

イシング重型の異常発現と非同義的な一塩基多型、及びコピー数多型や発現減少を報告している¹⁵⁾。これらのことから、CAPS2によるBDNF分泌制御は正しい脳発達に重要で、その異常は精神・神経疾患に関連すると考えられる。

4. おわりに

BDNFが発見されて30年になろうとしている。その間の実験技術の進歩は目覚ましく、BDNF研究は、ニューロンの分化・成熟、シナプス可塑性から、記憶・学習や精神・神経疾患に至るまで幅広い領域に広がりを見せている。現在BDNFは疾患治療や分子診断のターゲット分子として注目されており、BDNF分泌の生理学的挙動の基礎研究は今後益々重要になるであろう。特に*in vivo*における内因性BDNFの細胞内挙動及び局所分泌は、早急に明らかにされるべき課題である。また、BDNFの影響については互いに相反する結果が報告されていることも少なくない。そのいくつかは実験条件の違い(*in vivo*か*in vitro*か、実験のタイムスパンや使用する細胞タイプなど)によってもたらされているように思える。これはおそらくBDNFが微量で作用する生理活性物質であることと、BDNF分泌が発達脳内で時空間的、量的に制御されて特異的な神経回路の形成に作用しているためであると考えられ、これらを精査した実験系での解析が必要である。今後、BDNF分泌の研究は、神経回路の形成・機能とその疾患との関連性の追求、及び治療応用への基礎基盤の創出といった、基礎と臨床双方の観点でますます重要になると考える。

謝辞

本稿で紹介した筆者らの研究は主に理研脳科学総合研究センター・分子神経形成研究室で行われたものです。研究員であった定方哲史博士(現所属:群馬大学)をはじめとする共同研究者の方々に感謝致します。また、本文の執筆にあたりご協力いただいた広島大学の松本知也博士およびMax Planck Instituteの小池誠一博士に感謝致します。

- 1) Lessmann, V. & Brigadski, T. (2009) *Neurosci. Res.*, 65, 11–22.
- 2) Lewin, G.R. & Barde, Y.A. (1996) *Annu. Rev. Neurosci.*, 19, 289–317.
- 3) Chao, M.V., Rajagopal, R., & Lee, F.S. (2006) *Clin. Sci. (Lond.)*, 110, 167–173.
- 4) Kuczewski, N., Porcher, C., Lessmann, V., Medina, I., & Gaiarsa, J.L. (2009) *Mol. Neurobiol.*, 39, 37–49.
- 5) Canossa, M., Griesbeck, O., Berninger, B., Campana, G., Kolbeck, R., & Thoenen, H. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,

- 94, 13279–13286.
- 6) Hartmann, M., Heumann, R., & Lessmann, V. (2001) *EMBO J.*, 20, 5887–5897.
- 7) Shinoda, Y., Sadakata, T., Nakao, K., Katoh-Semba, R., Kinameri, E., Furuya, A., Yanagawa, Y., Hirase, H., & Furuichi, T. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108, 373–378.
- 8) Matsuda, N., Lu, H., Fukata, Y., Noritake, J., Gao, H., Mukherjee, S., Nemoto, T., Fukata, M., & Poo, M.M. (2009) *J. Neurosci.*, 29, 14185–14198.
- 9) Brigadski, T., Hartmann, M., & Lessmann, V. (2005) *J. Neurosci.*, 25, 7601–7614.
- 10) Dean, C., Liu, H., Dunning, F.M., Chang, P.Y., Jackson, M.B., & Chapman, E.R. (2009) *Nat. Neurosci.*, 12, 767–776.
- 11) Sadakata, T., Mizoguchi, A., Sato, Y., Katoh-Semba, R., Fukuda, M., Mikoshiba, K., & Furuichi, T. (2004) *J. Neurosci.*, 24, 43–52.
- 12) Gottmann, K., Mittmann, T., & Lessmann, V. (2009) *Exp. Brain Res.*, 199, 203–234.
- 13) Schwartz, P.M., Borghesani, P.R., Levy, R.L., Pomeroy, S.L., & Segal, R.A. (1997) *Neuron*, 19, 269–281.
- 14) Sadakata, T., Washida, M., Iwayama, Y., Shoji, S., Sato, Y., Ohkura, T., Katoh-Semba, R., Nakajima, M., Sekine, Y., Tanaka, M., Nakamura, K., Iwata, Y., Tsuchiya, K.J., Mori, N., Detera-Wadleigh, S.D., Ichikawa, H., Itohara, S., Yoshikawa, T., & Furuichi, T. (2007) *J. Clin. Invest.*, 117, 931–943.
- 15) Voineagu, I., Wang, X., Johnston, P., Lowe, J.K., Tian, Y., Horvath, S., Mill, J., Cantor, R.M., Blencowe, B.J., & Geschwind, D.H. (2011) *Nature*, 474, 380–384.

篠田 陽^{1,2}, 古市 貞一^{2,3,4}

¹European Neuroscience Institute,

²理研脳科学総合研究センター,

³東京理科大学理工学部応用生物科学科,

⁴JST-CREST)

Regulation of BDNF secretion and neural network formation—Enhancement of BDNF secretion by CAPS2 and its functional role

Yo Shinoda^{1,2} and Teiichi Furuichi^{2,3,4} (¹European Neuroscience Institute, Grisebachstr5, 37077 Göttingen, Germany, ²RIKEN BSI, Wako, Saitama 351-0198, Japan, ³Department of Applied Biological Science, Tokyo University of Science, Noda, Chiba 278-8510, Japan, ⁴JST-CREST, Kawaguchi, Saitama 332-0012, Japan)

アミロイドベータ前駆体タンパク質の代謝に糖鎖が与える影響

1. はじめに

アルツハイマー病は、最も典型的な老人性認知症であ

る。超高齢化社会を迎えた日本では、国内に200万人近いアルツハイマー病患者を抱えている。アルツハイマー病の病理学的特徴は、38~43個のアミノ酸残基から成るアミロイドβペプチド(Aβ)の脳内蓄積と神経原繊維変化の二つである。Aβの蓄積が神経原繊維変化、シナプスの脱落、神経細胞死といった一連のアルツハイマー病の進行につながる最初の引き金となっているらしいことが分かっている。タイプIの膜結合型糖タンパク質であるアミロイドβ前駆体タンパク質(APP)のβ部位およびγ部位をそれぞれ特定のプロテアーゼが切断すると、Aβが産生される。APPにはβ切断経路の代わりにα切断経路も存在する。このようなAPPの複雑な代謝経路は、APP自身とその切断酵素の発現量、細胞内局在、輸送によって規定されていると考えられている。

最近の研究では、機能性糖タンパク質の糖鎖が変化することで、タンパク質の安定性や立体構造変化、局在に変化が生じて機能不全にいたる例が複数報告されている。こういった現象は、APPにも当てはまるようである。実際に、細胞内の糖鎖を変化させるとAPPやAPP切断酵素の機能発現に影響を与え、Aβ産生量が変化することが報告されている。この総説ではまずAPPの代謝経路、翻訳後修飾について記述した後に、特定の糖鎖修飾がAβ形成、蓄積、クリアランスに与えている影響に関する最新の知見をまとめて紹介したい。

2. APPの代謝

Aβは、APPから2種類のプロテアーゼ、βセクレターゼとγセクレターゼが次々に作用して形成される¹⁾(図1)。βセクレターゼの本体、BACE1(β-site APP-cleaving enzyme 1)と呼ばれるタイプI型の膜貫通性のアスパラギン酸プロテアーゼが最初にAPPを切断し、C99と呼ばれる膜貫通領域を持った切断産物と可溶性APPβ(sAPPβ)が生じる。その後、γセクレターゼがC99を膜内で切断し、Aβが産生される。γセクレターゼは、プレセニリン、ニカストリン、Aph-1(anterior pharynx-defective 1)およびpen-2(presenilin enhancer 2)の4種類のタンパク質から構成される複合体であることが分かっていた。一方で、APPがαセクレターゼで切断された場合、C83断片と可溶性sAPPα(sAPPα)が生じる。その後にγセクレターゼがC83を切断することで、非病原性のp3ペプチドが形成される。αセクレターゼ候補となっている酵素は、ADAM(a disintegrin and metalloprotease)ファミリープロテアーゼであるADAM9, 10, 17の三つである²⁾。βおよびγセクレターゼ

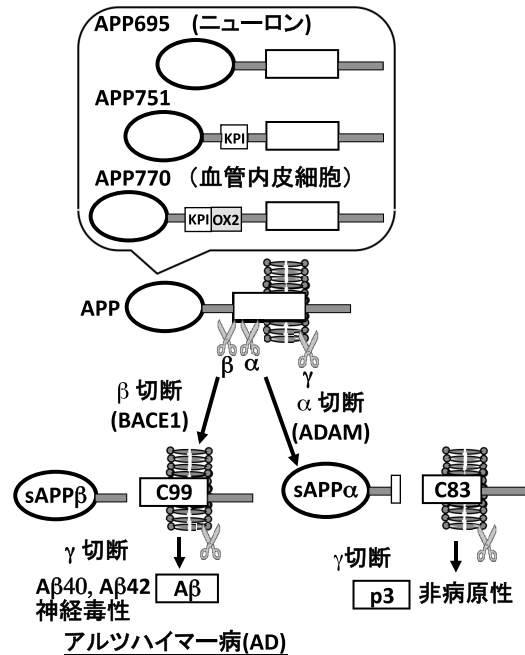


図1 APPの代謝経路とスプライシングバリエント

APPがβ部位で切断されると、続いてγ部位で切断されて神経毒性を持つAβが産生される。これとは別に、APPがα部位とγ部位で切断された場合、非病原性のp3ペプチドが産生される。APPには3種類の異なるスプライシングバリエント、APP695, APP751, APP770が存在する。

の阻害剤はアルツハイマー病治療薬として有望視されているが、γセクレターゼはNotch-1も基質とすること³⁾、またBACE1もα2,6-シアル酸転移酵素(ST6Gal I)⁴⁾をはじめ多くの生理的基質が存在することが分かっている。

3. APPの発現

APP mRNAにはAPP695, APP751, APP770という3種類のスプライシングバリエントがある(図1)。APP695と比べ、APP751は細胞外領域にKunitz型プロテアーゼインヒビター(KPI)領域が挿入されており、APP770はこれにさらにOX2領域が挿入されている。APP695はニューロン特異的に存在することが古くから知られており⁵⁾、脳実質に蓄積するAβはAPP695由来であると考えられる。一方、私達は最近、脳血管内皮細胞がAPP770を高発現すること、血管内皮型APP770からAβ40および42が産生されることを明らかにした⁶⁾(図2A)。そして、ヒト大脳皮質の切片に対してOX2領域に対する抗体を用いて免疫組織染色を行った結果、静脈性や細静脈性の血管内皮細胞の管腔側にAPP770が発現していることが明らかになった

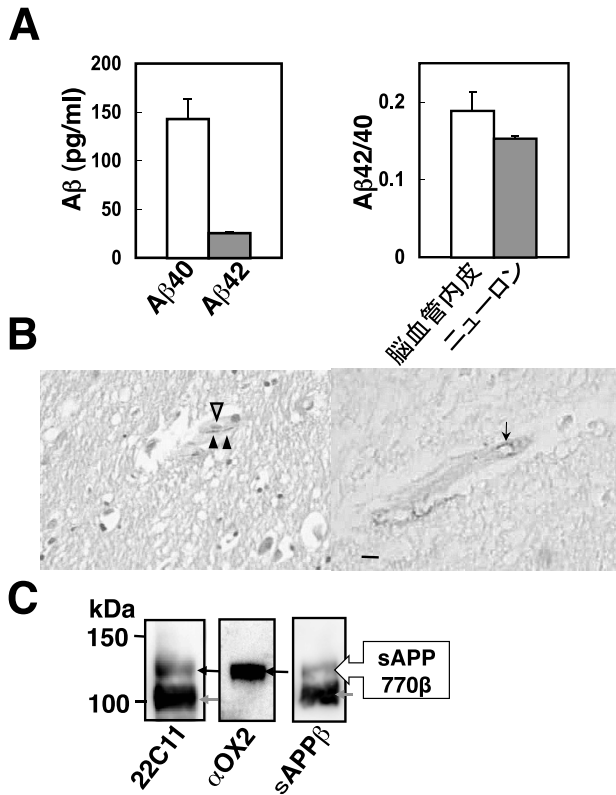


図2 ヒト脳内のAPP770の発現分布
 A. ヒト脳毛細血管内皮細胞の培養上清が含むAβ40とAβ42を定量した (n=3) (左). B. ヒト大脳皮質のパラフィン切片のヘマトキシリン・エオジン染色像と (左) 抗OX2抗体を用いた免疫組織染色像 (右). 白抜きと黒色の矢頭は, それぞれ血管内皮細胞と平滑筋細胞の核を示している. 矢印は, OX2抗体と反応している内皮細胞. スケール: 20 μm. C. ヒト脳脊髄液 (CSF) 中のsAPPをヘパリンアガロースで濃縮した後, 抗APP (22C11), 抗sAPPβ, 抗OX2抗体でウエスタンブロットを行った.

(図2B). さらに私達は脳脊髄液中にsAPP770βも見出している (図2C). およそ9割程度のアルツハイマー病患者には脳実質のみならず, 脳内血管にもAβが蓄積することが知られているが, 脳内血管のAβの一部は血管内皮細胞が発現するAPP770由来でないか, と想像される. アルツハイマー病患者脳ではBACE1活性が増加していることが最近明らかになった. 脳脊髄液中のsAPPαおよびsAPPβ (sAPPα/β) はアルツハイマー病診断で有効でないと考えられているが, BACE1活性との相関性があることが分かっている. そのため, sAPPα/βは臨床試験でBACE1阻害剤の効果を確認する際に有効でないか, と考えられている. また最近私達は, 血管内皮細胞に炎症性サイトカインを投与すると, sAPP770α/βの分泌量が有意に増加することも見出している (論文投稿中). 今まで市販されていたsAPP ELISAキットはsAPP695とsAPP770を見分けることが出来ない. 脳脊髄液中のsAPP695α/βとsAPP770α/βの区別が出来れば, ニューロンの障害と血管内皮細胞の障害の区別が可能になるかもしれない (2011年末よりAPP770 ELISAは入手可能).

4. APPの翻訳後修飾

APPの細胞質領域はサイクリン依存性キナーゼ5(Cdk5)によってThr668 (APP695の場合) 1カ所がリン酸化される. このリン酸化がAβの形成自体に与える影響は小さいが, リン酸化の結果生じる細胞質領域の構造変化によってAPPのアプター分子であるFE65が解離する. FE65自体の機能は今後明らかにされなければならない⁷⁾. 一方でAPPの細胞外領域は, N型糖鎖が2カ所, O型糖鎖が複数箇所結合している^{8,9)} (図3). 遠藤らは, CHO細胞に発現させたAPP695の詳細な糖鎖解析を行っており, N型糖鎖

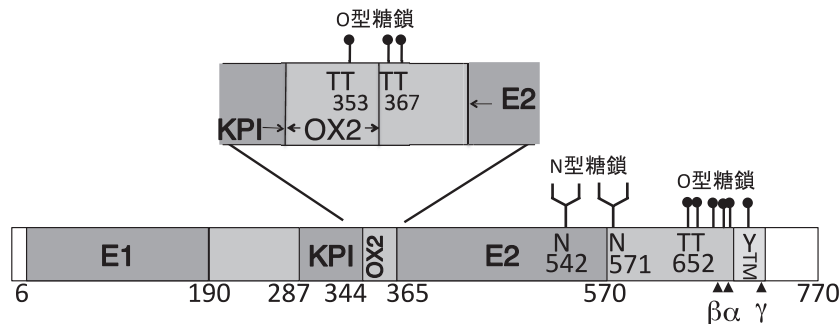


図3 APPの模式図
 APP770の細胞外領域はE1, KPI, E2領域 (濃灰色) と一定の立体構造をとらない領域 (薄灰色) から構成される. α, β, γ切断部位 (矢頭) を示した.

としてはコアフコースの結合した2本または3本鎖構造が存在すること、O型糖鎖としてはシアル酸を持つコア1型糖鎖の存在を報告している⁹⁾。APPの細胞外領域はE1およびE2と呼ばれる保存性の高いドメインが存在し、どちらもヘパリン結合性を有する。APPに結合する2本のN型糖鎖のうちC末側に位置する糖鎖はE2ドメインの端に位置しているため、糖鎖構造によってはドメインの立体構造に影響を与えるかもしれない。APP695のO型糖鎖付加部位は最近明らかになった¹⁰⁾。私達もAPP770の場合、さらにOX2ドメイン内にもO型糖鎖が結合することを明らかにした⁶⁾ (図3)。今やO型糖鎖の伸張開始点を担うUDP-GalNAc:ポリペプチド α N-アセチルガラクトサミン転移酵素(ppGalNAcT)は20種類程度見出されているが、各ppGalNAcTは特定のペプチド配列に作用しやすい、といったことも最近分かってきており¹¹⁾、APPのO型糖鎖付加に特定のppGalNAcTが関わっているかもしれない。

5. APPの糖鎖付加と代謝

A β 形成に関わるメンバーを眺めてみると、APPの α セクレターゼでの切断は細胞表面で起きるのに対し、アミロイド産生経路であるBACE1による切断はラフト内でエンドサイトーシスされる過程で起きるとされている。APPのみならず、BACE1、ADAMプロテアーゼ、そして γ セクレターゼの構成成分であるニカストリンなども糖タンパク質であることから、特定の糖鎖構造変化がAPPやセクレターゼの局在を変化させ、結果的にA β 形成量も変化する可能性が考えられる。そのため、糖転移酵素の発現を増加もしくは低下させてAPPの代謝に与える効果を見ようとするならば、どの分子が影響を受けたか知る必要がある。橋本らは、APP上のN型糖鎖の α 2,3-結合および α 2,6-結合のシアル酸付加が、sAPP α およびsAPP β の産生増加を促し、結果的にA β 量が増加するのに対し、2カ所のN型糖鎖付加部位を欠損させたAPP変異体ではそのような変化が見られなかったことから、APP自体のN型糖鎖のシアリル化がAPP代謝に関わっていることを示している¹²⁾。また、N-アセチルグルコサミン転移酵素GnT-IIIの過剰発現によってその糖鎖産物であるバイセクティングGlcNAcを増加させると、 α セクレターゼ活性が増加し、A β 産生が結果的に減少する、といった報告もある¹³⁾。遠藤らは、原因は不明であるが、野生型APPとスウェーデン型APP変異体を神経系の細胞C17に発現し、糖鎖構造解析を行ったところ、APP変異型はコアフコースやバイセクティングGlcNAc量が有意に増加していたことを示し

ている¹⁴⁾。

一方私達は、血管内皮細胞の溶解産物(ライセート)中のAPP770にはO型糖鎖の付加したものと付加していないものの2種類があるにも関わらず、代謝産物であるsAPP770 α および β はO型糖鎖の結合したのしか見出されなかったことから、O型糖鎖修飾とAPP代謝は共通の経路に含まれているのではないかと考えている⁶⁾。APP770のみならずニューロンに見出されるAPP695もO型糖鎖を持つ。またごく最近、A β 配列内の10番目のTyr残基にシアル酸を持つ糖鎖が付加していること、しかもアルツハイマー病患者の脳脊髄液により豊富に存在することが報告された。このことから、APP上のO型糖鎖が細胞内へのインターナリゼーションや輸送に与える影響、ひいてはアルツハイマー病との関わりは重要な課題である。

6. A β のクリアランス

今まではAPPの糖鎖修飾に焦点を絞って紹介したが、APP以外の糖タンパク質の糖鎖変化によって、A β 産生のみならず、A β の蓄積やクリアランスが変化する、といった報告もある。ミクログリアの活性化は、神経変性に関しては諸刃の剣であると考えられており、適度な活性化がA β のクリアランスに必要なであるとされている。Fialaらは、通常はA β 刺激によってマクロファージのGnT-III発現が増加するのに対しアルツハイマー病患者のマクロファージは顕著な増加が見られないこと、そして患者由来のマクロファージはファゴサイトーシス能が低下していることを報告している¹⁵⁾。近年、脳特異的な糖鎖が発生過程や成体での神経系細胞の相互作用に関わっていること、神経病理学的にも特異的な役割を果たしていることが認識されるようになってきた。脳特異的な糖鎖の遺伝子改変マウスや、高感度なMS解析によるグライコミクス的アプローチを体系的に用いることで、アルツハイマー病進行に関わる糖鎖の役割が解明されることが期待される。

- 1) Selkoe, D.J. & Schenk, D. (2003) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 43, 545-584.
- 2) De Strooper, B. (2010) *Physiol. Rev.*, 90, 465-494.
- 3) Hardy, J. (1997) *Trends Neurosci.*, 20, 154-159.
- 4) Kitazume, S., Tachida, Y., Oka, R., Shirotani, K., Saido, T.C., & Hashimoto, Y. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 13554-13559.
- 5) Wertkin, A.M., Turner, R.S., Pleasure, S.J., Golde, T.E., Younkin, S.G., Trojanowski, J.Q., & Lee, V.M. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 9513-9517.
- 6) Kitazume, S., Imamaki, R., Ogawa, K., Komi, Y., Futakawa,

- S., Kojima, S., Hashimoto, Y., Marth, J.D., Paulson, J.C., & Taniguchi, N. (2010) *J. Biol. Chem.*, 285, 6515–6521.
- 7) Suzuki, T. & Nakaya, T. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 29633–29637.
- 8) Tomita, S., Kirino, Y., & Suzuki, T. (1998) *J. Biol. Chem.*, 273, 6277–6284.
- 9) Sato, Y., Liu, C., Wojczyk, B.S., Kobata, A., Spitalnik, S.L., & Endo, T. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, 1472, 344–358.
- 10) Perdivara, I., Petrovich, R., Allinquant, B., Deterding, L.J., Tomer, K.B., & Przybylski, M. (2009) *J. Proteome Res.*, 8, 631–642.
- 11) Gerken, T.A., Jamison, O., Perrine, C.L., Collette, J.C., Moynova, H., Ravi, L., Markowitz, S.D., Shen, W., Patel, H., & Tabak, L.A. (2011) *J. Biol. Chem.*, 286, 14493–14507.
- 12) Nakagawa, K., Kitazume, S., Oka, R., Maruyama, K., Saido, T. C., Sato, Y., Endo, T., & Hashimoto, Y. (2006) *J. Neurochem.*, 96, 924–933.
- 13) Akasaka-Manya, K., Manya, H., Sakurai, Y., Wojczyk, B.S., Kozutsumi, Y., Saito, Y., Taniguchi, N., Murayama, S., Spitalnik, S.L., & Endo, T. (2010) *Glycobiology*, 20, 99–106.
- 14) Akasaka-Manya, K., Manya, H., Sakurai, Y., Wojczyk, B.S., Spitalnik, S.L., & Endo, T. (2008) *Glycoconj. J.*, 25, 775–786.
- 15) Fiala, M., Liu, P.T., Espinosa-Jeffrey, A., Rosenthal, M.J., Bernard, G., Ringman, J.M., Sayre, J., Zhang, L., Zaghi, J., Dejbakhsh, S., Chiang, B., Hui, J., Mahanian, M., Baghaee, A., Hong, P., & Cashman, J. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 12849–12854.

北爪 しのぶ

(理化学研究所基幹研究所疾患糖鎖研究チーム)

How does glycosylation affect the metabolism of amyloid β precursor protein?

Shinobu Kitazume (Disease Glycomics Team, RIKEN Advanced Science Institute, 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan)

胃 H^+ , K^+ -ATPase のユニークな性質と P 型 ATPase 間で保存された構造変化

1. はじめに

H^+ , K^+ -ATPase は胃プロトンポンプとして知られ、 H^+ と K^+ の対向輸送によって胃酸分泌の最終段階を担う。同じ P 型 ATPase ファミリーに属する Na^+ , K^+ -ATPase や筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase (SERCA) とはアミノ酸配列の 60%, 30% 以上がそれぞれ同一であり、まさに兄弟、従兄といった関係にある。しかしながら、このプロトンポンプは非常に困難な使命を果たさねばならない—ヒトの食物消化時の胃内腔は約 pH 1 という強酸性状態に曝されるが、これは細胞

内がほぼ中性であることを考えると、 H^+ , K^+ -ATPase は細胞膜を隔てて約 100 万倍 (10^6) もの H^+ 濃度勾配を形成していることになる。なぜ H^+ , K^+ -ATPase は他のイオンポンプ (Na^+ は 10 倍程度、 Ca^{2+} では 1,000~1 万倍) が達成できないような非常に大きな H^+ の濃度勾配を作り出すことができるのか？ 何が H^+ , K^+ -ATPase に特別に備わっていて、基本的な作動原理はどこまで保存されているのか？ 本稿では H^+ , K^+ -ATPase の構造解析の例を中心として、P 型 ATPase のメンバーそれぞれが持つユニークな側面とファミリー間での類似性について紹介する。

2. P 型 ATPase ファミリー

P 型 ATPase は、ATP の加水分解と共役した主として陽イオンの能動輸送を行うイオンポンプとして、様々な生命現象に密接に関わっている。ATP 加水分解反応が活性中心の自己リン酸化 (Auto-Phosphorylation) を伴う為に P 型と呼ばれるようになったこのファミリーは、P1 から P5 までのサブタイプに分類される¹⁾。中でも P2-type に分類されるイオンポンプは古くから研究されており、細胞内外での Na^+ 濃度勾配を作り出す Na^+ , K^+ -ATPase の発見²⁾ に対して 1997 年に Jens C Skou がノーベル化学賞を与えられた。2000 年にはこの P 型 ATPase として初めて SERCA の X 線結晶構造が³⁾、2007 年には Na^+ , K^+ -ATPase の構造⁴⁾ が報告された。現在 SERCA の様々な反応中間体も含めて 40 以上の構造が報告されており、その反応機構の分子レベルでの理解が進んでいる。

P 型 ATPase が行うイオン輸送は、 Na^+ , K^+ -ATPase に対する Post-Albers 機構に代表されるモデルによって酵素化学的に説明される (図 1A)。P 型 ATPase は主として $E1$, $E2$ という状態をサイクルすることで能動輸送を達成する。 H^+ , K^+ -ATPase を例に説明すると、 $E1$ 状態においてイオン結合サイトは細胞内に向けられ H^+ に対して高親和性を示す。次に H^+ を結合した酵素が ATP を加水分解し自己リン酸化された中間体 $E1P$ を形成する。 $E1P$ は H^+ を閉塞した状態にあり、これが H^+ を能動的に細胞外へと放出することで、 $E2P$ へと遷移する。 $E2P$ 状態ではイオン結合部位が細胞外に向けられ、 K^+ に対して高い親和性を示すように変化している。 $E2P$ は次に K^+ の結合によって脱リン酸化を促進され、 K^+ を閉塞した $E2$ 状態へと移行する。続いて $E2$ が ATP の結合によって $E1$ へと変換される過程で K^+ が細胞内へと輸送される。イオン輸送の化学量論は $ATP : H^+ : K^+ = 1 : 2 : 2$ とされるが、これは胃内部が酸性状態では $1 : 1 : 1$ に変化すると考えられている。