

博士論文

アルツハイマー病遺伝学的危険因子
BIN1 による BACE1 および A β 制御の分子機構

宮川 統爾

アルツハイマー病遺伝学的危険因子
BIN1 による BACE1 および A β 制御の分子機構

東京大学大学院医学系研究科

脳神経医学専攻 神経内科学

指導教官 辻 省次 教授

氏名 宮川 統爾

目次

要旨.....	5
第1章 序文.....	6
1. アルツハイマー病.....	6
1-1. アルツハイマー病の疫学.....	6
1-2. アルツハイマー病病理とアミロイド仮説.....	6
1-3. APP からの A β 産生.....	8
1-4. BACE1 の基質.....	11
1-5. BACE1 の構造.....	11
1-6. BACE1 の細胞内局在制御.....	12
2. BIN1.....	14
2-1. アルツハイマー病遺伝学的危険因子 BIN1 の同定.....	14
2-2. BIN1 の構造と機能.....	16
2-3. AD 病態機序において BIN1 が担う役割.....	17
3. メンブレントラフィックの概略.....	19
3-1. エンドサイトーシス.....	19
3-2. エンドソーム輸送経路.....	21
4. 本研究の目的.....	23
第2章 方法.....	25
1. 発現ベクターの作製.....	25
1-1. human wild-type BIN1 Isoform 1 発現ベクター.....	25
1-2. BAR ドメイン/SH3 ドメイン欠失変異型 BIN1 Isoform 1 発現ベクター.....	26
1-3. human BACE1 K501R 発現ベクター.....	26
1-4. その他の発現ベクター.....	26
2. small interfering RNA (siRNA).....	27

3. 薬剤.....	27
4. 細胞の培養と遺伝子導入.....	27
4-1. 培養細胞	27
4-2. 培養条件	28
4-3. 細胞への一過性遺伝子導入, RNA interference	28
5. 抗体.....	28
6. A β C 末端断片特異的 sandwich ELISA 法による A β の測定.....	30
7. ウェスタンブロット解析.....	30
7-1. 細胞からのタンパク質抽出	30
7-2. 培地からのタンパク質抽出	31
7-3. ウェスタンブロット解析	31
8. 免疫細胞化学.....	31
9. endocytosis assay	32
9-1. 細胞表面 biotin 化による endocytosis assay.....	32
9-2. Ligand uptake assay	32
9-2-1. EGF uptake assay	33
9-2-2. SNAP-BACE1 uptake assay	33
10. GST pull-down assay	33
10-1. リコンビナントタンパク質の精製	33
10-2. cell lysate の調製.....	34
10-3. GST pull-down assay	34
11. <i>Bin1</i> ^{fllox/fllox} マウス由来 primary cortical neuron culture.....	34
11-1. 動物	35
11-2. primary cortical neuron culture の培養方法	35
11-2-1. 培養プレートの準備	35
11-2-2. Neuronal culture 培養液.....	35

11-2-3. リコンビナントレンチウイルス の生成, 濃縮.....	35
11-2-4. primary cortical neuron culture の取得と培養, リコンビナントレンチウイルス の感染.....	36
12. <i>in vitro</i> BACE1 activity assay	36
12-1. N2a 細胞からの可溶化膜画分の抽出.....	36
12-2. <i>in vitro</i> BACE1 activity assay.....	37
13. qRT-PCR	37
13-1. N2a 細胞からの RNA の単離.....	37
13-2. cDNA の精製.....	37
13-3. qRT-PCR.....	38
14. ショ糖密度勾配遠心法による endosome purification.....	38
第 3 章 結果.....	40
1. Bin1 ノックアウト神経細胞における分泌 A β への影響の解析.....	40
2. Bin1 ノックアウト神経細胞における BACE1 の mRNA 発現量の解析.....	41
3. 神経系培養細胞における Bin1 ノックダウンによる分泌 A β への影響の解析.....	42
4. 神経系培養細胞における Bin1 ノックダウンによる <i>in vitro</i> BACE1 活性の解析.....	42
5. 神経系培養細胞における Bin1 ノックダウンによる BACE1 の細胞表面からのエンド サイトーシス効率の解析.....	43
6. 非神経系培養細胞における BIN1 ノックダウンによる分泌 A β への影響の解析.....	43
7. 免疫細胞化学を用いた BIN1 ノックダウンによる BACE1 のエンドサイトーシスお よび細胞内小胞輸送への影響の解析.....	45
8. ショ糖密度勾配遠心法を用いた Bin1 ノックダウンによる BACE1 の細胞内分布の解 析.....	47
9. BACE1 K501R 変異体を用いた GGA3 依存的細胞内小胞輸送と BIN1 との関係の解析	48
10. GST pull-down assay を用いた BIN1 と BACE1 との相互作用を担う分子機構の解析	49

11. 欠失変異型 BIN1 発現神経系培養細胞における分泌 A β への影響の解析.....	50
第 4 章 考察.....	51
1. 結果のまとめ.....	51
2. primary cortical neuron culture における BIN1 ノックアウトによる影響.....	52
3. in vivo での中枢神経系における Bin1 ノックアウトの影響.....	54
3. BIN1 のドメインと BACE1 細胞内小胞輸送との関係.....	55
4. GWAS で同定された BIN1 の AD 関連 SNPs との関係.....	57
5. 本研究からの AD 治療への寄与.....	59
6. 結語.....	60
引用文献.....	62
図表.....	79
謝辞	

要旨

BIN1 は、アルツハイマー病 (AD) の遺伝学的危険因子として *APOE* の $\epsilon 4$ アレルに次いで大きな影響を持つ AD 感受性遺伝子だが、AD への寄与に対する *BIN1* の作用点や分子機構については多くは理解されていない。本研究では神経系および非神経系培養細胞を用いた *in vitro* の実験系において、AD の病態機序において最重要と考えられているアミロイド β ($A\beta$) および $A\beta$ 産生経路に関わる各因子への *BIN1* の関与の有無を検討した。そして *BIN1* が $A\beta$ 産生を担う *BACE1* の細胞内小胞輸送を制御することで $A\beta$ 産生量を変化させ、AD の病態機序に影響を与えている可能性を初めて提唱した。

第1章 序文

1. アルツハイマー病

1-1. アルツハイマー病の疫学

アルツハイマー病 (Alzheimer disease; AD) は、高齢者の認知症の原因疾患として最も多い神経変性疾患であり、1906年に初めての詳細な臨床像と剖検所見を報告[Alzheimer, 1906]したドイツの Alois Alzheimer にちなんで命名された [Kraepelin et al., 1910]. 世界的な高齢化社会の進展に伴って AD 患者は増加の一途をたどっており、世界保健機関 (WHO) の“Dementia; a public health priority”の報告では2012年時点で全世界の認知症患者数は3560万人、2050年に1億1540万人に達すると予測され、その半数以上は AD 患者と考えられている (http://www.who.int/mental_health/publications/dementia_report_2012/en/). また、2013年時点で約520万人の AD 患者を抱える米国では、ADに関わる年間政府支出が2030億ドルに達するのに加え、1540万人の家族などの介護者は年間175億時間を対価のない介護に費やし、これは2160億ドルの経済的損失に値する (http://www.alz.org/alzheimers_disease_facts_and_figures.asp). このように、ADが社会および経済に与える莫大な負荷はもはや看過できない状況にも関わらず、未だ AD の根本治療薬は存在せず、AD 発症と進展の分子機構解明は人類にとっての急務となっている。

1-2. アルツハイマー病病理とアミロイド仮説

Alois Alzheimer は AD の第一報告例となった Auguste D の剖検脳から、大脳皮質や海馬の広汎な神経細胞脱落、神経細胞内および神経細胞脱落部位に蓄積する神経原線維の束状構造 (神経原線維変化; neurofibrillary tangle; NFT), 細胞外に沈着する無数の易染性構造物 (老人斑; senile plaque; SP) という特徴的な病理所見を報告し[Alzheimer 1911], 100年以上経過した現在でも AD を特徴付ける重要な病理所見となっている。1980年代になり、Alzheimer による老人斑と神経原線維変化の報告から約80年の時を経て、老人斑の主要構成成分としてアミロイドβ蛋白 (Aβ) [Glennner et al 1984], 神経原線維変化の主要構成成分として微小管結合蛋白であるタウ蛋白 (tau) がそれぞれ同定された[Grundke-Iqbal et al 1979, Selkoe et al 1982, Ihara et al 1983, Nukina et al 1986]. cDNA クローニングにより Aβ が第21番染色体にコードされる amyloid precursor protein (APP) の一部であることが明らかになった[Kang et al. 1987]. また、Aβ は C 末端側長に多様性が見られ、主にアミノ酸数42個の Aβ42 とアミノ酸数40個の Aβ40 が存在する。Aβ42 は Aβ40 よりも細胞膜内部分に C 末端のアミノ酸が2個 (イソロイシン (Ile), アラニン (Ala)) 付加されており、より疎水性が強く凝集性が高く [Jarrett et al

1993], 老人斑の形成において A β 42 が優位に早期から蓄積することが報告された[Iwatsubo et al 1994, Gravina et al 1995].

これら AD を特徴づける病理所見および蓄積蛋白のうち、老人斑と A β , 神経原線維変化と tau, いずれがより病態機序への寄与として重要であるのか、いずれが神経細胞の機能障害および神経細胞死へ至る一連のカスケードの本流や上流に位置するのか、についての理解は、AD の病態解明や根本治療薬の開発の標的を定めるうえで極めて重要であり、様々なアプローチから研究が進められてきた。

ダウン症の患者は 40 歳頃から認知症を呈し、剖検脳で老人斑や神経原性線維変化などの AD 病理を有することが以前より知られていた。この知見をもとに、ダウン症患者の各年齢での剖検脳が検討された。老人斑は認知症を呈する以前の 30 歳頃から脳への沈着が観察される一方で、神経原性線維変化は老人斑の沈着から 10 年ほど遅れて 40 歳頃から見られた。また神経原線維変化を認める剖検脳では、老人斑も同時に存在していたことなどから、老人斑は神経原性線維変化に先行する病理所見であることが報告された[Ikeda et al 1989, Mann 1989].

ダウン症は A β の前駆体蛋白である APP が存在する 21 番染色体のトリソミーを原因とするため、APP からの A β 産生量の増加が AD による認知症発症につながることを示唆された。さらに A β の凝集による老人斑が AD やダウン症に比較的特異的に観察される所見であるのに対して、タウの異常リン酸化による凝集は、パーキンソン症候群を伴う前頭側頭型認知症 (frontotemporal dementia with parkinsonism), Pick 病, 進行性核上性麻痺, 皮質基底核変性症, 筋強直性ジストロフィーなど多くの神経変性疾患でも認められる所見であることが明らかになった。

1990 年代に入り、早発性の家族性 AD (familial AD; FAD) 家系において連鎖解析がなされ、APP 遺伝子の点突然変異が FAD に連鎖する遺伝子として初めて同定された[Goate et al 1991]. この変異は A β 配列の直後に相当する APP の第 717 番アミノ酸である Val 残基を Ile 残基に置換するもので、V717I 変異または London 型変異と呼ばれている。その後の連鎖解析により同定された APP 遺伝子変異の多くも、London 型変異と同様に A β 配列の近傍や内部に位置していた (AD mutation database; <http://www.molgen.ua.be/Admutations/>). 培養細胞を用いた APP 遺伝子変異の解析により、A β 配列直前に存在する Lys と Met がそれぞれ Asn と Leu に二重置換される Sweden 型変異 (KM670/671NL) では、A β 40, A β 42 ともいずれも産生増加し、A β 総量を数倍上昇させることが明らかとなった [Citron et al 1992, Cai et al 1993]. 一方 London 型変異では、A β 総量には変化がないものの、より凝集性の高い A β 42 産生比率の上昇が見られた[Suzuki et al. 1994]. これらはいずれも A β 産生過程に影響を与え、A β 量を増加させることが示唆された。

早期発症型 FAD において APP 遺伝子変異を有する頻度は比較的稀であり、1992 年に早期発症型 FAD のほとんどは 14 番染色体に連鎖していることが報告された[Schellenberg et al 1992]. この 14 番染色体に連鎖する遺伝子は 1995 年に同定され、*presenilin 1 (PSEN1, PS1)* と命名された[Sherrington et al 1995]. 同年には 1 番染色体に連鎖する PS1 に相同な遺伝子もまた早期発症型 FAD の病因遺伝子であることが示され、*presenilin 2 (PSEN2, PS2)* と命名された[Levy-Lahad et al 1995, Rogaev et al 1995]. これまでに PS1 と PS2 遺伝子において 150 種類以上の FAD に連鎖する点突然変異が同定されているが、その多くで患者の脳脊髄液や血漿中の A β 42 比率が上昇していることや、患者脳での A β 42 蓄積量が多いことが示された. また、培養細胞や遺伝子改変動物での検討でも、FAD の原因となる PS 遺伝子変異は A β 42 産生比率を上昇させることが示された[Borchelt 1996, Citron et al 1997, Tomita et al 1997]. 後に PS1 と PS2 は APP から A β の C 末端側を切り出す γ -secretase (後述) の構成因子であることが明らかとなった.

以上、老人斑は神経原線維変化よりも AD に対する疾患特異性が高いこと、AD やダウン症患者脳において老人斑の沈着が先行すること、FAD の連鎖解析による原因遺伝子として同定された APP, PS1, PS2 遺伝子上の変異はいずれも A β 産生に影響を与えること、などから、AD の発症機序において A β , その中でも A β 42 の増加が重要な役割を担うと考えられた. そして、A β の凝集、沈着を契機として tau の異常リン酸化、凝集による神経細胞死、認知症発症に至る一連の経時的な AD 発症機序をアミロイド仮説やアミロイドカスケード仮説として提唱され[Hardy and Selkoe 2002, Holtzman et al 2011.], AD の根本治療薬の開発の基盤として広く支持されている.

1-3. APP からの A β 産生

A β は、I 型 1 回膜貫通型糖タンパク質である APP からの 2 段階の切断を経て産生される. APP は脊椎動物に広く存在し、全身で発現が見られる. APP 遺伝子は第 21 番染色体上に位置し、18 のエクソンから構成される. 選択的スプライシングでの第 7, 8, 15 エクソンの有無により複数のアイソフォームが存在するが、主なものはそれぞれ 695, 751, 770 アミノ酸から構成される APP695 (エクソン 7, 8 欠損), APP751 (エクソン 8 欠損), APP770 の 3 種類である[Yoshikawa et al 1990]. 中枢神経系において主に発現するものは APP695 であり、APP751 と APP770 は末梢組織で広汎に発現している.

細胞内において APP は、大半が Golgi 体や *trans*-Golgi network (TGN) に局在し、一部は細胞膜表面に存在する. APP は N 末端側の大きな細胞外領域、単一の膜貫通領域、C 末端側の短い細胞質内領域により構成され、N 末端側の細胞外領域は神経栄養作用や細胞接着作用を担い、C 末端側は細胞内小胞輸送や細胞内シグナルに関与することが示唆されている. C 末端側の細胞質内領域での

Y⁶⁸²ENPTY⁶⁸⁷ (NPXY 内在化モチーフを含む) 配列を介したクラスリン依存的エンドサイトーシス (clathrin-mediated endocytosis; CME) により恒常的に細胞内に取り込まれ, この内在化が A β 産生に必須であると報告されている [Koo and Squazzo 1994, Perez et al 1999]. endosome へと内在化された APP はリサイクリング経路で再び細胞膜表面に戻るか, endosome 輸送経路に沿って順次輸送され, 最終的に lysosome で分解を受けると考えられている.

APP の代謝には A β 産生経路と A β 非産生経路の 2 種類の経路が存在する (図 1). APP からの A β 産生には, A β の N 末端に相当する β 部位と C 末端に相当する γ 部位での 2 カ所の切断を必要とするが, 一方で, 細胞膜近傍 (A β 配列では 16 番目 Lys と 17 番目 Leu の間) の α 部位での切断も存在し, それぞれの部位で働くプロテアーゼは β -secretase, γ -secretase, α -secretase と名付けられた. APP の代謝において, A β 産生経路に進むか A β 非産生経路に進んで A β 産生が回避されるかは, APP が β -secretase による β 切断を受けるか, α -secretase による α 切断を受けるかによって規定される. その切断の後には APP の膜貫通領域に存在する γ 部位で γ 切断を共通に受ける. このように 2 段階の連続した切断が起こる点が特徴的である. また, β 切断/ α 切断と γ 切断のいずれが先に起こるかに関しては, 培養細胞に APP を高発現させると A β 配列を含む APP の C 末端を有する APP C-terminal fragment (APP-CTF) が生じることや [Estus et al 1992], A β の全アミノ酸配列を含む可溶性の APP が検出されないことから [Maruyama et al 1994], β 切断/ α 切断が先に起こり, 続いて γ 切断が行われると考えられている.

A β 非産生経路では, α 部位で切断を受け, 細胞外へ N 末端断片 (sAPP α) が放出されると同時に膜上に C 末端断片 (α -CTF; C83) が生成される [Esch et al 1990, Sisodia et al 1990, Maruyama et al 1990]. 続いて γ -secretase により C83 が切断されて, p3 と細胞内断片である APP intracellular domain (AICD) が生じる. α -secretase としては I 型膜貫通型メタロプロテアーゼである A-disintegrin and metalloproteinase (ADAM) ファミリーがその候補とされてきた. 特に神経系特異的な ADAM10 コンディショナル KO マウス由来の培養神経細胞において分泌 sAPP α が減少すること, AD モデル動物である APP トランスジェニック (Tg) マウスに野生型 ADAM10 を過剰発現させると A β の著明な減少が見られるが酵素活性を失った E384A 変異を有する ADAM10 の過剰発現系ではこの現象が観察されなくなることなどから, ADAM10 が神経組織において主要な α -secretase 活性を有すると考えられている [Lin et al 2008, Jorissen et al 2010, Postina R et al 2004]. ごく最近, 遅発性 FAD に連鎖する変異が ADAM10 遺伝子に同定され, その変異が α -secretase 活性を低下させることで APP 代謝を A β 産生にシフトさせることが明らかとなった [Suh et al 2013]. また, ADAM9, ADAM17 (TNF α -converting enzyme; TACE) にも同様に α -secretase 活性が示唆されている.

A β 産生経路では, 第一段階の切断として, β -secretase により β 切断が行われ

る。β切断では sAPPα よりもやや短い N 末端断片 (sAPPβ) が細胞外へと分泌され、膜内にとどまり C83 よりも長い C 末端断片 (β-CTF; C99) が生成される。次いで、γ-secretase により C99 が切断されることで、Aβ と AICD が生じる。なお、β-secretase による APP の切断では β切断の他に、Aβ 配列の 10 番目 Tyr と 11 番目 Glu の間で β'切断と呼ばれる切断も行われ、その結果 sAPPβ' と β'-CTF (C89) が生成される。1999 年に複数のグループより、β-secretase 活性を有する同一の 501 アミノ酸からなる I 型膜貫通型アスパラギン酸プロテアーゼが単離され、現在は β-site APP cleaving enzyme 1 (BACE1) の名で統一された[Hussain et al 1999, Sinha et al 1999, Vassar et al 1999, Yan et al 1999, Lin et al 2000]。BACE1 遺伝子は第 11 番染色体上に存在し、脳内の神経細胞で比較的特異的に発現している。一方、BACE1 のホモログである BACE2 は末梢組織で発現しており、脳内での β-secretase 活性や Aβ 産生能は有していないと考えられている。

γ-secretase は APP の Aβ 産生経路における β-secretase もしくは Aβ 非産生経路における α-secretase による切断に続く膜内での切断を担う。C99 からの γ切断による Aβ には C 末側長に多様性があり、N 末側から 40 残基目の切断が優位に起こり、同部位での切断の結果生成された Aβ40 の産生量は総 Aβ 産生量の 8-9 割を占める[Suzuki et al 1994]。Aβ42 は Aβ40 産生量の 1 割程度であるが、より高い凝集性と神経毒性を有するため AD 発症に重要な役割を果たすと考えられている[Jarrett et al 1993]。FAD 原因遺伝子として同定された PS1 と PS2 の解析が行われ、PS1 ノックアウトマウス由来の初代培養神経細胞において γ-secretase 活性が低下していること[De Strooper et al 1998]、PS1/PS2 ダブルノックアウトマウスの ES 細胞において γ-secretase 活性が完全に消失したことから[Herreman et al 2000]、PS が γ-secretase 活性に必須であることが示された。また、γ-secretase がアスパラギン酸プロテアーゼとしての性質を持つこと、467 アミノ酸から構成される 9 回膜貫通型タンパク質である PS の第 6, 7 膜貫通部位にはそれぞれ 1 つずつ保存性の高いアスパラギン残基が存在し、これらを他のアミノ酸に置換すると γ-secretase 活性が抑制されることが見出され、PS が膜内に活性中心を持つ新規アスパラギン酸プロテアーゼであるという仮説が Wolfe らにより提唱された[Wolfe et al 1999; Steiner et al 2000]。その後、生化学的な解析により PS が高分子量複合体に含まれることが明らかになり、その画分に γ-secretase 活性が認められたこと、また遷移状態模倣型阻害剤に直接 PS が結合したことから[Li et al., 2000; Esler et al 2000]、γ-secretase は膜タンパク質複合体であり、PS はその活性中心サブユニットであると考えられるようになった。PS1 の抗体カラムを用いた PS 複合体精製により、709 アミノ酸からなる 1 回膜貫通型タンパク質 Nicastrin (Nct) が同定され[Yu et al 2000]、線虫を用いたスクリーニングにより 265/257 アミノ酸からなる 7 回膜貫通型タンパク質 Aph-1 および 101 アミノ酸からなる 2 回膜貫通型タンパク質 Pen-2 がそれぞれ同定された[Goutte et al 2002, Francis et al 2002.]。

そして PS, Nct, Aph-1, Pen-2 を共発現させることで γ -secretase 複合体および活性が再構成されることが示され[Edbauer et al 2003; Takasugi et al 2003], PS/Nct/Aph-1/Pen-2 の 4 つの構成因子が γ -secretase の活性発揮に必要な最小構成単位であると考えられる。

1-4. BACE1 の基質

γ -secretase の主要構成因子である PS1 ノックアウトマウスが γ -secretase の生理基質の一つである Notch 欠損マウス同様に胎生致死であるのに対し[De Strooper et al 1999], BACE1 ノックアウトマウスは生存可能で、目立った異常を認めず脳での A β 産生が著明に減少したと報告された[Luo et al 2001]. その後, BACE1 の APP 以外の内因性基質として, Neureglin-1/3[Willem et al 2007], 電位依存性 Na チャネル (VGSC; Nav1) β サブユニット[Wong et al 2005], β -ガラクトシド α 2,6-シアル酸転移酵素 (ST6GalI) [Kitazume S et al 2001], APLP1/2[Li et al 2004], P-セレクトリン糖タンパク質リガンド 1 (PSGL1) [Lichtenthaler et al 2003], LDL 受容体関連タンパク質 (LRP) [Von Arnim 2005], IL-1RII[Kuhn et al 2007]などが次々に同定された. 一見有意な表現型を認めない BACE1 ノックアウトマウスでも, 末梢神経の髄鞘化遅延が観察されることが報告され, 末梢神経の髄鞘化に關与する Neureglin-1/3 に対する BACE1 によるシェディングの影響が考えられた [Willem et al 2006; Hu et al 2006]. しかし, この末梢神経の髄鞘化遅延の現象は個体の成長とともに目立たなくなり, BACE1 のヘテロノックアウトマウスでは観察されない. また, PSGL1 や ST6GalI は免疫系に関わるとされ, 非 SPF (specific pathogen-free) 環境下で飼育された BACE1 ノックアウトマウスは生後 1 週間以内の死亡率が高いと報告された[Dominguez et al 2005] .

1-5. BACE1 の構造

BACE1 は 501 アミノ酸からなる I 型の膜貫通型糖タンパク質であり, 活性部位が管腔側に配向している. N 末側から, シグナル配列 (残基 1~21), プロペプチドドメイン (残基 22~45), 触媒ドメイン (残基 46~460), 膜貫通ドメイン (残基 461~477), 細胞内ドメイン (残基 478~501) により構成される (図 2) [Shi et al 2001]. BACE1 は転写, 翻訳後, 二量体化し, S-パルミトイル化, 硫黄化, N-グリコシル化, アセチル化, リン酸化などの翻訳後修飾, プロドメインの切断などが行われることで成熟型となる. プロドメインは furin 様プロテアーゼにより切断されるが, BACE1 自身の活性を大きく阻害することなく, 触媒ドメイン内の活性部位が適切なフォールディングを行うためのシャペロンとして働く. 活性部位を構成する Asp⁹² と Asp²⁸⁹ 残基は, ペプシン, カテプシン D, レニンなどのアスパラギン酸プロテアーゼに保存される D(T/S)G(T/S)の共通配列の一部となっている. 触媒ドメイン内の 6 つのシステイン残基は 3 対のジスル

フィド結合を形成して BACE1 の立体構造維持に寄与し、活性部位を膜近傍へと折りたたむ[Hong et al. 2000]. 膜貫通ドメインと細胞内ドメインの膜近傍に存在する 4 つのシステイン残基 (Cys⁴⁷⁴/Cys⁴⁷⁸/Cys⁴⁸²/Cys⁴⁸⁵) は S-パルミトイル化を成熟化の過程で受け、脂質ラフトと呼ばれるコレステロールに富む膜内マイクロドメインに結合するアンカーとしての役割を担う[Benjannet et al 2001]. 細胞内ドメイン C 末端には ⁴⁹⁵DDISLLK⁵⁰¹ の酸性ジロイシンモチーフ (acid cluster-dileucine motif; DDXXLL)があり、BACE1 の細胞内小胞輸送や安定性の制御に関わる[Huse et al 2000].

1-6. BACE1 の細胞内局在制御

BACE1 による β 切断は $A\beta$ 産生過程における律速段階である. BACE1 は細胞内において後期 Golgi/TGN とエンドソームに主に局在し、一部は細胞膜表面とエンドソーム間を循環している[Huse et al 2000]. APP と BACE1 は細胞膜表面では空間的に異なる位置に局在し[Rajendran et al 2006], 細胞膜表面から初期エンドソームへのエンドサイトーシスにおいて APP がクラスリン依存的エンドサイトーシスによって内在化が行われるのに対し、BACE1 は ADP リボシル化因子 (Arf6) という small GTPase を介した非クラスリン依存的エンドサイトーシスにより内在化が行われると報告された[Santerud et al 2011]. 成熟型 BACE1 の半減期は 12~16 時間で、最終的にはライソソーム経路に輸送され分解される[Koh et al 2005]. α -secretase による α 切断が細胞膜表面で主に行われるのに対し、BACE1 による β 切断は大半が細胞内で行われると考えられている. BACE1 の至適 pH は酸性側にあり、このことから APP の BACE1 による β 切断は酸性環境下のエンドソームで最も効率よく行われると示唆され、特に Rab5 陽性初期エンドソームにおいて APP の切断が主に行われていると報告されている[Vassar et al 1999, Santerud et al 2011]. 実際に BACE1 の細胞膜表面からエンドソームへのエンドサイトーシスを阻害または促進させることで、 $A\beta$ 産生がそれぞれ減少、増加することが示され[Grbovic et al 2003, Carey et al 2005], BACE1 の細胞内局在の制御機構が $A\beta$ 産生および AD 発症に重要な役割を担っていると考えられるようになった[Rajendran et al 2012].

BACE1 の細胞内ドメインには DDXXLL で表される酸性ジロイシンモチーフに一致する ⁴⁹⁵DDISLL⁵⁰⁰ が存在し、BACE1 の細胞内局在の制御に関わっている. 細胞膜表面から Arf6 を含む超初期エンドソーム分画への輸送に酸性ジロイシンモチーフは必要ではないとされるが、Arf6 陽性顆粒から初期エンドソームへのソーティングに関与すると報告されている[Santerud et al 2011]. 酸性ジロイシンモチーフの 2 つの Leu を欠失した変異型 BACE1 ではエンドソーム内に BACE1 が保持されず、細胞膜表面での局在が増加する[Huse et al 2000]. また、BACE1 の酸性ジロイシンモチーフ内の ⁴⁹⁸Ser がリン酸化されることで初期エンドソ-

ムから TGN や後期エンドソームへの細胞内小胞輸送を促進させる。野生型 BACE1 とリン酸化された BACE1 を模倣した S498D の変異型 BACE1 では TGN や各エンドソームに BACE1 の局在が見られるが、リン酸化を受けない変異型である S498A では EEA1 陽性の初期エンドソームに BACE1 が蓄積する[Walter et al 2001].

この ⁴⁹⁸Ser のリン酸化が関与する酸性ジロイシンモチーフによる細胞内局在の制御には、Golgi localizing γ -adaptin ear containing ADP ribosylation factor binding protein (GGA) との結合が介在している。哺乳動物の GGA には GGA1~3 の 3 種類が存在し、VHS (Vps27/Hrs/STAM) ドメイン、GAT (GGA and Tom1), GAE (γ -adaptin ear) ドメインとヒンジ領域を有する。BACE1 の酸性ジロイシンモチーフ内の ⁴⁹⁸Ser がリン酸化を受けることで GGA の VHS ドメインとの結合が強固になり、GGA を介した BACE1 の初期エンドソームから TGN への細胞内小胞輸送が促進される[He X et al 2005]. GGA1 は中枢神経系の主に神経細胞に発現し、GGA1 を過剰発現させることで A β 産生が減少し、GGA1 を阻害すると A β が増加することが報告されている[Wahle et al 2006].

BACE1 のエンドソームから TGN への輸送には、GGA の他に、レトロマー複合体も関与する。レトロマーは I 型膜タンパク質をエンドソームから TGN へ輸送する輸送小胞のコート複合体で、2 つの sorting nexin (SNX) とカーゴ判別に関わる三量体 vacuolar protein sorting-associated protein (VPS) 26/29/35 からなるヘテロ複合体である。SNX6/12 は BACE1 のエンドソームから TGN への輸送の制御に関わり、SNX6/12 を阻害することで BACE1 がエンドソームに蓄積し、A β 産生が増加する[Okada et al 2010, Zhao et al 2011].

BACE1 の最 C 末端に存在する ⁵⁰¹Lys 残基はユビキチン化され、GGA3 を介することで、BACE1 が初期エンドソームから後期エンドソーム、ライソソームへの分解経路へと輸送される。この BACE1 の分解系への輸送制御には、酸性ジロイシンモチーフと GGA の VHS ドメインとの相互作用は必要とされず、⁵⁰¹Lys 残基がユビキチン化されることで GGA の GAT ドメインと結合することによる[Kang et al 2010]. GGA3 はこのように BACE1 の分解経路を制御しており、GGA3 の阻害によって BACE1 の安定性が増して、BACE1 活性や A β 産生の増加が見られる。AD 脳では GGA3 のタンパクレベルが減少しており、BACE1 の増加を認めた[Tesco et al 2007].

このように BACE1 は C 末側の細胞内ドメインを主体とした細胞内局在の制御が行われており、BACE1 の細胞内局在の変化は A β 産生に重要な影響を与えることが理解されてきた。

2. BIN1

2-1. アルツハイマー病遺伝学的危険因子 BIN1 の同定

早期発症型 FAD の原因遺伝子として *APP*, *PS1*, *PS2* が同定された。一方、晩期発症型 FAD の連鎖解析から第 19 番染色体上に存在し 299 個のアミノ酸からなる 34 kDa のタンパク質をコードする *Apolipoprotein E* (*APOE*) の $\epsilon 4$ アレルが報告された[Strittmatter et al 1993, Corder et al 1993]。 *APOE* 遺伝子には $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$ の 3 種類の遺伝子多型があり、それぞれのアレルにより 112 位および 158 位のアミノ酸が変化する (ApoE2 Cys112/Cys158, ApoE3 Cys112/Arg158, ApoE4 Arg112/Arg158)。 *APOE* の $\epsilon 4$ アレルの晩期発症型 FAD の危険因子となり、保因者は対照群と比して 3 倍以上も AD の発症リスクが高く、ホモで保因すると 10 倍近くのリスク増加となる。その後、晩期発症型 FAD のみならず、孤発性 AD でも *APOE* の $\epsilon 4$ アレルが危険因子となることが示された[Saunders et al 1993, Okuizumi et al 1994]。

AD の遺伝学的危険因子としての *APOE* の発見後、1990 年代後半～2000 年代前半にかけて様々な遺伝子が危険因子の候補として浮上したが、その大半が再現性をもって確認されるには至らなかった。晩期発症型 AD のような多数の因子が複合的に発症に関与する疾患では各遺伝子の単独での寄与は小さく、1980 年代より Huntington 病など様々な疾患の原因遺伝子の同定に活用されてきた positional cloning での探索は困難であったため、2000 年代前半より様々な疾患の感受性遺伝子の探索に使用され始めた GWAS (Genome-Wide Association Study) によって晩期発症型 AD の感受性遺伝子の探索が開始された。GWAS は、ヒトの全ゲノム中に 1000 万種以上ある SNPs (一塩基多型：ゲノム上で一塩基だけが置換されている変異のうち、特定の集団の 1% 以上に観察される変異) の代表的なものをマーカーとして使い、特定の個人が全ゲノム中にどのような SNPs を有するのかを網羅的にあぶりだす手法で、ある疾患の患者群とコントロールとの間に SNPs の頻度に有意な差を認めれば、その SNPs 近傍の遺伝子が疾患感受性遺伝子の候補として見出される。世界各地で晩期発症型 AD に関する AD 患者数千人規模の大規模 GWAS が行われ、これまで 1395 ゲノム研究で 695 遺伝子が報告されている(AlzGene; <http://www.alzgene.org/>)が異なる民族または検体数が少ないため多くは再現性が得られていない。GWAS の結果でも *APOE* $\epsilon 4$ アレルが odds ratio (OR) 3.685 (3.30-4.12) と最大の危険因子で、再現性が高いその他の感受性遺伝子は概ね OR 0.85-1.25 程度と *APOE* と比べると OR は小さい。

GWAS によって第 2 染色体長腕 2q14.3 に位置する *BIN1* (*Bridging-integrator 1*) 遺伝子 5'側約 30 kb 上流の rs744373 が晩期発症型 AD のリスク上昇 SNPs として同定された[Seshadri et al 2010, Carrasquillo et al 2011, Hu et al 2011]。 AlzGene による meta-analysis では OR 1.166 (1.13-1.20) , $p=1.59 \times 10^{-26}$ という結果であった (図 3)。この p 値は、AlzGene において AD の最大の遺伝学的危険因子である *APOE*

ε4 アレルに次いで 2 番目に小さい。また BIN1 遺伝子約 25 kb 上流に存在する rs7561528 と rs12989701 も rs744373 と類似の結果が得られた[Hu et al 2011, Wijsman et al 2011, Naj et al 2011]. 更にごく最近, 74000 を超える meta-analysis によっても *BIN1* 遺伝子の SNP である rs6733839 が OR1.22 の AD リスク因子として同定された[Lambert et al 2013]. rs744373 (T/C) は, Ancestral Allele: T, MAF (Minor Allele Frequency) : C (0.380) (Hap-Map-JPT (日本人) では 0.32) で, rs7561528 (G/A) は, Ancestral Allele: A, MAF : A (0.246) (Hap-Map-JPT (日本人) では 0.085) と, MAF が高く, 単独での AD 発症リスクを高める効果は大きくないが, 人工寄与割合 (population attributable fraction; PAF) は 6% となり, *APOE* 以外の AD 感受性遺伝子では最大の危険因子となり, 多くの AD 患者での *BIN1* 遺伝子の関与が示唆される。

しかし, GWAS で同定された SNPs の大半が遺伝子間やイントロンに存在し, SNPs が AD 発症に関わるメカニズムはほとんど知られていない。 *BIN1* を含め GWAS で同定された *PICALM*, *CD2AP*, など複数の AD の遺伝学的危険因子がエンドサイトーシスなどのメンブレントラフィックへの関与を知られていることから, *BIN1* もメンブレントラフィックへの寄与を介して AD 発症に関与することが想定されるが, その機序は正確にはわかっていない (図 4)。また, これらの *BIN1* の AD risk 関連 SNPs は *BIN1* 遺伝子の上流 20-30kb とかなり離れた位置にあり, *BIN1* の発現量や選択的スプライシングの制御に関与することが想定される。また, *BIN1* 遺伝子内にこれら SNPs と連鎖不平衡にある eQTL (expression quantitative trait locus) が存在するなどの可能性も考慮されるが, Holton らの報告では有意な eQTLs は同定されなかった[Holton et al 2013]. これら AD risk 関連 SNPs はいずれも transcription binding sites に位置し, CpG islands や micro RNA target sites には含まれていない。また, rs744373 は recombination hotspot 内に位置する。

BIN1 遺伝子は 2q14-2q21 染色体に存在する 59258bps 以上の領域で, 少なくとも 20 exons が含まれる[Ren et al 2006]. 生体内で広汎に発現が見られるが, 主に脳と筋で発現が多い。 promoter は CpG メチル残基に富み[Wechsler-Reya et al 1997], alternative splicing によって 10 種以上の isoform が生じる[Pineda-Lucena et al 2005]. Isoform 9, 10 は ubiquitous に発現, Isoform 1-7 は中枢神経系で発現, Isoform 8 は骨格筋に発現する。 mRNA は 2075-2637 bp で, それぞれ Isoform 1 は 2637 bp, Isoform 2 は 2508 bp, Isoform 3 は 2376 bp, Isoform 7 は 2283 bp, Isoform 8 は 2210 bp, Isoform 9 は 2165 bp, Isoform 10 は 2075 bp の塩基長である。

Microarray 解析により, CNS の各部位での *BIN1* の発現を比較すると, 発現量が最大の白質において, 発現量が最小の小脳と比較して 5.1 倍の発現が見られる, というように部位によって発現量に差が見られる。さらに, 総 *BIN1* 発現量が最大の白質において CNS の他部位と比して発現量が少ない isoforms の存在が示唆

されるなど、部位によって選択的スプライシングのパターンが異なって制御されていることが示唆される[Holton et al 2013].

2-2. BIN1 の構造と機能

BIN 蛋白はアミノ酸数 409~593, 分子量 45432~64568 kDa で, Isoform 1 が最大, Isoform 10 が最小の分子量である (図 5). 中枢神経系特異的な isoform である isoform 1-7 は細胞質に, 筋特異的な isoform 8 は細胞膜主体に, ubiquitous に発現する isoform 9-10 は細胞質・核両方に局在する. 大脳皮質と小脳では細胞質 (isoform 1-7, 9, 10), 核 (isoform 9, 10) 両方に存在している. BIN1 は進化的に保存され多数の蛋白質で見られる N 末端の N-terminal amphipathic helix と BIN-Amphiphysin-RV167 (BAR) ドメイン, C 末端の Src-Homology 3 (SH3) ドメインを持つ, N-BAR ドメインファミリーに分類されるアダプター分子である. そのほかにも各 exon に特徴的な機能を持つドメインがコードされており, N-terminal amphipathic helix が exon 1, BAR ドメインは exon 2-10 に, isoform 8 のみに存在する Phosphoinositide-binding (PI) ドメインは exon 11 に, isoform 1-7 のみに存在する Clathrin-associated protein-binding (CLAP) ドメインは exon 13-16 に, Myc-binding (MB) ドメインは exon 17-18 に, そして SH3 ドメインは exon 19-20 によってコードされている (図 6). BAR ドメインは脂質膜結合ドメインで, SH3 ドメインは蛋白質-蛋白質相互作用を担うドメインであり, この特徴により, BIN1 は特定の形態を持つ膜と SH3 ドメインに結合する dynamin や N-WASP などのアクチン細胞骨格制御因子や膜切断酵素を結びつけ, 膜の形態を制御する. そのため主にクラスリン依存的エンドサイトーシスに関わることが想定されている[Dawson et al 2006, Ren et al 2006]. さらにエンドソームへの内在以降の, エンドソームでの細胞内小胞輸送においても BIN1 の関与が報告されている [Leprince et al 2003, Pant et al 2009].

BAR ドメイン (図 7)

BIN1 を始めとして細胞膜の陥入に関わる 35 種以上の蛋白質で見られる約 210 アミノ酸残基からなる脂質結合ドメインで, 細胞膜結合活性と細胞膜変形活性を有する. 立体構造は, 6 本の突出した α -helix からなる coiled-coil 領域を持つバナナ型の 2 量体で構成される. バナナ型のカーブの凹面は正電荷を有する. BAR ドメインの凹面が負電荷を持つ細胞膜に巻きつき, 膜を変形させて tubule を形成する働きを有する.

PI ドメイン

muscle-isoform の isoform8 のみに特異的に存在し, 筋細胞の T 細管の形成や Ca^{2+} のホメオスタシスにおいて重要な役割を担う. 成人の筋ジストロフィーで最も頻度の高い筋強直性ジストロフィーや中心核ミオパチーの発症に関与し, 欠失の程度は病態の重症度に相関する.

CLAP ドメイン (図 8)

CNS-isoform の isoform1-7 に存在し、輸送小胞の形成に働くコートタンパク質である clathrin および adaptin-2 (AP-2) に結合することで、エンドサイトーシスへの関与が示唆されている。

MB ドメイン (図 8)

核内にも存在する Isoform9-10 で癌遺伝子 c-Myc に対して BAR ドメインや SH3 ドメインと複合的に作用し、癌抑制遺伝子として C-myc の活性を抑制するとされる。

SH3 ドメイン (図 8)

dynamin や N-WASP などのプロリンリッチな多数のタンパク質と結合し、タンパク質-タンパク質相互作用に関わる。Dynamin は GTP 依存的に膜を切断する酵素で、N-WASP はアクチン集合を誘導するタンパク質であることから、BAR ドメインの作用によって特定の曲率を有する膜に dynamin や N-WASP が引き寄せられ、dynamin の活性化やアクチン重合が誘導されることで、エンドサイトーシスにおける小胞の切断やその後の小胞輸送が行われる。

疾患関連研究やノックアウトマウスなどの解析から、BIN1 は様々な生理機能に関わっていることがこれまでにわかっている。初期には c-Myc 関連の癌抑制因子として同定された[Sakamuro et al 1996]が、c-Myc 依存的のみならず c-Myc 非依存的にも、乳癌、肺腺癌、前立腺癌、悪性黒色腫、大腸癌、神経膠芽腫など多くの悪性腫瘍で BIN1 の発現レベルの低下を認めることや、BIN1 の発現低下が遠隔転移などの悪性度の高さにつながる事が報告されている[Cher et al 1996, Ge et al 1999, Ge et al 2000, Ge et al 2000, Hogarty et al 2000, DuHadaway et al 2003, Tajiri et al 2003, Muller et al 2004, Chang et al 2007, Chang et al 2007, Ghaneie et al 2007]。BIN1 の Isoform 8 は骨格筋で発現が見られ、筋細胞の Ca のホメオスタシスや T 細管の形成に関わる[Butler et al 1997, Wechsler-Reya et al 1998, Lee et al 2002]。BIN1 ノックアウトマウスでは、他の BAR domain family の分子が代償的に補完することでエンドサイトーシス系に顕著な異常が見られない一方で、生後心筋症を呈し致死となる事が知られるように、筋発生において BIN1 は重要な役割を担う[Muller et al 2003]。ヒトにおいても、BIN1 は中心核ミオパチー[Nicot et al 2007]、拡張型心筋症[Jung et al 1999]、筋強直性ジストロフィー[Fugier et al 2011]、など筋疾患の発症に関与している。

2-3. AD 病態機序において BIN1 が担う役割

BIN1 は APOE ε4 アレルに次ぐ AD 危険因子であるが、どのような機序で AD 発症や神経変性に寄与しているかはほとんどわかっていない。GWAS によって PICALM, CD2AP などのエンドサイトーシス経路などの細胞内小胞輸送に関わ

る分子が *BIN1* とともに AD 危険因子として同定されていること, APP, BACE1, A β などの AD 発症機序におけるキープレーヤーとなるタンパク質がいずれも細胞表面膜からのエンドソームへの内在化およびエンドソームからライソソームへの細胞内小胞輸送による代謝を受けていること, そしてこれらの細胞内局在に変化が起これると A β 量に変化が生じることなどから, AD の発症機序において細胞内小胞輸送が重要な役割を持っていることが近年理解されてきた. したがって, *BIN1* も AD に関与するいずれかのタンパク質の細胞内小胞輸送の制御に関与していることが推察される.

一方, 前述のように *BIN1* はエンドサイトーシス以外にも様々な生理機能を有することが知られており, これらの機能のいずれかもしくは複合的な作用を介して AD 発症へ関与している可能性も考慮される. *BIN1* は, 微小管関連タンパク質である cytoplasmic linker protein 170 (CLIP-170) [Meunier et al 2009]や AD を含む神経変性疾患での関与が知られる tau に作用することが報告されている [Chapius et al 2013]. AD の発症において炎症や免疫系が関与することが知られてきているが [Salminen et al 2009], mosaic *BIN1* ノックアウトマウスでは *BIN1* と加齢に伴う炎症との間に負の相関が見られることが報告されている [Chang et al 2007]. indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO1) は免疫系に働き, また, 老人斑や神経原線維変化内に発現が見られることが知られているが, *BIN1* が IDO1 の発現制御に関わっていることが報告されている [Muller et al 2005, Guillemin et al 2005, Bonda et al 2010].

GWAS で同定された *BIN1* の AD risk SNPs は *BIN1* 遺伝子上流 20-30kb とかなり離れた位置にあるため, *BIN1* の発現量調節や選択的スプライシングの制御に影響することが考えられるが, その詳細は不明である. 現在までに *BIN1* の発現量に関して, Chapius らは AD 患者で非 AD 患者に比して *BIN1* の mRNA 発現量が増加していると報告している [Chapius et al 2013]. 一方, Glennon らは孤発性 AD 患者で非 AD 患者と比して, 前頭葉での *BIN1* のタンパク発現量が有意に減少しており, 神経系タンパク質のコントロールとしての neuron-specific enolase (NSE) タンパク発現量には有意な変化が見られなかったことを報告している [Glennon et al 2013]. また, 遺伝子変異が同定されている FAD 患者の海馬において非 AD 患者との間で有意な *BIN1* タンパク発現量の増減は見られなかったこと, 加齢に伴う *BIN1* タンパク発現量には減少傾向が示唆されたが有意な変化は認めなかった. 孤発性 AD 患者脳において *BIN1* 発現量の有意な減少を認めたものの, *BIN1* 発現量と, 可溶性 A β , 非可溶性 A β , A β 病理との間に相関は見られず, Chapius らが関与を示唆した tau 病理に関しても *BIN1* 発現量との相関は認めなかった. いずれせよ, AD risk SNPs がもたらす *BIN1* 発現量の変化についてそのコンセンサスは定まっておらず, 選択的スプライシングのパターンへの影響についてはこれまで報告されていない.

培養細胞における BIN1 発現量の変化がもたらす A β 産生量への影響についても報告は少ないが, Bali らによってスウェーデン型 APP を発現させたヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞に対し, BIN1 を含む GWAS で同定された各遺伝学的危険因子を網羅的に RNAi 法によりノックダウンを行った解析が報告されている [Bali et al 2012]. この解析においては BIN1 のノックダウンによって, 分泌 A β 40 の有意な増加, 分泌 A β 42 の有意な増加を認めている. 分泌 sAPP β については, 増加傾向が示唆されたものの, 有意ではなかった. 興味深いことに, 早発型 FAD では APP や PS 遺伝子変異によって γ -secretase 切断に影響を与え, A β 42/A β 40 比の上昇がしばしば観察される. しかし GWAS で同定された晩発型 AD の遺伝学的危険因子のノックダウンは BIN1 も含めていずれも A β 42/A β 40 比に影響を与えなかった.

また Glennon らは, ヒト神経芽細胞腫の SH-SY5Y 細胞に BIN1 を過剰発現, もしくは siRNA によるノックダウンを行っている [Glennon et al 2013]. BIN1 の過剰発現では, 分泌 A β 40 の有意な減少を, 分泌 A β 42 については減少傾向が見られたものの, 有意ではなかった. 一方, BIN1 ノックダウンでは, 分泌 A β 40 および A β 42 量に有意な変化は得られなかった. APP タンパク発現量および分泌 sAPP α 量は, BIN1 過剰発現, BIN1 ノックダウンいずれにおいても, 有意な変化は見られなかった. 分泌 sAPP β は, BIN1 過剰発現で減少傾向, BIN1 ノックダウンで増加傾向が見られたが, いずれも有意ではなかった.

3. メンブレントラフィックの概略

3-1. エンドサイトーシス

膜タンパク質, 分泌タンパク質の細胞表面膜やオルガネラ間の細胞内小胞輸送は, メンブレントラフィックもしくは小胞輸送と呼ばれる, 膜を介した標的分子の細胞内小胞輸送機構によって行われている (図 9). 細胞内には, 核, 小胞体, ゴルジ体, トランスゴルジネットワーク (TGN), 各エンドソーム, ライソソームなどのオルガネラが一定の位置関係で機能的に配置され, それらのオルガネラや細胞表面膜を微小管やアクチン線維といった細胞骨格が網目状につないでいる. 標的タンパク質を積んだ輸送小胞は, 細胞骨格に沿ってオルガネラ間をモータータンパク質の働きで運搬される. メンブレントラフィックは分泌経路と取り込み経路とが存在し, 後者の過程を広義のエンドサイトーシスと定義している.

分泌経路では, 小胞体で合成された神経伝達物質やホルモンなどに代表される生理活性物質が細胞外へと分泌される. まず, 合成された膜タンパク質, 分泌タンパク質は小胞体の膜もしくは内腔に組み込まれ, 標的タンパク質を含む小胞体膜の変形・切断によって輸送小胞となりシスゴルジネットワーク (CGN) を介してゴルジ体へと輸送される. ゴルジ体の膜と融合した輸送小胞内の標的

タンパク質は、ゴルジ体で糖鎖付加などの翻訳後修飾を受け、成熟タンパクとなる。修飾を受けた標的タンパク質は、ゴルジ体から TGN へと移行する。TGN から分泌小胞として分泌された標的タンパク質は、細胞膜と融合し、エキソサイトーシスで細胞外へと分泌もしくは細胞表面膜上に輸送される。

細胞表面膜上の膜タンパク質や細胞外の物質の取り込み、エンドサイトーシス経路としては、クラスリン依存的エンドサイトーシスとカベオラ依存的エンドサイトーシスに代表される非クラスリン依存的エンドサイトーシスが存在する。クラスリン依存的エンドサイトーシスは、トランスフェリン、LDL (low density lipoprotein)、EGF (epidermal growth factor) などの細胞表面膜上の受容体を介した細胞内への取り込み、神経細胞におけるシナプス小胞の取り込み、など多くのタンパク質の取り込みに関与している主要なエンドサイトーシス機構であり、数多くの研究がなされている。APP もこのクラスリン依存的エンドサイトーシスによって取りこまれることが知られている。

クラスリン依存的エンドサイトーシスにおいて、始めに、受容体へのリガンド結合などがトリガーとなり、細胞表面膜の細胞質側に豊富に存在するイノシトールリン脂質 (Phosphatidyl inositol phosphates; PIPs) である PI(4,5)P₂ の局所的な集積が起こる。

Phosphatidyl inositol (PI) は、疎水性のジアシルグリセロール骨格と親水性のイノシトール環を有する両親媒性分子であり、イノシトール環の 3 位, 4 位, 5 位の OH 基に可逆的なリン酸化を受けることで 7 種類の PIPs 分子種を生じる。PIP_s はそれぞれが特定のオルガネラ膜の細胞質側に存在することが知られ、PI(4,5)P₂ は細胞表面膜に、PI3P は初期エンドソームに、PI(3,5)P₂ は後期エンドソームに、PI4P はゴルジ体膜に主に存在する [Krauss et al 2007]。また、各 PIP_s はそれぞれに特異的な PIP_s 結合ドメインを有するメンブレントラフィック関連タンパク質と相互作用を果たす。

PI(4,5)P₂ が局所的に集積した領域に、FCHo (Fer/Cip4 homology domain-only) proteins が特異的に結合する。FCHo proteins は脂質二重膜の曲率を誘導・維持する機能を持つ F-BAR (Bin/Amphiphysin/Rvs) ドメインを有し、初期の膜屈曲を担う。FCHo proteins に引き続いてスキャフォールドタンパク質である EPS15 (EGFR pathway substrate 15) や intersectin がリクルートされ、これらの分子が clathrin coated pit (CCP) の土台を形成する [Henne et al 2010]。次に、adaptor protein-2 (AP-2) に代表されるアダプター分子がリクルートされ、膜上の ADP-ribosylation factor (Arf) という small GTPase に結合する。AP-2 は clathrin や cargo protein (カーゴ; 積み荷となるタンパク質)、PI(4,5)P₂ のシグナル配列を認識して結合し、それらの CCP への集積を促す [Collins et al 2002, Kelly et al 2008]。BIN1 の CLAP ドメインは、この過程における clathrin や AP-2 との作用による機能が示唆されている。また、BIN1 の BAR ドメインの N 末端側に存在する

N-terminal amphipathic helix は両親媒性 α ヘリックスをとり、楔のように膜に挿入されることによって膜の屈曲を誘導する。アダプター分子によって細胞質から膜上へリクルートされた clathrin は格子状に重合、被覆されることで、CCP が安定化される。CCP が細胞質側へと陥入が進行して clathrin coated vesicle (CCV) へと成熟していく過程において、CCV と表面膜とをつないでいる部分に、N-BAR を持つ BIN1 や amphiphysin 1, BAR ドメインを持つ SNX9 (sorting nexin 9) が結合し、管状構造 (neck) を形成する。BIN1 をはじめとした BAR ドメインタンパク質は分子内に SH3 (Src-homology 3) ドメインを持っており、アクチン重合を促進して neck 形成や膜切断に関わる N-WASP (Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein) が SH3 ドメインによってリクルートされる [Ferguson et al 2009]。続いて SH3 ドメインによって dynamin が管状構造の陥入部の根元へリクルートされ、GTP 加水分解依存的に膜切断を起こすことで、カーゴを含む小胞が生成される [Wigge et al 1997]。dynamin は PI(4,5)P2 とも結合することで、GTP 加水分解活性が亢進する [Zheng et al 1996]。細胞表面膜から分離された小胞からは clathrin coat が外れることによって、カーゴを含む小胞と初期エンドソームとの融合が可能になる。

非クラスリン依存的エンドサイトーシスについては、クラスリン依存的エンドサイトーシスと比べると、詳細な分子機構についてはわかっていないものが多い。カベオラはラフトと同様にスフィンゴ脂質とコレステロールに富む細胞表面膜の陥凹構造であり、50-80 nm の内腔を持つ。カベオラは大半の細胞に存在するが、神経細胞には存在していないと考えられている。カベオラ依存的エンドサイトーシスでは、コレステロール結合タンパク質であるカベオリンを介して小胞が形成され、クラスリン依存的エンドサイトーシス同様に、dynamin の作用により陥入膜の切断、小胞形成が行われる。カベオラ依存的エンドサイトーシスはアルブミンやコレラ毒素などの取り込みに関与しているとされる。

非クラスリン/非カベオリンエンドサイトーシス経路の存在も知られている。クラスリン依存的エンドサイトーシスにおいて重要な役割を担う AP-2 を siRNA によりノックダウンすると、APP やトランスフェリンの内在化には顕著な障害が生じるのに対して、BACE1 の取り込みには明らかな影響が生じず、BACE1 は Arf6 を介した非クラスリン依存的エンドサイトーシスにより内在化が行われると報告されている [Sannerud et al 2011]。

3-2. エンドソーム輸送経路

クラスリン依存的エンドサイトーシスもしくは非クラスリン依存的エンドサイトーシスによって内在化されたカーゴは、初期エンドソームに到達すると融合し、選別を受け、再び表面膜へと戻る recycling 経路と、後期エンドソームからライソソームへと輸送されて分解を受ける endolysosomal 経路へと振り分けら

れる。このため、初期エンドソームはソーティングエンドソームとも呼ばれる。recycling 経路へと輸送される代表的なクラスリン依存的エンドサイトーシスのカーゴはトランスフェリン受容体や LDL 受容体であり、endolysosomal 経路へと輸送され分解される代表的なクラスリン依存的エンドサイトーシスのカーゴは EGF である。

Endolysosomal 経路では初期エンドソームと融合したカーゴが次第に成熟化し、後期エンドソームとして分離され、最終的にライソソームと融合することで分解を受ける。輸送小胞とオルガネラ膜との融合に際しては、輸送小胞に含まれる v-SNARE と標的となるオルガネラ膜の t-SNARE とが SNARE 複合体を形成し、融合を促進する。この初期エンドソームからの成熟過程でエンドソーム小胞に局在するタンパク質や脂質の構成などに多くの変化が生じており、Rab conversion がスイッチの役割を担う[Rink et al 2005]。Rab タンパク質は Ras-like small GTPase の一群で、哺乳動物細胞においては 60 種類以上存在しており、それぞれが固有のオルガネラ内で特異的な細胞内小胞輸送を制御している[Zerial et al 2001]。Rab は GTP 結合型の活性型と GDP 結合型の不活性型をとり、個々の Rab はそれぞれ特異的な GEF (GDP/GTP exchange factor) と GAP (GTPase activating protein) によって調節され、GTP 結合型の活性型 Rab と相互作用するエフェクター分子を介して機能を発揮する。しかし、多くの Rab はその機能や対応するエフェクター分子、GEF、GAP について未だ十分には理解されていない。初期エンドソームには Rab5 とそのエフェクターである EEA1 (early endosome antigen 1) が特異的に局在するため、これらの分子は初期エンドソームマーカーとして各種解析に使用されている。初期エンドソームから後期エンドソームへの成熟、分離の際には、初期エンドソームにおける Rab5 の不活性化と、初期エンドソームからの分離に伴う Rab7 の活性化と膜上へのリクルートが起こる。この過程においてエンドソームが Rab7 活性依存的に細胞周辺部から微小管に沿って核近傍へと運搬される[Jordens et al 2001]。また、初期エンドソームから後期エンドソームへの成熟、分離に際して、Rab conversion とともに、phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase である PIKfyve/Fab1p の作用により、初期エンドソームに特異的な PI3P から PI(3,5)P₂ への PIPs の転換が生じる[Gary et al 1998, Ikonov et al 2001]。

後期エンドソームには Rab7 が特異的に局在し、限界膜が膜内に陥入して形成された直径 20-30 nm の多数の内腔小胞を内部に含有する multivesicular body (MVB) を形成する。MVB はライソソームと融合し、ライソソーム内の加水分解酵素によってカーゴが分解されることとなる。後期エンドソームからはライソソームへの分解系への移行だけでなく、マンノース 6 リン酸受容体のように後期エンドソームから TGN へと輸送され、再利用される経路も存在する。カーゴの内腔小胞への選別は、カーゴのユビキチン化と、真核生物において広く保

存される ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) タンパク質がカーゴのユビキチンシグナルを認識することによって行われる[Reider et al 1996, Doyotte et al 2005]. また, ESCRT タンパク質はこのカーゴの内腔小胞への輸送とともに, MVB の正常な構造形成にも働く. 後期エンドソームやライソソームの限界膜は獲得した加水分解酵素による分解から自らを守る必要があるが, このエンドソームの成熟化の過程で LAMP1 (lysosomal-associated membrane protein 1) などのグルコシル化タンパク質を持つようになり, LAMP1 は後期エンドソーム~ライソソームのマーカータンパク質として使用される.

初期エンドソームから後期エンドソーム, ライソソームへと成熟化に伴い, エンドソーム内腔の酸性化が行われる. このエンドソーム内腔の酸性化は, プロトンポンプである vacuolar H⁺-ATPase が担っている[Trombetta et al 2003, Lafourcade et al 2008]. 初期エンドソームの pH は 6.1-6.5 程度であるが, 後期エンドソームでは pH4.8-6 程度, ライソソームでは pH4.5 程度と強い酸性下にあり分解酵素の活性化に重要である[Maxfield et al 1987].

初期エンドソームからのリサイクリング経路には, Rab11 陽性コンパートメントから形成され, 核近傍に局在するリサイクリングエンドソームにより細胞表面膜へと戻る経路 (slow recycling) 以外にも, Rab4 陽性コンパートメントを介した初期エンドソームから細胞表面膜へと戻る経路 (rapid recycling), 初期エンドソームから TGN へと輸送される経路などが存在することが知られている[van der Sluijs et al 1992, Weigert et al 2004]. トランスフェリン受容体, LDL 受容体などのよく研究されてきたクラスリン依存的エンドサイトーシスを受けるカーゴは, リサイクリングエンドソームを介して再利用される. トランスフェリン受容体は大半がリサイクリングエンドソーム内に局在しているため, リサイクリングエンドソームのマーカータンパク質としても使用される.

4. 本研究の目的

世界的な高齢化社会の進展に伴う患者数の増加に伴って AD による経済的, 社会的な負荷は年々高まっているにも関わらず, 未だ根本治療薬はなく, これまでに臨床試験に進んだ候補薬の数々もいずれも失望する結果に終わっている. 一方, A β 蓄積から tau の過剰リン酸化, 神経細胞死へとつながるアミロイドカスケード仮説において, 近年の知見から, エンドサイトーシスや細胞内小胞輸送, 炎症や免疫系, などの因子がこのカスケードに影響を与えることが知られてきており, GWAS で同定された BIN1 を含む遺伝学的危険因子もこうした因子を介してアミロイドカスケードに作用していることが考慮される. 序論で述べたように, BIN1 は AD の遺伝学的危険因子として APOE に次いで重要性が高いにも関わらず, AD 発症機序への具体的な関与のメカニズムについてははっきりとわかっていない.

BIN1 が GWAS で同定された他の AD 遺伝学的危険因子である *PICALM* や *CD2AP* と同様にエンドサイトーシスや細胞内小胞輸送に関わる因子であることと、APP, BACE1 などの A β 産生系のキープレーヤーとなるタンパク質がエンドサイトーシスおよびエンドソームでの細胞内小胞輸送による代謝を受けてその細胞内局在の変化が A β 産生量の変化につながっていることから、本研究において私は *BIN1* が A β 産生系に与える影響の有無、そしてその具体的なメカニズムの解明を目的として神経系を含む培養細胞を用いて検討を行った。

第2章 方法

1. 発現ベクターの作製

1-1. human wild-type BIN1 Isoform 1 発現ベクター

Human fetal brain cDNA library から下記の2対の primer を用いて nested PCR を行い、5'末端側に Bgl II, 3'末端側に Xho I 認識配列を付加した ORF 部分を増幅した。PCR 反応は KOD plus DNA polymerase (TOYOBO) を用い、95°Cで1分間 denature 後に、95°Cで15秒間 denature, 60°Cで1分間 annealing, 72°Cで2分間 extension, の PCR サイクルを30回繰り返し、最後に72°Cで2分間の extension 反応を行った。1st PCR 産物を NucleoSpin Extract II kit (Macherey-Nagel) を用いて精製し、これを用いて2nd PCR を行った。2nd PCR 産物をアガロースゲル電気泳動し、目的のサイズのバンドを切り出して NucleoSpin Extract II kit を用いて精製した。精製2nd PCR 産物を等量の2x Taq master mix (New England BioLabs) と混合し、サーマルサイクラーを用いて72°Cで60分間インキュベートし、3'deoxyadenosine (A)付加反応を行った。この3'A付加したPCR産物と pCR2.1 TOPO TA ベクター (Invitrogen) を混合し、22°Cで30分間インキュベートすることによりクローニングした。Applied Biosystems 3500 ジェネティックアナライザを用いて配列を確認し、BIN1 の isoform で最大かつ CNS isoform である human BIN1 isoform1 を含むベクターを選択した。

作製したベクターを制限酵素 Bgl II および Xho I で処理し、目的タンパク質の N 末端側に EGFP を付加する pEF5/FRT/ EGFP NF, もしくは3つの連続した Myc-tag を付加する pcDNA3.1 MycA ベクター (英国オックスフォード大 Francis Barr 教授より供与) に制限酵素 Bam HI および Xho I 処理を施したものをそれぞれ NucleoSpin Extract II kit を用いて精製後に混合し、Ligation High Ver.2 (TOYOBO) を用いて ligation 反応を行った。反応液を大腸菌 DH5 α (TOYOBO) に transform して、BIN1 全長 (FL) 発現プラスミドを回収した。

1st PCR primer

Forward: 5'-AGATCTCCCCGCGCGAGAGCGGCC-3'

Reverse: 5'-CGGGAGGAGGTGTTCTTCACACGCC-3'

2nd PCR primer (wt BIN1)

Forward: 5'-GAGATCTCCATGGCAGAGATGGGCAGTAAAG-3'

Reverse: 5'-GCTCGAGTCATGGGACCCTCTCAGTG-3'

1-2. BAR ドメイン/SH3 ドメイン欠失変異型 BIN1 Isoform 1 発現ベクター

Human BIN1 isoform1 の BAR ドメイン欠失型変異体 (BIN1-ΔBAR) および SH3 ドメイン欠失型変異体 (BIN1-ΔSH3) 作製にあたり, BIN1-ΔBAR は下記 forward primer と前項の nested PCR の 2nd-PCR で用いた reverse primer を, BIN1-ΔSH3 は下記 reverse primer と前項の nested PCR の 2nd-PCR で用いた forward primer を使用した. テンプレートには, 前項で作製した human BIN1 isoform1 cDNA が組み込まれた pCR2.1 TOPO TA ベクターを用いた. PCR 条件および, TOPO TA クローニング, 配列の確認, EGFP もしくは Myc-tag を付加したベクターへのサブクローニングは前項 1-1 と同様の方法で行った.

BIN1-ΔBAR (hBIN1dBAR-Bgl F)

Forward: GAGATCTCCATGAAGGCCAGCCCAGTGACAAC

BIN1-ΔSH3 (hBIN1dSH3-Xho R)

Reverse: GCTCGAGTCATGGGGGCAGGTCCAAGCGC

1-3. human BACE1 K501R 発現ベクター

Human BACE1 の K501R 変異体作製にあたり, 下記 forward primer と reverse primer を使用し, テンプレートには東京大学大学院薬学系研究科臨床薬学教室 諸橋雄一博士が作製した pcDNA3.1-hygro ベクターにサブクローニングされた human BACE1 全長発現ベクターを用いた. PCR 条件および, TOPO TA クローニング, 配列の確認, pcDNA3.1-hygro ベクターへのサブクローニングは前項 1-1 と同様の方法で行った.

hBACE1-BamF

Forward: GGGATCCCCATGGCCCAAGCCCTGCCCTG

BACE1 K501R XhoR

Reverse: GCTCGAGTCACCTCAGCAGGGAGATGTCATC

1-4. その他の発現ベクター

pcDNA 3.1-hygro ベクターにサブクローニングされた human APP 695 全長および C99 発現ベクターは東京大学大学院薬学系研究科臨床薬学教室 岩田博司博士により作製された. pcDNA3.1-hygro ベクターにサブクローニングされた, human BACE1 全長発現ベクター, human BACE1 全長 N 末端に SNAP-tag を付加した SNAP-BACE1, pEF6 TOPO ベクターにサブクローニングされた human BACE1 全長の C 末端に EGFP が付加された human BACE1-EGFP ベクター, His×6

タグに glutathione S-transferase (GST)をつけたベクター (His₆-GST/pFAT2), His₆-GST/ pFAT2 に BACE1 C 末端の細胞内領域 23 アミノ酸 (BACE1CT) をタンデムに挿入した His₆-GST-BACE1CT×2/pFAT2 はいずれも東京大学大学院薬学系研究科臨床薬学教室 諸橋雄一博士により作製された.

2. small interfering RNA (siRNA)

以下の Dharmacon ON-TARGET plus siRNA (Thermo Scientific)を購入し, 実験に用いた.

mouse BIN1; SMART pool siRNA (#L-054779-01)

Target sequence:

1. CUUGAAAAGUGUCGGGAAA
2. GAAGCUGACCCGAGCGCAA
3. GGAAGGCGGACGAGACGAA
4. GGUGUGAAGGAGAGCGACU

human BIN1; (#J-008246-7)

Target sequence: ACAACGACCUGCUGUGGAU

mouse GGA3; (#J-040382-5)

Target sequence: UCAAAGAUGCCUACCAUUAU

また, control siRNA としては以下の Dharmacon ON-TARGET plus siRNA (Thermo Scientific)を購入し, 実験に用いた.

Non-targeting pool; (#D-001810-10)

3. 薬剤

arabinofuranosyl cytosine; Ara-C (SIGMA)

クロロキン (WAKO)

4. 細胞の培養と遺伝子導入

4-1. 培養細胞

以下の細胞を用いて実験を行った. なお *Bin1*^{flx/flx} マウス由来の初代培養神経細胞については別記する.

Neuro2a (N2a) 細胞

HeLa S3 細胞

HeLa/BACE1-GFP 細胞 ; C 末端に EGFP を付加した human BACE1 全長を恒常的に発現した HeLa S3 細胞

HeLa/SNAP-BACE1 細胞 ; N 末端に SNAP-tag を付加した human BACE1 全長を恒常的に発現した HeLa S3 細胞

HeLa/BACE1-GFP 細胞および HeLa/SNAP-BACE1 細胞は, HeLa S3 細胞に human BACE1-GFP/pEF6 TOPO および human SNAP-BACE1/pcDNA3.1-hygro をそれぞれ遺伝子導入し, 薬剤セレクション後, 限界希釈法にて取得した.

4-2. 培養条件

特に記載がない限り, N2a 細胞, HeLa S3 細胞, HeLa/BACE1-GFP 細胞, HeLa/SNAP-BACE1 細胞は, リボヌクレオシドおよびデオキシヌクレオシドを含まず, ペニシリン (Invitrogen) 50 unit/ml, ストレプトマイシン (Invitrogen) 50 mg/ml, 10%非動化ウシ胎児血清 (FBS) (Cell Culture Technologies) を含む高グルコース Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) (WAKO) (以下, DMEM は上記抗生物質等を含む培地のことを指す.) 中, 5%CO₂, 95%air, 37°C湿式インキュベーター内で培養, 継代した.

4-3. 細胞への一過性遺伝子導入, RNA interference

N2a 細胞, HeLa S3 細胞, HeLa/BACE1-GFP 細胞, HeLa/SNAP-BACE1 への遺伝子導入は 40-60% confluent の細胞に対して Fugene 6 (Roche) を用い, 遺伝子導入後 24-48 時間にサンプルを回収し, 解析に用いた.

siRNA の導入は LipofectAMINE RNAiMAX (Invitrogen) を用い, 20-30% confluent の細胞に対して siRNA 終濃度 20 nM となるように加えた. siRNA 添加後 48-72 時間でサンプルを回収し, 解析に用いた.

一過性の遺伝子導入と siRNA 添加の両者を行う際には, 20-30% confluent の細胞に対して siRNA 終濃度 20 nM となるように添加後 24 時間で遺伝子導入を行い, 遺伝子導入後 24-48 時間後にサンプルを回収し, 解析に用いた. これらの処置を行い分泌 A β 測定など培地も回収する際には, 上記の手順を行い, サンプル回収 24 時間前に培地交換を行った.

ライソソームでの分解抑制作用を有するクロロキン (WAKO) の添加は, 培地中濃度が 20 μ M になるように使用し, 添加 6 時間後にサンプルの回収を行った.

5. 抗体

ウェスタンブロット解析, sandwich ELISA および免疫細胞化学的解析に用いた抗体は以下の通り.

抗 BIN1 抗体

Clone 99D (マウスモノクローナル抗体) : 全ての isoforms に含まれる Myc 結合ドメイン (MBD) 内の 33 残基を認識 (Millipore) .

抗 APP 抗体

APPc (ラビットポリクローナル抗体) : APP C 末端 (IBL)

APP597 (ラビットポリクローナル抗体) : sAPP α C 末端 (IBL)

sAPP β wt (ラビットポリクローナル抗体) : sAPP β C 末端 (IBL)

抗 BACE1 抗体

BACE1c (ラビットポリクローナル抗体) : BACE1 C 末端 (IBL)

BACE1(N42) (ラビットポリクローナル抗体) : BACE1 aa42- (IBL)

抗 A β 抗体

BNT77 (マウスモノクローナル抗体) : A β ₁₁₋₂₈ (武田薬品工業より供与もしくは WAKO, Asami-Okada et al 1995)

BA27 (マウスモノクローナル抗体) : A β ₁₋₄₀ (武田薬品工業より供与もしくは WAKO, Suzuki et al 1994)

抗 Nicastrin (Nct)抗体

N1660 (ラビットポリクローナル抗体) : Nct C 末端 (SIGMA)

抗 Myc 抗体

9E10 (マウスモノクローナル抗体) (Roche)

9B11 (マウスモノクローナル抗体) (Cell Signaling)

71D10 (ラビットモノクローナル抗体) (Cell Signaling)

抗 GFP 抗体

anti-GFP (ラビットポリクローナル抗体) (Invitrogen)

抗 EEA1 抗体

anti-EEA1 (マウスモノクローナル抗体) (BD Biosciences)

抗 LAMP1 抗体

CD107a (マウスモノクローナル抗体) (BD Biosciences)

抗 α -tubulin 抗体

DM1A (マウスモノクローナル抗体) (SIGMA)

抗 β III-tubulin 抗体

TUJ1 (マウスモノクローナル抗体) (R&D Systems)

抗 TGN46 抗体

anti-TGN46 (シーブポリクローナル抗体) (AbD SeroTec)

抗 GM130 抗体

anti-GM130 (マウスモノクローナル抗体) (BD Biosciences)

抗 GGA3 抗体

anti-GGA3 (マウスモノクローナル抗体) (BD Biosciences)

抗トランスフェリン受容体 (TfR) 抗体

anti-TfR (マウスモノクローナル抗体) (Invitrogen)

6. A β C 末端断片特異的 sandwich ELISA 法による A β の測定

抗 A β モノクローナル抗体 BNT77, BA27, BC05 は武田薬品工業の Suzuki らによって樹立された[Suzuki et al 1994, Asami-Okada et al 1995]. BNT77 は A β の中間部位である 11 番から 16 番付近を認識する. この抗体を 1 次抗体として用い, サンプルまたはスタンダードの A β を 96 well plate 中でキャプチャーする. BA27, BC05 はそれぞれ A β の C 末端 40 番および 42 番のアミノ酸を断端特異的に認識する抗体である. これらを horseradish peroxidase (HRP) により標識した検出抗体を用いることにより, A β の C 末端を識別して定量する.

7. ウェスタンブロット解析

7-1. 細胞からのタンパク質抽出

細胞を phosphate buffered saline (PBS; 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM NaH₂PO₄ (WAKO), 150 mM NaCl) で洗浄し, 解析に用いるまで -80°C で保存した. 細胞に適量の 1×sample buffer (2% SDS (Nacalai tesque), 80 mM Tris-HCl pH 6.8 (Invitrogen), 15% glycerol (WAKO), Brilliant green (WAKO), Coomassie blue G-250 (Nacalai tesque)) を加えて溶解した. ソニケーター (BRANSON) を用いて細胞を破砕し,

BCA protein assay kit (Pierce) によりタンパク定量した。最終濃度が 1%となるように 2-mercaptoethanol (WAKO) を加え、100°Cで 3 分間 boil してウェスタンブロット解析のサンプルとして用いた。

7-2. 培地からのタンパク質抽出

回収した培地を 10000 rpm で 5 分間、4°Cで遠心し (TOMY MX-307)、上清に 5% 2-mercaptoethanol を含む 5×sample buffer を加え、100°Cで 3 分間 boil してウェスタンブロット解析のサンプルとして用いた。

7-3. ウェスタンブロット解析

SDS-PAGE によりタンパク質を分離した。サンプル毎のアプライ量は、BCA protein assay kit (Pierce) によるタンパク定量したタンパク濃度をもとに、各サンプルで同一のタンパク量となるようにした。マーカータンパク質として Precision Plus Protein Dual Xtra Standards (Bio-Rad) も同時に電気泳動した。分離したタンパク質を 226 mA, 2 時間で PVDF membrane (Millipore) に転写した。転写したメンブレンを 5% skim milk (Difco) を含む TS-Tween (0.1% Tween20 (KANTO) を含む Tris buffered saline (TBS; 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl) によって室温で 30 分間ブロッキングし、5% Skim milk/TS-Tween で適切に希釈した 1 次抗体と室温で 1-2 時間、または 4°Cで一晩反応させた。TS-Tween で 10 分間の洗浄を 3 回行った後、5% Skim milk/TS-Tween で 5000 倍に希釈した 2 次抗体 (anti-mouse および anti-rabbit IgG horseradish peroxidase linked whole antibody (GE Healthcare あるいは Jackson Immuno Research)) と室温で 1 時間反応させた。なお、必要に応じて 1 次抗体および 2 次抗体の希釈に Immunoenhancer (WAKO) を使用した。TS-Tween で 10 分間の洗浄を 3 回行った後、ImmunoStar detection kit (WAKO) もしくは ImmunoStar LD detection kit (WAKO), SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific) による化学発光を Image Quant LAS4000 (GE Healthcare) を用いて検出した。

8. 免疫細胞化学

以下、全ての処理は室温条件下で行い、溶液および抗体の希釈には PBS を用いた。6 well plate に入れたカバーガラス上で培養した細胞を PBS で 3 回洗浄した後、4% paraformaldehyde (PFA) /リン酸緩衝液 (4%PFA/PB) (WAKO) に室温で 15 分間固定した。PBS で 3 回洗浄後、0.2% Triton X-100 (KANTO) を含む PBS に室温で 10 分間浸して浸透化した。PBS で 3 回洗浄後、適切な濃度に希釈した 1 次抗体希釈液と室温で 1 時間反応させた。PBS で 3 回洗浄後、Alexa 488/546 で標識した 2 次抗体 (Invitrogen) 希釈液と遮光した状態で室温 1 時間反応させた。PBS で 3 回洗浄後、1 µg/ml DAPI(WAKO) を含む PermaFluor Aqueous Mounting

Medium (Thermo Scientific) を用いて封入した。蛍光観察は、蛍光顕微鏡 Axio Observer.Z1 (Zeiss) または共焦点レーザー顕微鏡 TCS-SP5 (Leica) を用いて行った。

9. endocytosis assay

9-1. 細胞表面 biotin 化による endocytosis assay

6 well plate 中で培養した 70-80% confluent の N2a 細胞を氷冷した PBS で 2 回洗浄し、PBS に適量溶解して用時調製した 1 mg/ml Sulfo-NHS-SS-Biotin (Thermo Scientific) を加え、氷上で 30 分間インキュベートした。Sulfo-NHS-SS-Biotin は膜非透過性であるため、この処理により細胞表面のタンパク質が標識される。0.1 M glycine/PBS で 3 回洗浄して過剰な Sulfo-NHS-SS-Biotin を除去後、氷冷 PBS で 2 回洗浄し、予めインキュベーター内において 37°C で CO₂ 平衡化しておいた DMEM を加え (t=0 サンプルを除く)、目的の時間まで 37°C インキュベーター内で静置した。目的時間までインキュベート後、再び氷上に戻し、取り込み反応を停止させた。氷冷 PBS で 2 回洗浄後、biotin-stripping buffer (50 mM Tris pH 8.6, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.2% purified BSA, 100 mM sodium 2-mercaptoethanesulfonate (MeSNA) (SIGMA)) で 20 分間 3 回洗浄し、細胞表面に残存した biotin 基を還元処理により除去した。120 mM Iodoacetic acid/PBS を加え 10 分間インキュベートして biotin-stripping buffer を除去し、氷冷 PBS で 2 回洗浄後、1% SDS/PBS を 1 ml 加えてシェーカー上で 30 分間穏やかに振って可溶化した。なお、biotin-stripping buffer 処理とその除去の手順を省いたものを MeSNA (-) サンプルとした。ソニケーターを用いて細胞を破碎し、BCA タンパク定量後、タンパク濃度を最低濃度のサンプルに合わせた。この溶液から 80 μ l 採取し、20 μ l の 5x sample buffer (5% 2-mercaptoethanol を含む) を加え、100°C で 1 分間 boil したものを input とした。残りの溶液から 900 μ l 採取し、そこに予め 1% SDS / PBS で平衡化しておいた 75% Streptavidin sepharose (GE Healthcare) を 30 μ l 加えて室温で 12 時間転倒混和した。5000 rpm, 1 分間の遠心条件で Streptavidin ビーズを沈降させ、上清を捨て、1% SDS/PBS を 500 μ l 加えて vortex によりビーズの洗浄を 3 回繰り返す。biotin 化されず非特異的に吸着したタンパク質を除去した。残ったビーズに 50 μ l の 1x sample buffer (1% 2-mercaptoethanol を含む) を加え、軽く vortex 後、100°C で 3 分間 boil して溶出を行い、溶出液を用いてウェスタンブロット解析を行った。

9-2. Ligand uptake assay

9-2-1. EGF uptake assay

6 well plate 中でカバーガラス上に培養した 70-80% confluent の細胞に対して、氷冷 PBS で 3 回洗浄後、氷上に 10 分間静置した。5 $\mu\text{g/ml}$ EGF coupled to Alexa Fluor 555 (Invitrogen) を含んだ uptake medium (DMEM に 2% extra pure bovine serum (Albumin from bovine serum, further purified Fracriion V) (SIGMA) と 20 mM HEPES-NaOH pH 7.4 (DOJINDO)) で 30 分間氷上にてインキュベートした。氷冷 PBS で 3 回洗浄後、0 分のもは 4% PFA/PB で固定、残りは予め CO₂ インキュベーター内で 37°C に温め指摘 pH になるよう平衡化しておいた 5% FBS を含む DMEM で置換し、目的の時間までインキュベーター内で静置した。インキュベート後、氷冷 PBS で洗浄を行い、4% PFA/PBS で固定。その後の手順に関しては、「8 免疫細胞化学」と同様に浸透化、抗体反応を行い、観察した。

9-2-2. SNAP-BACE1 uptake assay

6 well plate 中でカバーガラス上に培養、siRNA, SNAP-BACE1 の遺伝子導入を行った 70-80% confluent の HeLa-S3 細胞(手順に関しては前述の通り)に対し、37°C で温めておいた膜非透過性の 5 μM SNAP Surface Aleza Fluor 488 (New England BioLabs) を含む DMEM に培地交換し、37°C インキュベーター内に静置した。なお、このインキュベート開始点を ligand uptake の開始点とした。DMEM で 2 回洗浄して、予め CO₂ インキュベーター内で 37°C に温め至適 pH となるよう平衡化しておいた DMEM に置換して目的の時間まで 37°C インキュベーター内に静置した。PBS で洗浄後、「8 免疫細胞化学」と同様の手順で固定、浸透化、抗体反応を行い、観察した。

10. GST pull-down assay

10-1. リコンビナントタンパク質の精製

大腸菌株 BL21(DE3) (WAKO) に His₆-GST/pFAT2 もしくは His₆-GST-BACE1CT \times 2/pFAT2 を 42°C で 1 分間のヒートショックにより導入した。これらの大腸菌株を液体 LB 培地で 37°C, 200 rpm でインキュベートした。培養液の OD₆₀₀ が 0.6-1.0 の時点で終濃度が 0.25 mM となるように IPTG を加え、タンパク質の発現を 18°C で一晚誘導した。この培養液から得られた菌体を 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (SIGMA), 0.5% Triton X-100 を含む lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH8.0, 300mM NaCl, 20 mM imidazole (KANTO)) で懸濁後、ソニケーターを用いて細胞を破碎した。この溶液から 3 μl 採取し、30 μl の 1 \times sample buffer (1% 2-mercaptoethanol を含む) を加え、100°C で 3 分間 boil したものを total cell lysate (TCL) とした。残りを 8500 rpm で 20 分間遠心して (TOMY MX-300) 上清を回収し、予め lysis buffer で平衡化しておいた Ni-NTA agarose

(QIAGEN) を加え、4°Cで一晩転倒混和した。Ni-NTA agarose を添加前に上清から 5 µl 採取し、30 µl の 1×sample buffer (1% 2-mercaptoethanol を含む) を加え、100°Cで 3 分間 boil したものを cleared lysate (CL) とした。翌日、4°Cの条件下で、沈殿したビーズに 0.1 mM PMSF および 0.5% Triton X-100 を含む lysis buffer を加えてタンパクを溶出し、カラムに移した。Lysis buffer でカラムを 3 回洗浄した。このとき、ビーズを溶出させた溶出液、カラムからの lysis buffer での洗浄による溶出液、を 10 µl ずつ採取し、10 µl の 2×sample buffer (2% 2-mercaptoethanol を含む) を加え、100°Cで 3 分間 boil したものをそれぞれ flow through (FT), wash through (WT) とした。カラムに elution buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 200 mM imidazole) を段階的に流し、タンパク質を溶出させた。各溶出分画から 10 µl ずつ採取し、10µl の 2×sample buffer (2% 2-mercaptoethanol を含む) を加え、100°Cで 3 分間 boil したサンプルを、TCL, CL, FT, WT とともに電気泳動し、CBB 染色にて目的リコンビナントタンパク質の分子量、精製度の確認を行った。目的タンパク質が高濃度で溶出していた画分を集め、TBS 中で透析を行って imidazole を除去し、BCA タンパク定量を行い、-80°Cで保存した。

10-2. cell lysate の調製

HeLa-S3 細胞, N2a 細胞を lysis buffer C (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, Complete protease inhibitor cocktail (Roche)) で可溶化した後、glutathione sepharose (GE Healthcare) ビーズを加えて 4°Cで 1 時間転倒混和させることにより preclear 処理を行った。500×g, 5 分間の遠心条件で glutathione sepharose ビーズを沈降させて上清を回収し、BCA タンパク定量を行い、5 mg/ml になるよう調製し、-80°Cで保存した。

10-3. GST pull-down assay

10-2.の方法で得られた cell lysate 1mg と、10-1.の方法で得られた His₆-GST 融合タンパク質 200 µg を lysis buffer C 中で混合し、予め lysis buffer C で平衡化しておいた 50% glutathione sepharose ビーズを 100 µl 加えて、4°Cで 90 分間転倒混和した。500×g, 5 分間の遠心条件で glutathione sepharose ビーズを沈降させ、lysis buffer C 500 µl で 3 回洗浄し、ビーズに 100 µl の 2×sample buffer (2% 2-mercaptoethanol を含む) を加え、100°Cで 1 分間 boil した溶出液を用いてウェスタンブロット解析を行った。

11. Bin1^{flox/flox} マウス由来 primary cortical neuron culture

11-1. 動物

動物実験の実施にあたっては、「動物の愛護及び管理に関する法律」など法令等に基づいて定められている「東京大学動物実験実施マニュアル」および「薬学部動物研究施設利用の手引き」にさだめる事項を遵守し、東京大学大学院薬学系研究科の承認を得て動物の健康管理と動物福祉に常に配慮して実施した。初代培養神経細胞 (primary neuronal culture) 取得においては、Lankenau Institute for Medical Research Dr. James B. DuHadaway により作出された、C57BL/6J にバッククロスされた *Bin1^{flx/flx}* マウスを御供与いただき使用した[Chang et al 2007]。本マウスでは *Bin1* 遺伝子の第 3 エクソンの両端に *loxP* 配列が導入されており、Cre リコンビナーゼを発現させることにより全ての *Bin1* isoform がノックアウト (KO) される。

11-2. primary cortical neuron culture の培養方法

11-2-1. 培養プレートの準備

12 well plate (IWAKI あるいは FALCON) に poly-l-ornithine solution (PLO) (SIGMA) を 1 ml/well ずつ入れ、37°C で一晩コーティングを行った。翌日、DPBS (NaCl 150 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, KCl 2.7 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM) で 3 回洗浄し、使用時まで 4°C で保存した。

11-2-2. Neuronal culture 培養液

L-Glutamine 2 mM (Invitrogen), ペニシリン 50 unit/ml, ストレプトマイシン 50 mg/ml, B-27 supplement (Invitrogen) を含む Neurobasal medium (Invitrogen) を Neuronal culture 培養液として調製して primary neuronal culture の培養に用いた。

11-2-3. リコンビナントレンチウイルス の生成, 濃縮

レンチウイルスの生成は、Lenti-X 293 細胞 (Takara) に以下の lentiviral expression plasmid と 3 種の packaging plasmid とを polyethylenimine, branched (SIGMA) を用いて transfect させることで、目的とするリコンビナントレンチウイルスを得た。expression plasmid としては、pFUGW plasmid を用い、EGFP と nuclear localizing signal (NLS) に Cre recombinase 配列を有する EGFP-NLS-CRE とコントロールとしての EGFP と NLS のみを有する EGFP-NLS を使用した[Ho et al 2006]。packaging plasmid としては、pCAG-kGP4.1R, pCAG4-RTR2, pCAGGS-VSVG の 3 種類を使用した。各プラスミドは東京大学大学院医学系研究科神経生化学教室尾藤晴彦教授より御供与いただいた。

Lenti-X 293 細胞を 10 cm dish (IWAKI あるいは FALCON) 内で、10 ml の DMEM で培養し、70% confluent 程度までインキュベーター内で培養した。FBS および

抗菌薬を含まない DMEM 730 μ l と 500 μ g/ml plasmid cocktail 20 μ l (EGFP-NLS or EGFP-NLS-CRE: pCAG-kGP4.1R: pCAG4-RTR2: pCAGGS-VSVG = 5:3:1:1), 1 mg/ml で調製した PEI 50 μ l を混合, 10 分間室温で置き, Lenti-X 293 細胞の培地中に添加し, 培養を続けた. 18 時間後に, 8 ml の DMEM で培地交換を行った. 培地交換 24 時間後にウイルス液を含む培地を回収し (1st viral sup), 7 ml の DMEM で置換した. さらにその 24 時間後にウイルス液を含む培地を回収し (2nd viral sup), 1st viral sup と混合し, 0.45 μ m の PVDF フィルター (MILLIPORE) に通した. Lenti-X concentrator (Clontech) を 5 ml 加えて, 4 $^{\circ}$ C で一晩おいた. 翌日, 1500 \times g で 45 分間, 4 $^{\circ}$ C で遠心し (Eppendorf 5702R), ペレットを Neurobasal medium 500 μ l で懸濁し, 使用時まで -80 $^{\circ}$ C で保存した.

11-2-4. primary cortical neuron culture の取得と培養, リコンビナントレンチウイルス の感染

生後 0 日齢 (P0) の *Bin1^{flox/flox}* マウスの仔から, 氷冷 HBSS (Invitrogen) 中で 大脳皮質を分離し, 髄膜を剥がして分散した組織を HBSS 中に集め, 0.125% Trypsin, 1 μ l/ml Dnase (Nippon Gene), 0.8 mM MgSO₄, 1.85 mM CaCl₂ 処理下, 37 $^{\circ}$ C で 15 分間インキュベートして分散した. 得られた細胞液に DMEM を加えて懸濁し, cell strainer 100 μ m (BD FALCON) を通して, 細胞数をカウントした. 遠心により上清を抜きとり, 適量の DMEM を加え, 予め PLO でコーティングした 12 well plate に 2.5×10^5 cells/cm² で細胞懸濁液をまいた. インキュベーター内で培養し, 細胞を plate にまいてから 20-24 時間後 (DIV1) に, 前項で精製したリコンビナントレンチウイルス液を MOI 20 で含む Neuronal culture 培養液 250 μ l/cm² に置換した. レンチウイルス感染 48 時間後 (DIV3) に Ara-C 2 μ M を含む Neuronal culture 培養液 250 μ l/cm² に置換し, さらにその 24 時間後 (DIV4) に Ara-C を含まない Neuronal culture 培養液 250 μ l/cm² に培地交換を行い, 培地交換 168 時間後 (DIV10) で回収した. 以下 ELISA による培地中の分泌 A β 量測定および細胞のウエスタンブロット解析の手法は前述の記載と同様に行った.

12. in vitro BACE1 activity assay

12-1. N2a 細胞からの可溶化膜画分の抽出

N2a 細胞を 150 mm culture dish にまいて, siRNA 添加後 60 時間でほぼ confluent になるよう培養した. 氷冷 PBS で洗浄後に細胞をセルスクレーパーではがして回収し, 2500 rpm, 5 分間の遠心により細胞を沈殿させた. 沈殿させた細胞画分を 4 ml の Homogenize Buffer (10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 10% Glycerol, Complete protease inhibitor cocktail) で懸濁した. 氷上で Polytron homogenizer (HITACHI) により細胞を破碎し, 2500 rpm, 5 分間の遠心を行い, 上清を回収

する作業を2回繰り返した。この上清をさらに 100000×g (43 krpm), 4°C, 1 時間遠心 (HITACHI) して、沈殿を膜画分として回収した。

この膜画分に、500 µl ~ 1 ml の Solubilization Buffer (10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 10% Glycerol, Complete protease inhibitor cocktail, 1 % CHAPSO) を加え、21 G 注射針付きシリンジを用いて 10 回 suspend し、その後 27 G の注射針付きシリンジを用いて同様に 10 回 suspend した。この懸濁液を氷冷下で 1~2 時間静置した。100000×g (43 krpm), 4°C で 1 時間遠心 (HITACHI) して、上清を 1% CHAPSO 可溶化膜画分として回収した。1% CHAPSO 可溶化膜画分は、BCA タンパク定量後、1 mg/ml に調製し、使用するまで -80°C で保存した。

12-2. *in vitro* BACE1 activity assay

前項で取得した N2a 細胞 1% CHAPSO 可溶化膜画分 10 µg を 25 mM CH₃COONa pH4.5 中で total 150 µl となるように混合し、蛍光測定用黒色 96well プレート (SUMILON) にアプライした。各種化合物は 150 µl 中に 0.2 µl となるように濃度を調整して加えた。この混合溶液を、4°C で 30 分 preincubation した。その後、25 mM CH₃COONa pH4.5 に基質である JMV2236 (Bachem) を 40 µM で溶かした溶液を 50 µl 加え、ピペッティングを行った。37°C で incubation を行い、基質追加後目的の時間まで培養し、それぞれの時点での各 well の蛍光 (励起波長 320 nm, 測定波長 420 nm, cut off auto) を SpectraMax M2 (Molecular Devices) を用いて定量した。

13. qRT-PCR

13-1. N2a 細胞からの RNA の単離

N2a 細胞を 12 well plate にまきこみ、siRNA 添加後 60 時間で 90% confluent となるよう培養し、PBS で洗浄後、500 µl の ISOGEN (Nippon Gene) を加えて溶解した。室温で 5 分静置後、100 µl のクロロホルム (Wako) を加えて攪拌し、室温で 3 分間静置した。12000×g, 4°C で 15 分間遠心し、上層である水層を採取した。採取した画分に 250 µl のイソプロパノール (KANTO) を加え、室温で 5 分静置した。再び 12000×g, 4°C で 10 分間遠心し、RNA を沈殿として得た。上清を除去後、沈殿に 500 µl の 70 % エタノールを加え、7500×g, 4°C で 5 分間遠心し、RNA を洗浄した。上清を除去し、乾燥させた後、30 µl の miliQ に溶かし、RNA を得た。

13-2. cDNA の精製

13-1 で精製した RNA を 65°C で 5 分間インキュベートした後、氷上で急冷し RNA を変性させた。その後、ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix with gDNA

remover (TOYOBO) を用いて、ゲノム DNA の除去、逆転写反応を行い、cDNA を得た。

13-3. qRT-PCR

13-2 で精製した cDNA と THUNDERBIRD[®] SYBR[®] qPCR Mix (TOYOBO) を用いて qRT-PCR を行った。装置は Light Cycler[®] 480II (Roche) を用い、Relative Quantification で解析を行った。解析は GAPDH の増幅量に対する BACE1 の増幅量の比を用いた。

各遺伝子配列を増幅する際のプライマーは以下の配列のものを用いた。

(1)GAPDH

AACGACCCCTTCATTGAC

GAAGACACCAGTAGACTCCAC

(2)BACE1

GGAACCCATCTCGGCATCC

TCCGATTCTCGTCGGTCTC

14. ショ糖密度勾配遠心法による endosome purification

N2a 細胞を 150 mm culture dish にまいて、siRNA 添加後 60 時間でほぼ confluent になるよう培養した。1 mM MgCl₂ と 0.9 mM CaCl₂ を含む DPBS で 2 回洗浄後に細胞をセルスクレーパーではがして回収し、1200 rpm、5 分間の遠心により細胞を沈殿させた。沈殿させた細胞画分を 3ml の Homogenize Buffer (HB; 20 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂) で懸濁し、2300 ×g で 10 分間遠心した。沈殿を Complete protease inhibitor cocktail を含んだ HB で再懸濁し、27 G 注射針付きシリンジを用いて 8 回 suspend した。2500 rpm で 5 分間遠心し、上清を再び 2500 rpm で 5 分間遠心し、核除去後上清(post nuclear supernatant; PNS)を回収した。PNS 0.9 ml に 4 ×HB (80 mM HEPES pH 7.4, 600 mM NaCl, 8 mM CaCl₂) 0.5 ml, 2 M sucrose 2 ml を混合し、40.6 % sucrose fraction を作製した。残りの上清 100 μl に 2% 2-mercaptoethanol を含む 2 ×Sample buffer 100 μl を加え、input とした。上清を含む 40.6 % sucrose fraction の上に、35 % sucrose/ HB を 4 ml, 25 % sucrose/ HB を 3 ml, HB を 1 ml, をそれぞれ順に静かに加えた。これを 31 krpm, 4°C で 1 時間遠心 (BECKMAN; SW41 rotor) して、各濃度間の sucrose 境界面が一つの画分に入るように 1 ml 弱ずつ上層から静かに回収した (fraction 1-12 を回収し、fraction 2 に HB と 25 % sucrose 境界、fraction 5 に 25 % と 35 % sucrose 境界、fraction 9 に 35 % と 40.6 % sucrose 境界)。1-12 までの各 fraction 500 μl に MilliQ 400 μl, 0.15 % Na-deoxycholate 100 μl, 100 % trichloroacetic acid (TCA) 140 μl を加え、vortex 後、氷上で 1 時間静置した。14 krpm, 4°C で 10 分間遠心し、沈殿を氷冷した acetone 1 ml で洗浄、vortex し、14 krpm, 4°C で 10 分間遠心した。再度

沈殿を acetone 1 ml で洗淨, vortex し, 14 krpm, 4°C で 10 分間遠心した. 上清を捨て, 沈殿を 37°C のヒートブロックで 10 分間乾燥させ, 1.5 % 2-mercaptoethanol を含む 1.5 × Sample buffer 150 µl を加えて懸濁した. 室温で 3 時間攪拌し, input とともに 100°C で 3 分間 boil し, input を 3 µl, 各 fraction のサンプルを 10 µl ずつアプライし, ウエスタンブロット解析を行った.

第3章 結果

1. Bin1 ノックアウト神経細胞における分泌 A β への影響の解析

BIN1 の AD 発症への関与の分子機構について検討を行うため、まずアミロイドカスケード仮説において最重要と考えられる A β 産生経路に対する BIN1 の影響について評価を行った。BIN1 には中枢神経系のみが存在する isoform があることから、出生直後の *Bin1*^{flox/flox} マウス産仔由来大脳皮質から primary cortical neuron culture を得て、組み換えレンチウイルスを用いた Cre リコンビナーゼ発現系により、*in vitro* において Bin1 の発現をノックアウトした primary cortical neuron culture を解析することにした (図 10) (*Bin1*^{flox/flox} マウスは Lankenau Institute for Medical Research Dr. James B. DuHadaway より御供与いただき、実験に用いた)。この際に線維芽細胞などの増殖系細胞を抑制し、神経細胞をより特異的に培養するため、Ara-C を培地中に短時間添加した。*Bin1*^{flox/flox} マウス由来の primary cortical neuron culture に対して、EGFP-NLS あるいは Cre リコンビナーゼを融合した EGFP-NLS を発現させる組み換えレンチウイルス (それぞれ EGFP-NLS-LeV, EGFP-NLS-Cre-LeV とする。レンチウイルスのプラスミドは東京大学大学院医学系研究科神経生化学教室尾藤晴彦教授より御供与いただいた) を感染させ、sandwich ELISA 法による培地中の分泌 A β 量測定および細胞のウェスタンブロット解析を行った。

BIN1 には少なくとも 10 種類以上の isoforms が存在することが知られており、中枢神経系の CLAP ドメインを含む分子量が大きい isoforms が 8 種類 (CNS isoforms; isoform 1-7)、筋特異的 isoform が 1 種 (muscle isoform; isoform 8)、そして広汎な組織に発現する isoforms が 2 種類 (ubiquitous isoforms; isoform 9-10) 存在するが、中枢神経系組織における各 splicing variant の割合については知られていない。組み換えレンチウイルスを感染させた primary cortical neuron culture のウェスタンブロット解析により、75-100 kDa の間に抗 BIN1 抗体によって認識される少なくとも 3 本のバンドの消失もしくは減弱が確認された。また、50-75 kDa の間にも発現量の低いバンドがあり、同様に Bin1 ノックアウトにより減少した (図 11)。*Bin1* によってコードされている最大の CNS isoform である isoform 1 の予測分子量は 65 kDa 程度である。一方、これまでに BIN1 の CNS isoforms はヒトで 85kDa[Butler et al 1997]、ラットで 92kDa に観察されている[Wigge et al 1997]。また予測分子量が 50 kDa 程度の muscle isoform である isoform 8 も 60-70kDa の位置にポリアクリルアミドゲルで泳動されることが知られており[Sakamuro et al 1996]、糖鎖付加などの翻訳後修飾を受けていることが推測されている。これらの結果から、出生直後マウス産仔大脳皮質由来の primary cortical neuron culture においては、Bin1 の alternative splicing による isoforms の中で、CLAP ドメインを含む CNS isoforms が優位で、後述する非神経系培養細胞(HeLa 細胞)

での BIN1 ノックダウン実験の際に 50-75 kDa に観察される ubiquitous isoforms の発現量は相対的に低いことが示された。

次に Bin1 ノックアウトが A β 産生に及びず影響について検討した。FAD に連鎖する PS1 や PS2 変異などでは、A β 総量に対する、より凝集性や神経毒性が高いとされる A β 分子種である A β 42 の比率が上昇することが知られている。一方、EGFP-NLS-Cre-LeV を感染させた Bin1 ノックアウト primary cortical neuron culture 群では、EGFP-NLS-LeV 感染群（コントロール群）と比較して、有意な分泌 A β 40 および A β 42 量の増加を認めた（図 12-A, B）。また A β 40, A β 42 いずれも増加し、A β 42 の[A β 40 + A β 42]に対する比率（以下「A β 42 比率」）には有意な変化は見られなかった。（図 12-C）。このことから、primary cortical neuron culture において Bin1 が A β 代謝に関わる経路のどこかに関与することで総 A β 量の変化を通じ、AD 発症に寄与する可能性が想定された。これまでに A β 産生総量は主に A β 前駆体である APP 発現量や、 β -secretase である BACE1 の発現および活性に大きく依存していることが示されている。そこでこれらの分子への Bin1 の関与の有無について検討を行った。その結果、Bin1 をノックアウトした primary cortical neuron culture では、コントロール群と比して有意な BACE1 タンパクの増加および BACE1 による APP 切断産物である分泌 sAPP β の増加を認めた（図 13, 14(B), (D)）。一方で、APP タンパクおよび γ -secretase 構成因子である Nicastin の発現には明らかな変化が見られなかった（図 13, 14 (A), (C)）。この結果から、Bin1 ノックアウトによって BACE1 タンパクの増加が起こることで、APP からの BACE1 による β 切断が亢進し、A β 産生量の増加につながる可能性が想定された。

2. Bin1 ノックアウト神経細胞における BACE1 の mRNA 発現量の解析

BIN1 はメンブレントラフィックに関する機能を担っていることから、BACE1 タンパクの増加は Bin1 によって BACE1 のメンブレントラフィック制御に何らかの影響を持っている可能性が考えられる。しかし、BIN1 は ubiquitous isoforms 9-10 による核内での癌遺伝子などの転写活性を調節する働きも知られているため、BACE1 mRNA の転写が亢進することで BACE1 タンパクの増加が生じている可能性も否定できない。Primary cortical neuron culture において、定量的 PCR 法を用いて BACE1 の mRNA 発現量の評価を行ったところ、Bin1 ノックアウト群とコントロール群とで有意な変化は認められなかった（図 15）。このことから、Bin1 の発現低下による BACE1 タンパク発現量増加は、翻訳後の BACE1 代謝過程への影響によることが示唆された。

次に、Bin1 のノックアウトが BACE1 タンパク増加を呈する機序を考える際に、Bin1 の機能として知られているエンドサイトーシスや細胞内小胞輸送に対する作用が BACE1 の代謝も担っているかを検討することにした。この目的で、神経

系もしくは非神経系培養細胞を用いて、primary cortical neuron culture での Bin1 ノックアウトと同様に A β 増加および BACE1 の増加が観察されるかをまず評価し、そしてその分子学的機序についてより詳細に検討を進めた。

3. 神経系培養細胞における Bin1 ノックダウンによる分泌 A β への影響の解析

Primary cortical neuron culture で得られた Bin1 の A β や BACE1 に対する影響の背景機序を明らかにするため、内因性に APP, BACE1, γ -secretase の発現が見られ、内在性 A β の測定が可能な中枢神経系由来培養細胞であるマウス神経芽腫由来 Neuro2a (N2a) 細胞を用いて RNAi 法により Bin1 をノックダウンし、その影響を検証した。なおマウス由来 Bin1 の siRNA には、全ての Bin1 の isoform に対してノックダウン効果を有する 4 種の配列を含む Dharmacon ON-TARGET SMART pool siRNA (#L-054779-01)を用いた。また、本研究において培養細胞を用いた siRNA 処理を伴う解析においては、RNAi のネガティブコントロールとして哺乳類遺伝子をターゲットとしない配列を用いた Non Target siRNA を control siRNA として使用した。その結果、siRNA による Bin1 ノックダウン群では、primary cortical neuron culture での Bin1 ノックアウトと同様に、Non Target siRNA 処理群に比して培地中の有意な分泌 A β 40 および A β 42 量の増加が見られた (図 16-A, B)。しかし A β 42 比率には有意な変化は観察されなかった (図 16-C)。さらに、ウエスタンブロット解析において、Bin1 ノックダウン群では BACE1 タンパクの有意な発現増加が見られたが、BACE1 の基質となる APP タンパクには明らかな変化を認められなかった (図 17-A, B, C)。また、Bin1 ノックダウン群と Non Target siRNA 処理群とで、定量的 PCR を用いて BACE1 mRNA 発現量を評価したところ、両群で BACE1 mRNA 発現量に有意な差は認めなかった (図 18)。

これらの結果はいずれも primary cortical neuron culture での Bin1 ノックアウトで観察された A β に関わる現象と同一であり、中枢神経系培養細胞である N2a 細胞を用いることで Bin1 による A β や BACE1 そして AD 発症への影響につながる分子機構の解明が可能であると考えた。

4. 神経系培養細胞における Bin1 ノックダウンによる *in vitro* BACE1 活性の解析

これまでの Bin1 ノックアウトやノックダウンで見られた BACE1 タンパク増加と分泌 A β 量増加との関連について、BACE1 タンパクの増加が β -secretase 活性の亢進を伴うことで APP からの β 切断の亢進につながっているかを *in vitro* BACE1 activity assay で検証した。Bin1 もしくは Non Target siRNA で処理した N2a 細胞から BACE1 を含む可溶性膜画分を抽出し、BACE1 特異的な蛍光基質と反応させ、両 siRNA 処理群の各測定時間での蛍光強度を比較した。Bin1 ノックダウン群では、反応 30 分後以降の各測定時間において、Non Target siRNA 処理群

と比して同タンパク量における有意な BACE1 酵素活性の亢進が確認された (図 19). このことから, Bin1 ノックダウンによる BACE1 タンパクの増加は, APP に対する β -secretase 活性の亢進を伴い, A β の増加につながることを示された.

5. 神経系培養細胞における Bin1 ノックダウンによる BACE1 の細胞表面からのエンドサイトーシス効率の解析

Bin1 による BACE1 の変化は mRNA レベルでの変化に起因するのではないことが示唆されたことから, BACE1 のエンドサイトーシスもしくはエンドソームでの細胞内小胞輸送やライソソームでの分解などの経路に Bin1 が影響を与えている可能性について検討を進めることとした.

まずは, Bin1 が BACE1 の細胞表面からの初期エンドソームに至るエンドサイトーシス (内在化) へ影響を有するかの検証を行った. 細胞表面に存在するタンパク質の内在化過程を生化学的に検討する方法として, 還元処理による除去が可能な細胞表面 biotin 化を利用した endocytosis assay が用いられている (図 20-A). これは NHS-LC-SS-biotin というリンカー部位にジスルフィド結合を有する biotin 化試薬で細胞表面タンパク質を標識し, 37°C インキュベーター内で内在化を進行させた後に細胞表面に残存した biotin 基を細胞膜非透過性の還元試薬 sodium-2-sulfarylmethanesulfone (MeSNa) により除去することで, 内在化されたタンパク質のみを biotin 標識する方法である biotin 化され内在化されたタンパク質は可溶化後選択的に streptavidin ビーズにより回収することが可能であり, MeSNa 処理までの時間を変化させることで特定のタイムコースにおいて細胞表面からのエンドサイトーシスを評価することができる. Bin1 ノックダウン群および Non Target siRNA 処理群ともビオチン化試薬標識後 30 分で BACE1 の内在化が確認された. さらに 60 分, 120 分後においても両群における内在化される BACE1 に明らかな変化は見られなかった (図 20-B). 以上の結果から, Bin1 はクラスリン依存的エンドサイトーシスへの関与が報告されている分子であるが, BACE1 の細胞表面からの初期エンドソームへの内在化の制御において, Bin1 は明らかな影響を有していないと考えた.

6. 非神経系培養細胞における BIN1 ノックダウンによる分泌 A β への影響の解析

これまで primary cortical neuron culture での Bin1 ノックアウトおよび神経系培養細胞での Bin1 ノックダウンによる分泌 A β 量の増加, BACE1 タンパクの増加を確認してきた. BIN1 には CLAP ドメインを含む中枢神経系特異的 isoforms (CNS isoforms 1-7) と, CLAP ドメインを含まない全身に広く発現する ubiquitous isoforms 9-10 とが存在する. A β や BACE1 に対して BIN1 が与える影響が CNS isoforms に特異的な働きによるものなのかを検証するため, 非神経系培養細胞であるヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞を用いて検討を行った. HeLa 細胞は内因性

に APP や BACE1 をほとんど発現せず内因性 A β 産生も検出されないが, RNAi が容易である他, 様々な細胞生物学的解析に用いられており細胞内小胞輸送関連オルガネラの同定が容易である. そこで HeLa 細胞において BACE1 タンパクの輸送を可視化する目的で, SNAP タグおよび GFP タグを利用することとした. SNAP タグは約 20 kDa の DNA 修復酵素である O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase の変異体であり, benzylguanine 誘導体と特異的に共有結合を形成する. そのため様々な蛍光試薬や標識化合物を用いて SNAP タグを融合したりコンビナントタンパクを特異的にラベルすることが可能である. SNAP タグを N 末につけた BACE1 を恒常的に発現させる HeLa SNAP-BACE1 細胞を樹立し, まず BIN1 もしくは Non Target siRNA で処理すると同時に, APP を一過性に発現させることで sandwich ELISA 法による分泌 A β 量測定, ウェスタンブロット解析により BACE1 タンパクなどの解析を行った. Primary cortical neuron culture や N2a 細胞では, ウェスタンブロット解析での抗 BIN1 抗体において主に 75kDa 前後の分子量の位置にバンドが検出されたが, 非神経系培養細胞である HeLa 細胞においては 60 kDa 前後の位置に BIN1 ノックダウンによって減弱するバンドが検出された (図 21-C). このことから, Primary cortical neuron culture や N2a 細胞では BIN1 の CNS isoforms 1-7 が ubiquitous isoforms 9-10 に比して優位であることが示唆された. しかし HeLa SNAP-BACE1 細胞においても, これまでの中枢神経系の細胞と同様に, BIN1 のノックダウンにより培地中の有意な分泌 A β 40 および A β 42 量の増加が見られた (図 21-A, B). さらに, ウェスタンブロット解析での SNAP-BACE1 タンパクも BIN1 ノックダウンにより有意に増加していた (図 21-C, D). 一方, BACE1 の最 C 末に GFP タグをつけた BACE1-GFP を恒常的に発現させる HeLa BACE1-GFP 細胞を作成し, 同様に BIN1 ノックダウンの影響を検討したところ, HeLa SNAP-BACE1 細胞などと同様に, 有意な分泌 A β 40 および A β 42 量の増加 (図 22-A, B), 有意な BACE1 タンパクの増加が見られた (図 22-C, D). またエンドサイトーシスや細胞内小胞輸送への働きが報告されている BACE1 の最 C 末側領域に GFP タグを融合しても, BIN1 機能の欠失による BACE1 や A β への影響に目立った変化はないことを確認した. これらの結果から, 非神経系培養細胞である HeLa 細胞において, CLAP ドメインを有さない ubiquitous isoforms の BIN1 のみであっても BACE1 タンパク量および分泌 A β 量に同様の変化が生じることが示され, BIN1 の BACE1 や A β 産生に対する働きにおいて CNS isoforms 特異的な CLAP ドメインの存在は必須ではないことが示唆された.

また, APP, BACE1 とともに A β 産生系を担う γ -secretase 複合体に対する BIN1 の関与の有無を評価するため, 内因性の APP と BACE1 がほぼ存在しない HeLa 細胞に対して, APP の BACE1 による β 切断産物であり, γ -secretase の直接の基質である APP C99 を発現させ, BACE1 への影響を除外して γ -secretase への BIN1

の影響に起因する A β 産生の変化を解析した。その結果、A β 40 量は BIN1 ノックダウンにより有意に減少し (図 23-A), A β 42 量は有意な変化が見られなかった (図 23-B)。この C99 からの A β 産生量低下に関する詳細なメカニズムは不明であるが、少なくとも BIN1 の A β に対する作用は、産生系における γ -secretase によるものではなく、BACE1 に対する影響に起因していることが支持された。

7. 免疫細胞化学を用いた BIN1 ノックダウンによる BACE1 のエンドサイトーシスおよび細胞内小胞輸送への影響の解析

次にエンドソームや TGN などのオルガネラの局在をより容易に観察可能な HeLa 細胞を用いて、細胞表面からの BACE1 の内在化、初期エンドソームからの細胞内小胞輸送に対する BIN1 の影響を免疫細胞化学的に検討した。HeLa BACE1-GFP 細胞において BIN1 siRNA 処理を行うとほぼ全ての細胞において BIN1 の細胞質を主体とした染色が消失しノックダウンがなされることが抗 BIN1 抗体 (C99D) による染色から観察され、HeLa 細胞では siRNA によって高いノックダウン効率が得られることが示された (図 24)。一方、核内の染色像は非特異的と考えられた。

次に HeLa 細胞における BACE1-GFP タンパクの細胞内局在を明らかにするため、初期エンドソームのマーカーである EEA1 に対する抗体、リサイクリングエンドソームのマーカーであるトランスフェリン受容体 (TfR) に対する抗体、TGN のマーカーである TGN46 に対する抗体、後期エンドソームおよびライソソームのマーカーである LAMP1 に対する抗体、をそれぞれ用いて二重免疫染色を行った。control siRNA 処理群では BACE1-GFP は TfR や TGN46 の染色像とよく一致し (図 27, 28), EEA1 染色像と一部一致したが (図 25), LAMP1 との染色像の一致はわずかであり (図 26), 細胞表面膜上の BACE1-GFP も少なく, BACE1 は細胞内において TGN やリサイクリングエンドソーム内に多く局在し、一部は初期エンドソーム内に存在していることが確認された。この結果は、Huse らによる BACE1 は細胞内において後期 Golgi/TGN とエンドソームに主に局在し、一部は細胞膜表面とエンドソーム間を循環しているとの報告と合致し、BACE1-GFP の細胞内局在が内因性 BACE1 と同様の挙動を示していることが示唆された [Huse et al 2000]。一方、BIN1 siRNA 処理群では、TfR, TGN46, LAMP1 との共染色像では明らかな変化は観察されなかったものの (図 26, 27, 28), EE1A との共局在がより多く見られるようになり (図 25), BIN1 ノックダウンにより増加した BACE1 は初期エンドソームにおいて蓄積していることが示唆された。さらに、BACE1, EEA1 とともに BIN1 ノックダウンによって、細胞内の周辺部から核近傍へと分布が変化し、核近傍で共局在が増えていることが観察された (図 25)。

初期エンドソームが後期エンドソームやリサイクリングエンドソームへ成

熟・分離する際に、細胞周辺部から核近傍へと輸送されることが知られている。そこで BIN1 が BACE1 の初期エンドソームからの細胞内小胞輸送の制御に関与している可能性を考え、BACE1 の細胞内局在および輸送をより詳細に検証することを目的に、N 末に SNAP タグを付加した BACE1 の細胞表面からの細胞内への取り込みを経時的に追跡するために、ligand uptake assay による免疫染色を用いた検討を行った。HeLa SNAP-BACE1 細胞に対し、膜非透過性の基質である SNAP Surface Alexa Fluor 488 で細胞表面膜上に存在する SNAP-BACE1 をラベリングし、目的時間まで細胞内に取り込ませた後に固定、免疫染色を行った。取り込み開始 30 分後に固定・免疫染色したサンプルでは、Non Target siRNA 群、BIN1 siRNA 群いずれも、初期エンドソームマーカーである EEA1 と SNAP-BACE1 の染色像の一致が見られた (図 29)。この結果は、細胞表面 biotin 化による endocytosis assay において表面膜に存在する内因性 BACE1 が 30 分後には既に細胞内に取り込まれていること、また表面膜からの内在化に対して BIN1 ノックダウンは大きな影響を与えないことと合致し、BACE1 の表面膜からの初期エンドソームへの内在化に BIN1 は明らかな影響を有さないことが示唆された。

一方、細胞表面からの SNAP-BACE1 取り込み開始 120 分後に固定・免疫染色したサンプルでは、Non Target siRNA 群では細胞内に局在する SNAP-BACE1 は EEA1 の染色像とはほとんど一致しなくなり、初期エンドソームから異なるオルガネラへ輸送されているのに対し、BIN1 ノックダウン群では 120 分時点でも未だ EEA1 の染色像と一致するものが多く、初期エンドソーム内に SNAP-BACE1 が留まっていることが示された (図 30)。この結果から、BIN1 は BACE1 の初期エンドソームからの細胞内小胞輸送を制御している可能性が示唆された。

次に、この初期エンドソームにおける細胞内小胞輸送の制御が BACE1 に比較的特異的なものであるのか、もしくは多くのタンパク質の細胞内小胞輸送に関与するシステムであるのかを検討するため、蛍光標識された Epidermal growth factor (EGF coupled to Alexa Fluor 555) を用いた ligand uptake assay を行った。EGF は細胞表面膜上の EGF 受容体と結合し、クラスリン依存的エンドサイトーシスによって初期エンドソーム内へと取り込まれ、後期エンドソームを経由してライソソームで分解されることが知られており、エンドサイトーシスおよび細胞内小胞輸送の研究において頻用されている。BIN1 siRNA もしくは Non Target siRNA、初期エンドソームから後期エンドソームへの細胞内小胞輸送を制御することが知られる Rab7a の siRNA 処理をそれぞれ行った HeLa 細胞に、EGF coupled to Alexa Fluor 555 を加え、経時的な EGF の取り込みを追跡、EEA1 の染色像と比較することで EGF の細胞表面からの初期エンドソームへの内在化と細胞内小胞輸送への BIN1 の関与を評価した。細胞表面膜からの EGF 取り込み 30 分後に固定・免疫染色したサンプルにおいて、Non Target siRNA, Rab7a siRNA, BIN1 siRNA

群いずれも EGF が EEA1 と共局在し、細胞表面膜上から初期エンドソームへの内在化には 3 群とも明らかな違いは認められなかった (図 31). 一方、EGF 取り込み 60 分後に固定・免疫染色したサンプルでは、Rab7a siRNA 群では EGF は未だ EEA1 陽性初期エンドソーム内に留まっていたのに対し、control siRNA 群および BIN1 siRNA 群ではライソソームで分解されて生じたと考えられる細かい EGF coupled to Alexa Fluor 555 の粒子が観察され、control siRNA 群、BIN1 siRNA 群とも初期エンドソームから速やかに後期エンドソームを介してライソソームへの分解が行われたと考えられた (図 32). この結果から、BIN1 のノックダウンでは EGF の細胞膜表面からの内在化および初期エンドソームからの後期エンドソーム～ライソソームの分解系への移行いずれも明らかな影響がなく、BIN1 による BACE1 の初期エンドソームでの細胞内小胞輸送の制御は、BACE1 に比較的特異的なシステムであることが示唆された。

BACE1-GFP の染色像から、定常状態において BACE1 は後期エンドソーム～ライソソームでの局在は少ないことが観察されたが、これは BACE1 がこれらのコンパートメントにおいて比較的速やかに分解されていることによる可能性が考えられる。このため、pH 上昇作用によりライソソームでの分解を阻害するクロロキンを添加し、BACE1 の分解を停止させた状態で、初期エンドソームから後期エンドソーム～ライソソームへの細胞内小胞輸送に BIN1 が影響を与えるかを評価した。クロロキン添加後長時間が経過するとライソソーム内へのクロロキン蓄積による浸透圧膨張によってライソソームの空胞化が生じてしまうため、クロロキン添加 6 時間後の細胞を固定・染色した。クロロキン添加を行った HeLa BACE1-GFP 恒常発現細胞の Non Target siRNA 処理群では、クロロキン無添加時と比して、後期エンドソーム～ライソソームマーカーである LAMP1 と BACE1 との共局在が増加し、BACE1 が後期エンドソーム～ライソソームで分解されていることが確認された (図 33). 一方、クロロキン添加を行った BIN1 siRNA 処理群では、LAMP1 陽性後期エンドソーム～ライソソームへの BACE1-GFP の分布が目立たず、BIN1 のノックダウンにより BACE1-GFP の初期エンドソームから後期エンドソーム～ライソソームへの細胞内小胞輸送が阻害されていることが示唆された (図 33).

8. ショ糖密度勾配遠心法を用いた Bin1 ノックダウンによる BACE1 の細胞内分布の解析

N2a 細胞を用いて、ショ糖密度勾配遠心法により Bin1 ノックダウンによる BACE1 の細胞内局在の変化について生化学的に検討を行った。底部充填法により N2a 細胞から得た核除去後上清 (post-nuclear supernatant; PNS) を含んだ 40.6 % sucrose, 35 % sucrose, 25 % sucrose, homogenize buffer を順に重層し、31000 rpm で 60 分間遠心後、上層より fraction 1-12 の画分を得た。homogenize buffer 層と

25 % sucrose 層との境界は fraction 2 に、25 % sucrose 層と 35 % sucrose 層との境界は fraction 5 に、35 % sucrose 層と 40.6 % sucrose 層との境界は fraction 9 に含まれた。後期エンドソーム～ライソソームマーカーとして LAMP1 を、ゴルジ複合体マーカーとして GM130 を、リサイクリングエンドソームマーカーとしてトランスフェリン受容体 (TfR) を、初期エンドソームマーカーとして EEA1 を、それぞれ使用して核細胞内小器官の分布を解析した。LAMP1 は fraction 2 に、GM130 は fraction 5 と 9-12 に、TfR は fraction 4-9 を中心に比較的広汎に、EEA1 は fraction 9-12 に、それぞれ含まれていた (図 34 -A)。なお、この分布は Non Target siRNA 処理、Bin1 siRNA 処理いずれでも明らかな変化は見られなかった。

Bin1 ノックダウンした N2a 細胞では、これまでの実験系と同様に、Non Target siRNA 処理した細胞に比して、input での BACE1 の増加が見られた (図 34-B)。シヨ糖密度勾配遠心法により分離された 1-12 までの fraction においては、大半の fraction において Bin1 ノックダウン群で Non Target siRNA 群と比して BACE1 の増加を認めたが、fraction 2 においては Bin1 ノックダウン群で逆に BACE1 の減少が観察された (図 34-B)。この fraction 2 は、後期エンドソーム～ライソソームマーカーである LAMP1 が比較的選択的に分布する分画であることから、Bin1 ノックダウンにより BACE1 が増加するにも関わらず後期エンドソーム～ライソソーム内に局在する BACE1 は減少している可能性が示唆された。

以上の結果をあわせて、BIN1 が BACE1 の初期エンドソームから後期エンドソーム～ライソソームでの分解系への細胞内小胞輸送を制御していること、また BIN1 の機能低下によって BACE1 の分解系への細胞内小胞輸送が低下し、エンドソーム～細胞表面膜を循環する BACE1 量が増加することで β 切断の亢進および A β 産生の増加が生じていると考えられた。

9. BACE1 K501R 変異体を用いた GGA3 依存的細胞内小胞輸送と BIN1 との関係の解析

Kang らはこの BACE1 の初期エンドソームから後期エンドソーム～ライソソーム分解系への細胞内小胞輸送の制御には、BACE1 の最 C 末端に存在する ⁵⁰¹Lys 残基のユビキチン化と GGA3 の GAT ドメインとの結合が関与していること、また BACE1 K501R 変異体を発現させた培養細胞ではユビキチン化が行われずに BACE1 が初期エンドソームにおいて滞り、後期エンドソームへの細胞内小胞輸送が阻害されることを報告している [Kang et al 2010]。BIN1 が BACE1 の ⁵⁰¹Lys 残基のユビキチン化と GGA3 依存的な輸送機構の一部を担うのか、この機構とは独立した別の機構により初期エンドソームから後期エンドソームへの細胞内小胞輸送を制御するのかを検討するために、BACE1 K501R 発現ベクターを作製し、培養細胞に発現させた (図 35-A)。HeLa 細胞に BACE1 K501R と APP を共発現させ、BIN1 もしくは Non Target siRNA 処理を行い、sandwich ELISA 法で分

泌 A β 量の測定を，ウエスタンブロット解析により BACE1 タンパク量などを解析した．なお，これまでのウエスタンブロット解析による BACE1 の解析には BACE1 の C 末端領域を認識する抗 BACE1c 抗体 (IBL) を用いたが，BACE1 K501R 発現量の解析には BACE1 の内腔側配列 RLPRETDEEPEEPGR を認識する抗 BACE1(42)抗体 (IBL) を使用した．その結果，BACE1 K501R 発現細胞においても野生型 BACE1 発現細胞と同様に BIN1 ノックダウンによって有意な分泌 A β 40 および A β 42 量の増加を認めた (図 35-B, C)．また BACE1 K501R タンパク発現量についても有意な増加が観察された (図 35-D, E)．以上より，BIN1 による BACE1 の初期エンドソームにおける後期エンドソーム～ライソソームへの細胞内小胞輸送の制御は，BACE1 の ⁵⁰¹Lys 残基におけるユビキチン化と GGA3 が担う機構とは独立した機構によるものであると考えた．すなわち BACE1 の初期エンドソームから後期エンドソームへの細胞内小胞輸送には，複数の機構が関与していることが示唆された．

10. GST pull-down assay を用いた BIN1 と BACE1 との相互作用を担う分子機構の解析

これまでの結果により，BIN1 が BACE1 の初期エンドソームにおける細胞内小胞輸送を制御することが示唆されたが，BIN1 と BACE1 のそれぞれの部位が両者の相互作用を担っているのかについて検討を行った．一般的に，細胞内小胞輸送に関わる分子間の相互作用は一過性であるため，それらを通常の免疫沈降法などで検出するのは困難なことが多い．そこで，リコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* 結合実験によって結合の有無を検討した．BACE1 のエンドサイトーシスや細胞内小胞輸送には C 末端の細胞質ドメインが重要であると考えられている．そこで BACE1 の C 末端細胞質ドメインの 23 アミノ酸 (QWRCLRCLRQHQHDDFADDISLLK) をタンデムにつなげたものを His-GST 融合タンパク質として精製した (GST-B1CT \times 2)．ネガティブコントロールとしては，His-GST 単体 (GST) を用いた (図 36-A)．

初めに，精製した His-GST 融合リコンビナントタンパク質と，CNS isoform 1 の BIN1 全長 N 末に GFP を付加した GFP-BIN1 FL を一過性に発現させた HeLa 細胞より調製した cell lysate とを混合し，GST pull-down assay を行い，抗 BIN1 抗体を用いてウエスタンブロット解析により BACE1 の細胞質ドメインと BIN1 との相互作用の有無を検証した．その結果，GFP-BIN1 FL と GST-B1CT \times 2 に対する強い結合が見られ，GFP-BIN1 FL は BACE1 の細胞質ドメインと特異的に結合していると考えられた (図 36-B)．GFP と GST，GST-B1CT \times 2 いずれも明らかな結合関係は見られず，GFP-BIN1 FL と BACE1 細胞質ドメインとの結合は，BIN1 全長との結合であると考えた．次に，BACE1 の細胞質ドメインと BIN1 の結合とを担う BIN1 の部位を明らかにするため，BIN1 の欠失変異体を作製して

同様に GST pull-down assay を行った (図 37). GFP-BIN1 FL から BAR ドメインを欠失させた GFP-BIN1 Δ BAR, SH3 ドメインを欠失させた GFP-BIN1 Δ SH3 をそれぞれ一過性に発現させた HeLa 細胞より調製した cell lysate を用いて GST-B1CT \times 2 との結合性について検討した. その結果, GFP-BIN1 Δ SH3 を発現させた細胞由来の cell lysate では, GST-B1CT \times 2 との結合が見られたが, GFP-BIN1 Δ BAR を発現させた細胞由来の cell lysate では, GST-B1CT \times 2 との明らかな結合性は観察されなかった (図 38). このことから, BIN1 が BACE1 の細胞質ドメインと相互作用を行ううえで, BIN1 の BAR ドメインが重要な役割を担っていると考えられた.

11. 欠失変異型 BIN1 発現神経系培養細胞における分泌 A β への影響の解析

BIN1 の BACE1 との相互作用において, BIN1 の BAR ドメインと BACE1 の細胞質ドメインがそれぞれ重要であることが, GST pull-down assay で明らかになった. 次に, N2a 細胞に対して BAR ドメインもしくは SH3 ドメインを欠失させた BIN1 isoform 1 の欠失変異体 (BIN1 Δ BAR, BIN1 Δ SH3) を一過性に発現させ, sandwich ELISA 法により分泌 A β を, ウェスタンブロット解析により BACE1 タンパク発現量を評価した. その結果これらの変異型 BIN1 を発現させた N2a 細胞では, 分泌 A β 40 量, A β 42 量の有意な増加 (図 39-A, B) および BACE1 タンパクの増加 (図 39-C), を認め, 内因性 BIN1 のノックアウトやノックダウン時と同様の分泌 A β や BACE1 タンパクの変化が生じた. 一方, 全長 BIN1 を発現させても, 分泌 A β や BACE1 タンパク量に明らかな増減は見られなかった (図 39). すなわち, これら変異体は内因性 BIN1 に対して dominant negative effect を発揮して BACE1 タンパク発現量を増加させ, 分泌 A β 量の亢進を惹起していると考えられた.

第4章 考察

1. 結果のまとめ

GWASにより同定された *BIN1* は *APOE* の $\epsilon 4$ アレルに次いで大きな影響を有する AD の遺伝学的危険因子である。しかし、これまで AD への寄与に対する具体的な分子機構に関してはほとんど報告されていない。アミロイドカスケード仮説を理論的基盤として根本治療薬として期待されて開発された薬剤は、現時点ではいずれも明確な有効性を示すことができず、根治療法の開発のためには AD の分子病態機序に関する更なる深い理解が必要である。Alzgene, そして IGAP によるメタ解析から同定された AD 感受性遺伝子上位 10 個のうち、*BIN1*, *PICALM*, *CD2AP* の 3 つの遺伝子がエンドサイトーシスなど細胞内小胞輸送への関与が知られる遺伝子であり、また、*APP*, *BACE1* などの細胞内小胞輸送の制御変化により産生 A β 量に変化が生じることから、AD に関わる細胞内小胞輸送の制御機構を理解することは極めて重要であると考えられる。私は本研究において、*BIN1* が A β 産生経路における細胞内小胞輸送への関与の有無とその分子機構を明らかにするため、神経細胞を含む複数の培養細胞を用いて以下の現象を示した。

- 出生直後マウス産仔由来 primary cortical neuron culture において *Bin1* をノックアウトすると、*BACE1* タンパク発現増加および *BACE1* による *APP* 切断産物である分泌 sAPP β の増加が見られ、その結果と考えられる分泌 A β ₄₀, A β ₄₂ 量も増加する。
- 神経系培養細胞 (N2a 細胞), 非神経系培養細胞 (HeLa 細胞) いずれも *Bin1/BIN1* をノックダウンすることで、primary cortical neuron culture での *Bin1* ノックアウトと同様に、*BACE1* タンパク発現の増加と分泌 A β ₄₀, A β ₄₂ 量増加が見られる。
- 上記での *BACE1* タンパクの発現増加は、*BACE1* 活性の亢進を伴うものであり、*APP* からの β 切断亢進による A β 産生増加を示唆する。
- *BACE1* と同様に A β 産生に関わる *APP* や γ -secretase に対しては、*BIN1* 発現の変化による明らかな影響は見られなかった。
- *BIN1* の発現低下に伴う *BACE1* タンパクの増加は、mRNA レベルでの増加によるものではない。
- *BIN1* の機能低下は *BACE1* の細胞表面からの初期エンドソームへの内在化には明らかな影響を有さない。
- *BIN1* の発現低下により、*BACE1* の初期エンドソームからの細胞内小胞輸送が遅滞し、核近傍で初期エンドソームに蓄積、共局在する。

- BIN1 ノックダウンにより後期エンドソーム～ライソソームでの BACE1 の減少が示唆され、初期エンドソームから後期エンドソーム～ライソソーム分解経路への BACE1 の細胞内小胞輸送の低下が想定される。
- BIN1 による BACE1 の初期エンドソームから後期エンドソーム～ライソソーム分解経路への輸送制御は GGA3 非依存的に行われる。
- BACE1 の C 末端細胞質ドメインと BIN1 との結合には、BIN1 の BAR ドメインの働きが必要。
- BAR ドメインもしくは SH3 ドメインを欠失させた BIN1 欠失変異体を N2a 細胞に発現させると dominant negative effect を示し、BACE1 タンパク発現の増加と分泌 A β 40, A β 42 量増加を惹起する。

これらの得られた結果から、BIN1 が AD に関わる分子機構として、以下のメカニズムを想定した(図 40)。そして、これらの分子機構における BIN1 と BACE1 との相互作用において、BIN1 の BAR ドメインと BACE1 の細胞質ドメインとが結合することで作用することを明らかにした(図 41)。



2. primary cortical neuron culture における BIN1 ノックアウトによる影響

本研究では、神経細胞における BIN1 の A β や A β 産生系機構への寄与の有無を解析するため、*Bin1^{lox/lox}* マウス由来 primary cortical neuron culture を用いて、レンチウイルス発現系によって Cre リコンビナーゼを発現させることで BIN1 をノックアウトした。Cre リコンビナーゼ発現のため、本研究ではレンチウイルス発現系を用いることを選択した。一般的に、レンチウイルス、アデノウイルス、

アデノ随伴ウイルスなどが遺伝子導入のウイルスベクターとして広く使用されている。私が本研究で実験を行わせていただいた東京大学大学院薬学系研究科臨床薬学教室においては、Cre リコンビナーゼ発現ベクターとしてアデノウイルス（ペンシルバニア大学医学部 Rita Balice-Gordon 教授よりご供与頂いた）およびレンチウイルス（東京大学大学院医学系研究科神経生化学教室尾藤晴彦教授より御供与いただいた。）が使用可能である。両ウイルスベクターの主な特徴、性質の違いについて以下に記載した。

	レンチウイルス	アデノウイルス
ゲノム	ssRNA	dsDNA
エンベロープ	あり	なし
感染経路	細胞膜との融合	エンドサイトーシス経路
ゲノムへの組み込み	あり	なし
発現期間	持続的	一過性
細胞毒性	弱い	強い
神経細胞への感染	あり	あり

この中で特記すべき点としては、レンチウイルスはレトロウイルス科に属する脂質二重層からなるウイルス膜を持つエンベロープウイルスであり、感染細胞の細胞膜とウイルス膜が融合することによって細胞内に侵入し、ウイルスゲノムが組み込まれる。一方、アデノウイルスは非エンベロープウイルスであり、標的細胞内侵入の際に感染細胞のエンドサイトーシス経路を利用してエンドソームへと内在化され、エンドソームに達したウイルスはエンドソームを破壊して細胞質内へ侵入する。

このように、アデノウイルスは、感染細胞のエンドサイトーシス経路を利用して感染し、エンドソームを破壊するため、A β や APP, BACE1 などエンドサイトーシス経路による代謝を受ける各因子と BIN1 との影響を解析する際には適切でないと考えられる。実際に、東京大学大学院薬学系研究科臨床薬学教室で私を含めてそれぞれのウイルスベクターを用いた primary cortical neuron culture からの分泌 A β 量などを検討したところ、アデノウイルスのコントロールベクター（LacZ 発現ベクター）感染では、未感染群と比して、ウイルス感染による細胞生存割合の低下と比しても顕著な分泌 A β の減少を認め、アデノウイルスベクターの感染自体によって A β および A β 産生経路の細胞内小胞輸送に無視できない影響が生じていることが示唆された。

一方、レンチウイルスのコントロールベクター感染ではウイルス感染を行わ

なかったものと比して分泌 A β 量や APP, BACE1 タンパク発現量に大きな変化を認めなかったため、レンチウイルス感染によって本研究で着目した A β 産生系の細胞内小胞輸送には目立った影響はなく、本研究の実験の遂行においてアデノウイルスベクターよりも適切であると考えた。

培養神経細胞において、シナプス形成はおおよそ培養 1 週間目に盛んになり、成熟したシナプス形成が観察されるまでには 3~4 週間程度を要するとされている。本研究では培養開始から 10 日目の primary cortical neuron culture を解析に使用しており、この時期における神経細胞は、シナプス形成が活発化していく過程の成熟していない神経細胞である。AD という、加齢が危険因子となり、主に高齢で発症する神経変性疾患の病態を、*in vitro* での幼若な神経細胞の解析によって正確に反映できるかについては不明な面もある。しかし BIN1 とともに、APP, BACE1, γ -secretase などの A β 産生系に必要なタンパク質も全てこの時期の神経細胞に発現し、内因性に A β を分泌していることから、本実験系により BIN1 の A β 産生系に対する影響を解析することは妥当であると考えた。次項で述べるように、今後は CNS における BIN1 コンディショナルノックアウトマウスの解析により、本実験系で得られた現象の普遍性について更に *in vivo* で検証を進めていきたいと考えている。

3. *in vivo* での中枢神経系における Bin1 ノックアウトの影響

本研究では *in vitro* での *Bin1^{flx/flx}* マウス由来 primary cortical neuron culture の Bin1 ノックアウトや神経系および非神経系培養細胞での RNAi 法による Bin1/BIN1 ノックダウンにおいて、BACE1 タンパク発現増加と産生 A β の増加という同一の現象が複数の系において観察された。一般的に RNAi 法によるノックダウン実験では、off target 効果を考慮する必要がある。しかし本研究においては複数の培養細胞において primary cortical neuron culture のノックアウト時と同一の結果が得られていることから、これらの結果は実際の生体内での中枢神経系における BIN1 の働きを反映している可能性が高いと考える。2012 年の Bali らの報告でも、本研究と同様に、培養細胞における BIN1 のノックダウンによって、分泌 A β 40 および A β 42 の有意な増加を認めたことが報告されている[Bali et al 2012]。

一方、AD は加齢が危険因子となり、生体内で長い年月を経て様々な遺伝因子、環境因子の影響を複合的に受けながら発症に至る神経変性疾患である。前述のように、幼若な神経細胞である primary cortical neuron culture では AD の病態における加齢性変化を正確には反映することができていない可能性も除外できない。そのため、*in vivo* での *Bin1* ノックアウトマウスを用いてさらなる検討を行うべく、神経系に特異的な *BIN1* コンディショナルノックアウトマウス作製に取り組んでいる。全身の *Bin1* ノックアウトマウスは出生直後に muscle isoform が失わ

れることによると考えられる心筋症で致死となってしまう[Muller et al 2003]. 一方で、中枢神経系でのコンディショナルノックアウト動物についてはこれまで知られていない. これまでに私は、*Bin1*^{flox/flox} マウスと、神経系に特異的に Cre リコンビナーゼを発現する Nestin-Cre もしくは CamKII α -Cre トランスジェニックマウスとの交配を重ね、神経系特異的な *Bin1* コンディショナルノックアウトマウスの作出に成功した. 現在までに神経系においては *Bin1* を欠失しても胎生～生直後に致死になるような表現型の異常は見られていない. これは、筋特異的 isoform 8 が T 細管の形成や Ca のホメオスタシスに比較的非代償性に作用していることが示唆されるのに対して、CNS や ubiquitous isoforms における神経系での細胞内小胞輸送などに対する機能は、apmiphysin 1 など他の BAR ドメインファミリーのタンパク質などがある程度は代償性に働いている可能性が考えられる. 今後はこの神経系特異的 *BIN1* コンディショナルノックアウトマウスを含む仔を経時的に追跡し、目的の月齢での脳 RIPA 可溶画分中の A β 量や BACE1 タンパク発現量を比較することで、*in vivo* で *Bin1* が BACE1 や A β に及ぼす影響について検討していく予定である.

また、一般的に通常のマウスでは寿命の短さから脳内に加齢依存的なアミロイド蓄積は観察できないため、アミロイド蓄積を評価するためには、*APP* トランスジェニックマウスなどの AD モデル動物を用いる必要がある. そのため、神経系特異的 *BIN1* コンディショナルノックアウトマウスと *APP* トランスジェニックマウスとの掛け合わせによって、*BIN1* の A β 蓄積に及ぼす影響を検証していくことも検討している. ただし、*APP* トランスジェニックマウスでは *APP* の過剰発現や A β 42 比率上昇など、A β 産生に対して大きな影響を及ぼす現象が起こっており、Glennon らの報告でも、*BIN1* は孤発性 AD で発現が減少している一方で *APP* や *PS1* 変異を有する若年性の家族性 AD では有意な変化が見られなかった[Glennon et al 2013]. これらのことから、AD モデルマウスにおいては *APP* などが及ぼす影響が大きく、*BIN1* による A β 産生への影響がマスクされてしまう可能性も危惧され、解釈には注意を要すると考えている.

3. BIN1 のドメインと BACE1 細胞内小胞輸送との関係

BIN1 は少なくとも 10 以上の isoforms を持ち、CNS isoforms 1-7 のみに存在する CLAP ドメイン、muscle isoforms 8 のみに存在する PI ドメインを含め、各ドメインの BACE1 細胞内小胞輸送制御への関与の有無やその機構を明らかにすることは、*BIN1* が BACE1 を含めた細胞内での小胞輸送を制御している分子機構をより深く理解できるのみならず、*BIN1* の選択的スプライシングの変化が AD の病態にどのように影響を与えるかを検討していくうえでも重要である.

CLAP ドメインは、輸送小胞の形成に働くコートタンパク質である clathrin および AP-2 に結合することでクラスリン依存的エンドサイトーシスの過程に関与

することが想定されており、A β 産生機構における細胞表面膜からのエンドソームへの内在化などの小胞輸送に関与している可能性が考えられる。しかし、本研究において、CLAP ドメインを持たない ubiquitous isoforms のみしか内因性に発現していない非神経系培養細胞である HeLa 細胞でも、BIN1 ノックダウンによって primary cortical neuron culture のノックアウトや神経系培養細胞 N2a 細胞のノックダウンと同様の結果が得られたことから、BACE1 の細胞内小胞輸送の制御に BIN1 の CLAP ドメインは必要不可欠ではないことが示唆された。また、細胞表面 biotin 化による endocytosis assay および細胞免疫化学による SNAP-BACE1 uptake assay の結果からも、CLAP ドメインの関与が考慮される細胞表面膜からの内在化は BIN1 による明らかな影響がないことを示している。Sannerud らは BACE1 の細胞表面膜からのエンドソームへの内在化において BACE1 はクラスリン依存的エンドサイトーシスではなく ADP ribosylation factor 6 (ARF6) を介した非クラスリン依存的エンドサイトーシスによって内在化されると報告しており [Sannerud et al 2011], BIN1 の CLAP ドメインが BACE1 の内在化や細胞内小胞輸送の制御に必須でないことと合致する。しかし、CLAP ドメインの有無、つまり、CNS isoforms 1-7 と ubiquitous isoforms 9-10 間で、CLAP ドメイン自体の作用もしくは CLAP ドメインがあることによる BIN1 自体の三次元構造の変化などによって BACE1 の細胞内小胞輸送の制御に何らかの差がある可能性は否定できない。

一方 BIN1 に存在する機能ドメインとして、脂質膜結合ドメインである BAR ドメイン、蛋白質-蛋白質相互作用を担う SH3 ドメインを持つ。これらのドメインを欠失させた BIN1 変異体をそれぞれ作製し (BIN1 Δ BAR および BIN1 Δ SH3), 機能解析を行った。その結果 BIN1 と BACE1 の細胞内領域との結合には BAR ドメインの作用が必要である一方で、SH3 ドメインは BACE1 との結合には必要とされないことがわかった。また、それぞれの欠失変異体は dominant negative 効果を示し、内在性 Bin1 タンパクの機能を抑制することで A β 産生が亢進することが推測された。

BIN1 は二量体として BAR ドメインの 6 本の α -ヘリックス構造がバナナ型に立体構造を取ることで、膜チューブの形成に携わるとされる。この特徴により、BIN1 は特定の形態を持つ膜と SH3 ドメインに結合する dynamin や N-WASP などのアクチン細胞骨格制御因子や膜切断酵素を結びつけ、膜の形態を制御する。本研究で得られた結果とあわせて考えると、BIN1 は BAR ドメインで BACE1 を含む初期エンドソーム上のカーゴと結合すると同時に膜を変形させ、続いて SH3 ドメインが作用することによって、BACE1 を含むカーゴが初期エンドソームから分離し、後期エンドソームへ成熟するという機構が考えられる。このため、BAR ドメインを欠失すると BACE1 との結合性が失われ、SH3 ドメインを欠失すると BACE1 を含む初期エンドソーム上のカーゴが後期エンドソームへと分

離・成熟することができないため、それぞれの BIN1 欠失変異体において dominant negative 効果を呈すると考えられる。また、BAR ドメイン欠失変異体過剰発現下では、BIN1 とともに SH3 ドメインなどを介して BACE1 と働く何らかの因子が、内因性 BIN1 による BACE1 との作用において欠乏が生じる可能性が考えられる。

MB ドメインは核内で癌遺伝子などの転写活性を複合的に調節することが知られている。しかし、BIN1 ノックダウン細胞において qRT-PCR で BACE1 の mRNA レベルは有意な変化を認めなかったことから、BACE1 タンパクの増加の主体は mRNA レベルでの増加に起因するのではなく、ライソソームでの分解の低下によることが示唆された。

4. GWAS で同定された BIN1 の AD 関連 SNPs との関係

GWAS により *BIN1* の AD risk 関連 SNPs が同定されているが、AD risk 関連 SNPs の有無によって *BIN1* の発現にどのような変化が起こるのかは、未だ明らかではない。これらの AD risk 関連 SNPs は *BIN1* 遺伝子上流 20-30 kb に位置していることから、直接 *BIN1* の発現量の多寡を調節している可能性の他に、*BIN1* 遺伝子内にこれらの SNPs と連鎖不平衡にある eQTL が存在し、その部位で発現調節が行われている可能性も考慮される。また、*BIN1* には CNS 特異的に発現する 7 つの isoforms を含めて少なくとも 10 種類の isoforms が存在することが知られているが、AD risk 関連 SNPs が *BIN1* の選択的スプライシングを制御し、この SNPs の有無によって特定の isoforms が増減するなどして、AD の risk に変化を与えている可能性も考えられる。

AD risk 関連 SNPs の有無によるヒトでの脳における *BIN1* 発現量の増減に関しては現時点では知られていない。AD 患者と非 AD 群との間での *BIN1* 発現量の比較については、相反する報告が 2013 年になされている。Chapius らは、AD 患者で非 AD 群と比して、mRNA レベルでの *BIN1* 発現量が増加していることを報告している [Chapius et al 2013]。一方、Glennon らは、孤発性 AD 患者で非 AD 群と比して、タンパクレベルでの *BIN1* 発現量が前頭葉で減少していることを報告している [Glennon et al 2013]。これらの報告間での手法的な違いとして、Chapius らは mRNA レベルでの *BIN1* 発現量を測定しており、Glennon らはタンパクレベルでの *BIN1* 発現量の測定を行っていることから、mRNA レベルでの挙動が実際の *BIN1* のタンパクレベルでの発現を正確には反映していない可能性も考慮されるが、更なる検証が必要である。

私は本研究において、*BIN1* の発現もしくは機能が低下することで、BACE1 タンパク増加に由来する A β 産生の増加が生じることを明らかにした。A β はアミロイドカスケード仮説において最重要な因子であり、既知の常染色体優性の家族性 AD はいずれも A β 産生に関わる遺伝子の変異によるものであることから、

A β の増加がAD risk上昇につながっている可能性は高いと思われる。したがって、ヒトにおいてこのAD risk関連SNPsの有無と脳でのBIN1発現量やBACE1タンパク発現量への影響を明らかにすることは重要であると考えられる。これまで、AD発症との関連が示唆されている遺伝子の中でBACE1の発現や活性を制御する因子は見出されておらず、BIN1はBACE1活性を制御する初めての遺伝学的AD危険因子といえる。興味深いことに、孤発性AD患者においては脳内BACE1発現量の増加が見られることが報告されているが、必ずしも全てのAD患者において見られるものではない。もしBIN1のAD risk関連SNPsとの相関が観察されるのであれば、BIN1の発現ないし機能との関連が示唆され、興味深い。また、ADの時間軸での経過において、認知症を発症したAD dementiaの時期（いわゆるAD患者）ではADによる神経変性や神経細胞死が脳内でかなり進行してしまっている段階であるため、BIN1がA β 産生などアミロイドカスケードの最初期に影響を与えている可能性を考慮すると、AD患者だけでなく、軽度認知障害（mild cognitive impairment; MCI）やpreclinical AD（アミロイドイメージング陽性などに代表される、脳内にA β の蓄積はあるものの無症状の時期。）も含めた認知機能正常例、などでもBIN1のAD risk関連SNPsの有無とBIN1やBACE1タンパクの発現量への影響を検討していくことが有用であると考えられる。

実際にAD risk関連SNPsとBIN1発現に相関が見られるのであれば、本研究で明らかにしたBIN1が担うBACE1細胞内小胞輸送の制御がAD riskの上昇の主な機序であることが示唆される。しかしtau [Chapuis et al 2013]を含めた他のAD関連因子へのBIN1による影響の寄与も考慮される。BIN1はエンドサイトーシスや細胞内小胞輸送の他にも複数の生理機能を有するとされていることから、BIN1による複数のAD関連因子に対する影響が複合的に組み合わさっている可能性も考慮され、様々な観点からのADへの寄与の可能性を念頭におくことが望ましい。さらに、単純なBIN1の発現の多寡だけでなく、BIN1には少なくとも10種のisoformsがあり、これらの選択的スプライシングによる制御の変化による影響も検討していく必要がある。Holtonらは、CNSにおける部位によってBIN1の発現量や選択的スプライシングのパターンが異なっていることを報告しており、このように複雑に制御された選択的スプライシングのパターンが変化することによって各isoforms間でのAD病態機序への影響の差がAD riskの変化につながっている可能性についても検討が必要である。

本研究で、CNS isoformsのみに存在するCLAPドメインを持たないubiquitous isoformsしか内因性に発現しないHeLa細胞においてもBIN1のノックダウンによりBACE1やA β の増加がCNS isoformsが主体の中枢神経系細胞での実験系と同様に見られたことから、CNS isoformsかubiquitous isoformsかの違いはA β 産生に対する影響の方向性という観点では顕著な違いはないのかもしれない。し

かし、CNS isoforms と ubiquitous isoforms との間での AD の病態機序への影響度の違い、さらには CNS isoforms や ubiquitous isoforms 間の中での違いについても、より詳細に検討していくことが重要である。また、本研究においても BACE1 増加や A β 増加効果が見られた BAR ドメインや SH3 ドメインを欠失した isoforms など、現時点では知られていないヒトの BIN1 isoforms が存在する可能性も否定できず、評価していくことが必要である。

5. 本研究からの AD 治療への寄与

アミロイドカスケード仮説を理論的基盤としてこれまで AD 根本治療薬として開発、臨床試験へと進んだ γ -secretase 阻害薬や A β に対する免疫療法を含む薬剤・治療法は、いずれも明らかな AD に対する有効性を示せていない。これら各臨床試験薬の失望的な結果からは、アミロイドカスケード仮説に対して疑義を唱える意見も一部で見られる。しかし、従来のアミロイドカスケード仮説という「幹」に、GWAS で同定された遺伝学的危険因子が関与すると考えられる、エンドサイトーシス・細胞内小胞輸送、免疫・炎症、脂質代謝、などの「枝」となる要素の AD への寄与の分子機構を理解することで、より詳細なアミロイドカスケードの機序の理解とそれに基づく創薬・治療法の確立に進むことができると多くの AD 研究者が考えている。

1999 年の BACE1 発見後すぐに特異的阻害薬の探索が開始されたが、細胞透過性の低さ、bioavailability の小ささ、脳移行率の低さなどの障害によって、脳内での有効な治療濃度を得ることが困難であった。しかし、現在ではこれらの問題点を克服した低分子化合物の開発に成功し、複数の BACE1 阻害薬の臨床試験が進められている。また、BACE1 ノックマウスは少なくとも生存に関わるような顕著な形態・機能異常は認めないことから、酵素阻害による副作用が少ないことが期待され、BACE1 は現在 AD の根本治療薬として最も期待されている創薬ターゲットの一つである。BACE1 の細胞内小胞輸送制御の変化は A β 産生量の増減に直結することから、AD 治療としての BACE1 阻害を行うにあたり、BACE1 の細胞内小胞輸送制御の分子機構についての理解は欠かせない。本研究では、BIN1 による BACE1 の初期エンドソームから後期エンドソーム～ライソソームの分解系への輸送を制御する新たな分子機構を明らかにした点で、意義があると考えられる。

また、BIN1 の発現低下が BACE1 の細胞内小胞輸送制御の変化を介して分泌 A β 量の増加につながることを本研究で示しており、この結果からは BIN1 の機能を増強することで産生 A β の減少が得られる可能性も考慮される。また、これまで BIN1 関連の疾患として知られている各種の悪性腫瘍や筋疾患などはいずれも BIN1 の発現低下が関与すると報告されており、BIN1 の発現増強はこれらの病態に対しても有効であるかもしれない。だが、BIN1 は複数の生理機能を有

し、多くの因子とも相互作用が知られているため、単純な BIN1 発現の多寡を介入して調節することには慎重にならざるを得ない。また、本研究においては BIN1 全長を過剰発現させても有意な A β 産生の減少は見られなかったことから、単純な BIN1 の発現量増加によって BACE1 の分解系が亢進するわけではなく、他の因子が協同的に作用している可能性も考えられる。

将来的に AD の根本治療薬として異なる作用機序を持つ薬剤が複数確立され、BIN1 をはじめとする AD の遺伝学的危険因子による AD の病態寄与への理解が集積したとき、複数存在する治療薬の中からどの薬剤を使用するかを選択するうえで BIN1 の SNPs を調べるのが有用となる可能性も期待される。個々の AD 患者において各分子病態の変化は患者毎に様々であると推測され、例えば APP もしくは BACE1 発現量が増加している、 γ -secretase による切断部位が A β 42 側にシフトしている、A β の分解が低下している、など複数の要因がそれぞれ異なる影響度で寄与していると考えられる。BACE1 の増加や活性亢進が病態の背景として存在する AD 患者においては、BACE1 阻害薬による治療がより有効であることが期待される。GWAS で同定された AD の遺伝学的危険因子が寄与する分子病態を解明することによって、患者毎の遺伝的背景によってより適切で有効な治療法を選択するというテーラーメイド医療として応用できる可能性が期待できる。AD は加齢性の疾患であり、AD による認知症が発症する 10~20 年前から脳内では A β の蓄積が始まっているとされる。この無症候期に先制医療として介入を行うのが適切で、認知症が顕在化してからでは既に不可逆的な神経変性が起こってしまっているために手遅れである可能性が提起されている。無症候期からの幾年にもわたる根本治療薬の長期投与を行ううえで、複数の候補薬の中から個々の患者により有効性の高い適切な治療法を選択することが望ましい。

6. 結語

本研究において私は、AD の遺伝学的危険因子として同定された BIN1 が、BACE1 の細胞内小胞輸送を制御することで A β の産生を調節する機構を初めて明らかにした。また、BACE1 の細胞内小胞輸送制御の分子機構に関しては近年 GGA3 などの関与が報告され始めたが、未だ BACE1 の細胞内小胞輸送制御の包括的な理解は途上にあり、BIN1 はこれまで知られていなかった BACE1 の細胞内輸送制御機構の一翼を担うことを本研究において示した。AD の遺伝学的危険因子として同定された遺伝子の中で、BACE1 の発現や活性を制御する因子は BIN1 以外にはこれまでに見出されておらず、BACE1 の細胞内小胞輸送制御に関わる GGA3 などの因子のなかで AD との関連が示唆されている因子も BIN1 のみである。

BACE1 は A β 産生を担う主要な因子の一つであり、BACE1 阻害薬は現在 AD

の根本治療薬として最も期待されている薬剤の一つであることから、 $A\beta$ 産生を調節する **BACE1** の細胞内小胞輸送制御の分子機構を理解することは重要であり、本研究で明らかにした **BIN1** による **BACE1** の制御機構がその理解の一助となることを期待する。

引用文献

Alzheimer A. *Über einen eigenartigen schweren Erkrankungsprozeß der Hirnrinde. Neurologisches Centralblatt* 1906; 23: 1129-36.

Alzheimer A. *Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters. Zeitschrift für die Gesamte Neurologie und Psychiatrie* 1911; 4: 356-85.

Asami-Okada A, Ishibashi Y, Kikuchi T, Kitada C, Suzuki N. Long amyloid- β protein secreted from wild-type human neuroblastoma IMR-32 cells. *Biochemistry* 1995; 34(32): 10272-8.

Bali J, Gheinani AH, Zurbriggen S, Rajendran L. Role of genes linked to sporadic Alzheimer's disease risk in the production of β -amyloid peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(38): 15307-11.

Benjannet S, Elagoz A, Wickham L, Mamarbachi M, Munzer JS, Basak A, Lazure C, Cromlish JA, Sisodia S, Checler F, Chretien M, Seidah NG. Post-translational processing of beta-secretase (beta-amyloid-converting enzyme) and its ectodomain shedding. The pro- and transmembrane/cytosolic domains affect its cellular activity and amyloid-beta production. *J Biol Chem* 2001; 276(14): 10879-87.

Bonda DJ, Mailankot M, Stone JG, Garrett MR, Staniszewska M, Castellani RJ, Siedlak SL, Zhu X, Lee HG, Perry G, Nagaraj RH, Smith MA. Indoleamine 2,3-dioxygenase and 3-hydroxykynurenine modifications are found in the neuropathology of Alzheimer's disease. *Redox Rep* 2010; 15(4): 161-8.

Borchelt DR, Thinakaran G, Rckman CB, Lee MK, Davenport F, Ratovitsky T, Prada CM, Kim G, Seekins S, Yager D, Slunt HH, Wang R, Seeger M, Levey AI, Gandy SE, Copeland NG, Jenkins NA, Price DL, Younkin SG, Sisodia SS. Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate A β 1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* 1996; 17(5): 1005-13.

Butler MH, David C, Ochoa GC, Freyberg Z, Daniell L, Grabs D, Cremona O, De Camilli P. Amphiphysin II (SH3P9; BIN1), a member of the amphiphysin/RVS family, is concentrated in the cortical cytomatrix of axon initial segments and nodes of Ranvier in brain and around T tubules in skeletal muscle. *J Cell Biol* 1997; 137(6): 1355-67.

Cai XD, Golde TE, Younkin SG. Release of excess amyloid β protein from a mutant amyloid β precursor. *Science* 1993; 259(5094): 514-6.

Carey RM, Balcz BA, Lopez-Coviella I, Slack BE. Inhibition of dynamin-dependent endocytosis increases shedding of the amyloid precursor protein ectodomain and reduces generation of amyloid beta protein. *BMC Cell Biol* 2005; 6: 30

Carrasquillo MM, Belbin O, Hunter TA, Ma L, Bisceglia GD, Zou F, Crook JE, Pankratz VS, Sando SB, Aasly JO, Barcikowska M, Wszolek ZK, Dickson DW, Graff-Radford NR, Peterson RC, Morgan K. Replication of BIN1 association with Alzheimer's disease and evaluation of genetic interactions. *J Alzheimers Dis* 2011; 24(4): 751-8.

Chang MY, Boulden J, Katz JB, Wang L, Meyer TJ, Soler AP, Muller AJ, Prendergast GC. Bin1 ablation increases susceptibility to cancer during aging, particularly lung cancer. *Cancer Res* 2007; 67(16): 7605-12.

Chang MY, Boulden J, Sutanto-Ward E, Duhadaway JB, Soler AP, Muller AJ, Prendergast GC. Bin1 ablation in mammary gland delays tissue remodeling and drives cancer progression. *Cancer Res* 2007; 67(1): 100-7.

Chapius J, Hansmann F, Gistelink M, Mounier A, Van Cauwenberghe C, Kolen KV, Geller F, Sottejeau Y, Harold D, Dourlen P, Grenier-Boley B, Kamatani Y, Delepine B, Demiautte F, Zelenika D, Zommer N, Hamdane M, Bellenguez C, Dartigues JF, Hauw JJ, Letronne F, Ayrat AM, Slegers K, Schellens A, Broeck LV, Engelborghs S, De Deyn PP, Vandenberghe R, O'Donovan M, Owen M, Epelbaum J, Mercken M, Karran E, Bantscheff M, Drewes G, Joberty G, Champion D, Octave JN, Berr C, Lathrop M, Callaerts P, Mann D, Williams J, Buée L, Dewachter I, Van Broeckhoven C, Amouyel P, Moechars D, Dermaut B, Lambert JC. Increased expression of BIN1 mediates Alzheimer genetic risk by modulating tau pathology. *Mol Psychiatry* 2013; doi:10.1038/mp.2013.1.

Cher ML, Bova GS, Moore DH, Small EJ, Carroll PR, Pin SS, Epstein JI, Isaacs WB, Jensen RH. *Cancer Res* 1996; 56(13): 3091-102.

Citron M, Oltersdorf T, Hass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, Vigo-Pelfrey C,

Lieberburg I, Selkoe DJ. Mutation of the β -amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases β -protein production. *Nature* 1992; 360(6405): 672-4.

Citron M, Westaway D, Xia W, Carlson G, Diehl T, Levesque G, Johnson-Wood K, Lee M, Seubert P, Davis A, Kholodenko D, Motter R, Sherrington R, Perry B, Yao H, Strome R, Lieberburg I, Rommens J, Kim S, Schenk D, Fraser P, Hyslop PSG, Selkoe DJ. Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid β -protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat Med* 1997; 3(1): 67-72.

Collins BM, McCoy AJ, Kent HM, Evans PR, Owen DJ. Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex. *Cell* 2002; 109(4): 523-35.

Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 1993; 261(5123): 921-3.

Dawson JC, Legg JA, Machesky LM. Bar domain proteins: a role in tubulation, scission and actin assembly in clathrin-mediated endocytosis. *Trends Cell Biol* 2006; 16(10): 493-8.

De Strooper B, Saftig P, Craessaerts K, Vanderstichele H, Guhde G, Annaert W, Von Figura K, Van Leuven F. Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 1998; 391(6665): 387-90.

De Strooper B, Annaert W, Cupers P. A presenilin-1 dependent γ -secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 1999; 398: 518-22.

Dominguez D, Tournoy J, Hartmann D, Huth T, Cryns K, Deforce S, Serneels L, Camacho IE, Marjaux E, Craessaerts K, Roebroek AJ, Schwake M, D'Hooge R, Bach P, Kalinke U, Moechars D, Alzheimer C, Reiss K, Saftig P, De Strooper B. Phenotypic and biochemical analyses of BACE1- and BACE2-deficient mice. *J Biol Chem* 2005; 280: 30797-806.

Doyotte A, Russell MRG, Hopkins CR, Woodman PG. Depletion of TSG101 forms a mammalian Class E compartment: a multicisternal early endosome with multiple

sorting defects. *J Cell Sci* 2005; 118(14): 3003-17.

DuHadaway JB, Lynch FJ, Brisbay S, Bueso-Ramos C, Troncoso P, McDonnell T, Prendergast GC. Immunohistochemical analysis of Bin1/Amphiphysin II in human tissues: diverse sites of nuclear expression and losses in prostate cancer. *J Cell Biochem* 2003; 88(3): 635-42.

Edbauer D, Winkler E, Regula JT, Pesold B, Steiner H, Haass C. Reconstitution of γ -secretase activity. *Nat Cell Biol* 2003; 5(5): 486-6.

Esch FS, Keim PS, Beattie EC, Blacher RW, Culwell AR, Oltersdorf T, McClure D, Ward PJ. Cleavage of amyloid β peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 1990; 248(4959): 1122-4.

Estus S, Golde TE, Kunishita T, Blades D, Lowery D, Eisen M, Usiak M, Qu XM, Tabira T, Greenberg BD et al. Potentially amyloidogenic, carboxylterminal derivatives of the amyloid protein precursor. *Science* 1992; 255: 726-8.

Ferguson SM, Ferguson S, Raimondi A, Paradise S, Shen H, Mesaki K, Ferguson A, Destaing O, Ko G, Takasaki J, Cremona O, O'Toole E, De Camilli P. Coordinated actions of actin and BAR proteins upstream of dynamin at endocytic clathrin-coated pits. *Dev Cell* 2009; 17(6): 811-22.

Francis R, McGrath G, Zhang J, Ruddy DA, Sym M, Apfeld J, Nicoll M, Maxwell M, Hai B, Ellis MC, Parks AL, Xu W, Li J, Gurney M, Myers RL, Himes CS, Hiebsch R, Ruble C, Nye JS, Curtis D. *aph-1* and *pen-2* are required for Notch pathway signaling, γ -secretase cleavage of β APP, and presenilin protein accumulation. *Dev Cell* 2002; 3(1): 85-97.

Fugier C, Klein AF, Hammer C, Vassilopoulos S, Ivarsson Y, Toussaint A, Tosch V, Vignaud A, Ferry A, Messaddeq N, Kokunai Y, Tsuburaya R, de la Grange P, Dembele D, Francois V, Precigout G, Boulade-Ladame C, Hummel MC, Lopez de Munain A, Sergeant N, Laquerrière A, Thibault C, Deryckere F, Auboeuf D, Garcia L, Zimmermann P, Udd B, Schoser B, Takahashi MP, Nishino I, Bassez G, Laporte J, Furling D, Charlet-Berguerand N. Misregulated alternative splicing of BIN1 is associated with T tubule alterations and muscle weakness in myotonic dystrophy. *Nat Med* 2011; 17(6): 720-5.

Gary JD, Wurmser AE, Bonangelino CJ, Weisman LS, Emr SD. Fab1p is essential for PtdIns(3)P5-kinase activity and the maintenance of vacuolar size and membrane homeostasis. *J Cell Biol* 1998; 143(1): 65-79.

Ge K, DuHadaway J, Du W, Herlyn M, Rodeck U, Prendergast GC. Mechanism for elimination of a tumor suppressor: aberrant splicing of a brain-specific exon causes loss of function of Bin1 in melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(17): 9689-94.

Ge K, DuHadaway J, Sakamuro D, Wechsler-Reya R, Reynolds C, Prendergast GC. Losses of the tumor suppressor Bin1 in breast carcinoma are frequent and reflect deficits in a programmed cell death capacity. *Int J Cancer* 2000; 85(3): 376-83.

Ge K, Minhas F, DuHadaway J, Mao NC, Wilson D, Buccafusca R, Sakamuro D, Nelson P, Malkowicz SB, Tomaszewski J, Prendergast GC. *Int J Cancer* 2000; 86(2): 155-61.

Ghanie A, Zemba-Palko V, Itoh H, Sakamuro D, Nakamura S, Soler AP, Prendergast GC. Bin1 attenuation in breast cancer is correlated to nodal metastasis and reduced survival. *Cancer Biol Ther* 2007; 6(2): 192-4.

Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 120: 885-90.

Glennon EBC, Whitehouse IJ, Miners JS, Kehoe PG, Love S, Kellett KAB, Hooper NM. BIN1 is decreased in sporadic but not familial Alzheimer's disease or in aging. *PLOS ONE* 2013; 8(10): e78806.

Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 1991; 349(6311): 704-6.

Goutte C, Tsunozaki M, Hale VA, Priess JR. APH-1 is a multipass membrane protein essential for the Notch signaling pathway in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(2): 775-9.

Gravina SA, Ho L, Eckman CB, Long KE, Otvos L Jr, Younkin LH, Suzuki N, Younkin SG. Amyloid beta protein in Alzheimer's disease brain. Biochemical and immunocytochemical analysis with antibodies specific for forms ending at A beta 40 or A beta 42(43). *J Biol Chem* 1995; 37: 7013-6.

Grbovic OM, Mathews PM, Jiang Y, Schmidt SD, Dinakar R, Summers-Terio NB, Ceresa BP, Nixon RA, Cataldo AM. Rabr-stimulated up-regulation of the endocytic pathway increases intracellular beta-cleaved amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragment levels and Abeta production. *J Biol Chem* 2003; 278(33): 31261-8.

Grundke-Iqbal I, Johnson AB, Wisniewski HM, Terry RD, Iqbal K. Evidence that Alzheimer neurofibrillary tangles originate from neurotubules. *Lancet* 1979; 1(8116): 578-80.

Guillemin GJ, Brew BJ, Noonan CE, Takikawa O, Cullen KM. Indoleamine 2,3-dioxygenase and quinolinic acid immunoreactivity in Alzheimer's disease hippocampus. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2005; 31(4): 395-404.

Hardy J and Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science* 2002; 297: 353-6.

He X, Li F, Chang WP, Tang J. GGA proteins mediate the recycling pathway of memapsin 2 (BACE). *J Biol Chem* 2005; 280(12): 11696-703.

Henne WM, Boucrot E, Meinecke M, Evergren E, Vallis Y, Mittal R, McMahon HT. FCHo proteins are nucleators of clathrin-mediated endocytosis. *Science* 2010; 328(4): 1281-4.

Ho A, Morishita W, Atasoy D, Liu X, Tabuchi K, Hammer RE, Malenka RC, Sudhof TC. Genetic analysis of Mint/X11 proteins: essential presynaptic functions of a neuronal adaptor protein family. *J Neurosci* 2006; 26(50): 13089-101.

Hogarty MD, Liu X, Thompson PM, White PS, Sulman EP, Maris JM, Brodeur GM. BIN1 inhibits colony formation and induces apoptosis in neuroblastoma cell lines with MYCN amplification. *Med Pediatr Oncol* 2000; 35(6): 559-62.

Holton P, Ryten M, Nalls M, Trabzuni D, Weale ME, Hernandez D, Crehan H, Gibbs JR, Mayeux R, Haines JL, Farrer LA, Pericak-Vance MA, Schellenberg GD; Alzheimer's Disease Genetics Consortium, Ramirez-Restrepo M, Engel A, Myers AJ, Corneveaux JJ, Huentelman MJ, Dillman A, Cookson MR, Reiman EM, Singleton A, Hardy J, Guerreiro R. Initial assessment of the pathogenic mechanisms of the recently identified Alzheimer risk loci. *Ann Hum Genet.* 2013 Mar;77(2):85-105.

Holtzman DM, Morris JC, Goate AM: Alzheimer's disease: the challenge of the second century. *Sci Transl Med* 2011; 3: 77sr1.

Hong L, Koelsch G, Lin X. Structure of the protease domain of memapsin 2 (β -secretase) complexed with inhibitor. *Science* 2000; 290: 150-3.

Hu X, Pickering E, Liu YC, Fournier H, Katz E, Dechairo B, John S, Eerdewegh PV, Soares H, the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Meta-analysis for genome wide association study identifies multiple variants at the BIN1 locus associated with late onset Alzheimer's disease. *PloS One* 2011; 6(2): e16616.

Huse JT, Pijak DS, Leslie GJ, Lee VM, Doms RW. Maturation and endosomal targeting of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. The Alzheimer's disease beta-secretase. *J Biol Chem* 2000; 275(43): 33729-37.

Hussain I, Powell D, Howlett DR, Tew DG, Meek TD, Chapman C, Gloger IS, Murphy KE, Southan CD, Ryan DM, Smith TS, Simmons DL, Walsh FS, Dingwall C, Christie G. Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as β -secretase. *Mol Cell Neurosci* 1999; 14(6): 419-27.

Ihara Y, Abraham C, Selkoe DJ. Antibodies to paired helical filaments in Alzheimer's disease do not recognize normal brain proteins. *Nature* 1983; 304: 727-30.

Ikeda S, Allsop D, Glenner GG. A study of the morphology and distribution of amyloid beta protein immunoreactive plaque and related lesions in the brains of Alzheimer's disease and adult Down's syndrome. *Prog Clin Biol Res* 1989; 317: 313-23.

Iknomov OC, Sbrissa D, Shisheva A. Mammalian cell morphology and endocytic membrane homeostasis require enzymatically active phosphoinositide 5-kinase PIKfyve. *J Biol Chem* 2001; 276(28): 26141-7.

Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y. Visualization of A β 42(43) and A β 40 in senile plaques with end-specific A β monoclonals: evidence that an initially deposited species is A β 42(43). *Neuron* 1994; 13: 45-53.

Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT. The carboxy terminus of the β amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 1993; 32(18): 4693-7.

Jordens I, Fernandez-Borja M, Marsman M, Dusseljee S, Janssen L, Calfat J, Janssen H, Wubbolts R, Neefjes J. The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynactin motors. *Curr Biol* 2001; 11(21): 1680-5.

Jorissen E, Prox J, Bernreuther C, Weber S, Schwanbeck R, Serneels L, Snellinx A, Craessarts K, Thathiah A, Tesseur I, Bartsch U, Weskamp G, Blobel CP, Glatzel M, De Strooper B, Saftig P. The disintegrin/metalloproteinase ADAM10 is essential for the establishment of the brain cortex. *J Neurosci* 2010; 30(14): 4833-44.

Jung M, Poepping I, Perrot A, Ellmer AE, Wienker TF, Dietz R, Reis A, Osterziel KJ. *Am J Hum Genet* 1999; 65(4): 1068-77.

Kang EL, Cameron AN, Piazza F, Walker KR, Tesco G. *J Biol Chem* 2010; 285(31): 24108-19.

Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum J, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Mueller-Hill B. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 1987; 325(6106): 733-6.9

Kelly BT, McCoy AJ, Spaete K, Miller SE, Evans PR, Hoening S, Owen DJ. A structural explanation for the binding of endocytic dileucine motifs by the AP2 complex. *Nature* 2008; 456(7224): 976-9.

Kitazume S, Tachida Y, Oka R, Shirotani K, Saido TC, Hashimoto Y. Alzheimer's β -secretase, β -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme, is responsible for cleavage secretion of a Golgi-resident sialyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 13554-9.

Koh YH, von Armin CA, Hyman BT, Tanzi RE, Tesco G. BACE is degraded via the lysosomal pathway. *J Biol Chem* 2005; 280(37): 32499-504.

Koo EH, Squazzo SL. Evidence that production and release of amyloid β -protein involves the endocytic pathway. *J Biol Chem* 1994; 269(26): 17386-9.

Kraepelin E. *Psychiatrie: Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte*. Leipzig: Barth 1910: 593-632.

Krauss M, Haucke V. Phosphoinositide-metabolizing enzymes at the interface between membrane traffic and cell signalling. *EMBO* 2007; 8(3): 241-6.

Kuhn PH, Marjaux E, Imhof A, De Strooper B, Haass C, Lichtenthaler SF. Regulated intramembrane proteolysis of the interleukin-1 receptor II by alpha-, beta-, and gamma-secretase. *J Biol Chem* 2007; 282(16): 11982-95.

Lafourcade C, Sobo K, Kieffer-Jaquinod S, Garin J, van der Goot FG. Regulation of the V-ATPase along the endocytic pathway occurs through reversible subunit association and membrane localization. *PLoS One* 2008; 3(7): e2758.

Lee E, Marucci M, Daniell L, Pypaert M, Weisz OA, Ochoa GC, Farsad K, Wenk MR, De Camilli P. Amphiphysin 2 (Bin1) and T-tubule biogenesis in muscle. *Science* 2002; 297(5584): 1193-6.

Leprince C, Le Scolan E, Meunier B, Fraissier V, Brandon N, De Gunzburg J, Camonis J. Sorting nexin 4 and amphiphysin 2, a new partnership between endocytosis and intracellular trafficking. *J Cell Sci* 2003; 116(Pt10): 1937-48.

Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K, et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 1995; 269: 973-7.

Li Q, Sudhof TC. Cleavage of amyloid- β precursor protein and amyloid- β precursor-like protein by BACE1. *J Biol Chem* 2004; 279: 10542-50.

Li YM, Lai MT, Xu M, Huang Q, DiMuzio-Mower J, Sardana MK, Shi XP, Yin KC, Shafer JA, Gardell SJ. Presenilin1 is linked with γ -secretase activity in the detergent

solubilized state. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(11): 6138-43.

Lichtenthaler SF, Dominguez D, Westmeyer GG, Reiss K, Saftig P, De Strooper B, Seed B. The cell adhesion protein p-selectin glycoprotein ligand-1 is a substrate for the aspartyl protease BACE1. *J Biol Chem* 2003; 278:48713-9.

Lin J, Luo J, Redies C. Differential expression of five members of the ADAM family in the developing chicken family. *Neuroscience* 2008; 157(2): 360-75.

Lin X, Koelsch G, Wu S, Downs D, Dashti A, Tang J. Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the β -secretase site of β -amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(4): 1456-6-.

Luo Y, Bolon B, Kahn S, Bennett BD, Babu-Kahn S, Denis P, Fan W, Kha H, Zhang J, GKong Y, Martin L, Louis JC, Yan Q, Richards WG, Citron M, Vassar R. Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's β -secretase, have normal phenotype and abolished β -amyloid generation. *Nat Neurosci* 2001; 4: 231-2.

Mann DM. Cerebral amyloidosis, aging and Alzheimer's disease; a contribution from studies on Down's syndrome. *Neurobiol aging* 1989; 10(5): 397-9.

Maruyama K, Terakado K, Usami M, Yoshikawa K. Formation of amyloid-like fibrils in COS cells overexpressing part of the Alzheimer amyloid protein precursor. *Nature* 1990; 347(6293): 566-9.

Maruyama K, Kawamura Y, Asada H, Ishiura S, Obata K. Cleavage of the N-terminal site of Alzheimer amyloid β /A4 is essential for its secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 202: 1517-23.

Maxfield FR, Yamashiro DJ. Endosome acidification and the pathways of receptor-mediated endocytosis. *Adv Exp Med Biol* 1987; 225: 189-98.

Meunier B, Quaranta M, Daviet L, Hatzoglou A, Leprince C. The membrane-tubulating potential of amphiphysin 2/BIN1 is dependent on the microtubule-binding cytoplasmic linker protein 170 (CLIP-170). *Eur J Cell Biol* 2009; 88: 91-102.

Muller AJ, Baker JF, DuHadaway JB, Ge K, Farmer G, Donover PS, Meade R, Reid C,

Grzanna R, Roach AH, Shah N, Soler AP, Prendergast GC. Targeted disruption of the murine Bin1/Amphiphysin II gene dose not disable endocytosis but results in embryonic cardiomyopathy with aberrant myofibril formation. *Mol Cell Biol* 2003; 23(12): 4295-306.

Muller AJ, DuHadaway JB, Donover PS, Sutanto-Ward E, Prendergast GC. Targeted deletion of the suppressor gene Bin1/Amphiphysin2 enhances the malignant character of transformed cells. *Cancer Biol Ther* 2004; 3(12): 1236-42.

Muller AJ, DuHadaway JB, Donover PS, Sutanto-Ward E, Prendergast GC. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. *Nat Med* 2005; 11(3): 312-9.

Naj AC, Naj AC, Jun G, Beecham GW, Wang LS, Vardarajan BN, Buross J, Gallins PJ, Buxbaum JD, Jarvik GP, Crane PK, Larson EB, Bird TD, Boeve BF, Graff-Radford NR, De Jager PL, Evans D, Schneider JA, Carrasquillo MM, Ertekin-Taner N, Younkin SG, Cruchaga C, Kauwe JS, Nowotny P, Kramer P, Hardy J, Huentelman MJ, Myers AJ, Barmada MM, Demirci FY, Baldwin CT, Green RC, Rogava E, St George-Hyslop P, Arnold SE, Barber R, Beach T, Bigio EH, Bowen JD, Boxer A, Burke JR, Cairns NJ, Carlson CS, Carney RM, Carroll SL, Chui HC, Clark DG, Corneveaux J, Cotman CW, Cummings JL, DeCarli C, DeKosky ST, Diaz-Arrastia R, Dick M, Dickson DW, Ellis WG, Faber KM, Fallon KB, Farlow MR, Ferris S, Frosch MP, Galasko DR, Ganguli M, Gearing M, Geschwind DH, Ghetti B, Gilbert JR, Gilman S, Giordani B, Glass JD, Growdon JH, Hamilton RL, Harrell LE, Head E, Honig LS, Hulette CM, Hyman BT, Jicha GA, Jin LW, Johnson N, Karlawish J, Karydas A, Kaye JA, Kim R, Koo EH, Kowall NW, Lah JJ, Levey AI, Lieberman AP, Lopez OL, Mack WJ, Marson DC, Martiniuk F, Mash DC, Masliah E, McCormick WC, McCurry SM, McDavid AN, McKee AC, Mesulam M, Miller BL, Miller CA, Miller JW, Parisi JE, Perl DP, Peskind E, Petersen RC, Poon WW, Quinn JF, Rajbhandary RA, Raskind M, Reisberg B, Ringman JM, Roberson ED, Rosenberg RN, Sano M, Schneider LS, Seeley W, Shelanski ML, Slifer MA, Smith CD, Sonnen JA, Spina S, Stern RA, Tanzi RE, Trojanowski JQ, Troncoso JC, Van Deerlin VM, Vinters HV, Vonsattel JP, Weintraub S, Welsh-Bohmer KA, Williamson J, Woltjer RL, Cantwell LB, Dombroski BA, Beekly D, Lunetta KL, Martin ER, Kamboh MI, Saykin AJ, Reiman EM, Bennett DA, Morris JC, Montine TJ, Goate AM, Blacker D, Tsuang DW, Hakonarson H, Kukull WA, Foroud TM, Haines JL, Mayeux R, Pericak-Vance MA, Farrer LA, Schellenberg GD. Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 2011; 43: 436-41.

Nicot AS, Toussaint A, Tosch V, Kretz C, Wallgren-Petterson C, Iwarsson E, Kingston H, Garnier JM, Biancalana V, Oldfors A, Mandel JL, Laporte J. *Nat Genet* 2007; 39(9): 1134-9.

Nukina N, Ihara Y. One of the antigenic determinants of paired helical filaments is related to tau protein. *J Biochem* 1986; 99: 1541-4.

Okada H, Zhang W, Peterhoff C, Hwang JC, Nixon RA, Ryu SH, Kim TW. Proteomic identification of sorting nexin 6 as a negative regulator of BACE1-mediated APP processing. *FASEB J* 2010; 8: 2783-94.

Okuizumi K, Onodera O, Tanaka H, Kobayashi H, Tsuji S, Takahashi H, Oyanagi K, Seki K, Tanaka M, Naruse S, et al. ApoE-epsilon 4 and early-onset Alzheimer's. *Nat Genet* 1994; 7(1): 10-11.

Pant S, Sharma M, Patel K, Caplan S, Carr CM, Grant BD. AMPH-1/Amphiphysin/Bin1 functions with RME-1/Ehd1 in endocytic recycling. *Nat Cell Biol* 2009; 11: 1399-410.

Perez RG, Soriano S, Hayes JD, Ostaszewski B, Xia W, Selkoe DJ, Chen X, Stokin GB, Koo EH. Mutagenesis identifies new signals for β -amyloid precursor protein endocytosis, turnover, and the generation of secreted fragments, including A β 42. *J Biol Chem* 1999; 274(27): 18851-6.

Pineda-Lucena A. A structure-based model of the c-Myc/Bin1 protein interaction shows alternative splicing of Bin1 and c-Myc phosphorylation are key binding determinants. *J Mol Biol* 2005; 351: 182-94.

Postina R, Schroeder A, Dewachter I, Bohl J, Schmitt U, Kojro E, Prinzen C, Endres K, Blessing M, Flamez P, Dequenne A, Godaux E, Van Leuven F, Fahrenholz F. A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest* 2004; 113: 1456-64.

Rajendran L, Honsho M, Azhni TR, Keller P, Geiger KD, Verkade P, Simons K. Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 11172-7.

Reider SE, Banta LM, Koehrer K, McCaffery JM, Emr SD. Multilamellar endosome-like compartment accumulates in the yeast vps28 vacuolar protein sorting mutant. *Mol Biol Cell* 1996; 7(6): 985-99.

Ren G, Vajjhala P, Lee JS, Winsor B, Munn AL. The BAR domain proteins: molding membranes in fission, fusion, and phagy. *Microbiol Mol Biol Rev* 2006; 70: 37-120.

Rink J, Ghigo E, Kalaidzidis Y, Zerial M. Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* 2005; 122(5): 735-49.

Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, Chi H, Lin C, Holman K, Tsuda T. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* 1995; 376(6543): 775-8.

Salminen A, Ojala J, Kaupinnen A, Kaarniranta K, Suuronen T. Inflammation in Alzheimer's disease: amyloid- β oligomers trigger innate immunity defence via pattern recognition receptors. *Prog Neurobiol* 2009; 87(3): 181-94.

Sannerud R, Declerck I, Peric A, Raemaekers T, Menendez G, Zhou L, Veerle B, Coen K, Munck S, De Strooper B, Schiavo G, Annaert W. ADP ribosylation factor 6 (ARF6) controls amyloid precursor protein (APP) processing by mediating the endosomal sorting of BACE1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: E559-68.

Schellenberg GD, Bird TD, Wijsman EM, Orr HT, Anderson L, Nemens E, White JA, Bonnycastle L, Weber JL, Alonso ME. Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science* 1992; 258(5082): 668-71.

Selkoe DJ, Ihara Y, Salazar FJ. Alzheimer's disease: insolubility of partially purified paired helical filaments in sodium dodecyl sulfate and urea. *Science* 1982; 215(1243-5).

Seshadri S, Fitzpatrick AL, Ikram MA, DeStefano AL, Gudnason V, Boada M, Bis JC, Smith AV, Carassquillo MM, Lambert JC, Harold D, Schrijvers EM, Ramirez-Lorca R, Debette S, Longstreth WT Jr, Janssens AC, Pankratz VS, Dartigues JF, Hollingworth P, Aspelund T, Hernandez I, Beiser A, Kuller LH, Koudstaal PJ, Dickson DW, Tzourio C, Abraham R, Antunez C, Du Y, Rotter JI, Aulchenko YS, Harris TB, Peterson RC, Berr C, Owen MJ, Lopez-Arrieta J, Varadarajan BN, Becker JT, Rivadeneira F, Nalls MA,

Graff-Radford NR, Campion D, Auerbach S, Rice K, Hofman A, Jonsson PV, Schmidt H, Lathrop M, Mosley TH, Au R, Psaty BM, Uitterlinden AG, Farrer LA, Lumley T, Ruiz A, Williams J, Amouyel P, Youkin SG, Wolf PA, Launer LJ, Lopez OL, van Duijn CM, Breteler MM; CHARGE Consortium; GERAD1 Consortium; EADI1 Consortium. Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease. *JAMA* 2010; 303(18): 1832-40.

Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 1995; 375(6534): 754-60.

Shi XP, Chen E, Yin KC, Na S, Garsky VM, Lai MT, Li YM, Platchek M, Register RB, Sardana MK, Tang MJ, Thiebeau J, Wood T, Shafer JA, Gardell SJ. The pro domain of beta-secretase does not confer strict zymogen-like properties but does assist proper folding of the protease domain. *J Biol Chem* 2001; 276(13): 10366-73.

Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Crapper-MacLachlan DR, Alberts MJ et al. Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 1993; 8: 1467-72.

Sakamuro D, Elliott KJ, Wechsler-Reya R, Prendergast GC. BIN1 is a novel MYC-interacting protein with features of a tumor suppressor. *Nat Genet* 1996; 14: 69-77.

Sinha S, Anderson JP, Barbour R, Basi GS, Caccavello R, Davis D, Doan M, Dovey HF, Frigon N, Hong J, Jacobson-Croak K, Jewett N, Keim P, Knops J, Lieberburg I, Power M, Tan H, Tatsuno G, Tung J, Schenk D, Seubert P, Suomensaaari SM, Wang S, Walker D, Zhao J, McConlogue L, John V. Purification and cloning of amyloid precursor protein β -secretase from human brain. *Nature* 1999; 402(6761): 537-40.

Sisodia SS, Koo EH, Beyreuther K, Unterbeck A, Price DL. Evidence that β -amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing. *Science* 1990; 248(4954): 492-5.

Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance MA, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD. Apolipoprotein E: high-avidity binding to β -amyloid and increased

frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(5): 1977-81.

Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, Odaka A, Otvos L, Eckman C, Golde TE, Younkin SG. An increased percentage of long amyloid β protein secreted by familial amyloid β protein precursor (β APP717) mutants. *Science* 1994; 264(5163): 1336-40.

Tajiri T, Liu X, Thompson PM, Tanaka S, Suita S, Zhao H, Maris JM, Prendergast GC, Hogarty MD. Expression of a MYCN-interacting isoform of the tumor suppressor BIN1 is reduced in neuroblastomas with unfavorable biological features. *Clin Cancer Res* 2003; 9(9): 3345-55.

Tesco G, Koh YH, Kang EL, Cameron AN, Das S, Sena-Esteves M, Hiltunen M, Yang SH, Zhong Z, Shen Y, Simpkins JW, Tanzi RE. Depletion of GGA3 stabilizes BACE and enhances beta-secretase activity. *Neuron* 2007; 54(5): 721-37.

Trombetta ES, Ebersold M, Garrett W, Pypaert M, Mellman I. Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation. *Science* 2003; 299(5611): 1400-3.

Van der Sluijs P, Hull M, Webster P, Male P, Goud B, Mellman I. The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. *Cell* 1992; 70: 729-40.

Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M. β -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 1999; 286(5440): 735-41.

Von Arnim CA, Kinoshita A, Peltan ID, Tangredi MM, Herl L, Lee BM, Spoelgen R, Hshieh TT, Ranganathan S, Battey FC, Liu CX, Bacskai BJ, Sever S, Irizzary MC, Strickland DK, Hyman BT. The low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) is a novel β -secretase (BACE1) substrate. *J Biol Chem* 2005; 280: 23009-17.

Wahle T, Thal DR, Sastre M, Rentmeister A, Bogdanovic N, Famulok M, Heneka MT, Walter J. GGA1 is expressed in the human brain and affects the generation of amyloid beta-peptide. *J Neurosci* 2006; 26(49): 12838-46.

Walter J, Fluhrer R, Hartung B, Willem M, Kaether C, Capell A, Lammich S, Multhaup G, Haass C. Phosphorylation regulates intracellular trafficking of beta-secretase. *J Biol Chem* 2001; 276(18): 14634-41.

Wechsler-Reya R, Sakamuro D, Zhang J, Duhadaway J, Prendergast GC. Structural analysis of the human BIN1 gene. Evidence for tissue-specific transcriptional regulation and alternate RNA splicing. *J Biol Chem* 1997; 272: 31453-8.

Wechsler-Reya R, Elliott KJ, Prendergast GC. A role for the putative tumor suppressor Bin1 in muscle cell differentiation. *Mol Cell Biol* 1998; 18(1): 566-75.

Weigert R, Yeung AC, Li J, Donaldson JG. Rab22a regulates the recycling of membrane proteins internalized independently of clathrin. *Mol Biol Cell* 2004; 15: 3758-70.

Wigge P, Koehler K, Vallis Y, Doyle CA, Owen D, Hunt SP, McMahon HT. Amphiphysin heterodimers: potential role in clathrin-mediated endocytosis. *Mol Biol Cell* 1997; 8(10): 2003-15.

Wigge P, Koler K, Vallis Y, Doyle CA, Owen D, Hunt SP, McMahon HT. Amphiphysin heterodimers: potential role in clathrin mediated endocytosis. *Moc Biol Cell* 1997; 8: 2003-15.

Wijsman EM, Pankratz ND, Choi Y, Rothstein JH, Faber KM, Cheng R, Lee JH, Bird TD, Bennett DA, Diaz-Arrastia R, Goate AM, Farlow M, Ghetti B, Sweet RA, Foroud TM, Mayeux R; NIA-LOAD/NCRAD Family Study Group. Genome-wide association of familial late-onset Alzheimers disease replicates BIN1 and CLU and nominates CUGB2 in interaction with APOE. *PLoS Genet* 2011; 7(2): e1001308.

Willem M, Garratt AN, Novak B, Citron M, Kaufmann S, Rittger A, De Strooper B, Saftig P, Birchmeier C, Haass C. Control of peripheral nerve myelination by the β -secretase BACE1. *Science* 2006; 314: 664-6.

Wolfe MS, Xia W, Ostaszewski BL, Diehl TS, Kimberly WT, Selkoe DJ. Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and γ -secretase activity. *Nature* 1999; 398(6727): 513-7.

Wong HK, Sakurai T, Oyama F. β Subunits of voltage-gated sodium channels are novel substrates of β -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme (BACE1) and γ -secretase. *J Biol Chem* 2005; 280(24): 23009-17.

Yan R, Bienkowski MJ, Shunck ME, Miao H, Tory MC, Pauley AM, Brashier JR, Stratman NC, Mathews WR, Buhl AE, Carter DB, Tomasselli AG, Parodi LA, Heinrichson RL, Gurney ME. Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease β -secretase activity. *Nature* 1999; 402(6761): 533-7.

Yoshikawa K, Aizawa T, Maruyama K. Neural differentiation increases expression of Alzheimer amyloid protein precursor gene in murine embryonal carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 171(1): 204-9.

Yu G, Nishimura M, Arawaka S, Levitan D, Zhang L, Tandon A, Song YQ, Rogaeva E, Chen F, Kawarai T, Supala A, Levesque L, Yu H, Yang DS, Holmes E, Milman P, Liang Y, Zhang DM, Xu DH, Sato C, Rogaev E, Smith M, Janus C, Zhang Y, Aebbersold R, Farrer LS, Sorbi S, Bruni A, Fraser P, George-Hyslop PS. Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and β APP processing. *Nature* 2000; 407(6800): 48-54.

Zerial M, McBride H. Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2(2): 107-17.

Zhao Y, Wang Y, Yang J, Wang X, Zhao Y, Zhang X, Zhang YW. Sorting nexin 12 interacts with BACE1 and regulates BACE1-mediated APP processing. *Mol Neurodegener* 2012; 7(30)

Zheng J, Cahill SM, Lemmon MA, Fushman D, Schlessinger J, Cowburn D. Identification of the binding site for acidic phospholipids on the pH domain of dynamin: implications for stimulation of GTPase activity. *J Mol Biol* 1996; 255(1): 14-21.

图表

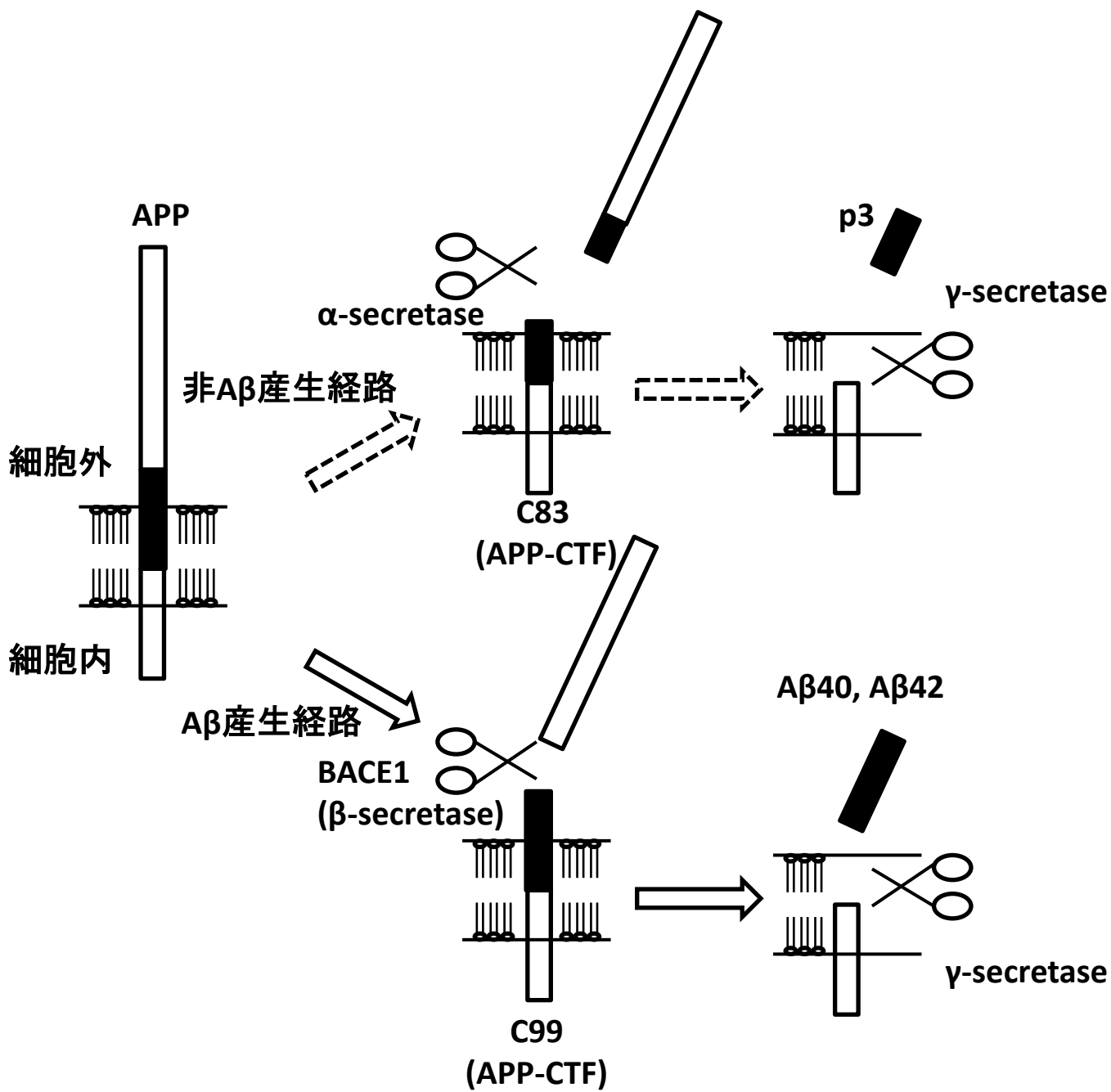


図1. APPの代謝経路

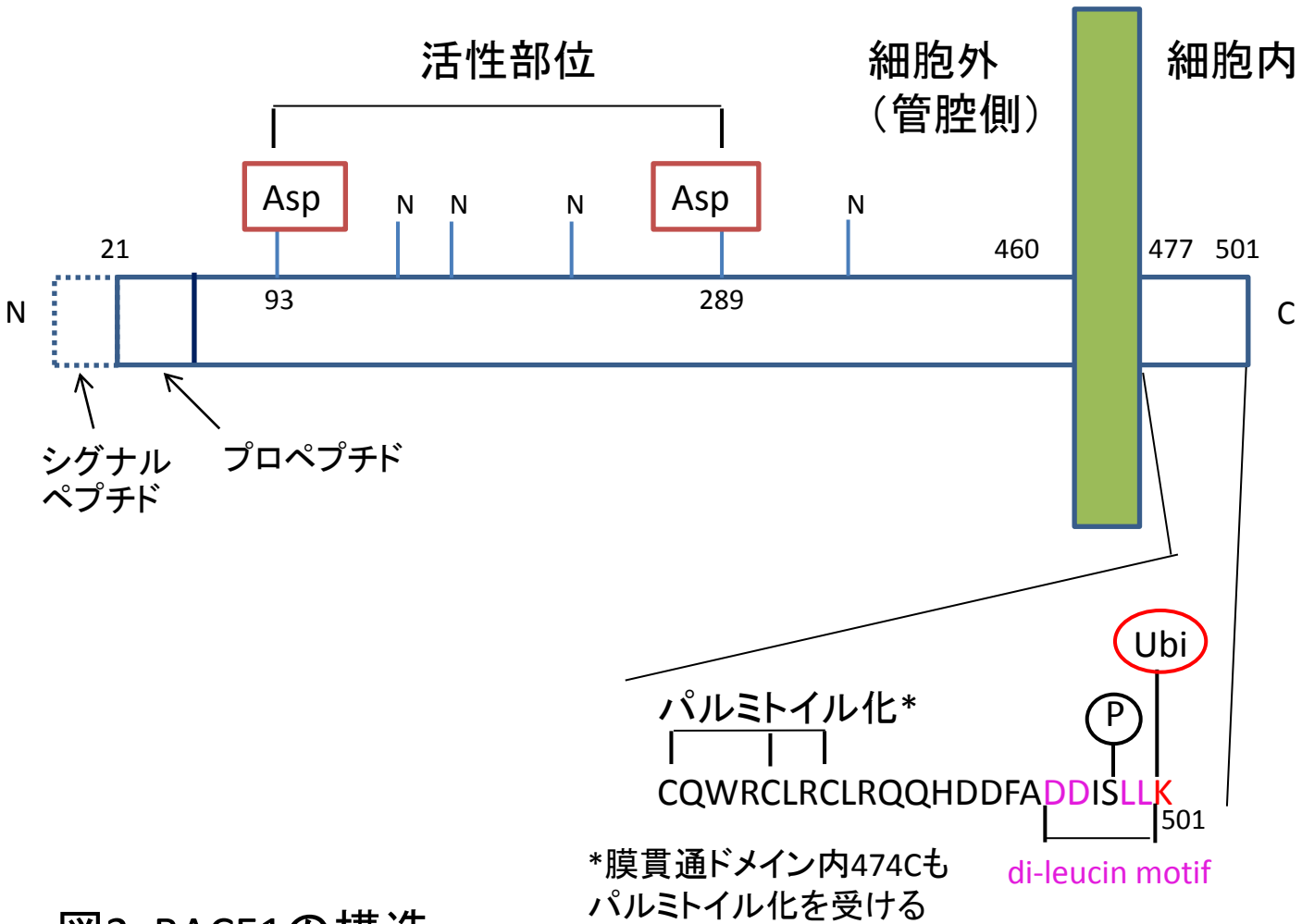


図2. BACE1の構造

Ranking based on HuGENet interim guidelines for the assessment of genetic association studies (2011/4updated)					
	Gene	Polymorphism	Ethnicity	OR (95% CI)	P-value
1	ApoE ε2/3/4	ApoE ε2/3/4	All	3.685 (3.30-4.12)	<1E-50
2	BIN1	rs744373	All	1.166 (1.13-1.20)	1.59E-26
3	CLU	rs11136000	Caucasian	0.879 (0.86-0.90)	3.37E-23
4	ABCA7	rs3764650	All	1.229 (1.18-1.28)	8.17E-22
5	CR1	rs3818361	Caucasian	1.174 (1.14-1.21)	4.72E-21
6	PICALM	rs3851179	Caucasian	0.879 (0.86-0.9)	2.85E-20
7	MS4A6A	rs610932	All	0.904 (0.88-0.93)	1.81E-11
8	CD33	rs3865444	All	0.893 (0.86-0.93)	2.04E-10
9	MS4A4E	rs670139	All	1.079 (1.05-1.11)	9.51E-10
10	CD2AP	rs9349407	All	1.117 (1.08-1.16)	2.75E-9

図3. GWASにより同定されたAD感受性遺伝子ランキング (Alzgene ; <http://www.alzgene.org/>を改変)

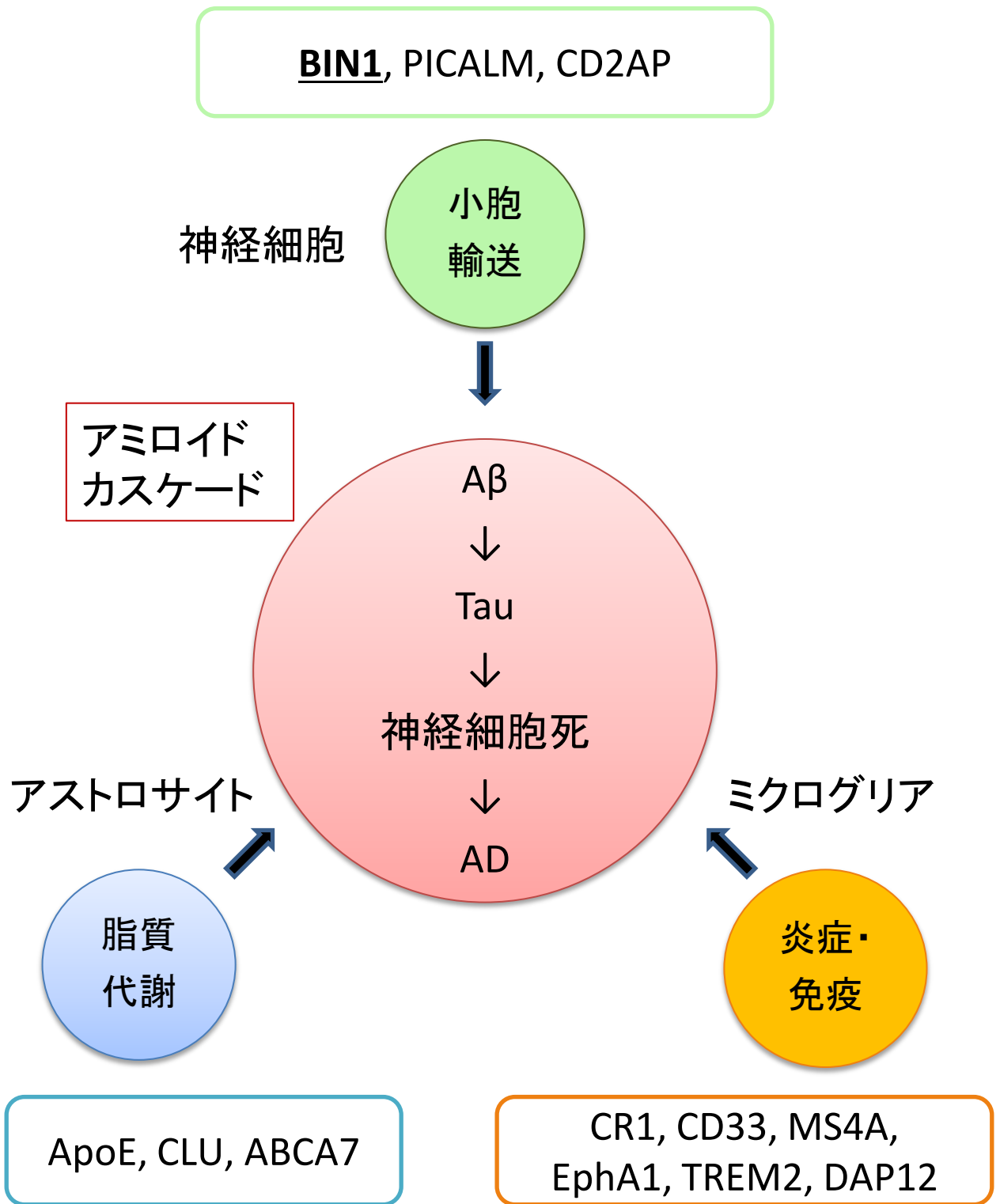


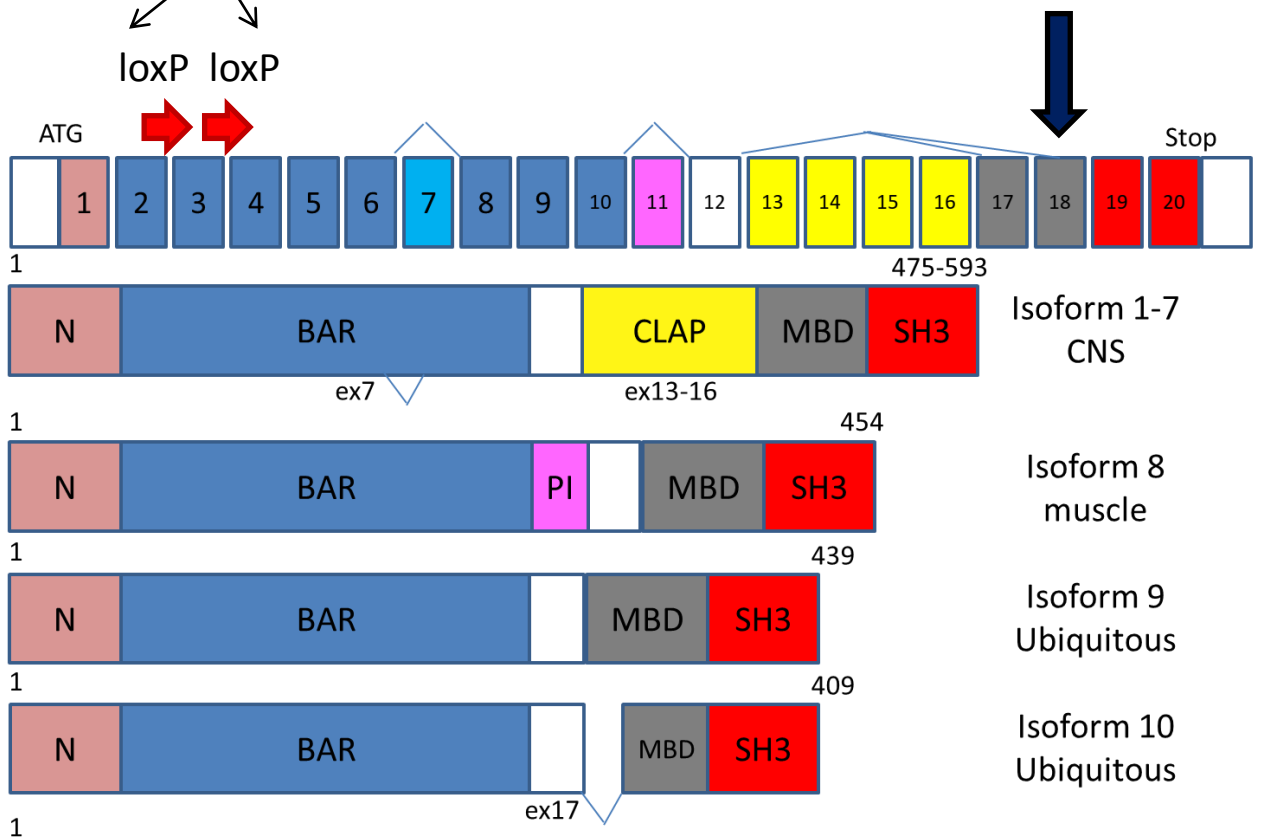
図4. GWASで同定されたAD感受性遺伝子と想定される機能

Isoform	アミノ酸数	分子量 (Da)	発現部位	主な局在
1	593	64568	CNS	Cytosolic
2	550	59806	CNS	Cytosolic
3	506	55044	CNS	Cytosolic
4	497	54817	CNS	Cytosolic
5	518	56368	CNS	Cytosolic
6	482	52889	CNS	Cytosolic
7	475	51606	CNS	Cytosolic
8	454	50054	Skeletal muscle	Plasma membrane
9	439	48127	Ubiquitous	Cytosolic / Nucleus
10	409	45432	Ubiquitous	Cytosolic / Nucleus

図5. *BIN1*遺伝子がコードするalternative splicing isoforms

本研究で使用した *Bin1^{flox/flox}*
マウスloxP挿入部位

Anti-BIN1 antibody C99D認識部位
(全isoformsを認識)



N; N-terminal amphipathic helix

BAR; BIN1-amphiphysin-Rvs167 domain

CLAP; clathrin-associated protein-binding domain

MBD; Myc-binding domain

SH3; Src homology 3 domain

PI; Phosphoinositide domain

図6. BIN1の構造



▪ N; N-terminal amphipathic helix

BARドメインのN末端側約20~30残基で, 両親媒性 α ヘリックス構造をとる.

▪ BAR; BIN1-amphiphysin-Rvs167 domain

BIN1など細胞膜の陥入に関わる35種以上の蛋白質で見られる約210アミノ酸残基からなる脂質結合ドメインで, 細胞膜結合活性と細胞膜変形活性を有する. 立体構造は, 6本の突出した α -helixからなるcoiled-coil領域を持つバナナ型の2量体で構成される. バナナ型のカーブの凹面は正電荷を有する. BARドメインの凹面が負電荷を持つ細胞膜に巻きつき, 膜を変形させてtubuleを形成する.

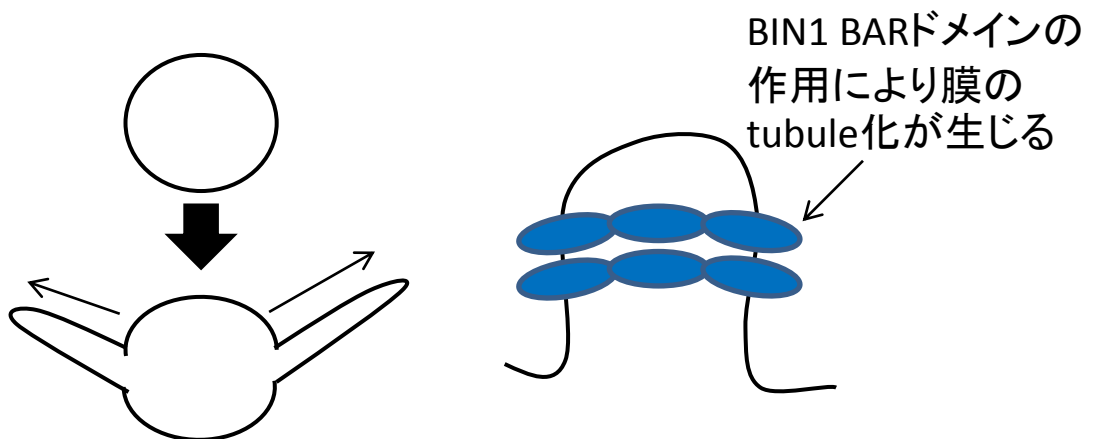


図7. メンブレントラフィッキングにおけるBIN1の各ドメインの結合分子と機能 (BARドメイン)



・CLAP; Clathrin-associated protein-binding domain

中枢神経系のIsoform 1-7で特異的に発現し，輸送小胞の形成に働くコート蛋白質であるclathrinおよびadaptin-2 (AP-2)に結合することで，クラスリン依存的エンドサイトーシスに寄与する。

・MBD; Myc-binding domain

核内に発現するubiquitous isoforms 9, 10において，BARドメインやSH3ドメインと協調的に作用することでc-Mycなどの転写活性を調節する。メンブレントラフィックに関する機能は知られていない。

・SH3; Src homology 3 domain

プロリンリッチな多数の蛋白質と結合し，蛋白質-蛋白質相互作用を担う。この中で量的に多く含まれる蛋白質はdynaminとN-WASPであり，dynaminはGTP依存的に膜を切断する酵素で，N-WASPはアクチン集合を誘導する蛋白質。特定の曲率を持つ膜にdynaminやN-WASPが引き寄せられ，dynaminの活性化やアクチン重合が誘導されることで，tubule化した膜が切断され，小胞の形成を行う。

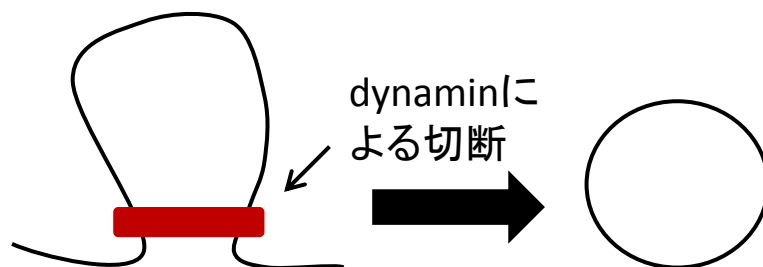


図8. メンブレントラフィックにおけるBIN1の各ドメインの結合分子と機能(CLAPドメイン, MBD, SH3ドメイン)

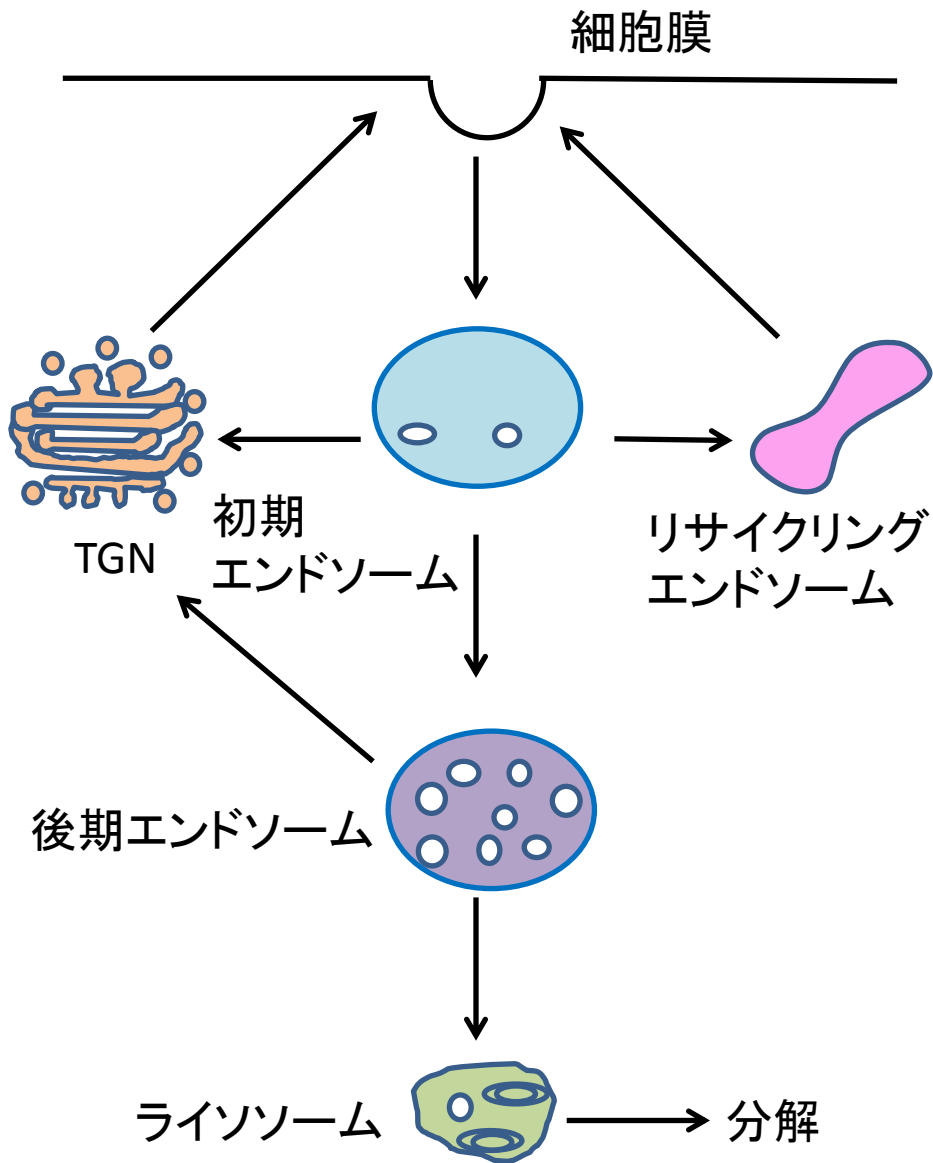
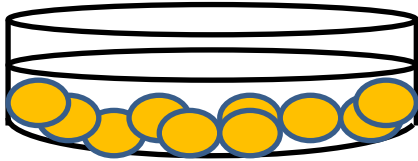
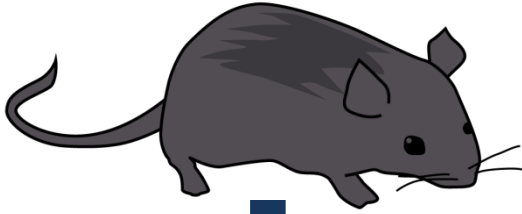
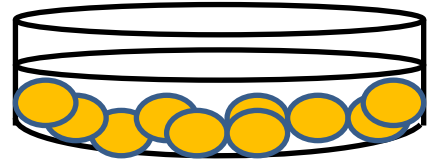


図9. エンドサイトーシスによる細胞内小胞輸送の模式図

*Bin1^{flox/flox}*マウス



レンチウイルス発現系による
Cre recombinase発現



*Bin1*ノックアウト
神経細胞

Bin1^{flox/flox}



Cre



図10. *Bin1^{flox/flox}*マウス由来primary cortical neuronal cultureとレンチウイルス発現系による*Bin1*ノックアウト神経細胞の作成

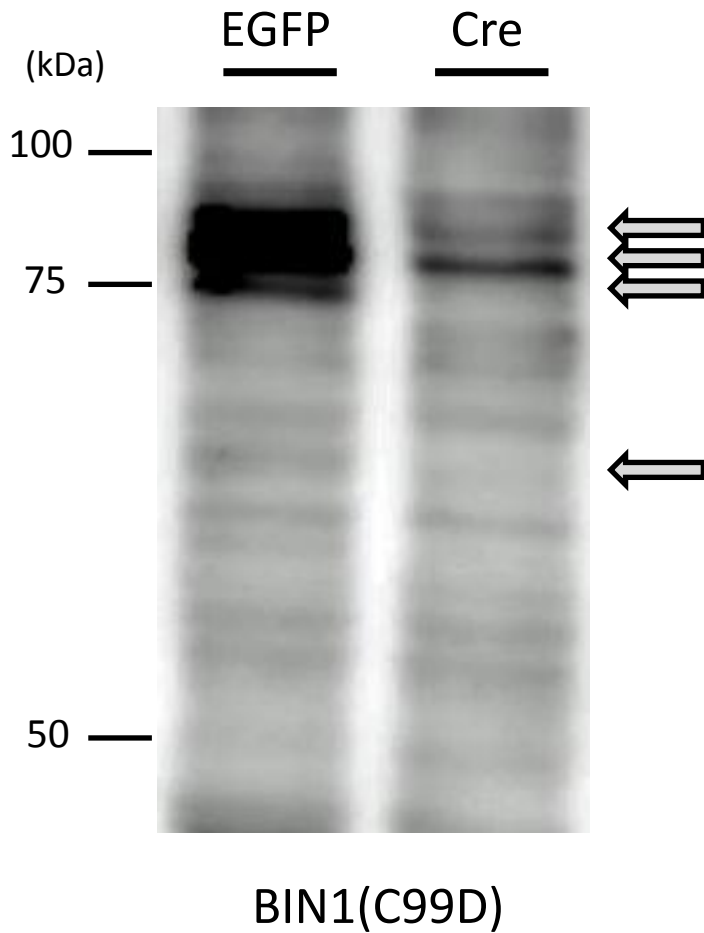


図11. マウスprimary cortical neuron cultureにおけるBin1タンパクの検出

Bin1^{flox/flox} マウス由来primary cortical neuron cultureにおいてEGFP-NLS(以降EGFP)あるいはEGFP-NLS-Creリコンビナーゼ(以降Cre)を発現させるレンチウイルスを感染させ、抗BIN1抗体(c99D)を用いてウェスタンブロット解析を行った。

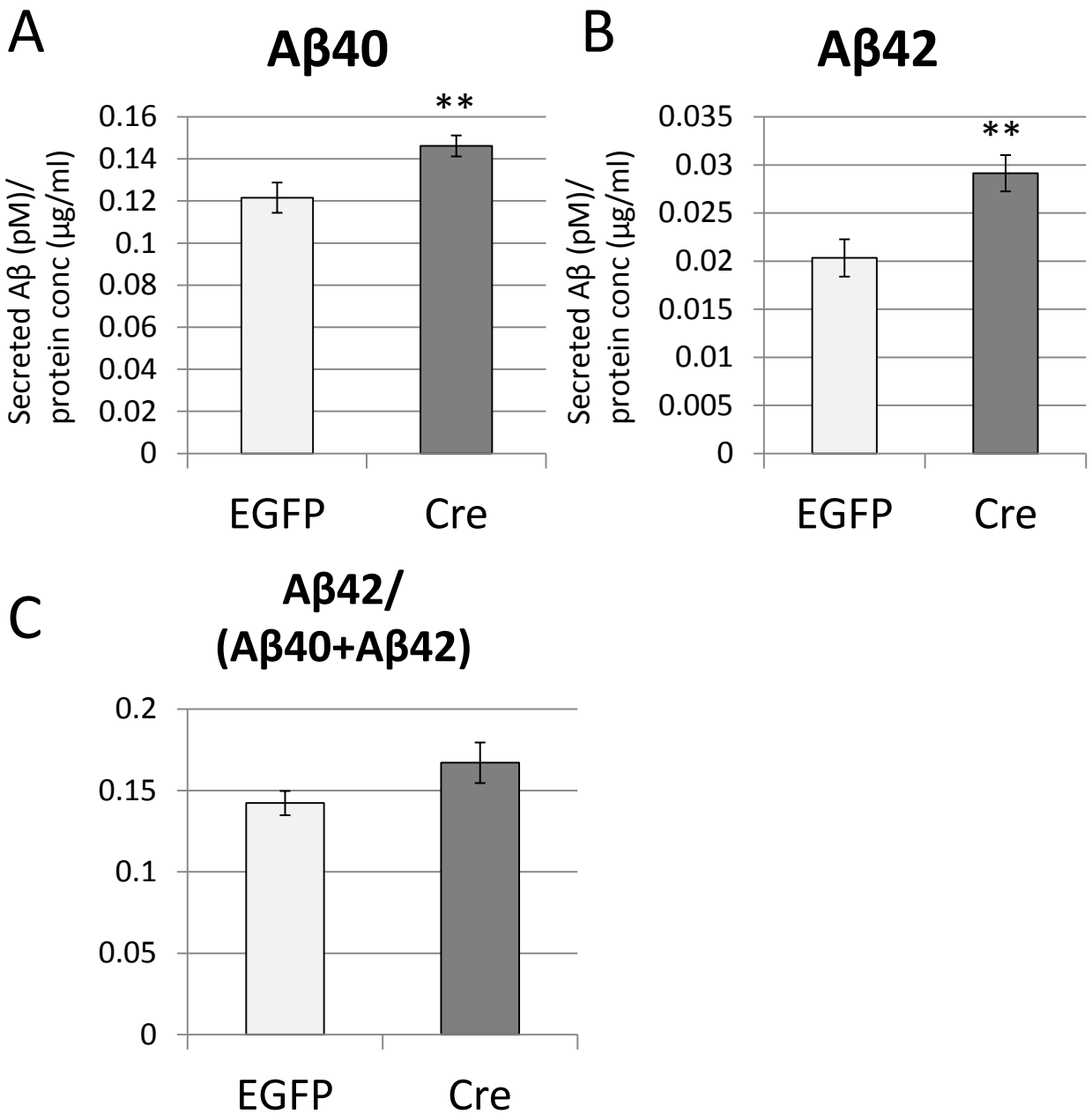


図12. primary cortical neuron cultureへのBin1ノックアウトによる分泌Aβ量への影響

*Bin1^{flox/flox}*マウス由来primary cortical neuron cultureにおいてEGFPあるいはCreを発現させるレンチウイルスを感染させ、sandwich ELISA法により分泌Aβ40量(A), Aβ42量(B)を測定し、細胞のタンパク量で除して比較を行った。Aβ42比率はAβ42/(Aβ40+Aβ42))で定義した(C) (n=6, mean±SEM, **p<0.005)。

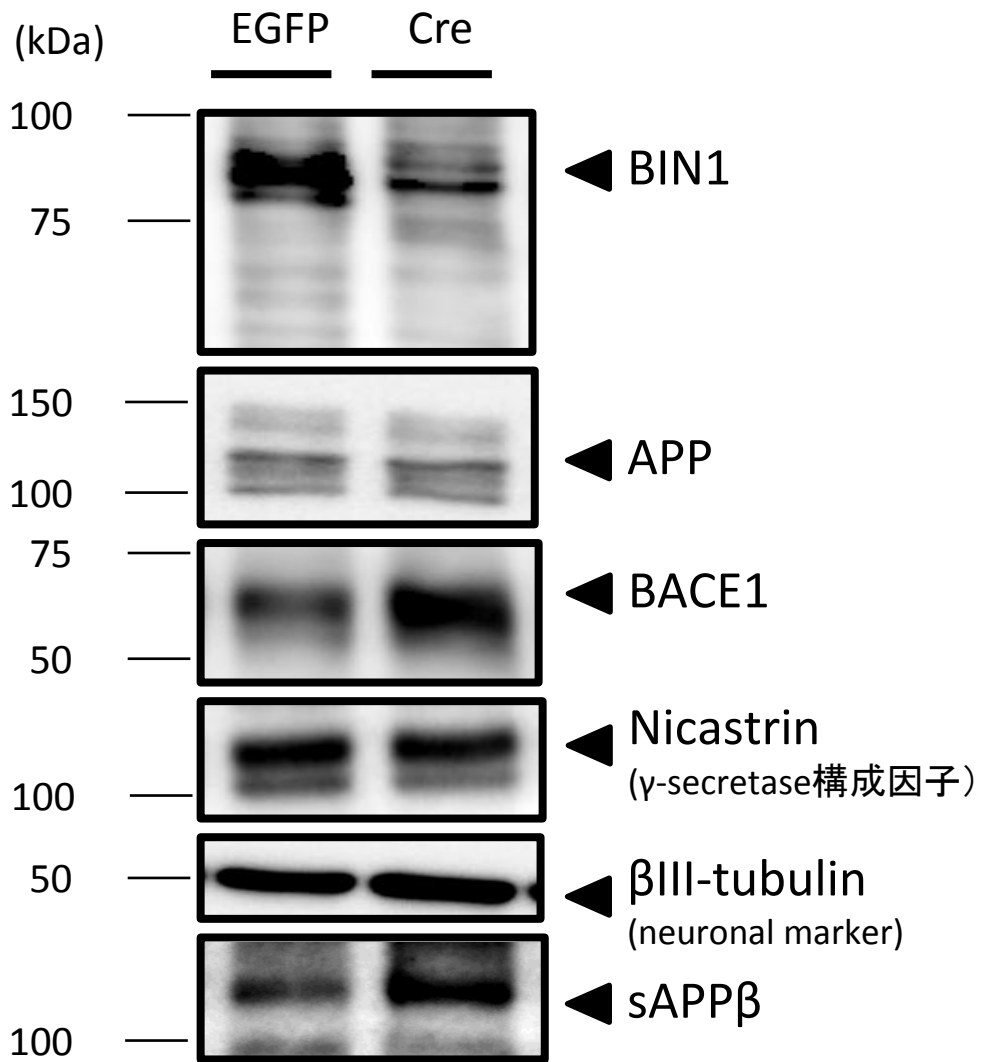


図13. primary cortical neuron cultureへのBin1ノックアウトによるAPPおよびBACE1タンパク発現量への影響

*Bin1^{flox/flox}*マウス由来primary cortical neuron cultureにおいてEGFPあるいはCreを発現させるレンチウイルスを感染させ、ウエスタンブロット解析を行った。

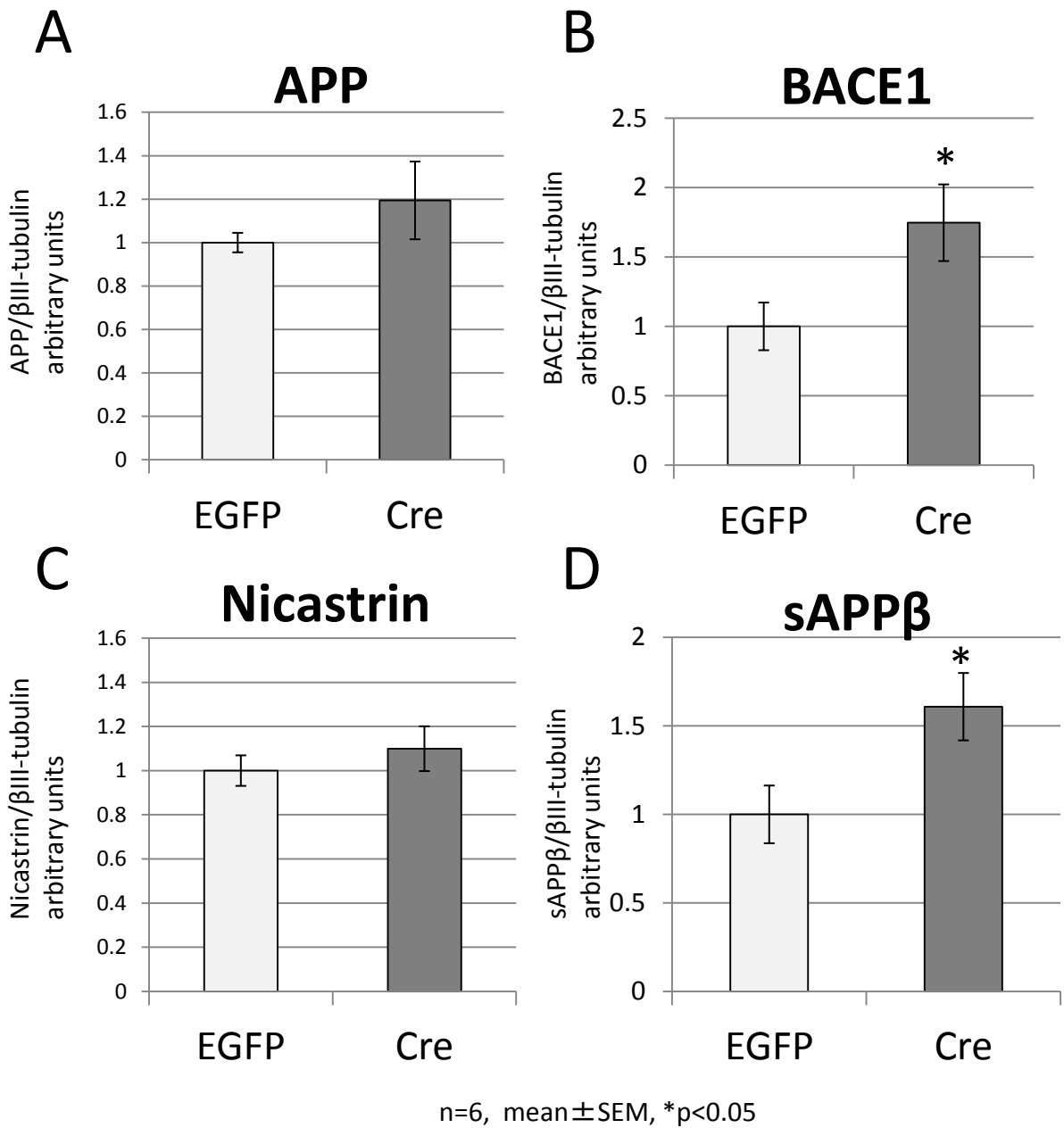


図14. primary cortical neuron cultureへのBin1ノックアウトによるAPPおよびBACE1タンパク発現量, 分泌sAPP β への影響

*Bin1^{flox/flox}*マウス由来primary cortical neuron cultureにおいてEGFPあるいはCreを発現させるレンチウイルスを感染させ, ウェスタンブロット解析を行った. ウェスタンブロット解析における, APP(A), BACE1(B), Nicastrin(C), 分泌sAPP β (D)の相対的なバンドシグナル強度を定量した (n=6, mean \pm SEM, *p<0.05).

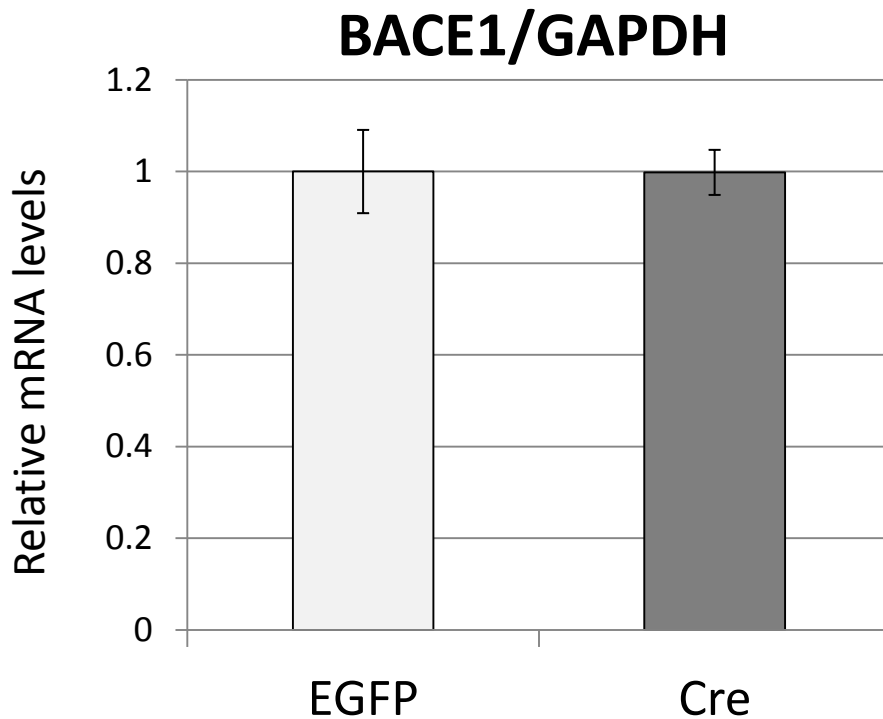


図15. primary cortical neuronal cultureへのBin1ノックアウトによるBACE1 mRNAの発現量への影響

*Bin1^{flox/flox}*マウス由来primary cortical neuron cultureにおいてEGFPあるいはCreを発現させるレンチウイルスを感染させた。BACE1およびGAPDHのmRNA量を定量的PCRにより測定し、BACE1のmRNA量をGADPHのmRNA量で除して比較を行った (n=6, mean±SEM)。

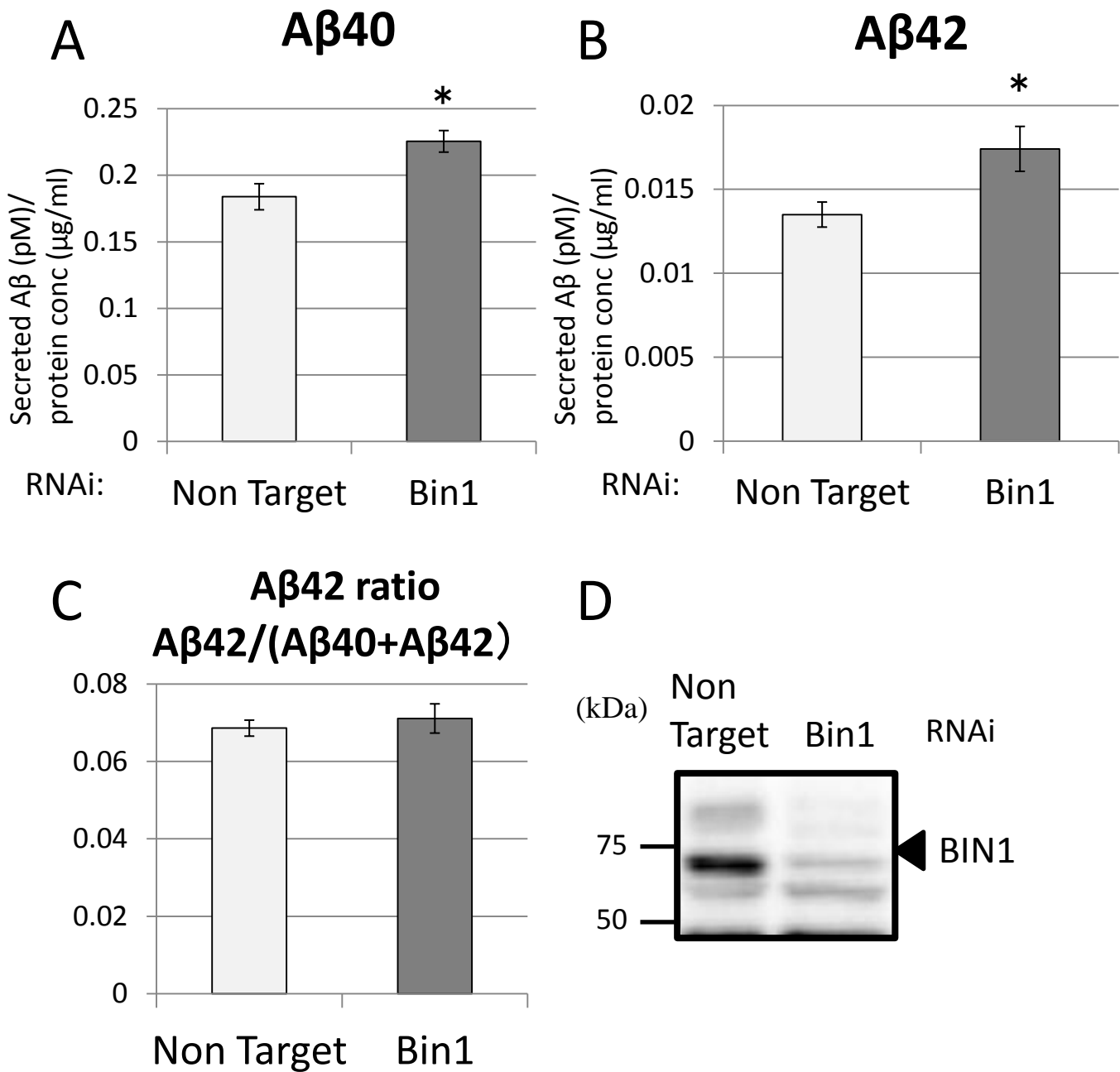


図16. 神経系培養細胞でのBin1ノックダウンによる分泌Aβ量への影響

N2a細胞にBin1あるいはNon Target siRNA処理を行い、sandwich ELISA法により、培地中の分泌Aβ40、Aβ42量を定量し、細胞のタンパク量で除して比較を行った(n=10, mean±SEM, *p<0.05)(A, B). Aβ42比率はAβ42/(Aβ40+Aβ42)で定義した(C). ウェスタンブロット解析によるBIN1ノックダウンの確認(D).

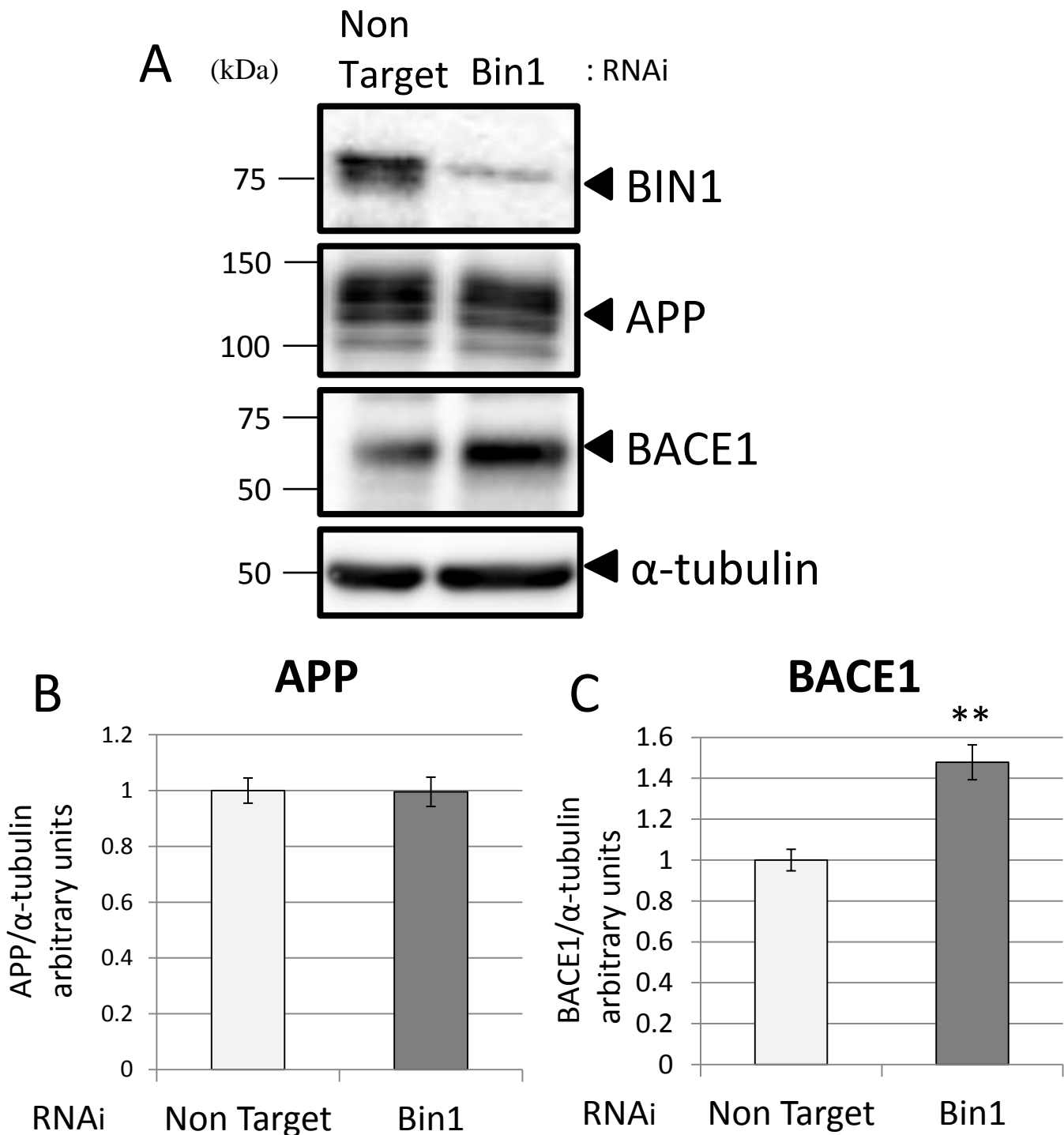


図17. 神経系培養細胞でのBin1ノックダウンによるAPP, BACE1タンパク発現量への影響

N2a細胞にBin1あるいはNon Target siRNA処理を行い、ウェスタンブロット解析を行った(A)。ウェスタンブロット解析においてAPPまたはBACE1の相対的なバンドシグナル強度を定量した(n=6, mean \pm SEM, **p<0.005)(B, C)。

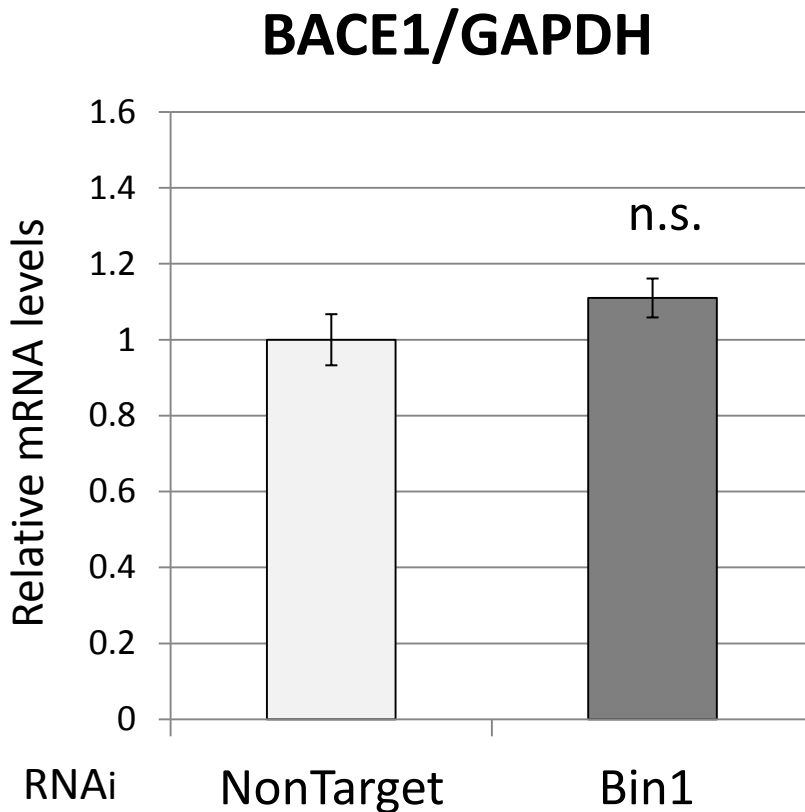


図18. 神経系培養細胞でのBin1ノックダウンによるBACE1 mRNAの発現量への影響

N2a細胞にBin1あるいはNon Target siRNA処理を行った。BACE1およびGAPDHのmRNA量を定量的PCRにより測定し、BACE1のmRNA量をGADPHのmRNA量で除して比較を行った(n=3, mean±SEM)。

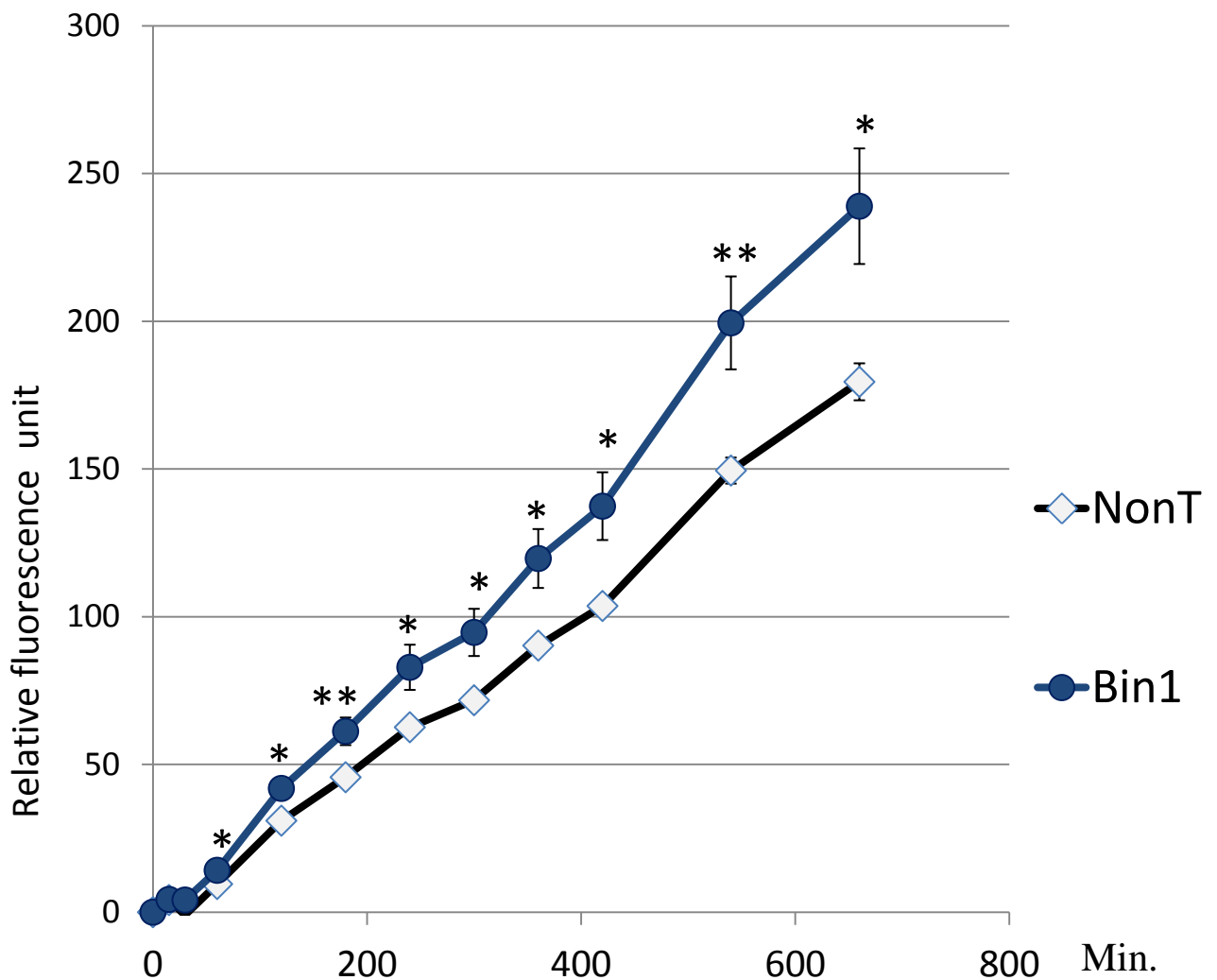


図19. 神経系培養細胞でのBin1ノックダウンによるBACE1酵素活性への影響

Bin1あるいはNon Target siRNA (NonT) 処理を行ったN2a細胞からBACE1を含む可溶化膜画分を抽出し、BACE1特異的な蛍光基質と660分まで反応させ、各時間での相対蛍光強度を定量、比較した (n=9, mean±SEM, *p<0.05, **p<0.005).

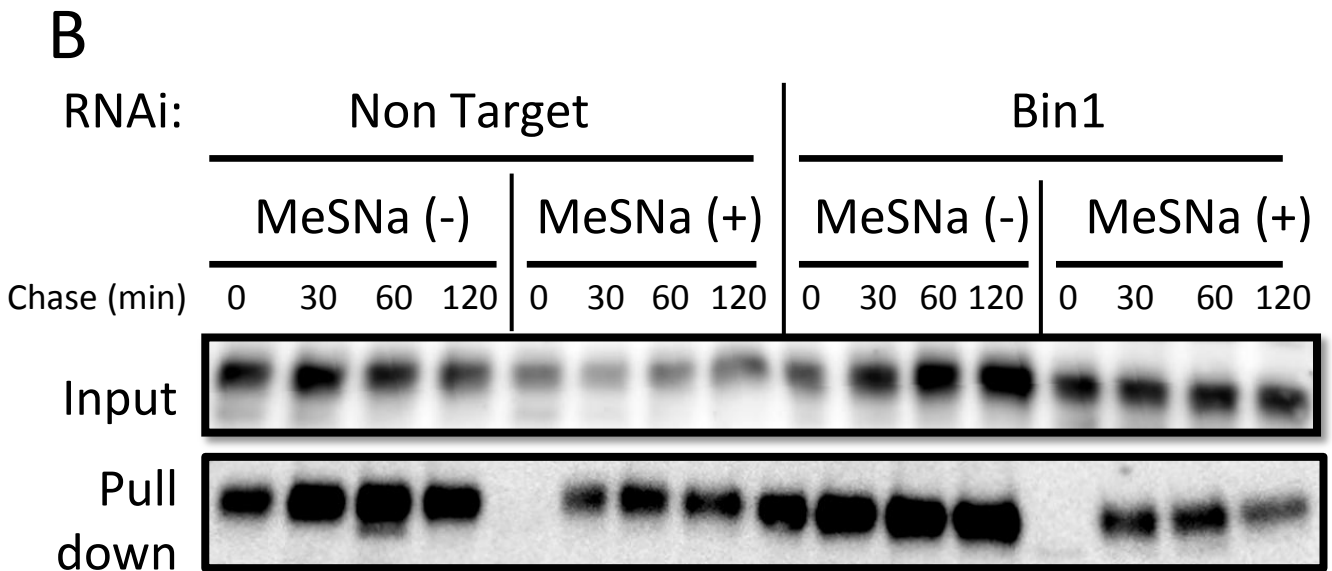
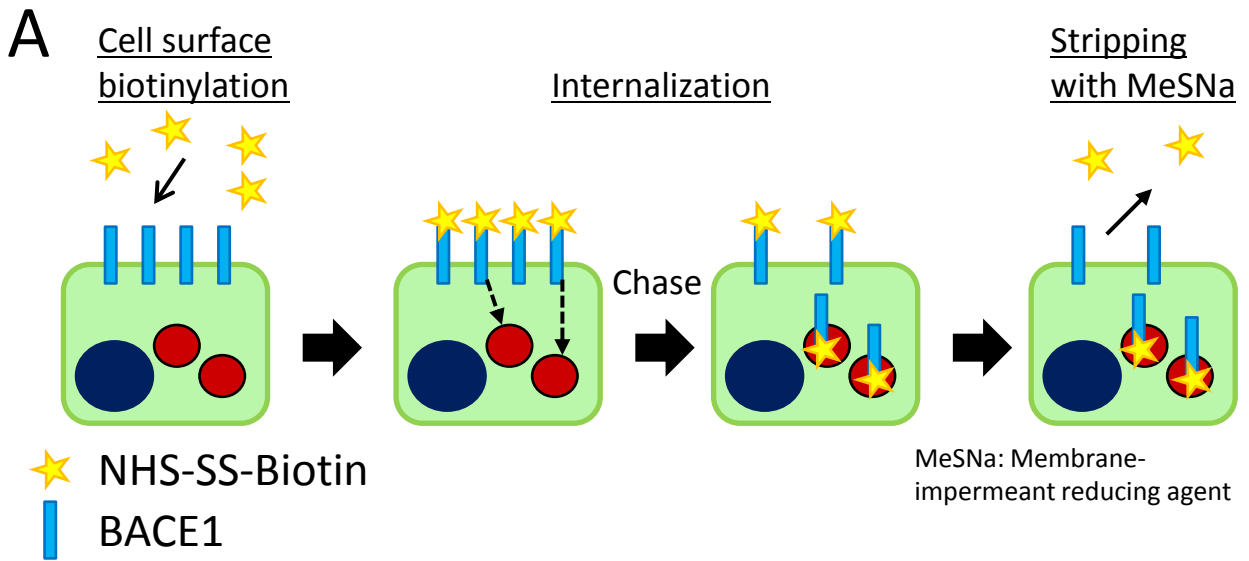


図20. 神経系培養細胞でのBin1ノックダウンによるBACE1のエンドサイトーシスへの影響(細胞表面biotin化による生化学的endocytosis assay)

(A) 本実験の概略図

(B) Bin1もしくはNon Target siRNA処理を行ったN2a細胞を用い、細胞表面biotin化によるBACE1の生化学的endocytosis assayを行った。

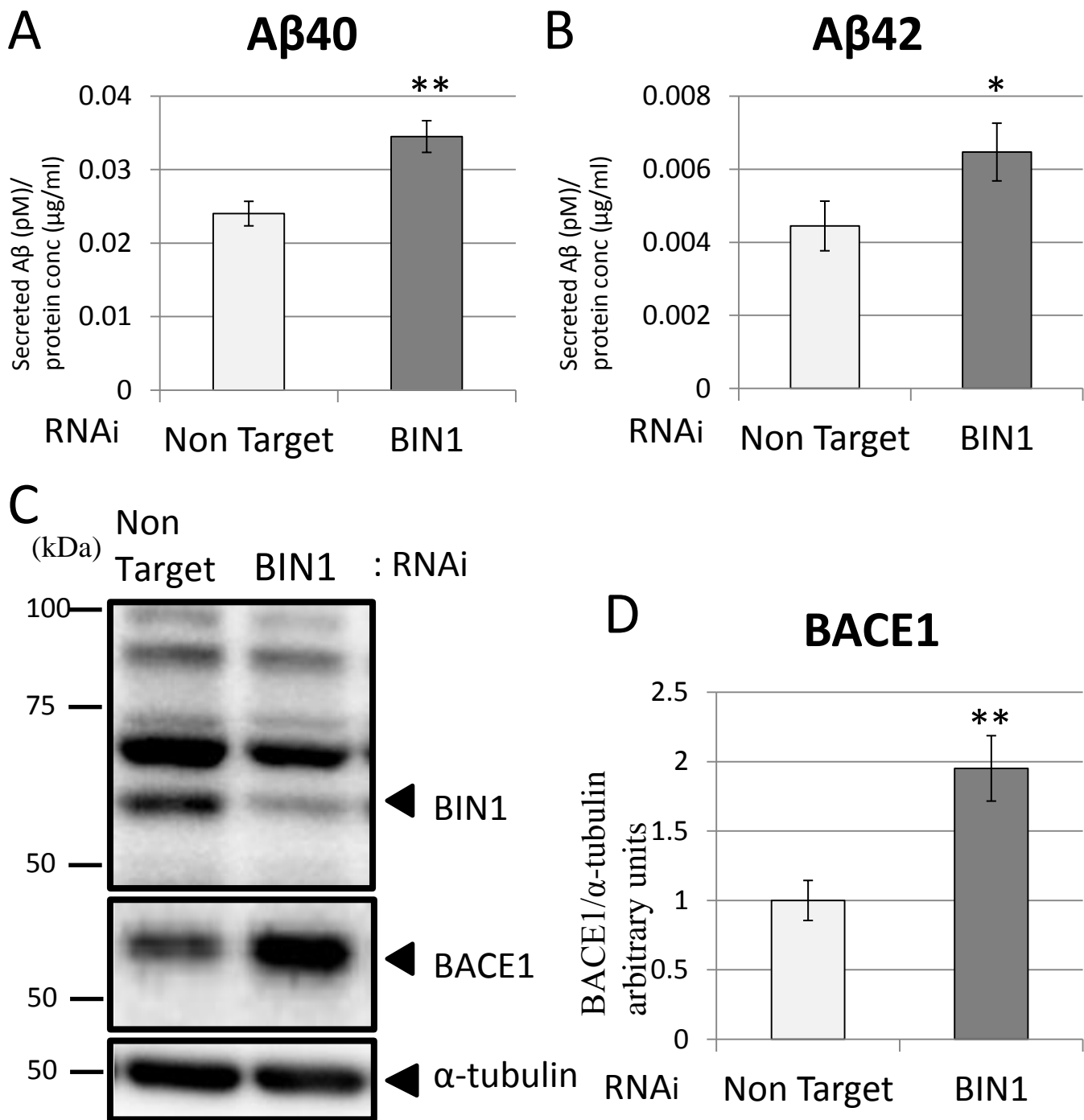


図21. 非神経系培養細胞でのBIN1ノックダウンによる分泌Aβ, SNAP-BACE1タンパクへの影響

SNAP-BACE1恒常発現HeLa細胞にAPPを一過性発現させ、BIN1あるいはNon Target siRNA処理を行った。

(A, B) sandwich ELISA法で分泌Aβ40, Aβ42量を測定した (n=12, mean±SEM, *p<0.05, **p<0.005)。

(C, D) ウェスタンブロット解析においてAPPまたはBACE1の相対的なバンドシグナル強度を定量した (n=8, mean±SEM, **p<0.005)。

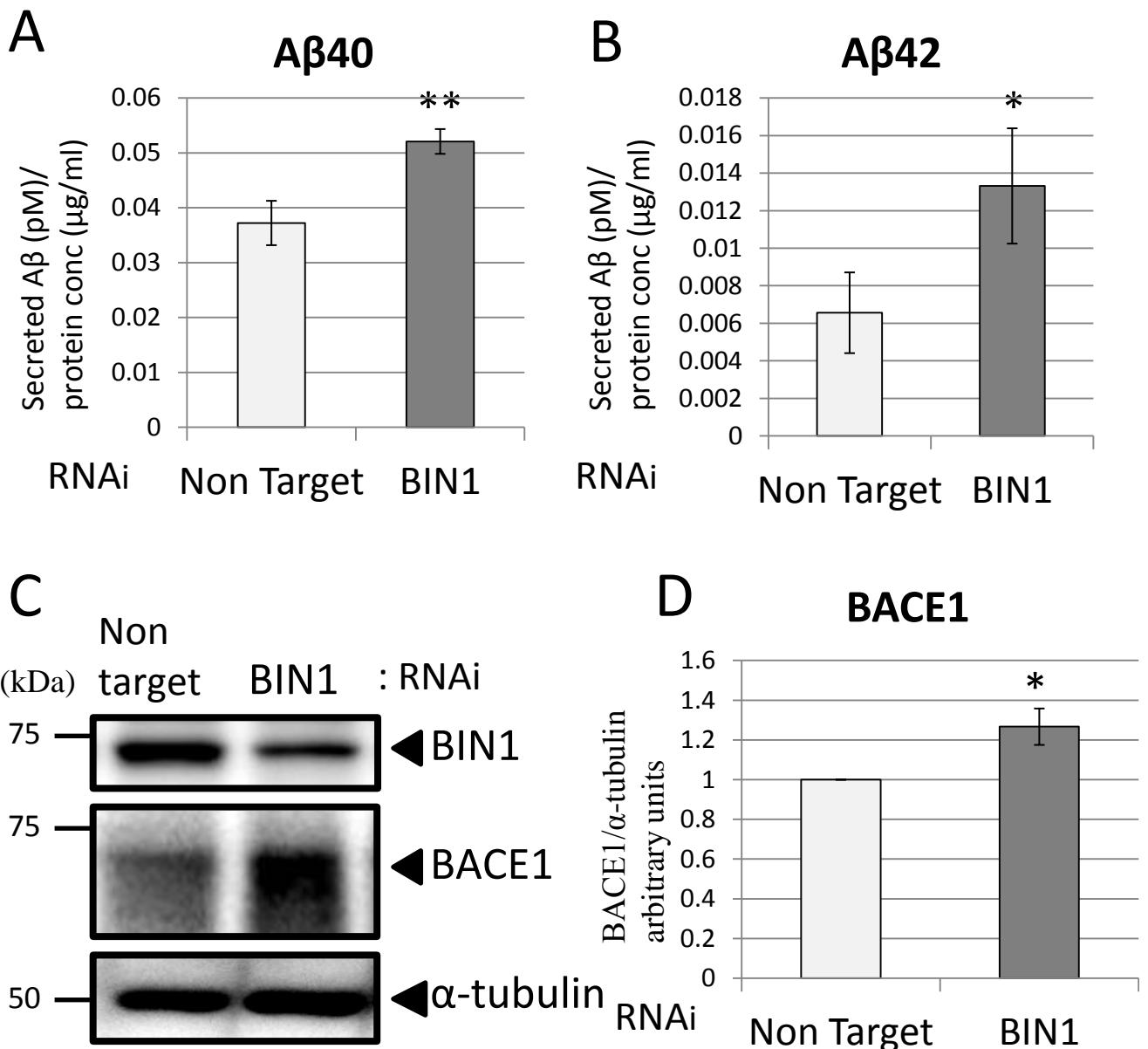


図22. 非神経系培養細胞でのBIN1ノックダウンによる分泌Aβ, BACE1-GFPタンパクへの影響

BACE1-GFP恒常発現HeLa細胞にAPPを一過性発現させ, BIN1あるいはNonTarget siRNA処理を行った.

(A, B) sandwich ELISA法で分泌Aβ40, Aβ42量を測定した(n=7, mean±SEM, *p<0.05, **p<0.005).

(C, D)ウエスタンブロット解析においてBACE1の相対的なバンドシグナル強度を定量した(n=5, mean±SEM, *p<0.005).

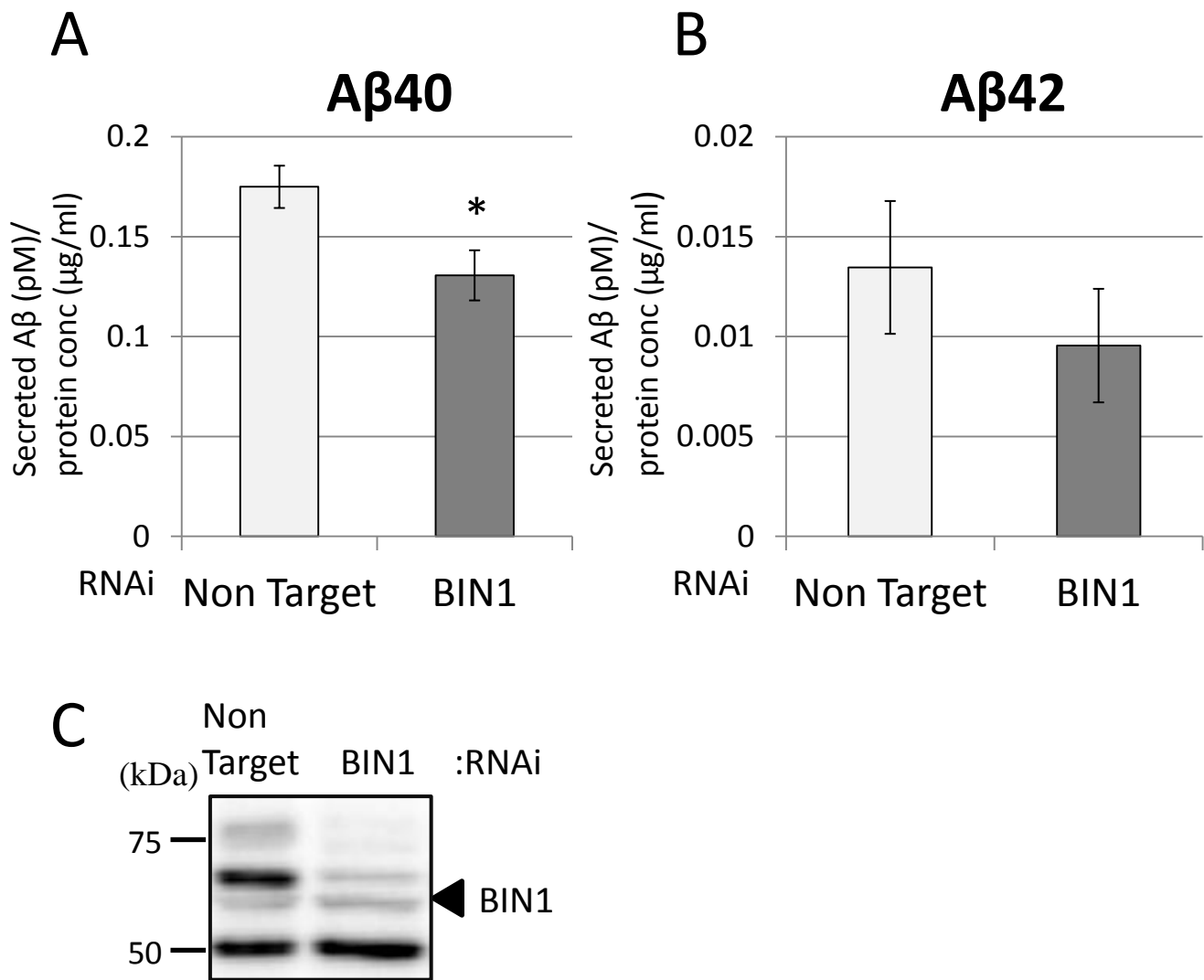
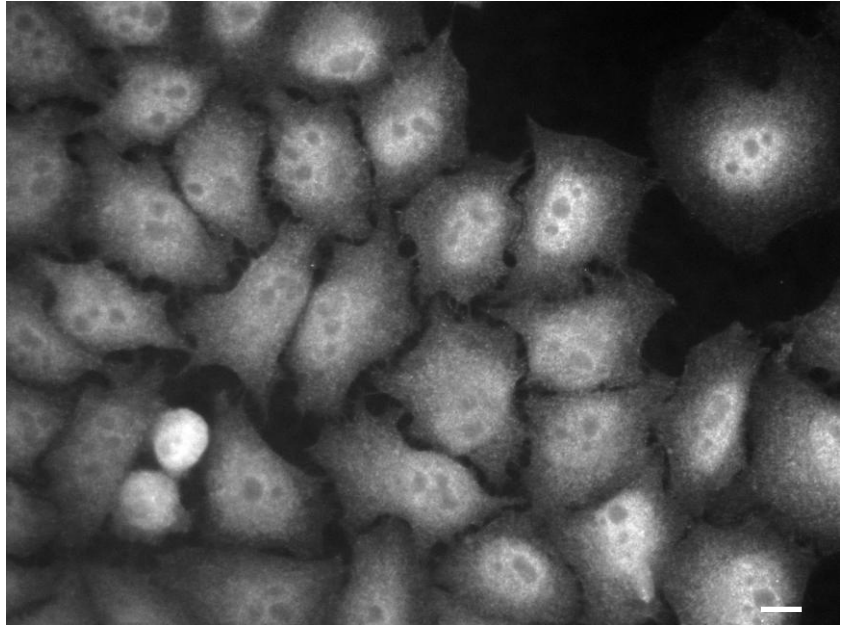


図23. γ -secretase基質C99発現HeLa細胞でのBIN1ノックダウンによる分泌A β への影響

APP由来の γ -secretase基質APP C99を一過性発現させたHeLa細胞に、BIN1あるいはNon Target siRNA処理を行い、sandwich ELISA法で分泌A β 40, A β 42量を測定し、タンパク量で除した (n=4, mean \pm SEM, *p<0.05) (A, B). ウェスタンブロット解析によるBIN1ノックダウンの確認(C).

BIN1 (C99D)

Non
Target
RNAi



BIN1
RNAi

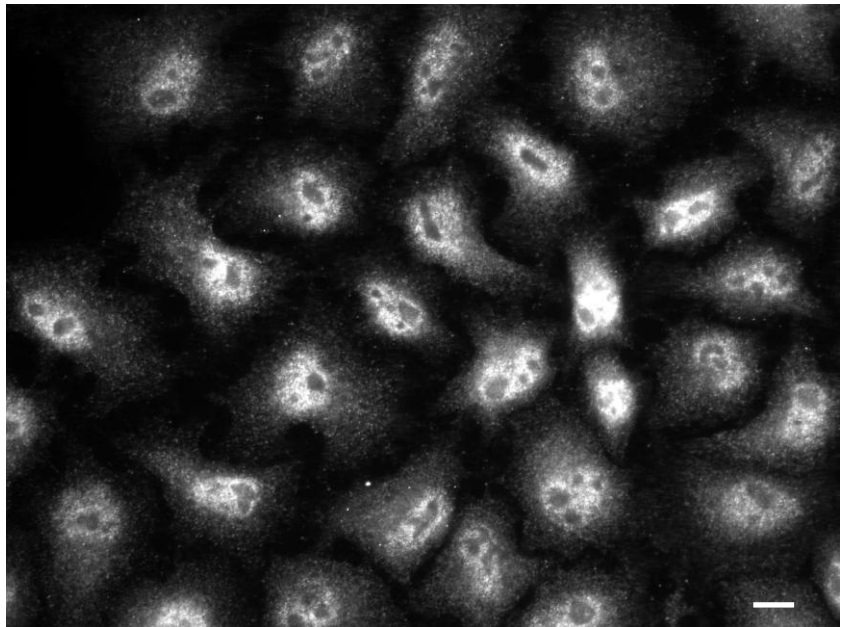


図24. HeLa細胞でのBIN1ノックダウン効率と染色像

HeLa BACE1-GFP発現細胞に対し、BIN1 もしくはNon Target siRNA処理を行い、抗BIN1抗体(C99D)で免疫細胞化学を行った(Bar = 10 μ m).

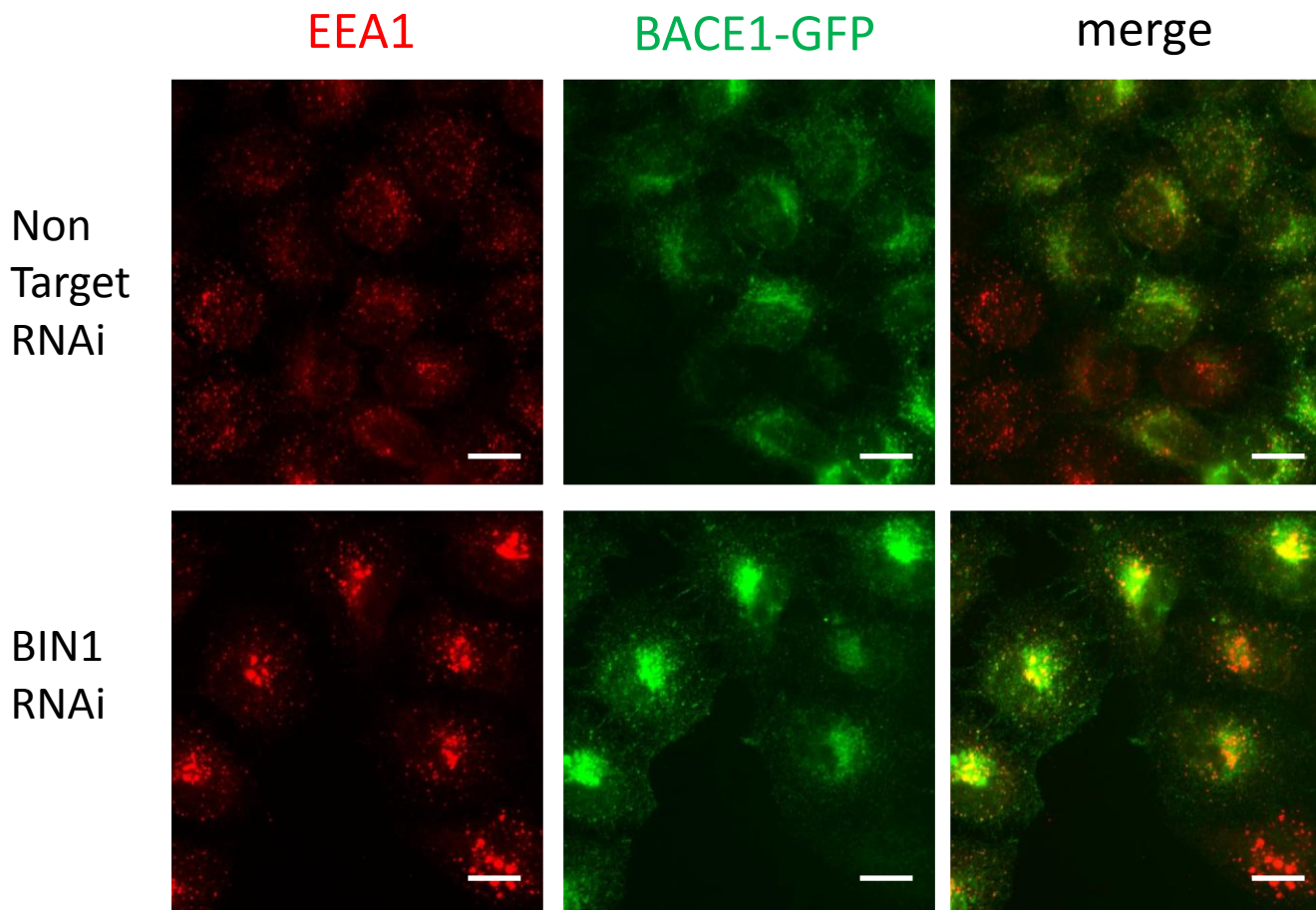


図25. BACE1-GFPと初期エンドソームとの局在

HeLa BACE1-GFP発現細胞に対し，BIN1もしくはNon Target siRNA処理を行い，免疫細胞化学を行った．初期エンドソームマーカーとして，抗EEA1抗体を用いて染色した(Bar = 10 μ m).

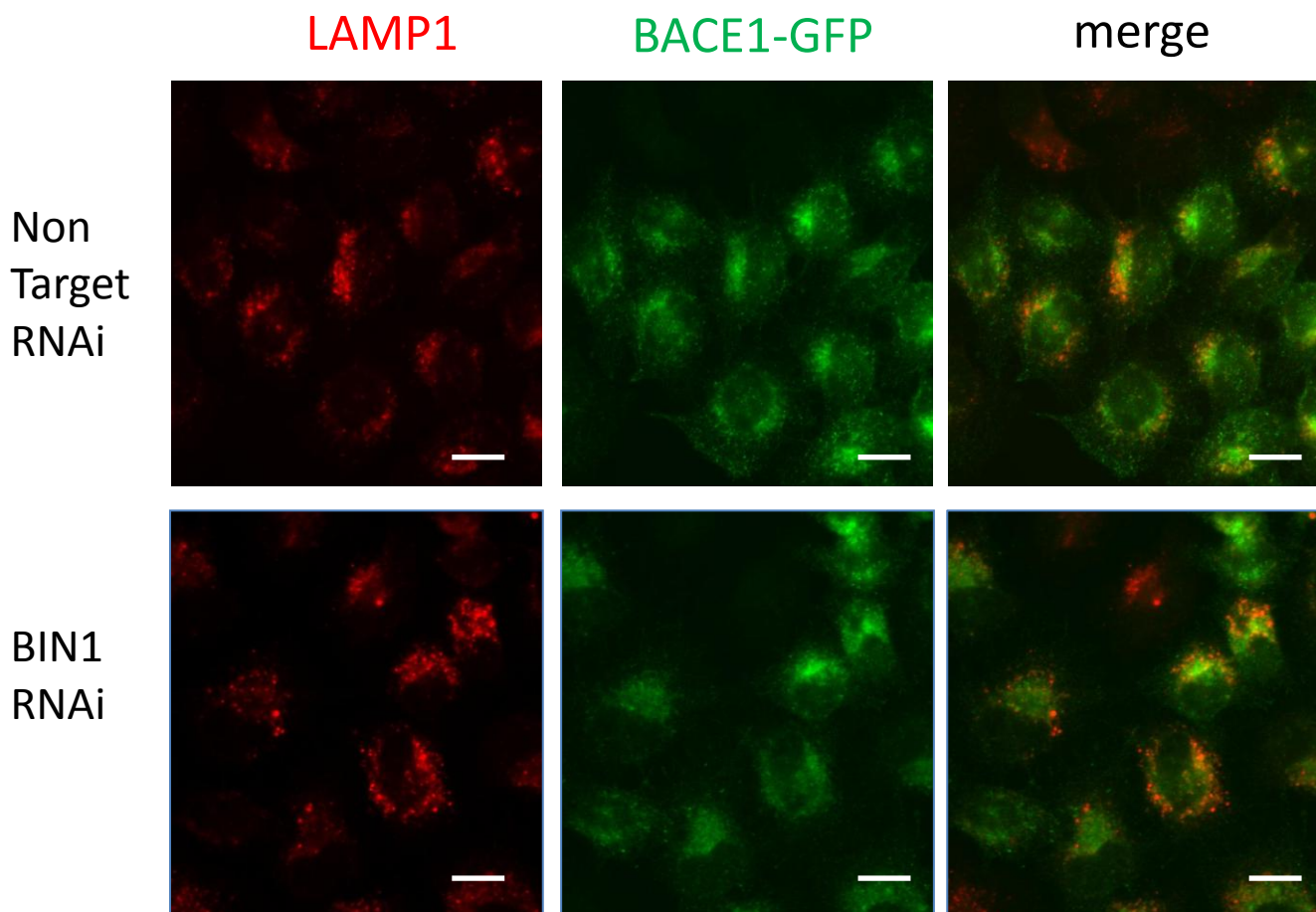


図26. BACE1-GFPと後期エンドソーム～ライソソームとの局在

HeLa BACE1-GFP発現細胞に対し，BIN1もしくはNon Target siRNA処理を行い，免疫細胞化学を行った．後期エンドソーム～ライソソームマーカーとして，抗LAMP1抗体を用いて染色した（Bar = 10 μ m）．

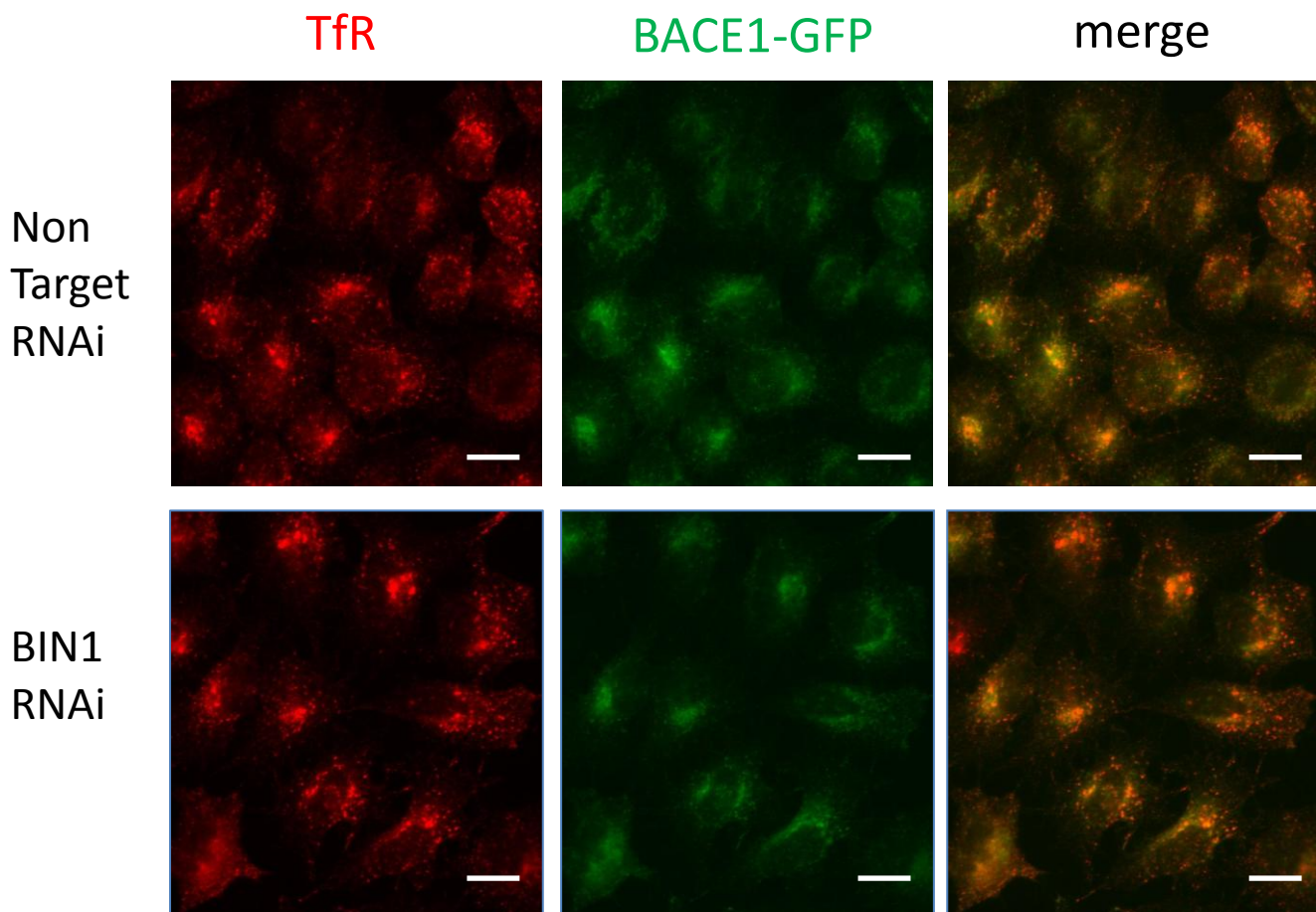


図27. BACE1-GFPとリサイクリングエンドソームとの局在

HeLa BACE1-GFP発現細胞に対し，BIN1もしくはNon Target siRNA処理を行い，免疫細胞化学を行った．リサイクリングエンドソームマーカーとして，抗トランスフェリン受容体（TfR）抗体を用いて染色した（Bar = 10 μ m）．

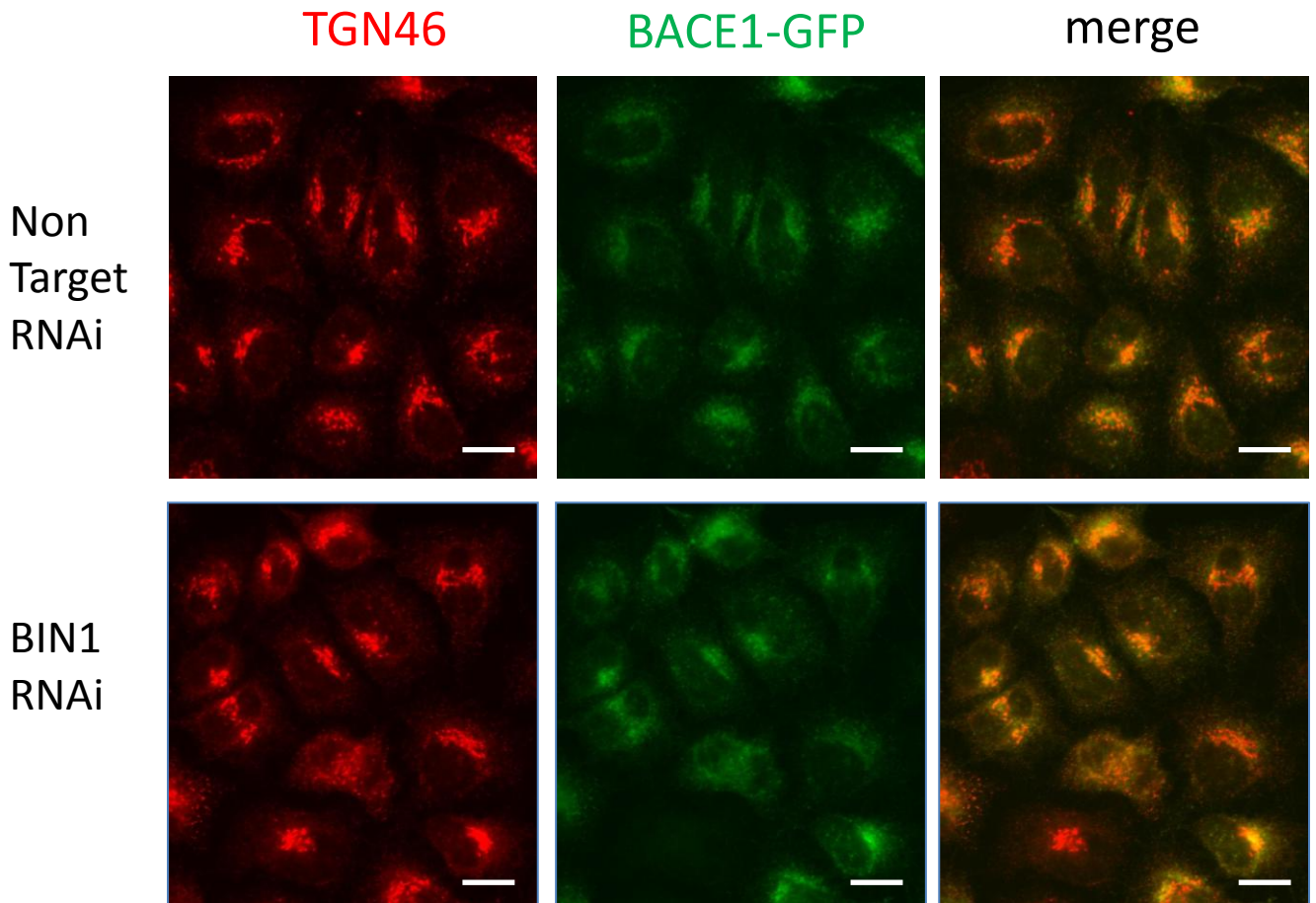


図28. BACE1-GFPとTGNとの局在

HeLa BACE1-GFP発現細胞に対し，BIN1もしくはNon Target siRNA処理を行い，免疫細胞化学を行った．TGNマーカーとして，抗TGN46抗体を用いて染色した(Bar = 10 μ m)．

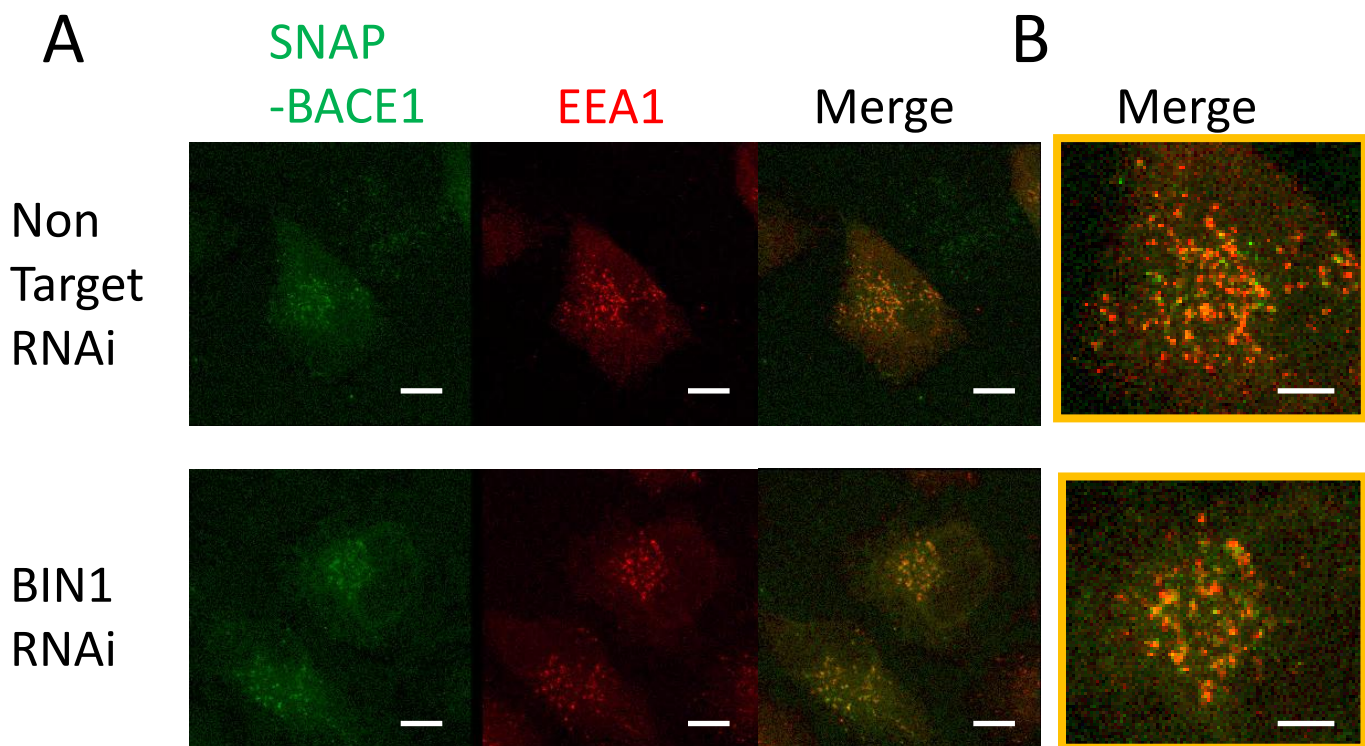


図29. ligand uptake assayによる細胞表面のSNAP-BACE1の取り込みと初期エンドソームとの局在の経時的変化(30分)

BIN1もしくはNon Target siRNA処理を行ったHeLa SNAP-BACE1細胞と膜非透過性基質のSNAP-Surface Alexa Fluor 488(緑)を用いることで細胞表面のSNAP-BACE1を選択的にラベリングし、反応30分後の初期エンドソームとの局在を解析した。初期エンドソームマーカーとして、抗EEA1抗体を用いて染色した(A; Bar = 10 μm , B; Bar = 5 μm)。

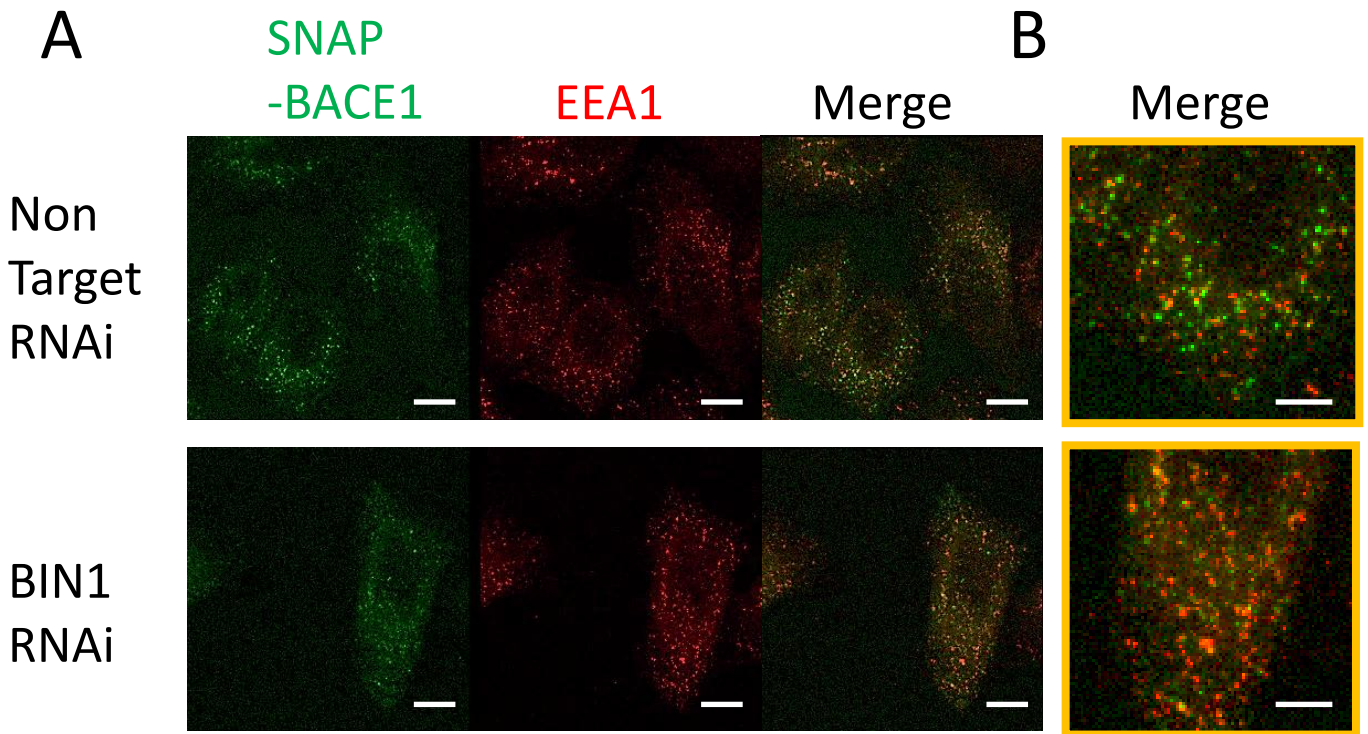


図30. ligand uptake assayによる細胞表面のSNAP-BACE1の取り込みと初期エンドソームとの局在の経時的変化(120分)

BIN1もしくはNon Target siRNA処理を行ったHeLa SNAP-BACE1細胞と膜非透過性基質のSNAP-Surface Alexa Fluor 488(緑)を用いることで細胞表面のSNAP-BACE1を選択的にラベリングし、反応120分後の初期エンドソームとの局在を解析した。初期エンドソームマーカーとして、抗EEA1抗体を用いて染色した(A; Bar = 10 μm , B; Bar = 5 μm)。

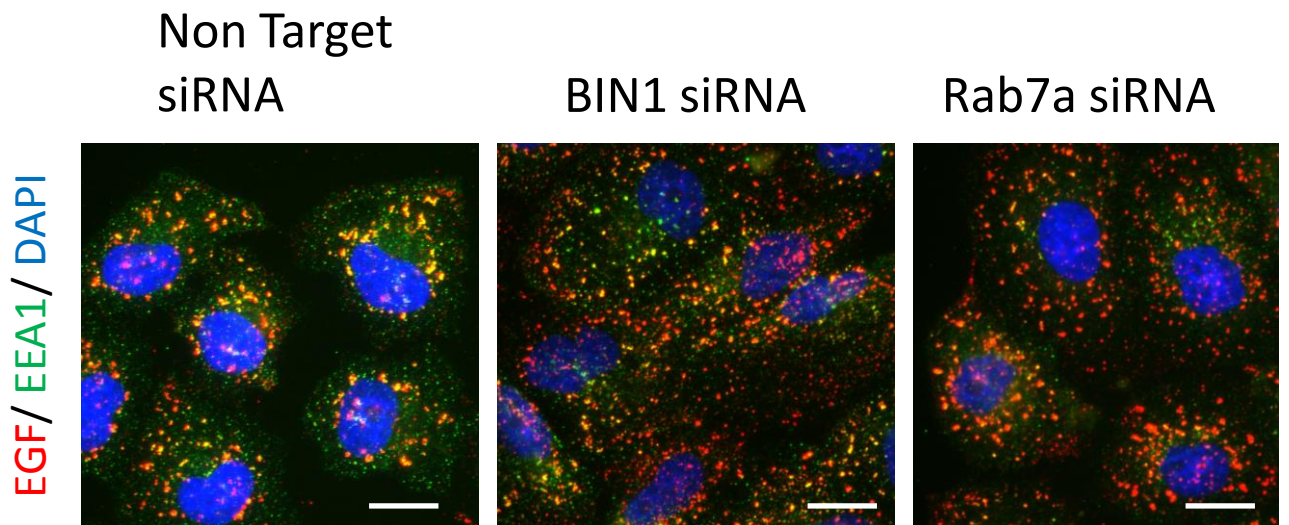


図31. ligand uptake assayによる細胞表面のEGFの取り込みと初期エンドソームとの局在の経時的変化(30分).

Non Target siRNA, BIN1 siRNA, Rab7a siRNA処理を行ったHeLa細胞にEGF coupled to Alexa Fluor 555(赤)を取り込ませ, 反応30分後の初期エンドソームとの局在を解析した. 初期エンドソームマーカーとして抗EEA1抗体(緑), 核はDAPI(青)を用いて染色した(Bar = 10 μ m).

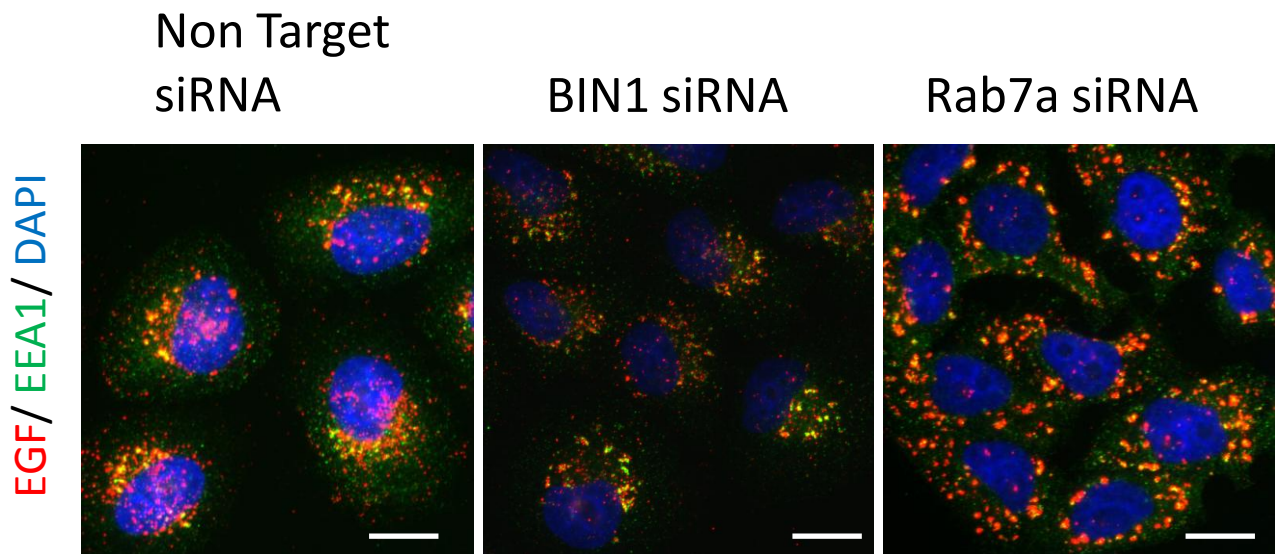


図32. ligand uptake assayによる細胞表面のEGFの取り込みと初期エンドソームとの局在の経時的変化(60分).

Non Target siRNA, BIN1 siRNA, Rab7a siRNA処理を行ったHeLa細胞にEGF coupled to Alexa Fluor 555(赤)を取り込ませ, 反応60分後の初期エンドソームとの局在を解析した. 初期エンドソームマーカーとして抗EEA1抗体(緑), 核はDAPI(青)を用いて染色した(Bar = 10 μ m).

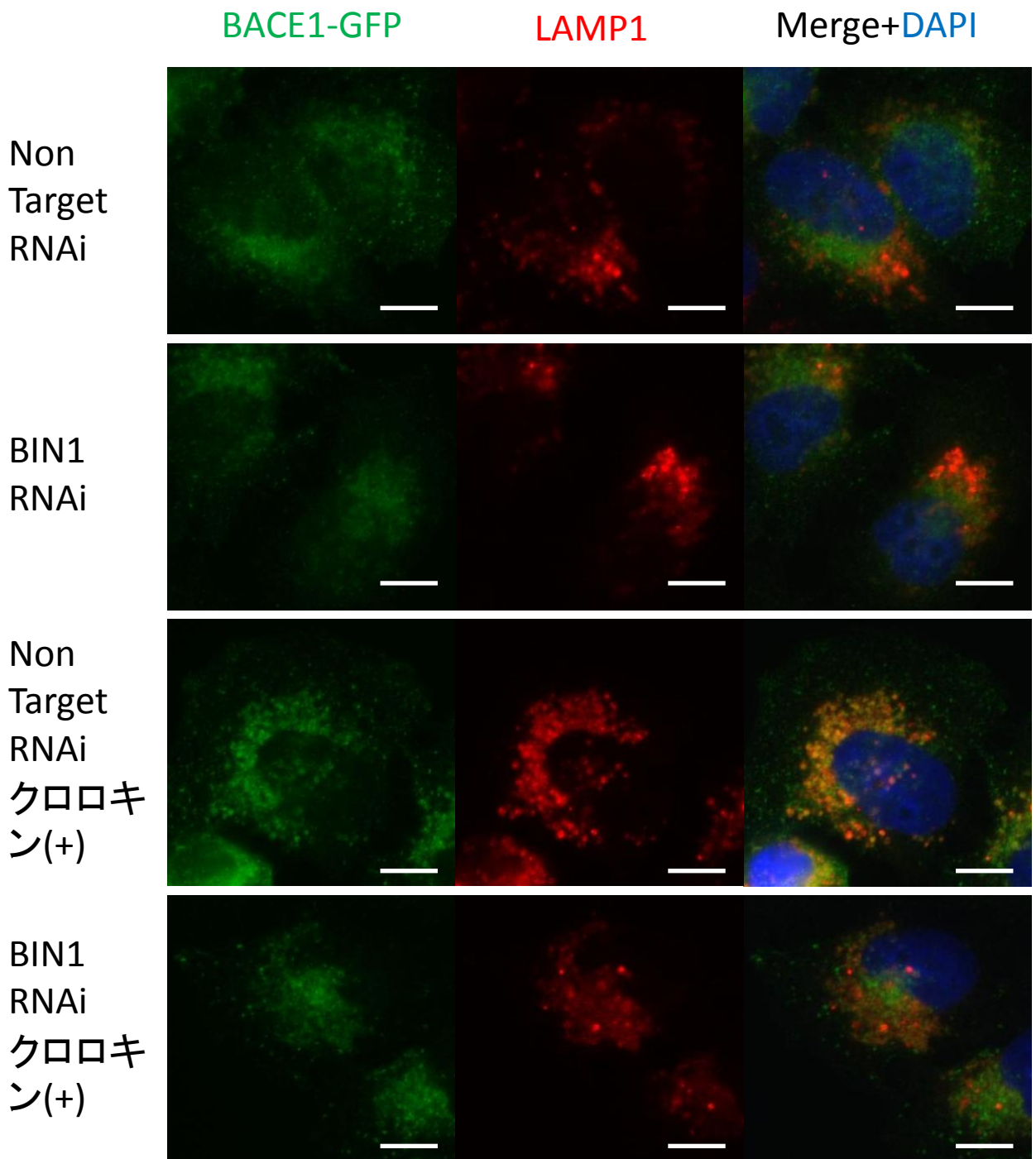


図33. BACE1-GFPと後期エンドソーム～ライソソームとの局在.

HeLa BACE1-GFP発現細胞に対して、Non TargetもしくはBIN1 siRNA処理を行い、細胞免疫化学を行った。クロロキン処理群ではクロロキンを20 μ Mになるよう培地に添加し、6時間後に無添加群と同時に固定した。後期エンドソーム～ライソソームマーカーとして抗LAMP1抗体、核をDAPIを用いて染色した(Bar = 10 μ m)。

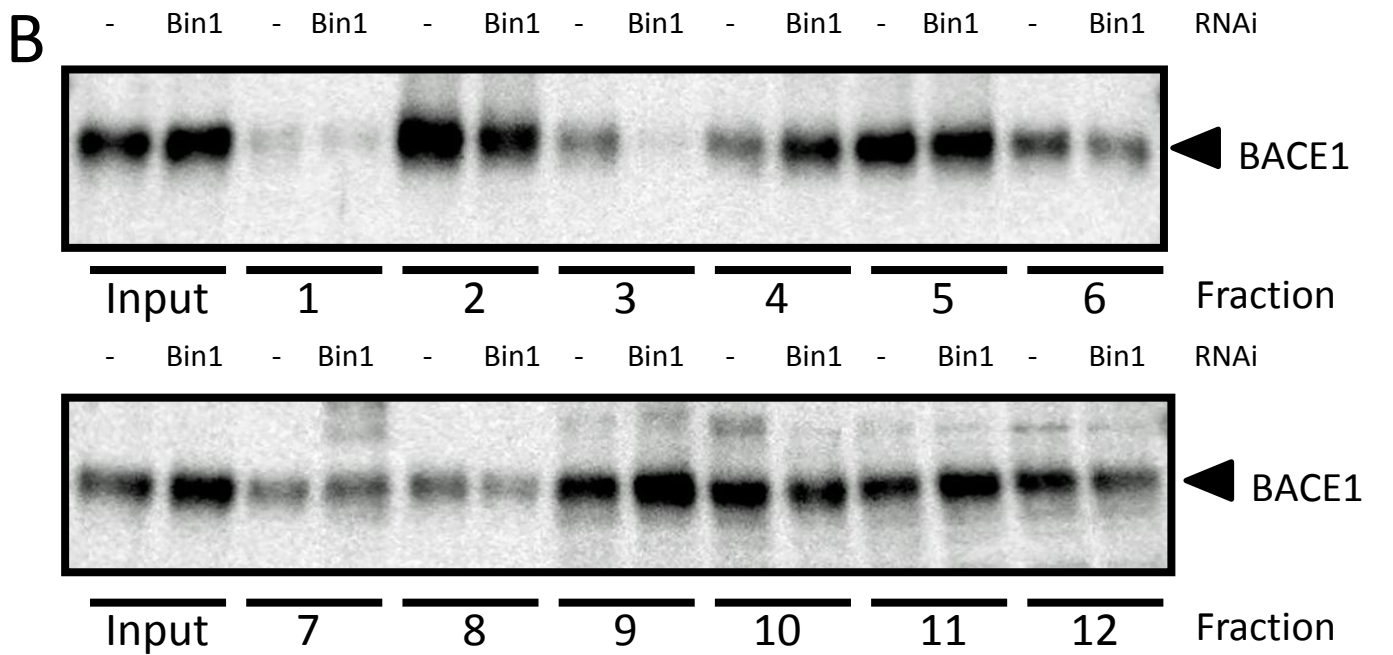
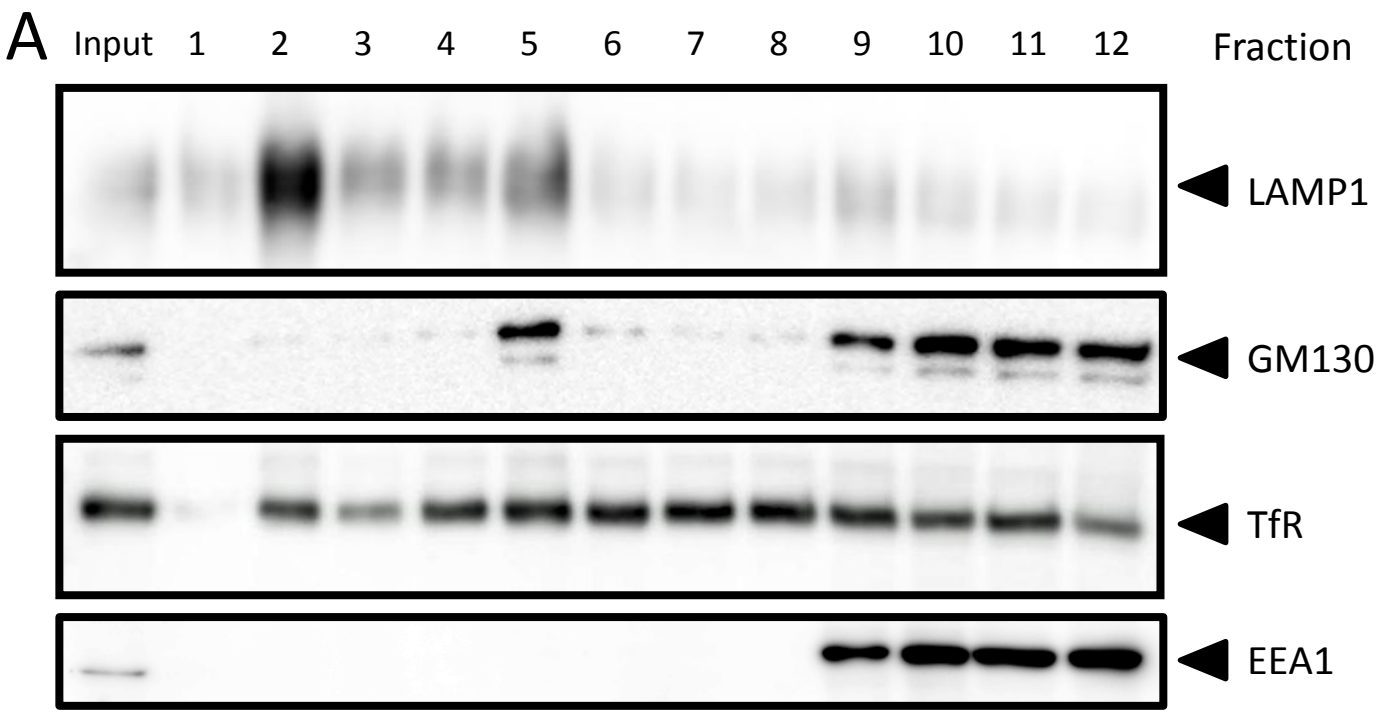


図34. ショ糖密度勾配遠心法によるエンドソーム画分分離.

Bin1もしくはNon Target siRNA処理をしたN2a細胞から、ショ糖密度勾配遠心法により、fraction 1-12を得た。

(A) 各fractionにおけるオルガネラの分布. 後期エンドソームはLAMP1, ゴルジ複合体はGM130, リサイクリングエンドソームはトランスフェリン受容体(TfR), 初期エンドソームはEEA1をそれぞれオルガネラマーカーとして使用した。

(B) Bin1 siRNAとNon Target siRNA処理でのBACE1分布の変化. BIN1 siRNAを「Bin1」, Non Target siRNAを「-」で表記。

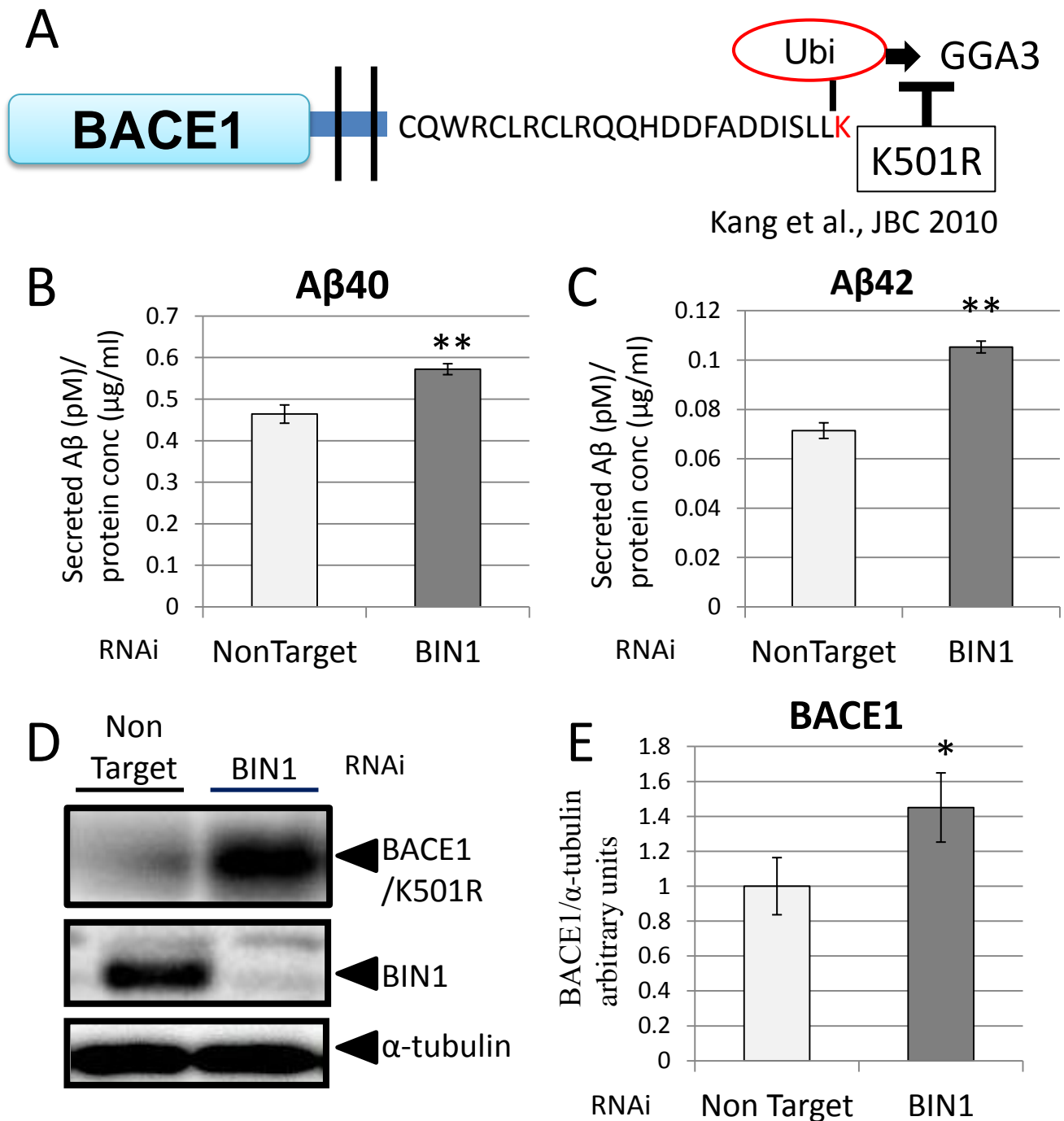


図35. BACE1 K501R発現培養細胞でのBIN1ノックダウンによる分泌Aβ, BACE1 K501Rへの影響

BIN1もしくはNon Target siRNA処理を行ったHeLa細胞に, APPとBACE1 K501Rを発現させた.

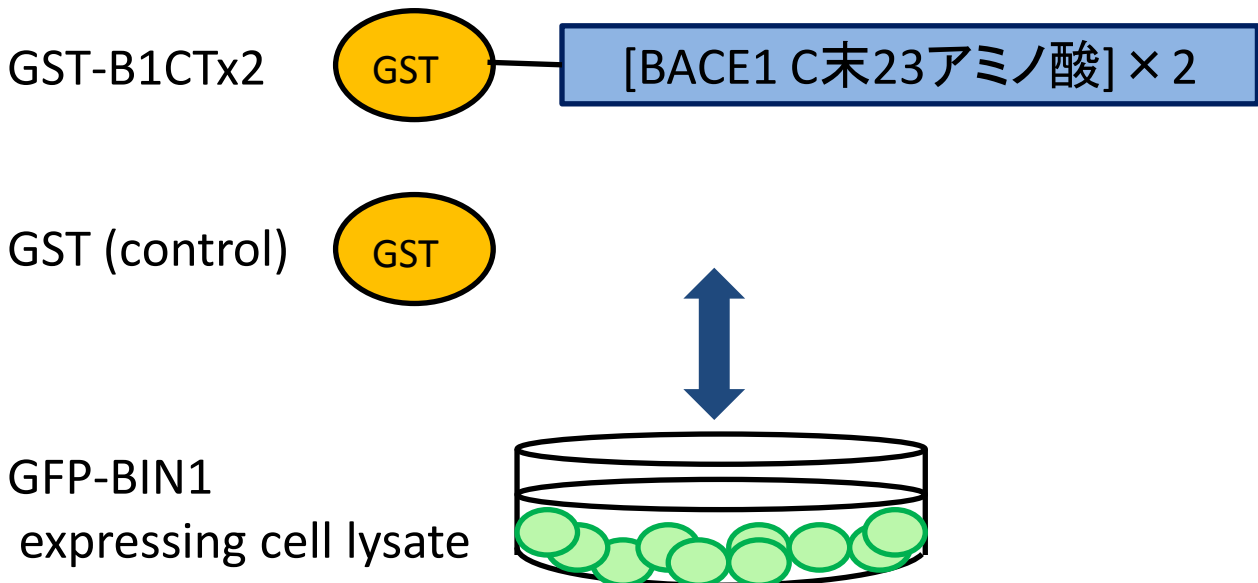
(A) BACE1 K501Rの模式図.

(B, C) BIN1 siRNAとNon Target siRNA処理での分泌Aβ量 (n=6, **p<0.005).

(D) ウェスタンブロット解析. 抗BACE1抗体として抗BACE1(42)抗体.

(E) ウェスタンブロット解析においてBACE1の相対的なバンドシグナル強度を定量した) (n=4, *p<0.05).

A



B

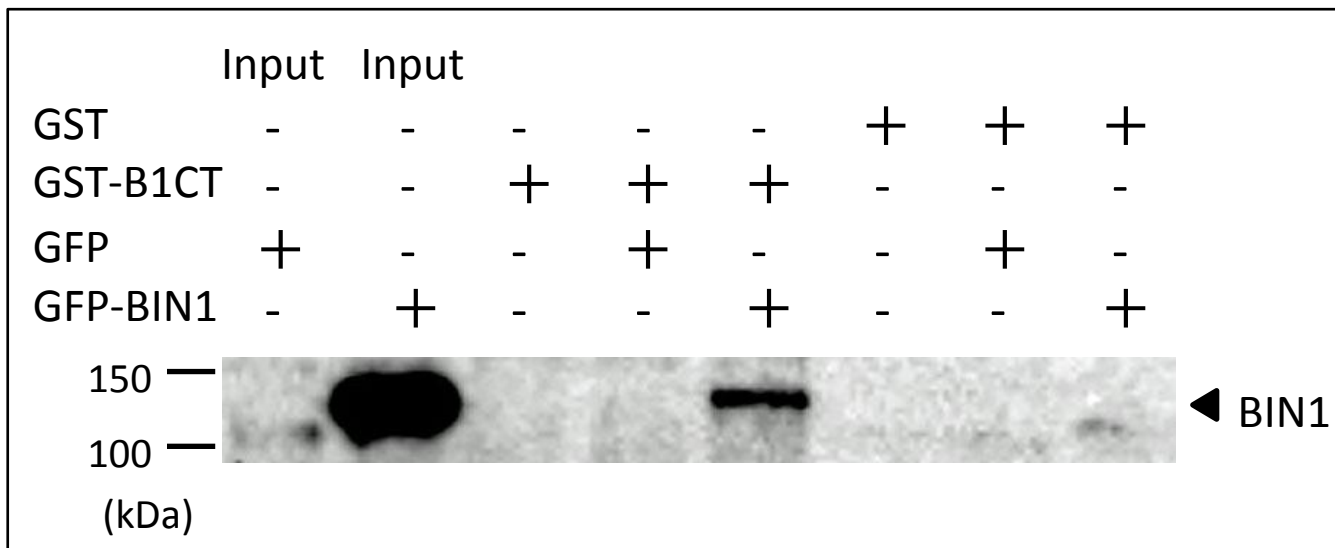


図36. GST pull-down assayによるBIN1とBACE1細胞内領域との結合解析

一過性にGFP-BIN1全長(FL)もしくはGFPのみを発現したHeLa細胞より調製したcell lysateと、BACE1C末端細胞内ドメインの23アミノ酸をタンデムで付加したHis-GST融合リコンビナントタンパク質(GST-B1CT)とHis-GST単体(GST)のみとでGST pull-down assayを行った。解析は抗BIN1抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。

(A) 本実験系の模式図。

(B) ウエスタンブロット解析



BIN1 Isoform 1 FL



BIN1 Isoform 1 ΔBAR



BIN1 Isoform 1 ΔSH3

図37. 用いたBIN1全長と欠失変異体の模式図

- ・BIN1はCNS isoformで最長のisoform 1を使用.
- ・BIN1ΔBARはBARドメインを欠失, BIN1ΔSH3はSH3ドメインをそれぞれ欠失させた変異体.
- ・N末にGFPもしくはMycタグを付加.

GST	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
GST-B1CTx2	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
GFP	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
GFP-BIN1 FL	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
GFP-BIN1 ΔBAR	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
GFP-BIN1 ΔSH3	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+

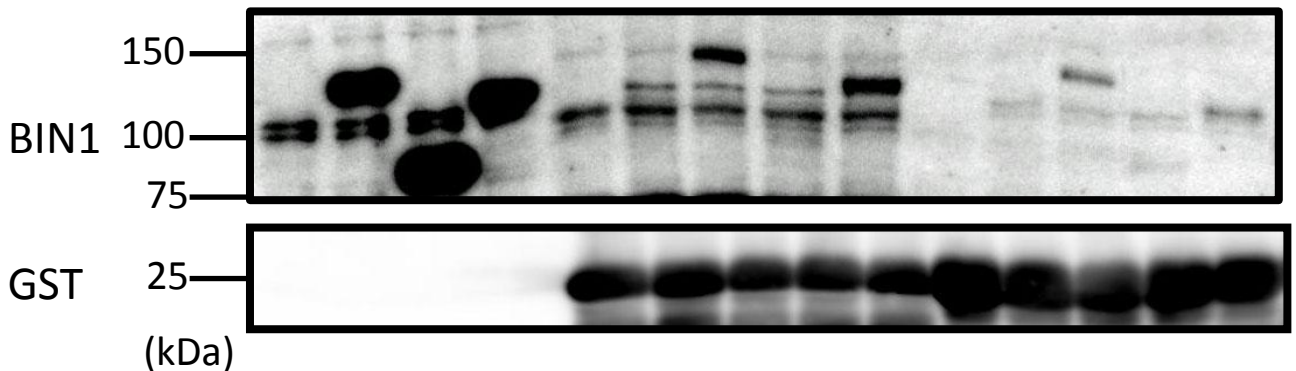


図38. GST pull-down assayによるBIN1全長および欠失変異体とBACE1細胞内領域との結合解析

一過性にGFP-BIN1全長 (FL), GFP-BIN1ΔBAR, GFP-BIN1ΔSH3, GFPのみのいずれかを発現したHeLa細胞より調製したcell lysateと, GSTにBACE1C末端細胞内ドメインの23アミノ酸をタンデムで付加したHis-GST融合リコンビナントタンパク質 (GST-B1CT×2) とHis-GST単体 (GST) とでGST pull-down assayを行った. 解析は抗BIN1抗体および抗GST抗体を用いてウエスタンブロット解析で行った.

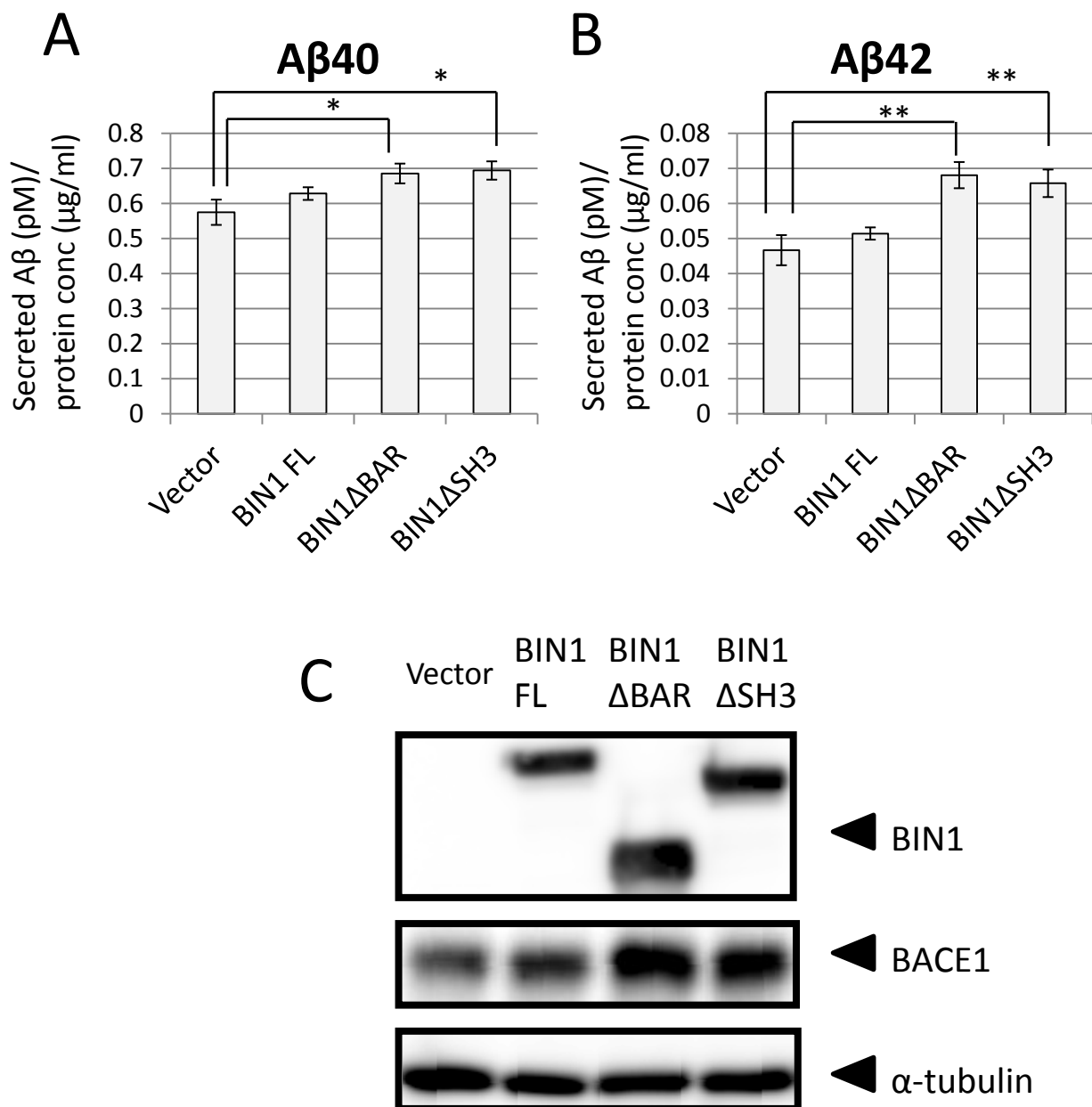


図39. BIN1全長と欠失変異体発現による神経系培養細胞での分泌Aβに対する影響

N2a細胞にMycタグをつけたBIN1 FL, BIN1ΔBAR, BIN1ΔSH3, 空ベクターのいずれかを一過性に発現させて, 分泌Aβ量をsandwich ELISA法(A, B), BACE1タンパク発現量をウエスタンブロット解析で検討した(C) (n=6, mean±SEM, *p<0.05, **p<0.005).

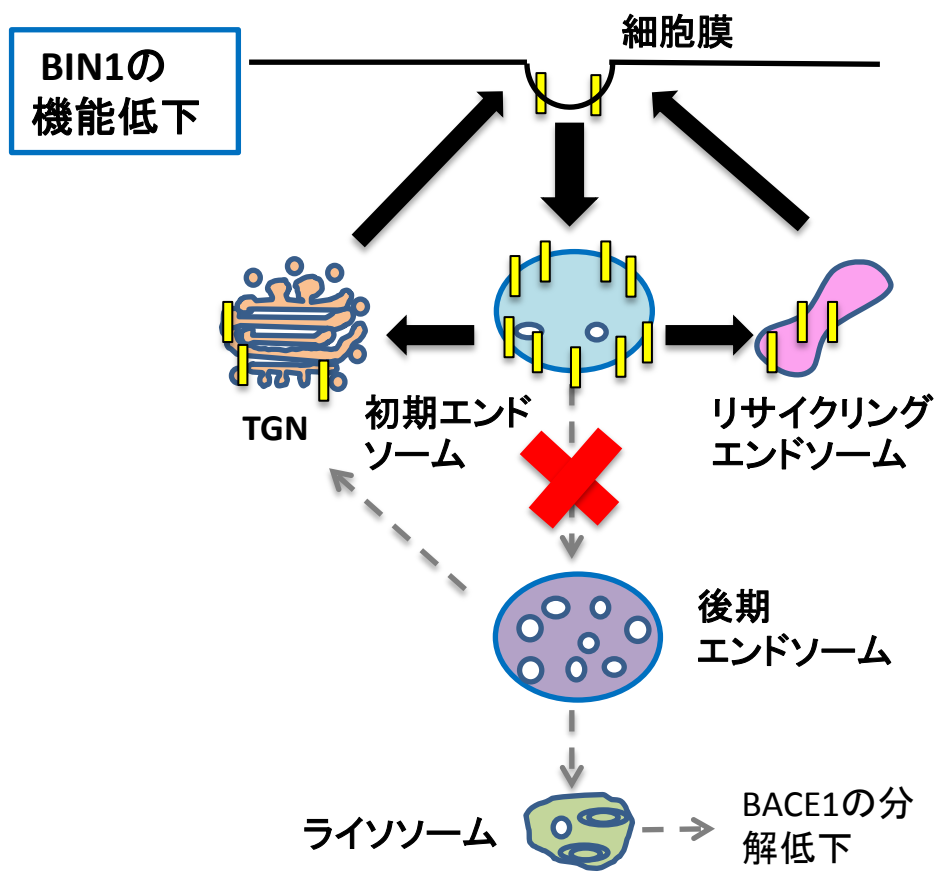
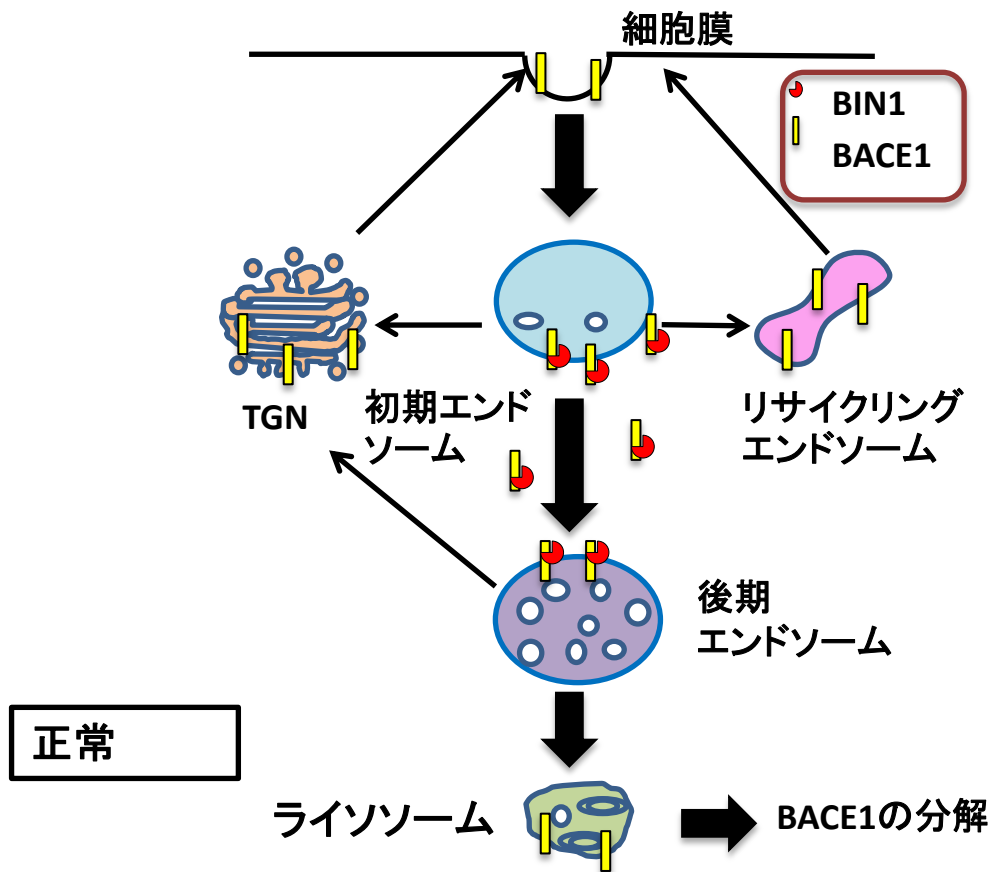


図40. BIN1によるBACE1細胞内輸送の制御

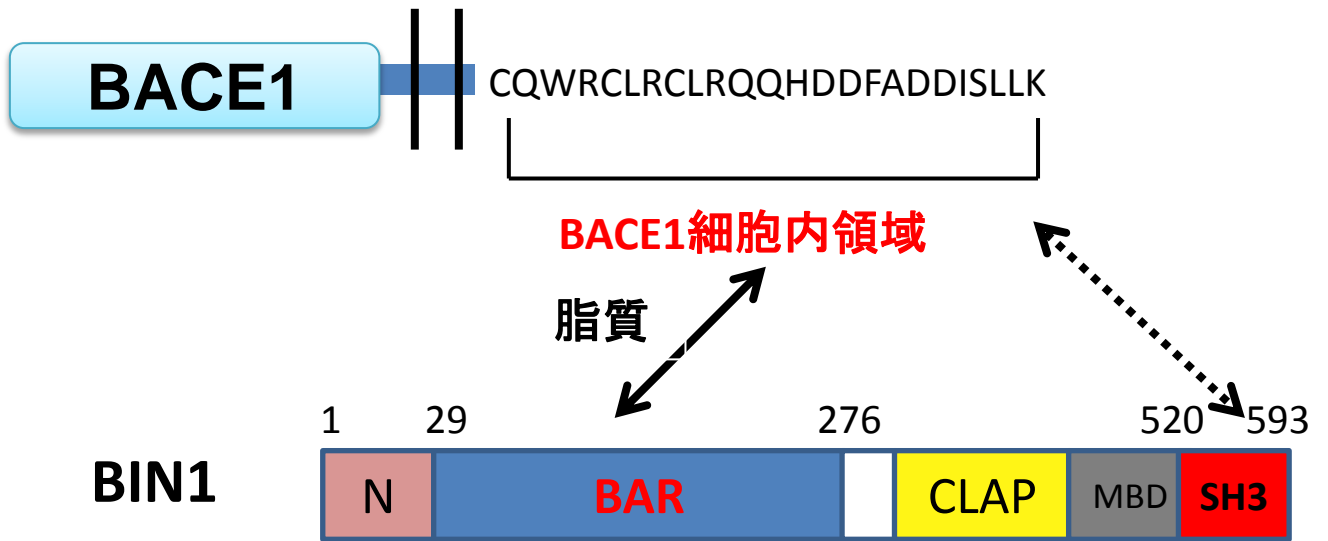


図41. BIN1とBACE1の相互作用部位

謝辞

本研究を遂行するにあたり、御指導、御高配を賜りました東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻・神経内科学教室 辻 省次 教授、ならびに、同・神経病理学分野 岩坪 威 教授に深謝いたします。

研究の遂行・論文執筆において直接御指導いただき、基礎研究の基本的な考え方や技術、面白さ、奥深さ、そして難しさを教えていただきました東京大学大学院薬学系研究科臨床薬学教室 富田 泰輔 准教授、諸橋 雄一 前助教には深く感謝申し上げます。また、主な研究の場として基礎研究を行わせていただいた臨床薬学教室の皆さまには、技術的な御指導・アイディアの御提案など多岐にわたってお世話になりました。医療、基礎研究、製薬、今後も様々な分野で御活躍されることを祈念申し上げるとともに、力を合わせてアルツハイマー病をはじめとした疾患の克服に取り組んでいけることを切に願っております。神経内科学教室、神経病理学教室、臨床薬学教室の皆さまにこの場を借りて心より感謝申し上げます。

Cre リコンビナーゼ発現レンチウイルスのプラスミドを御供与いただきました東京大学大学院医学系研究科神経生化学教室 尾藤 晴彦 教授に深く感謝申し上げます。

本研究で用いた *Bin1^{flox/flox}* マウスを御供与いただきました Dr. George C Prendergast, Dr. James B. DuHadaway (Lankenau Institute for Medical Research) に厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究を遂行するにあたり、研究に供された全ての小さな命たちへ心より感謝の意を表します。

宮川 統爾