63　神経細胞におけるエンドソーム輸送制御と認知症	久永　眞市

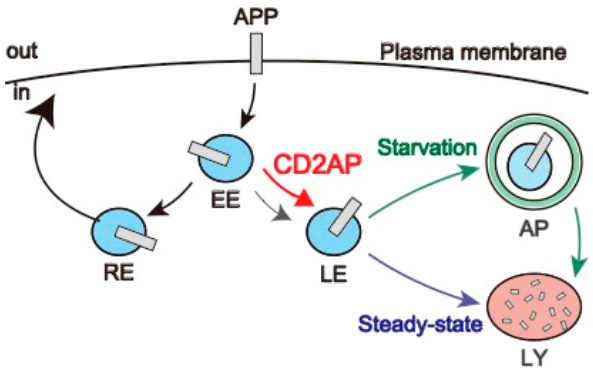
【目的】アルツハイマー病（AD）や前頭側頭葉型認知症（FTD）など神経変性疾患の多くは加齢依存的である。高齢化が進み、患者数は増加の一途を辿っており、病因の解明が急務である。家族性（遺伝性）の研究から原因遺伝子が同定されている疾患も多い。AD ではアミロイドβ（Aβ）がアミロイド前駆体タンパク質（APP）からβセクレターゼ（BACE1）とγセクレターゼ（PSEN1／2）によって切り出されるのが発端となる。しかし、認知症になる仕組みは解明されていない。AD の原因因子、APP、BACE1、PSEN1／2 は全て膜タンパク質で、エンドソームによって細胞膜と細胞内を行来している。以前は Aβの切り出し機構が注目され、エンドソーム輸送関連の研究は少なかった。ところが、最近認知症患者のゲノムワイドな遺伝子解析が行われ、エンドソーム輸送制御因子が一群の危険因子として同定されたことから、認知症発症におけるエンドソーム輸送の重要性が認識されるようになった。

最近の認知症研究では原因タンパク質の伝搬、即ち、変性・凝集した病原タンパク質が神経細胞から神経細胞へと伝搬し、脳全体へと病態を広げるという説が注目されている。まだ様々な仮説が乱立しているが、神経細胞間の移動にはエンドソームの関与が示唆されており、エンドソーム輸送は疾患の発端ばかりではなく、病態進行にも関わると考えられる。我々は、ここ 10 年ほど神経細胞におけるエンドサイトーシスやエンドソーム輸送の生理的な役割について研究を続けてきた。その過程で、神経細胞でエンドソーム輸送を制御する新たな因子を 4 つ（CD2AP／CIN85、LMTK1、GRAB、CHMP2B）ほど見つけた。非常に興味あることに、それらのうち 3 つは AD や FTD の原因または危険因子であった。そこで、ここ数年は視点を神経変性疾患へとシフトさせて研究を続けている。神経細胞は軸索と樹状突起という長い神経突起を介し、神経回路を形成し、記憶、学習、認知など高度な脳機能を果たしている。軸索先端で使われるタンパク質は神経細胞体で合成され、エンドソーム輸送によって末端まで運ばれていく。これは神経細胞にとって非常に大きな負担であり、加齢に伴いその破綻が生じても不思議ではない。本研究では、我々の見つけたエンドソーム輸送制御因子 2 つ（CD2AP と LMTK1）の役割と神経変性疾患との関連について調べた。

【方法】主に株化培養細胞、マウス初代神経細胞に CD2AP または LMTK1 を AD 関連因子である APP や BACE1 などと共発現させ、その細胞内局在や輸送、およびその役割について調べた。

【結果】APP はリサイクリングエンドソーム輸送（図の RE）により細胞膜と細胞内の膜小器官を行き来する。APP のタンパク質量は後期エンドソーム（図の LE）を経由してリソゾーム（図の LY）で分解されることで調節されている。CD2AP は初期エンドソーム（図の EE）から後期エンドソームへ（LE）の輸送を促進し、APP の分解を促進することが明らかとなった（図参照）。CD2AP 活性の低下は APP のエンドソーム滞在時間を長くして、Aβ生成の可能性を高めると考えられる。LMTK1 をノックアウトやノックダウンするとシナプス形成が促進された。また、BACE1 の局在に異常が見られることが判明した。LMTK1 の機能異常が変性疾患と関連する可能性が示唆された。

CD2AP による APP の細胞内輸送制御機構



63. 神経細胞におけるエンドソーム輸送制御と認知症

久永　眞市

首都大学東京 大学院理工学研究科

Key words：アルツハイマー病，認知症，危険因子，エンドソーム，小胞輸送

緒　言

アルツハイマー病（AD）や前頭側頭葉型認知症（FTD）など神経変性疾患の多くは加齢依存的である。高齢化が進み、患者数は増加の一途を辿っており、病因の解明が急務である。家族性（遺伝性）の研究から原因遺伝子が同定されている疾患も多い。AD ではアミロイドβ（Aβ）がアミロイド前駆体タンパク質（APP）からβセクレターゼ（BACE1）とγセクレターゼ（PSEN1／2）によって切り出されるのが発端となる。しかし、認知症になる仕組みは解明されていない。AD の原因因子、APP、BACE1、PSEN1／2 は全て膜タンパク質で、エンドソームによって細胞膜と細胞内を行来している。以前は Aβの切り出し機構が注目され、エンドソーム輸送関連の研究は少なかった。ところが、最近認知症患者のゲノムワイドな遺伝子解析が行われ、エンドソーム輸送制御因子が一群の危険因子として同定されたことから［1〜4］、認知症発症におけるエンドソーム輸送の重要性が認識されるようになった。

また、最近の認知症研究では原因タンパク質の伝搬、即ち、変性・凝集した病原タンパク質が神経細胞から神経細胞へと伝搬し、脳全体へと病態を広げるという説が注目されている。まだ様々な仮説が乱立しているが、神経細胞間の移動にはエンドソームの関与が示唆されており、エンドソーム輸送は疾患の発端ばかりではなく、病態進行にも関わると考えられる。我々は、ここ 10 年ほど神経細胞におけるエンドサイトーシスやエンドソーム輸送の生理的な役割について研究を続けてきた。その過程で、神経細胞でエンドソーム輸送を制御する新たな因子を 4 つほど（CD2AP／CIN85、LMTK1、GRAB、CHMP2B）見つけた［5〜7］。非常に興味あることに、それらのうち 3 つは AD や FTD の原因または危険因子であった［5〜7］。そこで、ここ数年は視点を神経変性疾患へとシフトさせて研究を続けている。何故、神経細胞でエンドソーム輸送の障害が神経変性疾患の原因・危険因子になるかについては次のように考えている。神経細胞は軸索と樹状突起という長い神経突起を介し、神経回路を形成し、記憶、学習、認知など高度な脳機能を果たしている。軸索は長いもので 1 m にも及び、その先端で使われるタンパク質は神経細胞体で合成され、エンドソーム輸送によって末端まで運ばれていく。これは神経細胞にとって非常に大きな負担であり、加齢に伴いその破綻が生じても不思議ではない。このようにエンドソーム輸送の機能障害は神経細胞で特に影響を受けやすく、それが AD や FTD など認知症の原因・危険因子の所以ではないかと考えている。

本研究では、認知症原因・危険因子であるエンドソーム輸送制御タンパク質である CD2AP、LMTK1 ついて、それらの神経における役割を解析し、認知症を起こす仕組みにアプローチしてきた。その結果について報告する。

方　法

1. アルツハイマー病危険因子 CD2AP のアミロイド前駆体タンパク質（APP）輸送における役割

APP を CD2AP や各種 Rab 低分子量 G タンパク質と株化培養細胞や初代培養神経細胞に発現させ、細胞内局在を蛍光観察するとともに、免疫ブロッティング法により APP の発現量を測定した。アミロイドβはエライザ法によって定量した。

2. LMTK１のシナプス形成とβセクレターゼ（BACE1）輸送における役割

マウス胎児脳から分離した神経細胞は培養２週間目以降にシナプスを形成する。LMTK1 のシナプス形成における役割を明らかにするため、培養 10 日前後に LMTK1 のノックダウンベクターやキナーゼ不活性型を細胞内に導入し、シナプス形成を EGFP の蛍光で培養 15 日前後に観察した。BACE1 については、株化培養細胞や神経細胞へ LMTK1 と共発現させ、細胞内局在を蛍光染色によって観察した。

結　果

1. アルツハイマー病危険因子 CD2AP のアミロイド前駆体タンパク質（APP）輸送における役割

APP と各種 Rab（Rab5、Rab7、Rab8、Rab11 など）との共局在を観察したところ、APP は Rab7 以外の Rab と 30 から 50%とかなりの高い割合で共局在を示したが、後期エンドソームのマーカーである Rab7 との共局在は少なく、主にリサイクル系で細胞内を輸送されていることが示された。そこへ CD2AP を加えると、APP の Rab7 との共局在が選択的に増加した。即ち、CD2AP は APP の輸送をリサイクル系から後期エンドソームとリソゾーム系へとシフトさせることが示された。リソゾームは膜タンパク質の分解に関わる。APP の分解が CD2AP によって影響を受けるかどうかを調べたところ、APP が分解され始めるまでの時間が短縮されることが示された。アルツハイマー病ではオートファジー分解系も異常になっていること、APP はオートファジー系でも分解されることが示されている。そこで、栄養飢餓によりオートファジーを誘導し、その時の APP の分解に対する CD2AP の影響についても調べた。CD2AP はオートファジーによる APP の分解においても、分解までにかかる時間を短縮していた。これらの結果は培養神経細胞でも確認ができた。CD2AP は Aβの産生を抑えることが示された。

2. LMTK１のシナプス形成とβセクレターゼ（BACE1）輸送における役割

LMTK1 は細胞内における Rab11 依存的なエンドソーム輸送を抑制することをすでに明らかにしている。Rab11 はスパイン形成にも関与していることが報告されている。即ち、LMTK1 は Rab11 を介してスパイン形成を制御している可能性が考えられた。スパインは興奮性シナプスの後シナプス構造であり、アルツハイマー病の初期にその機能が低下することが示唆されている。LMTK1 ノックアウトマウスの脳内でのスパイン数を PSD95 による免疫染色で調べると、スパイン数が増加していた。培養神経細胞を用いてスパイン形成における LMTK1 の影響を調べた。LMTK1 の不活性型やノックダウンベクターを神経細胞に導入するとスパイン密度が増加した。この効果は Rab11 活性を介して行われていたが、直接の相互作用は見られなかった。Rab11 の活性化因子（GEF）、不活性化因子（GAP）と LMTK1 との相互作用を調べたところ、LMTK1 は GAP である TBC1D9B と結合し、GAP 活性を制御することが明らかとなった。TBC1D9B は実際にスパイン形成を、Rab11 の不活性化を介して負に制御していることも初めて示された。

BACE1 は AD 脳において、APP のβ切断を最初にする膜結合性のプロテアーゼである。どのエンドソームで APP と遭遇し、切断するかが未定である。BACE1 を LMTK1 の野生型またはキナーゼ不活性型と共発現させた時に、BACE1 の細胞内局在が変化することを見つけた。BACE1 は野生型 LMTK1 とリサイクリングエンドソームに存在し、LMTK1 の不活性型が存在すると、細胞内に分散していた。但し、その結果として、Aβの生成が増加するようなことは見られなかった。

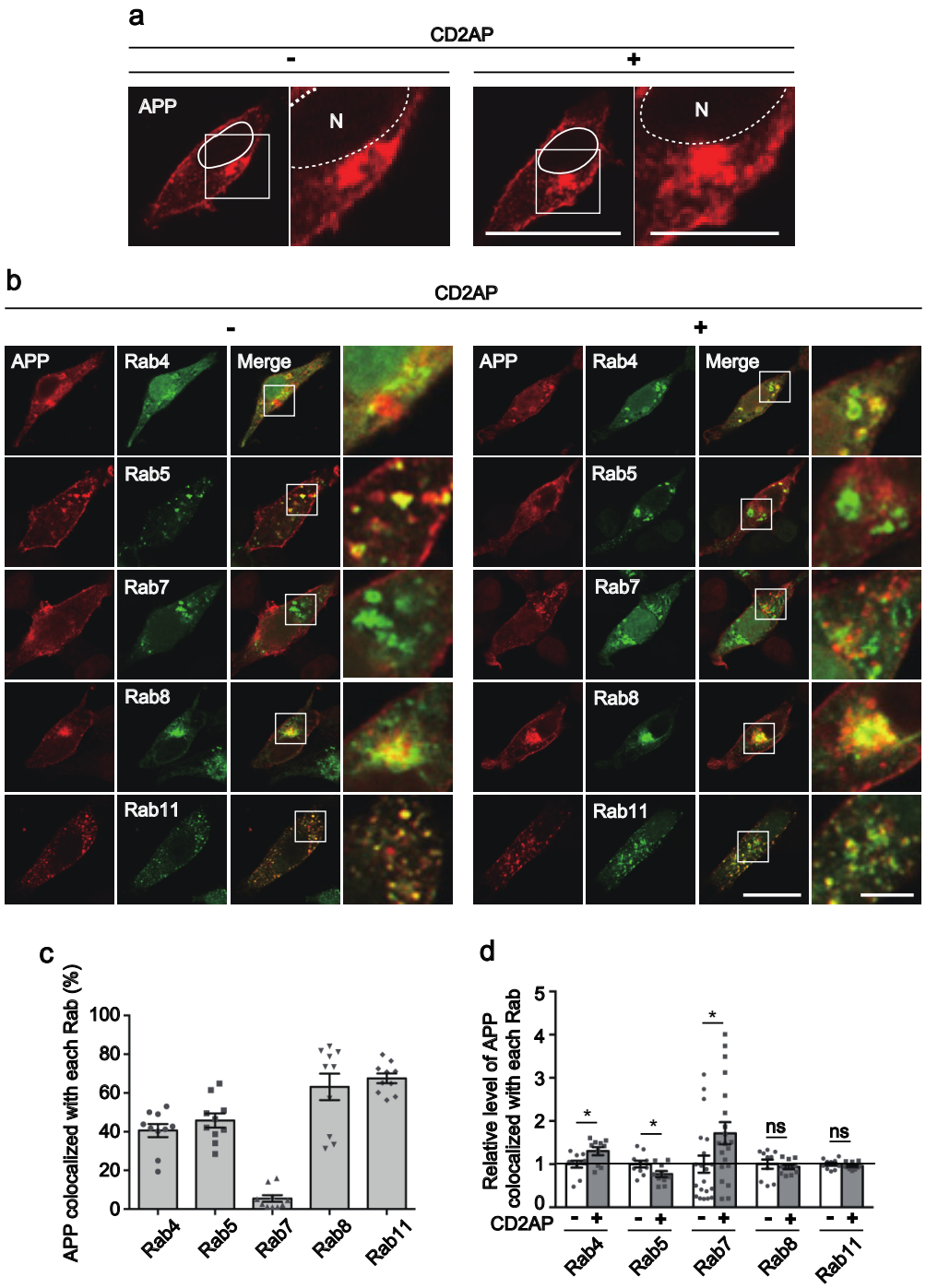


図 1. CD2AP は APP の後期エンドソーム局在を促進する

a) CD2AP 非存在下（−）、存在下（＋）における APP の細胞内局在。白丸は核の位置を示す。それぞれ右の写真は左の白枠を拡大したもの。バーの長さは、低倍が 20 μm で、高倍が 5 μm。

b) は APP と各種 Rab との共局在を示したもの。Rab4 は早いリサイクリングエンドソーム、Rab5 は初期エンドソーム、Rab7 は後期エンドソーム、Rab8 は分泌小胞、Rab11 は遅いリサイクリングエンドソームのマーカー。右側は高倍像。バーの長さは、低倍が 20 μm で高倍が 5 μm。

c) は APP が各エンドソームに局在する割合を測定した結果。

d) は APP の各エンドソームへの局在に対する CD2AP の影響を測定した結果。

*：$P < 0.05$、Student's t-test。

考　察

家族性 AD の原因遺伝子は APP、プレセニリン（PSEN1／2）であり、それらの変異によって起こる Aβの増加が原因であるのは定説となっている。しかし、神経細胞内のどこでその Aβの生成が起こり、何故神経細胞が障害を受けるのかはまだ明らかになっていない。また、殆どの AD 患者は孤発性であるが、その場合何故 Aβの生成が起こるのかはわかっていない。最近、危険因子の同定から APP の細胞内輸送との関係が示唆されるようになってきた。本研究では、CD2AP、LMTK1 という 2 つの疾患関連因子について、それらがどのように AD 発症に関わるかを調べ、CD2AP については APP を分解経路に誘導し、APP のタンパク質量を制御していること、LMTK1 はシナプス形成を制御し、BACE1 の細胞内局在を調節していることを明らかにした。しかし、これらの結果はまだ細胞レベルの結果である。今後はヒトの疾患での関わり方を明確にするとともに、これらをターゲットとした発症防止や治療法を開発していく必要があると考えられる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、首都大学東京大学院理工学研究科神経分子機能研究室の安藤香奈絵、斎藤太郎、古澤孝太郎、西野尋紀、魏冉、カクアンニ、東北大学大学院生命科学研究科細胞ネットワーク講座の福田光則、明海大学統合教育センターの友村美根子、東京大学大学院薬学研究科機能病理学教室富田泰輔、堀由起子、邱詠玟である。

文　献

1） Bertram L, McQueen MB, Mullin K, Blacker D, Tanzi RE. Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. Nat Genet. 2007 Jan;39(1):17-23. PubMed PMID: 17192785.

2） Harold D, et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. Nat Genet. 2009 Oct;41(10):1088-93. doi: 10.1038/ng.440. Epub 2009 Sep 6.

3） Hollingworth P, et al. Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. Nat Genet. 2011 May;43(5):429-35. doi: 10.1038/ng.803. Epub 2011 Apr 3. PubMed PMID: 21460840; PubMed Central PMCID: PMC3084173.

4） Treusch S, et al. Functional links between Aß toxicity, endocytic trafficking, and Alzheimer's disease risk factors in yeast. Science. 2011 Dec 2;334(6060):1241-5. doi: 10.1126/science.1213210. Epub 2011 Oct 27. PubMed PMID: 22033521; PubMed Central PMCID: PMC3281757.

5） Sato Y, Taoka M, Sugiyama N, Kubo K, Fuchigami T, Asada A, Saito T, Nakajima K, Isobe T, Hisanaga S. Regulation of the interaction of Disabled-1 with CIN85 by phosphorylation with Cyclin-dependent kinase 5. Genes Cells. 2007. Dec;12(12):1315-27. PubMed PMID: 18076569.

6） Takano T, Tomomura M, Yoshioka N, Tsutsumi K, Terasawa Y, Saito T, Kawano H, Kamiguchi H, Fukuda M, Hisanaga S. LMTK1/AATYK1 is a novel regulator of axonal outgrowth that acts via Rab11 in a Cdk5-dependent manner. J Neurosci. 2012 May 9;32(19):6587-99. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5317-11.2012. PubMed PMID: 22573681

7） Furusawa K, Asada A, Urrutia P, Gonzalez-Billault C, Fukuda M, Hisanaga S. Cdk5 Regulation of the GRAB-Mediated Rab8-Rab11 Cascade in Axon Outgrowth. J Neurosci. 2017 Jan 25;37(4):790-806. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2197-16.2016. PubMed PMID: 28123016.