinsic gamma-secretase activity of presenilin 1." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 21435-40.
 50. Esler, W. P., W. T. Kimberly, et al. (2000). "Transition-state analogue inhibitors of gamma-secretase bind directly to presenilin-1." *Nat Cell Biol* 2: 428-34.
 51. Li, Y. M., M. Xu, et al. (2000). "Photoactivated gamma-secretase inhibitors directed to the active site covalently label presenilin 1." *Nature* 405: 689-94.
 52. Yu, G., M. Nishimura, et al. (2000). "Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing." *Nature* 407: 48-54.
 53. Fagan, R., M. Swindells, et al. (2001). "Nicastrin, a presenilin-interacting protein, contains an aminopeptidase/transferrin receptor superfamily domain." *Trends Biochem Sci* 26: 213-4.
 54. Shah, S., S. F. Lee, et al. (2005). "Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor." *Cell* 122: 435-47.
 55. Dries, D. R., S. Shah, et al. (2009). "Glu-333 of nicastrin directly participates in gamma-secretase activity." *J Biol Chem* 284: 29714-24.
 56. Chavez-Gutierrez, L., A. Tolia, et al. (2008). "Glu(332) in the Nicastrin ectodomain is essential for gamma-secretase complex maturation but not for its activity." *J Biol Chem* 283: 20096-105.
 57. Pamren, A., J. Wanngren, et al. (2011). "Mutations in nicastrin protein differentially affect amyloid beta-peptide production and Notch protein processing." *J Biol Chem* 286: 31153-8.
 58. Francis, R., G. McGrath, et al. (2002). "aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation." *Dev Cell* 3: 85-97.

59. Fortna, R. R., A. S. Crystal, et al. (2004). "Membrane topology and nicastrin-enhanced endoproteolysis of APH-1, a component of the gamma-secretase complex." *J Biol Chem* 279: 3685-93.
60. Crystal, A. S., V. A. Morais, et al. (2003). "Membrane topology of gamma-secretase component PEN-2." *J Biol Chem* 278: 20117-23.
61. Lee, S. F., S. Shah, et al. (2002). "Mammalian APH-1 interacts with presenilin and nicastrin and is required for intramembrane proteolysis of amyloid-beta precursor protein and Notch." *J Biol Chem* 277: 45013-9.
62. LaVoie, M. J., P. C. Fraering, et al. (2003). "Assembly of the gamma-secretase complex involves early formation of an intermediate subcomplex of Aph-1 and nicastrin." *J Biol Chem* 278: 37213-22.
63. Luo, W. J., H. Wang, et al. (2003). "PEN-2 and APH-1 coordinately regulate proteolytic processing of presenilin 1." *J Biol Chem* 278: 7850-4.
64. Takasugi, N., T. Tomita, et al. (2003). "The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex." *Nature* 422: 438-41.
65. Niimura, M., N. Isoo, et al. (2005). "Aph-1 contributes to the stabilization and trafficking of the gamma-secretase complex through mechanisms involving intermolecular and intramolecular interactions." *J Biol Chem* 280: 12967-75.
66. Chyung, J.H., DM. Raper, et al. (2005) "Gamma-secretase exists on the plasma membrane as an intact complex that accepts substrates and effects intramembrane cleavage." *J Biol Chem*. 280: 4383-92.
67. Haass, C., C. Kaether, et al. (2012) "Trafficking and proteolytic processing of APP." *Cold Spring Harbor Perspect Med*. 2: a006270.
68. Haapasalo, A. and D. M. Kovacs (2011). "The many substrates of presenilin/gamma-secretase." *J Alzheimers Dis* 25: 3-28.
69. Weidemann, A., S. Eggert, et al. (2002). "A novel epsilon-cleavage within the transmembrane domain of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with Notch processing." *Biochemistry* 41: 2825-35.
70. Zhao, G., G. Mao, et al. (2004). "Identification of a new presenilin-dependent zeta-cleavage site within the transmembrane domain of amyloid precursor protein." *J Biol Chem* 279: 50647-50.
71. Sato, T., Y. Tanimura, et al. (2005). "Blocking the cleavage at midportion between gamma- and epsilon-sites remarkably suppresses the generation of amyloid beta-protein." *FEBS Lett* 579: 2907-12.

72. Zhao, G., M. Z. Cui, et al. (2005). "gamma-Cleavage is dependent on zeta-cleavage during the proteolytic processing of amyloid precursor protein within its transmembrane domain." *J Biol Chem* 280: 37689-97.
73. Chavez-Gutierrez, L., L. Bammens, et al. (2012). "The mechanism of gamma-Secretase dysfunction in familial Alzheimer disease." *EMBO J* 31: 2261-74.
74. Passer, B., L. Pellegrini, et al. (2000). "Generation of an apoptotic intracellular peptide by gamma-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid beta protein precursor." *J Alzheimers Dis* 2: 289-301.
75. Kopan, R., E. H. Schroeter, et al. (1996). "Signal transduction by activated mNotch: importance of proteolytic processing and its regulation by the extracellular domain." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 1683-8.
76. Schroeter, E. H., J. A. Kisslinger, et al. (1998). "Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain." *Nature* 393: 382-6.
77. Shen, J., R. T. Bronson, et al. (1997). "Skeletal and CNS defects in Presenilin-1- deficient mice." *Cell* 89: 629-39.
78. Donoviel, D. B., A. K. Hadjantonakis, et al. (1999). "Mice lacking both presenilin genes exhibit early embryonic patterning defects." *Genes Dev* 13: 2801-10.
79. Li, T., G. Ma, et al. (2003). "Nicastrin is required for assembly of presenilin/gamma-secretase complexes to mediate Notch signaling and for processing and trafficking of beta-amyloid precursor protein in mammals." *J Neurosci* 23: 3272-7.
80. Ma, G., T. Li, et al. (2005). "APH-1a is the principal mammalian APH-1 isoform present in gamma-secretase complexes during embryonic development." *J Neurosci* 25: 192-8.
81. Wong, G. T., D. Manfra, et al. (2004). "Chronic treatment with the gamma-secretase inhibitor LY-411,575 inhibits beta-amyloid peptide production and alters lymphopoiesis and intestinal cell differentiation." *J Biol Chem* 279: 12876-82.
82. Evin, G., M. F. Sernee, et al. (2006). "Inhibition of gamma-secretase as a therapeutic intervention for Alzheimer's disease: prospects, limitations and strategies." *CNS Drugs* 20: 351-72.
83. Wolfe, M. S. (2008). "Inhibition and modulation of gamma-secretase for Alzheimer's disease." *Neurotherapeutics* 5: 391-8.
84. Panza, F., V. Solfrizzi, et al. (2009). "Disease-modifying approach to the treatment of Alzheimer's disease: from alpha-secretase activators to gamma-secretase inhibitors and modulators." *Drugs Aging* 26: 537-55.
85. Zhou, S., H. Zhou, et al. (2005). "CD147 is a regulatory subunit of the gamma-secretase

complex in Alzheimer's disease amyloid beta-peptide production." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 7499-504.

86. Chen, F., H. Hasegawa, et al. (2006). "TMP21 is a presenilin complex component that modulates gamma-secretase but not epsilon-secretase activity." *Nature* 440: 1208-12.
87. Wakabayashi, T., K. Craessaerts, et al. (2009). "Analysis of the gamma-secretase interactome and validation of its association with tetraspanin-enriched microdomains." *Nat Cell Biol* 11: 1340-6.
88. He, G., W. Luo, et al. (2010). "Gamma-secretase activating protein is a therapeutic target for Alzheimer's disease." *Nature* 467: 95-8.
89. Teranishi, Y., J. Y. Hur, et al. (2010) "Affinity pulldown of gamma-secretase and associated proteins from human and rat brain." *J. Cell. Mol. Med.* 14: 2675-86.
90. Hur, J. Y., Y. Teranishi, et al. (2012). "Identification of Novel γ -Secretase-associated Proteins in Detergent-resistant Membranes from Brain." *J Biol Chem.* 287: 11991-2005.
91. Frykman, S., Y. Teranishi, et al. (2012) "Identification of two novel synaptic γ secretase associated proteins that affect amyloid β -peptide levels without altering Notch processing." *Neurochem Int.* 61: 108-18
92. Teranishi, Y., JY. Hur, et al. (2012) "Erlin-2 is associated with active c-secretase in brain and affects amyloid β -peptide production." *Biochem Biophys Res Commun* 424, 476-81.
93. Teranishi, Y., M. Inoue, et al. (2015) "Proton myo-inositol cotransporter is a novel gamma-secretase associated protein that regulates Abeta production without affecting Notch cleavage." *FEBS J.* 282: 3438-51.
94. Lazarov, VK., PC. Fraering, et al. (2006) "Electron microscopic structure of purified, active gamma-secretase reveals an aqueous intramembrane chamber and two pores." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 6889-94.
95. Osenkowski, P., H. Li, et al. (2009) "Cryoelectron microscopy structure of purified gamma-secretase at 12 Å resolution." *J Mol Biol* 385: 642-52.
96. Renzi, F., X. Zhang, et al. (2011) "Structure of gamma-secretase and its trimeric pre-activation intermediate by single-particle electron microscopy." *J Biol Chem* 286: 21440-9.
97. Soderberg, O., K.J. Leuchowius, et al., (2008) "Characterizing proteins and their interactions in cells and tissues using the in situ proximity ligation assay," *Methods* 45 227-32.
98. Wanngren, J., J. Franberg, et al. (2010). " The large hydrophilic loop of presenilin 1 is important for regulating gammasecretase complex assembly and dictating the amyloid

- beta peptide (Abeta) Profile without affecting Notch processing." *J Biol Chem* 285: 8527-36.
99. Fath, T., YD. Ke, et al. (2009). "Primary support cultures of hippocampal and substantia nigra neurons." *Nat Protoc* 4: 78-85.
 100. Shearman, MS., D. Beher, et al. (2000) "L-685,458, an aspartyl protease transition state mimic, is a potent inhibitor of amyloid beta-protein precursor gamma-secretase activity." *Biochemistry* 39: 8698-704.
 101. Schon, EA., E. Area-Gomez, (2010) "Is Alzheimer's disease a disorder of mitochondria-associated membranes?" *J Alzheimers Dis* 20 Suppl 2: S281-92.
 102. Frykman, S., JY. Hur, et al. (2010) "Synaptic and endosomal localization of active gamma-secretase in rat brain." *PLoS One* 5: e8948.
 103. Hur, JY., H. Welander, et al. (2008) Active gamma-secretase is localized to detergent-resistant membranes in human brain." *Febs J* 275: 1174-1187.
 104. Jeong, SJ., HS. Kim, et al. (2000) "Subcellular localization of presenilins during mouse preimplantation development." *Faseb J* 14: 2171-2176.
 105. Soderberg, O., M. Gullberg, et al. (2006) "Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation." *Nat Methods* 3: 995-1000.
 106. Franberg, J., H. Welander H, et al. (2007) "Rat brain gamma-secretase activity is highly influenced by detergents." *Biochemistry* 46: 7647-54.
 107. Nilsson, T., K. Malkiewicz, et al. (2006). "Antibody-bound amyloid precursor protein upregulates ornithine decarboxylase expression." *Biochem Biophys Res Commun* 341: 1294-9.
 108. Hollingworth, P., D. Harold, et al. (2011) "Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease." *Nat Genet* 43: 429-35.
 109. Levental, I., D. Lingwood, et al. (2010) "Palmitoylation regulates raft affinity for the majority of integral raft proteins." *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 22050-4.
 110. Bhattacharyya, R., C. Barren, et al. (2013) Palmitoylation of amyloid precursor protein regulates amyloidogenic processing in lipid rafts." *J Neurosci* 33, 11169-83.
 111. Benarroch, EE. (2014) "Brain glucose transporters: implications for neurologic disease." *Neurology* 82: 1374-9.
 112. Pevsner, J., SC. Hsu, et al. (1994) "n-Sec1: a neural-specific syntaxin-binding protein." *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 1445-9.
 113. Winblad. B., CG. Gottfries, et al. (1979) "Monoamine oxidase in platelets and brains of

- non-psychiatric and non-neurological geriatric patients.” *Med Biol.* 57: 129-32.
114. Adolfsson. R., CG. Gottfries, et al. (1980) “Increased activity of brain and platelet monoamine oxidase in dementia of Alzheimer type.” *Life Sci.* 27: 1029-34.
 115. Rodriguez-Vieitez. E., L. Saint-Aubert, et al. (2016) “Diverging longitudinal changes in astrogliosis and amyloid PET in autosomal dominant Alzheimer’s disease.” *Brain.* 139: 922-36.
 116. Sano, M., C. Ernesto, et al. (1997) “A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer’s disease. The Alzheimer’s Disease Cooperative Study.” *N Engl J Med.* 336: 1216-22.
 117. Dani, A., B. Huang, et al. (2010) “Superresolution imaging of chemical synapses in the brain. *Neuron.*” 68: 843-56.
 118. Hashimoto, M., N. Bogdanovic, et al. (2010). "Analysis of microdissected human neurons by a sensitive ELISA reveals a correlation between elevated intracellular concentrations of Abeta42 and Alzheimer's disease neuropathology." *Acta Neuropathol.* 119: 543-54.
 119. Saura, J., JM. Luque, et al. (1994) “Increased monoamine oxidase B activity in plaque-associated astrocytes of Alzheimer brains revealed by quantitative enzyme radioautography.” *Neuroscience.* 62: 15-30.
 120. Mousseau, DD., GB. Baker. (2012) “Recent developments in the regulation of monoamine oxidase form and function: is the current model restricting our understanding of the breadth of contribution of monoamine oxidase to brain [dys]function?” *Curr Top Med Chem.* 12: 2163-76.
 121. Area-Gomez, E., EA. Schon. (2016) “Mitochondria-associated ER membranes and Alzheimer disease.” *Curr Opin Genet Dev.* 38: 90-6.
 122. Schreiner, B., L. Hedskog, et al. (2015) “Amyloid-beta peptides are generated in mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes.” *J Alzheimers Dis.* 43: 369-74.
 123. Binda, C., A. Mattevi, et al. (2011) “Structural properties of human monoamine oxidases A and B.” *Int Rev Neurobiol.* 100: 1-11.
 124. Bar-Am, O., T. Amit, et al. (2010) “Propargylamine containing compounds as modulators of proteolytic cleavage of amyloid-beta protein precursor: involvement of MAPK and PKC activation.” *J Alzheimers Dis.* 21: 361-71.
 125. Bar-Am, O., M. Yogev-Falach, et al. (2004) “Regulation of protein kinase C by the anti-Parkinson drug, MAO-B inhibitor, rasagiline and its derivatives, in vivo.” *J Neurochem.* 89: 1119-25.

126. Carter, SF., M. Scholl, et al. (2012) "Evidence for astrocytosis in prodromal Alzheimer disease provided by 11Cdeuterium-L-deprenyl: a multitracers PET paradigm combining 11CPittsburgh compound B and 18 F-FDG." *J Nucl Med.* 53: 37-46.
127. Scholl. M., SF. Carter, et al. (2015) "Early astrocytosis in autosomal dominant Alzheimer's disease measured in vivo by multitracers positron emission tomography." *Sci Rep.* 5: 16404.
128. He, C., F. Chen, et al. (2014) "Neurophysiology of HCN channels: from cellular functions to multiple regulations." *Prog. Neurobiol.* 112: 1-23.
129. Satoh, TO., M. Yamada. (2000) "A bradycardiac agent ZD7288 blocks the hyperpolarization-activated current (I_h) in retinal rod photoreceptors." *Neuropharmacology.* 39: 1284-91.
130. Lundgren, J.L., S. Ahmed, et al., (2014). "Activity-independent release of the amyloid beta-peptide from rat brain nerve terminals." *Neurosci. Lett.* 566C 125-30.
131. Tomita, S., Y. Kirino, et al. (1998) "Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein (APP) by secretases occurs after O-glycosylation of APP in the protein secretory pathway. Identification of intracellular compartments in which APP cleavage occurs without using toxic agents that interfere with protein metabolism." *J. Biol. Chem.* 273: 6277-84.
132. Saito, Y., T. Inoue, et al. (2012) "Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated channels: a potential molecular link between epileptic seizures and Aβ generation in Alzheimer's disease." *Mol. Neurodegener.* 7: 50.
133. Saito, Y., M. Akiyama, et al. (2011) "Intracellular trafficking of the amyloid beta-protein precursor (APP) regulated by novel function of X11-like." *PLoS One* 6 e22108.
134. Lewis, A.S., D.M. Chetkovich (2011) HCN channels in behavior and neurological disease: too hyper or not active enough?" *Mol. Cell Neurosci.* 46: 357-67.
135. Chen, A.C., S. Kim, et al. (2003) "Physical and functional interaction between the alpha- and gamma-secretases: a new model of regulated intramembrane proteolysis." *J. Cell Biol.* 211: 1157-76.
136. Hebert, S.S., V. Bourdages, et al. (2003) "Presenilin-1 interacts directly with the beta-site amyloid protein precursor cleaving enzyme (BACE1)." *Neurobiol. Dis.* 13: 238-45.