

学 位 論 文 題 名

X11 proteins の生理機能解析

～ X11/X11L doubly deficient mice の作成と解析～

学位論文内容の要旨

X11 proteins (Mint: munc18 interacting proteins); X11, X11L, X11L2 は PTB (Phosphotyrosine Binding) ドメインと 2 つの PDZ ドメインを有し、この構造は線虫から哺乳類まで進化上よく保存された蛋白質ファミリー分子である。機能ドメインに結合する蛋白質として、家族性 Alzheimer 病の原因遺伝子の一つであるアミロイド前駆体蛋白質(APP)等があり、これまでに X11L 遺伝子欠損により APP の代謝が亢進し A β 産生が増加することを報告してきた。X11 遺伝子欠損マウスは線条体でのドパミンの放出、海馬での GABA の放出異常が報告されたが、興奮性の神経細胞活動に関しては異常が報告されていない。これら X11 proteins 欠損マウスの解析から、X11 proteins は神経細胞が正常に機能する上で重要な機能を持つことが示唆されているが、異常を起こす分子機構や原因、X11 proteins の生理機能は明らかになっていない。本研究では中枢神経系における X11 および X11L の生理機能解明を目的とし、X11/X11L doubly deficient mice を作成し解析を行った。

[第一部：X11 proteins の基礎解析と X11/X11L doubly deficient mice の作成]

X11-KO: [X11^{-/-}, X11L^{+/+}] mice と X11L-KO: [X11^{+/+}, X11L^{-/-}] mice の交配により Double-KO: [X11^{-/-}, X11L^{-/-}] mice を作製した。Double-KO mice の postnatal day1 (P1)における生存率は約 50%と低く、生存した Double-KO mice の体重は他の Genotype の mice (wild-type, X11-KO, X11L-KO mice)と比較し、測定した全てのステージ(P7, P14, P21, P28, P35, P42, P49, P90)において有意に体重が軽かった。Wild-type と Double-KO mice の脳構造を比較したところ大脳皮質の層構造、海馬、小脳の形態等の巨視的な脳構造は同様であった。また、他の X11 proteins の発現上昇による機能補償、dendritic atrophy, gliosis, synaptic loss は起こっていないことが明らかとなった。

[第二部：APP 代謝 (Alzheimer's disease) と X11 proteins]

X11 proteins は APP の細胞質ドメインに結合し、A β 産生を含む APP 代謝を抑制するアダプター蛋白質として単離同定され、*in vivo*においても APP 代謝を安定化する機能を持つことが示されてきたが、APP 代謝安定化の分子機構は明らかになっていない。本研究では X11 proteins による APP 代謝抑制の分子機構の解明を目的に実験を行った。APP の一段階目の切断産物である APP calboxyl-terminal fragment (CTF)の定量を Western blot 法で、A β の産生量を sELISA 法で海馬および大脳皮質をサンプルとし wild-type mice と比較した。結果、 β -secretase (BACE) により生成される CTF β (C99 および C89) が X11-KO, X11L-KO, double-KO mice で増加し、A β 40 および A β 42 は X11L-KO および Double-KO mice で有意に増加していた。A β 産生が亢進する原因を解明するために、初代培養神経細胞を Wild-type および X11L-KO mice 脳より調整し、APP および BACE の細胞内局在を免疫染色により比較した。定量の結果、wild-type と比較し X11L-KO neuron で APP signal と BACE signal の共局在の

割合が増加していた。BACE および γ -secretase は Detergent-resistant membrane (DRM) fraction (Lipid raft)で高い活性を示すことが報告されている。そこで、wild-type, X11-KO, X11L-KO, double-KO mice cortex より DRM を調整し、APP, APP CTF, APP 切断酵素量を Western Blot 法により検出・定量した。定量の結果、X11L-KO および double-KO mice の DRM fraction に回収される APP および APP CTF 量が wild-type mice と比較し有意に増加していた。しかし、non-DRM に回収される APP, APP CTF および APP 切断酵素量は各遺伝子型のマウスで同等であった。また、大部分の X11 proteins は non-DRM fraction に回収されることから、X11 proteins の欠損により A β 産生が亢進する分子機構として以下の分子機構を提唱した。X11 proteins 存在下では大部分の APP は X11 proteins と結合することで non-DRM に存在し、 β -および γ -secretase 活性の高い DRM へ移行する割合は少ないが、X11 proteins 非存在下では、DRM に移行する APP の割合が増加し、結果として β -secretase と共局在する APP の割合が増加し A β 産生が亢進する。

[第三部：Epilepsy と X11 proteins]

一連の解析の中で、double-KO mice は脳波異常を伴う自発的な痙攣発作を起こすことを見出した。Double-KO mice で異常を起こしている脳内領域を同定するために、神経細胞の活動マーカーである c-fos の免疫染色を痙攣発作 90 分後の double-KO mice の脳切片を用いた結果、Dentate gyrus において c-fos の高発現が観察された。Dentate gyrus は主に Entorhinal cortex layer II から興奮性の入力を受けている。X11 および X11L の発現量は dentate gyrus では低く、Entorhinal cortex layer II で高いことから、Dentate gyrus でみられる c-fos の高発現は dentate gyrus の異常によるものではなく、Entorhinal cortex layer II の異常である可能性が考えられた。これらの可能性を検証するために、current clamp recording により外部刺激（電流注入）に対する神経細胞の応答パターン（電位）を dentate gyrus および Entorhinal cortex layer II の神経細胞で検証した。Dentate gyrus では wild-type および double-KO mice で同様の応答パターンを示したが、X11 および X11L 共に高発現している Entorhinal cortex layer II においては、神経細胞の膜抵抗および firing (spike) number（活動電位数）が有意に増加していた。神経細胞の膜抵抗の変化は I_h current の変化で引き起こされることが報告されている。そこで次に、Entorhinal cortex layer II における I_h current を測定した結果、double-KO mice で wild-type mice と比較し有意に I_h current が減少していた。I_h current を作り出す分子は hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channel であり、HCN channel には HCN1-4 の 4 分子が存在する。Entorhinal cortex における発現が高い HCN1 および HCN2 の発現量を Entorhinal cortex をサンプルとし Western Blot 法で検出・定量した。定量の結果、Entorhinal cortex における HCN1 および HCN2 の発現量は wild-type および double-KO mice で同様であったので、次に免疫染色により HCN1 の脳内局在を wild-type および double-KO mice で比較した。HCN1 は wild-type および double-KO mice の Entorhinal cortex layer II で高い発現が確認されたが、double-KO mice の HCN1 染色像は wild-type と比較し Layer I 方向により広範囲に局在が観察され、Layer II の細胞膜上の染色像は減少していた。これらの結果から、X11 および X11L の欠損により異常を示す脳内領域として、Entorhinal cortex layer II を同定した。また、HCN1 の細胞内局在の変化により I_h current の減少および膜抵抗の増加が引き起こされ、異常な firing が起こることで、結果として痙攣発作が引き起こされる可能性を示した。

[第四部：Glutamate receptor と X11 proteins]

X11 proteins は NMDA 型グルタミン酸受容体のサブタイプの一つである NR2B の輸送に関与していることが報告されている。また、AMPA 型グルタミン酸受容体の構成分子である GluR1 および 2 と結合することが報告されている。これらグルタミン酸受容体は post synaptic density (PSD) で機能していると考えられている。そこで、NR2B, GluR1 および GluR2 の発現量および PSD への回収量を wild-type と X11 proteins mutant mice で比較した。定量の結果、NR2B, GluR1 および GluR2 の発現量は wild-type

と X11 proteins mutant mice で同等であったが、PSD への回収量は、GluR1 および 2 は減少しており、NR2B は増加していた。これらの結果から、X11 proteins がグルタミン酸受容体の細胞内局在を制御している可能性が示された。

以上の結果から、X11 proteins は結合分子の細胞内局在を制御することで、結合分子の機能及び代謝を制御するアダプター蛋白質であることを示した。また、X11 proteins の機能異常が、Alzheimer 病や Epilepsy 等の発症頻度の高い神経疾患の発症に関与していることを示した。さらに近年、Alzheimer 病モデルマウスが脳波異常を含む痙攣発作を起こすことや、神経活動の亢進により A β 産生が亢進することが多数報告されている。さらに A β の産生亢進により PSD に存在する GluR 量が減少することが報告されている。よって、X11 proteins は Alzheimer 病と Epilepsy 両疾病の関係および A β とグルタミン酸受容体の関係性を解明する上で、重要な分子群である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 鈴 木 利 治

副 査 教 授 南 雅 文

副 査 准教授 山 本 融

副 査 准教授 上 原 孝

学 位 論 文 題 名

X11 proteins の生理機能解析

～ X11/X11L doubly deficient mice の作成と解析～

X11 ファミリータンパク質 X11 および X11L (X11s)は、神経で強く発現するアダプター分子である。家族性アルツハイマー病(AD)の原因遺伝子産物である APP の細胞質ドメインに結合し、APP から代謝生成される AD 発症原因因子アミロイド β -タンパク質(A β)の生成を抑制することが知られていたが、脳内 *in vivo* における機能と作用機序は未解明であった。本論文の前半では、X11 および X11L の両遺伝子を欠失した変異マウスを作成し、脳内 APP の代謝を生化学的、組織学的、細胞生物学的に詳細に解析した。その結果、X11s は APP に結合することで APP が膜の DRM(界面活性剤耐性領域=脂質ラフト/マイクロドメイン)に入ることを制御していることを明らかにした。膜 DRM には A β 生成酵素である β -サイトセクレターゼが存在し、X11s 欠失マウスでは APP の β サイト切断代謝産物が増加していた。本研究は、これまで未解明であった *in vivo* における X11s の APP 代謝制御機構を明らかにした最初の報告である。本論文の後半では、X11/X11L 二重欠失マウスでは中枢の脳波異常を伴う自発的な痙攣発作が誘発されることを見だし、その発症機構における X11s の役割を分子レベルで解明した。痙攣直後マウスの解析から初発部位を嗅内野皮質第二層と同定し、電気生理学的な解析から変異マウスでは嗅内野皮質第二層の神経が一定の入力に対して大きな応答を起こすことを突き止めた。この分子機構として、X11s が Ih カレントを形成している HCN チャネルの分布を規定している可能性を見だし、X11s 欠失による HCN チャネルの分布異常がてんかん発作の原因であることを見いだした。AD 患者は一定の割合でてんかん発作を起こすことが知られており、本研究はその分子機構に新しい知見を与えた。本論文の成果は、孤発性 AD の発症原因として X11L の機能低下が考えられること、AD に伴うてんかん発作の分子機構の解明を進めたこと等、AD 疾患の原因解明と新たな治療法の開発に貢献するもので、薬学領域の博士号に相当するきわめて先進的な研究である。

これは、ようするに、著者はアルツハイマー病(AD)における APP のアミロイド産生的切断における X11s の制御機構の分子メカニズムを解明し、加えて AD に付随して起こる痙攣発作の発症機構に新たな知見を見いだしたもので、AD 特に原因不明の孤発性 AD の発症機構の解明に貢献し、新たな創薬ターゲットの創出に貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士(生命科学/薬学)の学位を授与される資格があるものと認める。