

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770116

研究課題名(和文) 低分子量G蛋白質Arf6 / リン脂質キナーゼPIP5Kによる脳内 アミロイドの調節

研究課題名(英文) Regulation of amyloid-beta clearance by the small GTPase Arf6 and the phospholipid kinase PIP5K

研究代表者

船越 祐司 (Funakoshi, Yuji)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：30415286

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー型認知症の関連物質A $\beta$ の脳からの排出には、LRP1とMegalinという膜受容体が重要な働きを担っている。両者は、脳毛細血管内皮細胞、脈絡叢上皮細胞において、脳内A $\beta$ を取り込み循環血液中に排出する。本研究において我々は、低分子量G蛋白質Arf6とリン脂質キナーゼPIP5Kが、Megalin、LRP1の細胞内ドメインに結合することを見出した。また、Arf6をノックダウンした細胞において、Megalin、LRP1が細胞内の微小構造に蓄積し、両者の発現量が顕著に増加することを明らかにした。以上より、Arf6がMegalin、LRP1のリソソームへの移行を制御していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The plasma membrane receptors Megalin and LRP1, play a pivotal role in elimination of the Amyloid-beta peptide (A $\beta$ ), which is crucially involved in Alzheimer's disease, from the brain. In brain microvascular endothelial cells and choroid plexus epithelial cells, both receptors uptake A $\beta$  from the brain fluid and transport them to the blood. In this research we find that the small GTPase Arf6 and the phospholipid kinase PIP5K bind to the cytoplasmic domains of Megalin and LRP1. We also demonstrate that knockdown of Arf6 causes accumulation of Megalin and LRP1 at intracellular endosomes and significant increase of the expression level of those proteins. These results indicate that Arf6 regulates transport of Megalin and LRP1 to lysosomes for degradation.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：Arf6 PIP5K アミロイド 細胞内輸送

### 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー型認知症 (AD) の発症は、アミロイドβペプチド (Aβ) の脳内への蓄積が主な原因と考えられている。Aβの脳内への蓄積は、産生と代謝・排出のバランスが崩れることにより起こる。AD 患者の大半を占める孤発性 AD においては、Aβの脳内クリアランスの低下が主要因であることが示唆されており、排出メカニズムの解明が急務となっている。

脳内 Aβは、血液脳関門および血液脳脊髄液関門を介して循環血液中へと排出される。血液脳関門の実体は脳毛細血管内皮細胞であり、細胞同士がタイトジャンクションで互いに連結し物質の輸送を制限している。血液脳脊髄液関門においても、脈絡叢上皮細胞がタイトジャンクションを形成し、物質輸送を制限している。それ故、これら関門の通過には特異的な輸送機構が必要であり、Aβの排出には、LDL receptor-related protein1 (LRP1) および Megalin という膜受容体が中心的な役割を担うことが報告されている。従って、LRP1 と Megalin を介した Aβの排出機構の解明は、AD の病因解明、治療法開発に貢献できるものと期待される。

LRP1 と Megalin は LDL receptor ファミリーに属する膜受容体であり、肝、腎、肺、小腸などの上皮系組織に多く発現がみられる。両者は、Aβやそのアダプタータンパクをはじめ、多くのリガンドと結合し、リガンドとともに細胞内へ取り込まれる。取り込まれたリガンドは、リソソームによる分解を受けるか、あるいは、トランスサイトシスにより取り込んだ膜とは反対側に運搬・放出される。各発現臓器において多数のリガンドが同定され、両受容体の生理的な重要性は明らかにされているものの、細胞内への取り込みのメカニズムは多くが不明のままである。

### 2. 研究の目的

このような状況下、研究代表者らは、低分子量 G 蛋白質 Arf6、およびリン脂質キナーゼ PIP5K が Megalin、LRP1 と相互作用することを見出した (未発表データ)。Arf6 は膜蛋白質の取り込みやリサイクリングに関わる低分子量 G 蛋白質であり、PIP5K は、細胞膜微量リン脂質である PIP<sub>2</sub> の産生を介してエンドサイトーシスや分泌反応に関わることが知られている。研究代表者の属する研究室では、Arf6 が PIP5K を直接活性化することを報告しており (Honda et al., Cell 99, 1999) その後、Arf6-PIP5K シグナルがクラスリン依存性エンドサイトーシスを制御することが明らかにされ、Arf6-PIP5K シグナルが細胞膜からの物質の取り込みに深く関与することが強く示唆される。これらの知見、予備的結果より、Arf6、PIP5K は、Megalin、LRP1 と複合体を形成し、細胞内への取り込みやその後の細胞内輸送を制御している可能性が考えられた。本研究では、これらを検

証し、Megalin、LRP1 による Aβ排出のメカニズムを解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 発現プラスミドの構築

Megalin、LRP1 は巨大な分子であるため、Arf6、PIP5K との相互作用や細胞内輸送を解析するにあたり、Obermoller-McCormick *et al.* (2001)、Nagai *et al.* (2003)らの方法に従い、HA タグを付加した Megalin mini-gene、および LRP1 mini-gene を作成した。いずれの mini-gene も、4 つのリガンド結合領域のうちの 4 番目 (もっとも細胞膜側) の結合領域と膜貫通ドメイン、および細胞内ドメインを含む。また、Megalin の細胞内ドメインにある 3 つの NPXY モチーフの欠損変異体を作製した。

#### (2) 免疫沈降

HEK293T 細胞に HA-Megalin mini-gene あるいは HA-LRP1 mini-gene と Arf6-Flag あるいは Flag-PIP5K をトランスフェクションし、24 時間後細胞を回収した。細胞を破碎・溶解後、抗 Flag 抗体あるいは抗 HA 抗体にて免疫沈降を行い、常法に従いウエスタンブロッティングにて検出を行った。

#### (3) Arf6 のノックダウン

HeLa 細胞、あるいはグリオブラストーマ由来 U87 細胞に Arf6 の siRNA を導入し、72 時間後に各種実験に用いた。発現プラスミドを導入する際には、siRNA とプラスミドを同時に細胞にトランスフェクションした。

#### (4) 細胞内への取り込み、リサイクリングアッセイ

細胞内への取り込み、リサイクリングの解析には、いずれも NHS-SS-Biotin (スペーサー部にジスルフィド結合を含有するビオチン) を用いた。HA-Megalin mini-gene あるいは HA-LRP1 mini-gene を発現させた細胞の細胞膜表面の蛋白質を NHS-SS-Biotin にてラベル後、15-30 分間培養し細胞内へと取り込ませた。その後、細胞を 2-mercaptoethanesulfonate で処理することにより、残存する膜表面のビオチンを除去した。この細胞を回収し破碎・溶解後、Avidin ビーズを用いて細胞内に取り込まれたビオチン化蛋白質を回収した。回収した蛋白質を SDS-PAGE にて分離後、抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロットを行うことにより、細胞内に取り込まれた HA-Megalin mini-gene、HA-LRP1 mini-gene を検出・定量した。

リサイクリングアッセイでは、上記の取り込み後 (残存ビオチン除去後) を開始点 (0 min) とし、さらに 30 分間培養した。培養後、膜表面にリサイクリングされたビオチンを再度 2-mercaptoethanesulfonate にて除去した (30 min)。0 min、30 min 時点での細胞をそれぞれ回収し、前述と同様に Avidin ビーズを用いて細胞内の HA-Megalin mini-gene、HA-LRP1 mini-gene 量を測定した。得られた 0 min、30 min の細胞内の蛋白質量の差をとり、リサイクリングされた量を算出した。

#### (5) 免疫蛍光染色

HeLa 細胞あるいは U87 細胞に HA-Megalin mini-gene あるいは HA-LRP1 mini-gene をトランスフェクションし、細胞を 4% パラホルムアルデヒドにて固定後、抗 HA 抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。

#### 4. 研究成果

(1) Arf6、PIP5K は、Megalin の NPXY モチーフに結合する。

Megalin、LRP1 の細胞内ドメインには複数の NPXY モチーフが存在する。NPXY モチーフには、クラスリンコート蛋白質のアダプター蛋白質やエンドサイトーシス関連因子が結合し、細胞内への取り込みや細胞内輸送の制御に関わることが知られている。Megalin には 3 つの NPXY モチーフが存在することから、それぞれのモチーフを欠損する Megalin mini-gene 変異体を作製し、Arf6、PIP5K との相互作用を検討した。その結果、最も N 末端側 (細胞膜側) の NPXY モチーフを欠損させた際に、Megalin と Arf6 および PIP5K との結合が消失していた。この結果より、Arf6、PIP5K は、Megalin の細胞膜側の NPXY モチーフに結合し、複合体を形成していることが考えられる。

(2) Arf6 は、Megalin、LRP1 の安定性制御に関わる。

一般的に膜蛋白質は、細胞内に取り込まれた後、リソソームによる分解を受けるか、再度細胞膜へとリサイクリングされる。そのため、取り込みやその後の細胞内輸送制御が、膜蛋白質の安定性に大きく影響する。Arf6 は、接着分子や受容体などのエンドサイトーシスやリサイクリングの制御に関わることが知られていることから、Arf6 の機能抑制が Megalin、LRP1 の安定性を変化させる可能性が考えられる。そこで、Arf6 をノックダウンした細胞において Megalin mini-gene、LRP1 mini-gene の発現量を解析した。その結果、Arf6 をノックダウンした細胞において、Megalin、LRP1 の発現量が著しく増加していた。また、Arf6 の不活性型変異体を過剰発現した細胞においても同様の発現量増加がみられた。以上の結果より、Arf6 は Megalin、LRP1 の安定性を調節していることが示唆される。

(3) Arf6 は、Megalin、LRP1 の細胞内への取り込み、リサイクリングの制御には関与しない。

Arf6 の機能を鑑みると、上記の Megalin、LRP1 の発現量の増加は、細胞内への取り込み、あるいはリサイクリングが Arf6 の機能阻害により変化した可能性が考えられる。そこで、Megalin、LRP1 の細胞内への取り込みへの Arf6 の関与を検討した。HeLa 細胞において Arf6 をノックダウンし、Megalin mini-gene、LRP1 mini-gene の細胞内への取り込みを解析

した。その結果、コントロールと Arf6 をノックダウンした細胞との間で、Megalin mini-gene、LRP1 mini-gene の取り込みに顕著な差はみられなかった。

次に、リサイクリングへの Arf6 の関与を検討した。方法にあるように、ピオチンラベル法を用いて Megalin mini-gene、LRP1 mini-gene のリサイクリングを解析したところ、おおよそ 25% がリサイクリングされた。そこで、Arf6 をノックダウンした細胞において、同様に解析を行ったところ、Arf6 のノックダウンによる影響は観察されなかった。

上記の取り込み、リサイクリングは血清存在下の定常状態における解析であったため、次に、Megalin のリガンドとして知られるラクトフェリンにより刺激した際の取り込み、リサイクリングについて同様の解析を行った。しかしながら、ラクトフェリン刺激下の取り込み、リサイクリングともに Arf6 ノックダウンの影響は認められなかった。また、LRP1 を介した  $\beta$  の取り込み・分解が行われることが知られているグリオブラストーマ由来 U87 細胞株を用いて同様の解析を行ったものの、Arf6 の関与は認められなかった。

以上の結果より、Arf6 は、Megalin、LRP1 の細胞内への取り込み、リサイクリングには関与しないことが示唆された。

(4) Arf6 は、Megalin、LRP1 の細胞内輸送を制御する。

続いて、Megalin、LRP1 の細胞内輸送における Arf6 の機能を検討するため、Megalin mini-gene、LRP1 mini-gene の細胞内局在を解析した。Arf6 をノックダウンした HeLa 細胞に Megalin mini-gene あるいは LRP1 mini-gene を発現させ、細胞内の局在を免疫蛍光染色により観察した。その結果、Arf6 をノックダウンした細胞において、Megalin、LRP1 が細胞内の微小構造に蓄積することが明らかとなった。この結果は、Arf6 が Megalin、LRP1 の細胞内輸送のある特定のステップの制御に関わっていることを示唆している。

通常膜蛋白質は、細胞内に取り込まれた後、初期エンドソームに取り込まれ、後期エンドソームを経て、リソソームへ運ばれ分解される。上記の Arf6 ノックダウンの結果は、初期エンドソームからリソソームへ至る輸送経路のいずれかに障害が生じ、リソソームにて分解される前の段階で Megalin、LRP1 が細胞内エンドソームに蓄積した結果、発現量の上昇がみられたものと考えられる。つまり、Arf6 は Megalin、LRP1 のリソソームへの輸送を制御している可能性が考えられる。このような Arf6 の機能はこれまでに報告がなく、本研究によって Arf6 の新たな機能が明らかとなった。今後は、上記可能性を検証するとともに、 $\beta$  を結合した際にも同様の作用があるかを検討する。また、脈絡叢上皮細胞やそのモデル細胞を用いた *in vitro* の脈絡叢モデルにお

いて、A $\beta$ の排出や分解に Arf6 が関与するかを検証する。さらに、遺伝子改変マウスを用いて、in vivo で実際に Arf6 が A $\beta$ の排出・分解制御に関与するかを検討していく予定である。

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

Ogami K., Hosoda N., Funakoshi Y., Hoshino S. Antiproliferative protein Tob directly regulates c-myc proto-oncogene expression through cytoplasmic polyadenylation element-binding protein CPEB. *Oncogene* 33, 55-64, 2013 DOI: 10.1038/onc.2012.548 (査読有)

Sato T., Hongu T., Sakamoto M., Funakoshi Y., Kanaho Y. Molecular mechanisms of N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced superoxide generation and degranulation in mouse neutrophils: phospholipase D is dispensable. *Mol. Cell. Biol.* 33, 136-145, 2013 DOI: 10.1128/MCB.00869-12 (査読有)

Kanaho Y., Sato T., Hongu T., Funakoshi Y. Molecular mechanisms of fMLP-induced superoxide generation and degranulation in mouse neutrophils. *Adv. Biol. Reg.* 63, 128-134, 2013 DOI: 10.1016/j.jbior.2012.09.001 (査読無)

Hasegawa H., Noguchi J., Yamashita M., Okada R., Sugimoto R., Furuya M., Unoki T., Funakoshi Y., Baba T., Kanaho Y. Phosphatidylinositol 4-Phosphate 5-Kinase Is Indispensable for Mouse Spermatogenesis. *Biology of Reproduction*, 86, 2012 DOI: 10.1095/biolreprod.110.089896 (査読有)

[学会発表](計3件)

Yuji Funakoshi, Yasunori Kanaho, Julie G. Donaldson. Ubiquitin-specific protease TRE17/USP6 targets clathrin-independent cargo to recycling. 第86回日本生化学会大会、2013年9月11日~9月13日、横浜

本宮綱記、船越祐司、金保安則 リン脂質代謝酵素ホスホリパーゼ D2 は腫瘍形成を抑制する。 第55回日本脂質生化学会、2013年6月6日~6月7日、宮城県松島町

Funakoshi Y., Kanaho Y, Donalson JD. Ubiquitin-specific protease TRE17/USP6 targets clathrin-independent cargo to recycling. 2012 American Society for Cell Biology, Annual Meeting、2012年12月15日~2012年12月19日、サンフランシスコ、アメリカ合衆国

[その他]

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/biochem/kanaholab/>

#### 6 . 研究組織

#### (1) 研究代表者

船越 祐司 (Funakoshi Yuji)  
筑波大学・医学医療系・助教  
研究者番号：30415286