

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 宮川統爾

【序論】

世界的な高齢化社会の進展に伴い、認知症の背景疾患として最も多いアルツハイマー病 (AD) の病態機序の理解とそれに基づいた根本治療薬開発は人類の急務である。近年、Genome-Wide Association Study (GWAS) により、AD の伝学的危険因子として最大の影響を有する *ApoE* ϵ 4 アレルに次いで AD 発症への寄与が大きい遺伝学的危険因子として *Bridging-Integrator 1 (BIN1)* が同定された。BIN1 は N 末に BAR ドメイン、C 末に SH3 ドメインを有する BAR ドメインファミリーに分類される分子である (図 1)。中枢神経系に特異的に発現するものを含めて 10 種類以上の alternative isoforms が存在し、細胞内小胞輸送、ガン抑制、筋の形態形成、など複数の生理機能を有することが報告されている。GWAS で得られた遺伝子のコードするタンパクのパスウェイ解析では AD 発症メカニズムと細胞内輸送との関連が示唆されていることから、BIN1 も細胞内輸送に関わる作用により AD 発症に寄与すると考えられているが、具体的な機序について不明である。アミロイド β タンパク (A β) は AD の発症機序として広く支持されているアミロイドカスケード仮説 (図 2) で最も重要な疾患鍵分子である。A β 産生経路のキープレーヤーとなる APP, BACE1, γ -secretase がいずれも細胞内小胞輸送による制御を受けていることから、私は本研究において、BIN1 と A β 産生経路に関わる細胞内輸送の関連について検討を行った。

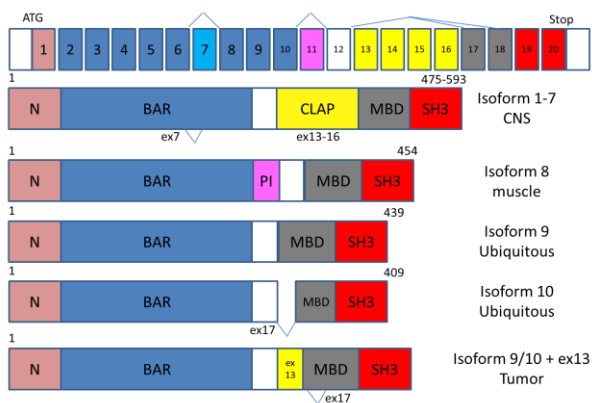


図1. BIN1の構造

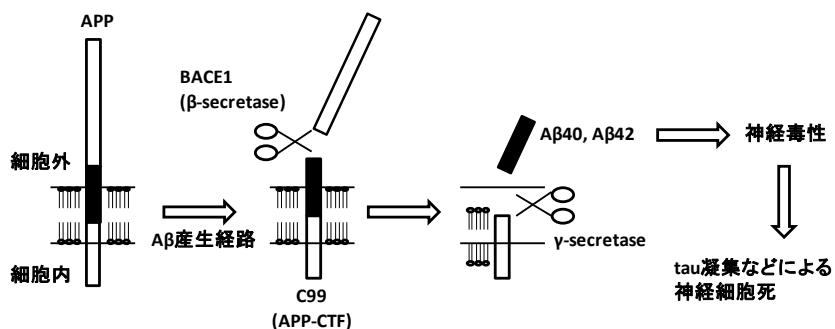


図2. A β 産生経路とアミロイドカスケード仮説

【結果】

1. BIN1 は BACE1 タンパクの制御を介して A β 産生量を変化させる

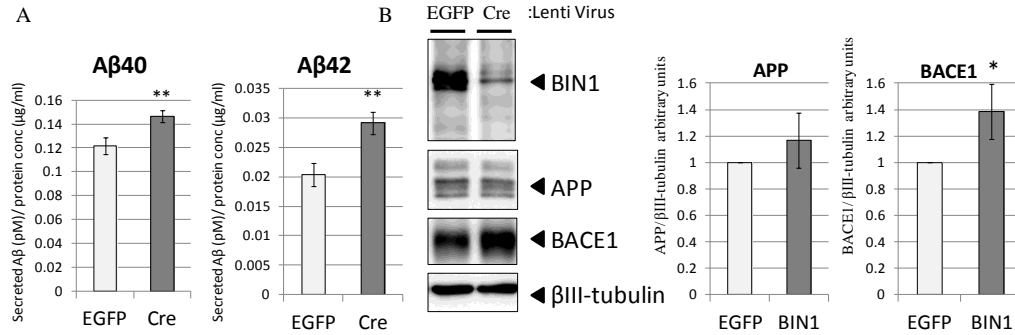


図3. 神経細胞におけるBIN1ノックアウトによる分泌A β 量への影響

出生直後BIN1 flox/floxマウス由来primary cortical neuron cultureにEGFP-NLS (EGFP)またはEGFP-NLS-Creリコンビナーゼ (Cre)を発現するレンチウイルスを感染させ、sandwich ELISA法による培地中のA β 測定と細胞のウェスタンブロット解析を行った。(n=6, *p<0.05, **p<0.005, mean \pm SEM.)

(A) A β 40量, A β 42量, (B) APP, BACE1タンパク発現量.

まずBIN1のADへの寄与を解明するため、初代培養神経細胞におけるBIN1のA β 産生系への影響を検討した。マウス *Bin1* 遺伝子の第3エクソンを loxP 配列によって挟んだ *Bin1*^{flox/flox} マウスを Prendergast 博士 (Lankenau Institute for Medical Research) よりご提供いただいた。出生直後の *Bin1*^{flox/flox} マウス産仔より primary cortical neuron culture を得て、レンチウイルスを用いて Cre リコンビナーゼを発現させて *Bin1* を *in vitro* においてノックアウトした。この初代培養神経細胞について sandwich ELISA 法による分泌 A β 量測定とウェスタンブロット解析を行ったところ、Cre 発現神経細胞において分泌 A β 40, A β 42 量の有意な増加を認めた (図 3-A)。また、ウェスタンブロット解析では BACE1 タンパクの有意な発現増加を認めた。すなわち、BACE1 タンパクの増加に伴う APP の β 切断亢進が *Bin1* 欠損による A β 産生増加に至るメカニズムと考えられた (図 3-B)。この *Bin1* タンパクの発現低下に伴う BACE1 タンパクと分泌 A β 量の増加は、神経系培養細胞である N2a 細胞, 非神経系培養細胞である HeLa-S3 細胞系に対する RNAi 実験においても確認され、*Bin1* による BACE1 タンパクの発現量調節は、細胞種や神経細胞の発生時期によらない普遍的な現象であることが示唆された。

2. BIN1 は BACE1 の初期エンドソームでの細胞内輸送を制御する

次に BIN1 が BACE1 の細胞内輸送を制御することでその発現量に影響を与えている可能性を検討するため、SNAP タグを N 末につけた BACE1 (SNAP-BACE1) を発現させた HeLa 細胞に対し、膜非透過性基質の SNAP-Surface Alexa Fluora 488 を用いて細胞表面の SNAP-BACE1 を標識し、細胞内への取り込みを経時的に追跡した。標識 30 分後には SNAP-BACE1 は初期エンドソームマーカーである EEA1 と共局在し、BIN1 ノックダウンによって SNAP-BACE1 の細胞表面から初期エンドソームへの内在化には明らかな影響はないと考えられた (図 4; 30 分)。一方、120 分後には Control においては SNAP-BACE1 は EEA 陽性初期エンドソームからさらに輸送されていたが、BIN1 をノックダウンした細胞においては同オルガネラに滞留していることが示された (図 4; 120 分)。すなわち、BIN1 発現低下より SNAP-BACE1 の初期エンドソームから後期エンドソームなどへの輸送の遅滞が生じていると考えられ、BIN1 は BACE1 の初期エンドソームからのライソソーム分解経路への細胞内輸送を制御している可能性が想定された。

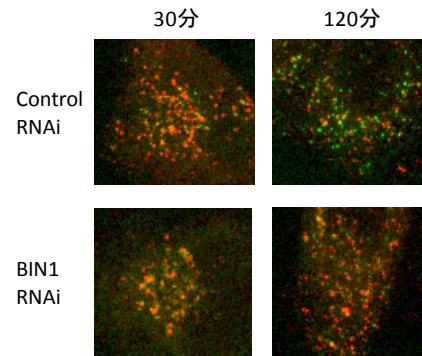


図4. ligand uptake assayによる細胞表面のSNAP-BACE1の内在化と初期エンドソームとの局在の経時的変化
緑; SNAP-BACE1
赤; EEA1 (初期エンドソームマーカー)

3. BIN1 の BAR ドメインは BACE1 の細胞内領域と結合し、細胞内輸送を制御する

BAR ドメインは脂質やタンパクとの結合が、SH3 ドメインは様々なタンパク間相互作用に用いられているドメインである。BIN1 が BACE1 の細胞内輸送を制御する分子機構を明らかにするため、*in vitro* 結合実験により結合の有無を検討した。特に BACE1 の細胞内輸送にはその C 末端の細胞質ドメインが重要と考えられていることから、BACE1 細胞質ドメインの 23 アミノ酸を 2 つ連結したリコンビナントタンパク質 GST-B1CTx2 を精製した。そして CNS isoform 1

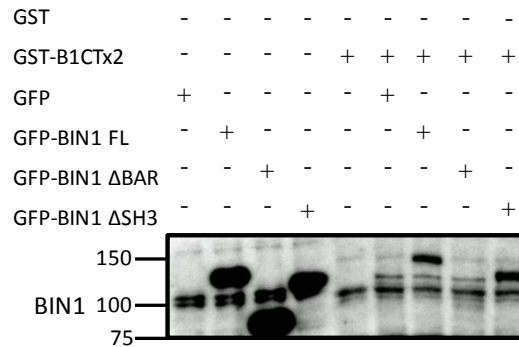


図5. GST pull-down assayによるBIN1全長および欠失変異体とBACE1細胞内領域との結合解析

の BIN1 全長分子に GFP を融合させた GFP-BIN1 FL を HeLa 細胞に発現させ、その cell lysate を用いて pull down アッセイを行ったところ、GST-B1CTx2 と特異的に結合が観察された。次に BIN1 のどのドメインが BACE1 との結合に重要であるかを検討するため、BAR ドメインを欠失させた GFP-BIN1 ΔBAR、SH3 ドメインを欠失させた GFP-BIN1 ΔSH3 を発現させた cell lysate を用いてアッセイを行ったところ、GFP-BIN1 ΔBAR と GST-B1CTx2 の結合が見られなくなったことから、BIN1 の BAR ドメインと BACE1 細胞質ドメインが結合すると考えられた (図 5)。

次に N2a 細胞を用いて BIN1 の過剰発現が Aβ 産生に与える影響について検討した。BIN1 FL

を発現させても大きな影響は観察されなかったが、BIN1 Δ BAR や BIN1 Δ SH3 を発現させた場合には、Bin1 のノックダウンと同様に、分泌 A β 40 と A β 42 量の有意な増加と BACE1 タンパク増加を認めた (図 6). すなわち、これらの変異体は 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 産生を亢進していることが推測された. 以上より、BACE1 と BIN1 との相互作用には BAR ドメインが重要な役割を担っていること、また BIN1 の SH3 ドメインは BACE1 を含むカーゴの初期エンドソームから後期エンドソームへの成熟化および輸送に関わる分子との相互作用に必要である可能性が考えられた.

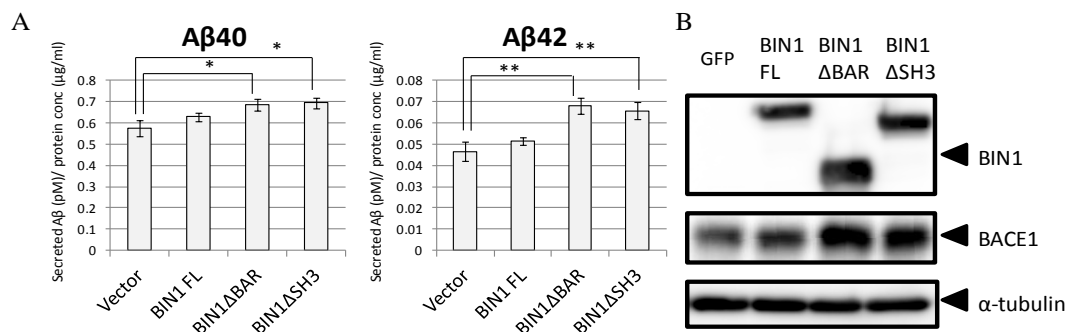


図6. BIN1全長および欠失変異体を発現させたN2a細胞での分泌A β とBACE1タンパク発現への影響.

N2a細胞にGFP-BIN1 FL, GFP-BIN1 Δ BAR, GFP-BIN1 Δ SH3, GFPのみのいずれかを発現させて、分泌A β 40, A β 42量を sandwich ELISA法で(A), BACE1などタンパク発現をウエスタンブロット解析(B)で検討した. (n=6, mean \pm SEM, *p<0.05, **p<0.005)

【総括】

本研究により、ADの遺伝学的危険因子として *ApoE* 遺伝子に次いで大きな影響を有する BIN1 が、BAR ドメインを介して BACE1 細胞質ドメインと結合し、SH3 ドメインと相互作用する分子と協調して、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細胞内輸送を制御することで A β 産生を制御することを初めて明らかにした (図 7).

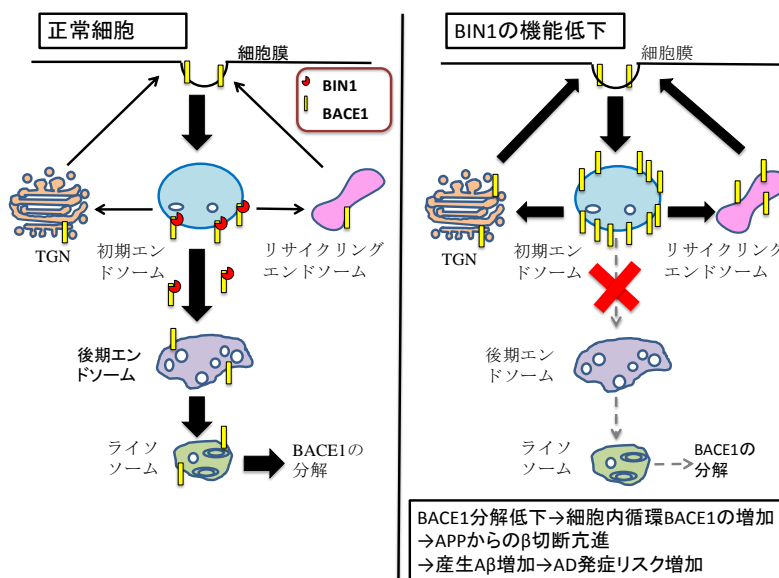


図7. BACE1細胞内輸送制御におけるBIN1の役割

BACE1 阻害薬は 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り、BACE1 の発現量制御機構を理解することは AD の根本治療を実現する上で重要である. また、アルツハイマー病の重要な遺伝学的危険因子である *BIN1* がアルツハイマー病の病態機序へどのように寄与するのかを理解するうえで、本研究で得られた結果はその理解の手掛かりの一翼を担う可能性が期待される.