



Title	Soluble β -amyloid Precursor Protein Alpha Binds to p75 Neurotrophin Receptor to Promote Neurite Outgrowth
Author(s)	長谷部, 紀子
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34077
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	長谷部 紀子
論文題名 Title	Soluble β -amyloid Precursor Protein Alpha Binds to p75 Neurotrophin Receptor to Promote Neurite Outgrowth (可溶性 β -アミロイド前駆体蛋白質 α はp75 ニューロトロフィン受容体と結合し神経伸長を促進する)
論文内容の要旨	
〔目 的〕 p75^{NTR}は発生期や脳損傷時に発現し、軸索伸長と細胞死を制御する受容体である。TrkAと神経成長因子(NGF)に結合し軸索伸長を促進する。またcoreceptor Sortillinと神経成長因子前駆体(ProNGF)に結合しアポトーシスを促す。更にNogo受容体, Lingoと受容体複合体を形成し, Mag, Nogo, OMgpといったミエリン由来の成長阻害因子に結合し軸索伸長を抑制する。このようにp75^{NTR}の結合は多岐に渡る。p75^{NTR}はAβとも結合する。アルツハイマー病では脳にアミロイドが蓄積するが、この構成成分がAβでAPPはその前駆体である。Aβはp75^{NTR}に結合して下流のJNK等を活性化しアポトーシスが起こる。p75^{NTR}はAPPとも結合する。APPやAβがp75^{NTR}に結合するとアポトーシスが促進されるのに対して、APPの分解物であるsAPPαとsAPPβは軸索伸長作用や神経保護作用があるが、受容体は不明である。本研究ではsAPPα, sAPPβ, C末端sAPPα(C-sAPPα)の3つのsAPPsについて調べた。sAPPsはAPPと共通の構造を持つので、p75^{NTR}がsAPPsの受容体ではないかと考え、sAPPsがp75^{NTR}に結合するかを検証する事を第一の目的とした。更にNGFがp75^{NTR}に結合し、PKAを介して神経伸長を促すという我々の研究からPKAがp75^{NTR}の下流にあると考え、sAPPαがp75^{NTR}に結合しPKAを介して軸索伸長を促進するかを検証する事を第二の目的とした。 〔方法ならびに成績〕 sAPPsとp75^{NTR}の結合をpull down assay, 免疫細胞化学的方法, ELISAで確認した。更にELISAで両者の結合親和力を調べた。Pull down assayはHis tag付きsAPPsをNi agaroseと沈降させ、コントロールIgG-Fcあるいはp75^{NTR}ECD-Fcを加えた。IgGはsAPPsと共免疫沈降しなかったがp75^{NTR}はsAPPsと共免疫沈降した。sAPPsはp75^{NTR}と結合する事がわかった。次にsAPPsが細胞表面でp75^{NTR}と共局在するか調べた。COS細胞にコントロールpcDNAあるいはpcDNA-p75^{NTR}を導入した。固定後、sAPPsを添加し4℃に2時間放置し、抗sAPPs抗体と抗p75^{NTR}ECD抗体で免疫染色した。p75^{NTR}を発現するCOS細胞ではsAPPsはp75^{NTR}と共局在したが、p75^{NTR}発現のない細胞ではsAPPsは細胞表面に付着しなかった。sAPPsは細胞表面でp75^{NTR}と共局在するという事がわかった。更にsAPPsのp75^{NTR}に対する結合親和力をELISAで調べた。sAPPsでコートしてあるwellにコントロールIgG-Fcあるいはp75^{NTR}ECD-Fcを添加した。これにIgG-Fc抗体を加え、HRP-IgG抗体で標識した。sAPPα, sAPPβ, C-sAPPαのEC50はそれぞれ90 nM, 120 nM, 150 nMであった。sAPPsはp75^{NTR}に結合するが、結合親和力はNGF, Aβより弱く、sAPPαはsAPPβ, C-sAPPαより強くp75^{NTR}に結合するとわかった。 sAPPαが軸索伸長を促すかをE16, C57BL/6J マウス的大脑皮質ニューロンで調べた。ニューロンにコントロールIgGあるいはsAPPαを加えて24時間培養すると、sAPPαは軸索伸長を促した。更に、コントロールpcDNAあるいはpcDNA-sAPPαを導入したCHO細胞とニューロンを共培養した結果、sAPPαは軸索伸長を促した。 p75^{NTR}がsAPPαの機能的受容体である事を示すためにp75^{NTR}に対するsiRNAを用いてloss of function実験を行った。ニューロンにコントロールscrambled siRNAあるいはp75^{NTR}siRNAを導入し、sAPPα添加後24時間培養した。コントロールではsAPPαが軸索伸長を促したのに対してp75^{NTR}のノックダウンではsAPPαの軸索伸長促進効果はなかった。sAPPαの軸索伸長にp75^{NTR}が必要であるとわかった。最後にsAPPαの軸索伸長にPKAが必要であることをPKA阻害剤を用いて証明した。ニューロンをコントロールDMSOあるいはPKA阻害剤で前処置した後sAPPαを添加し24時間培養した。コントロールではsAPPαが軸索伸長を促したのに対してPKA 阻害剤はsAPPαの軸索伸長を抑制した。sAPPαの軸索伸長にPKA必要であるとわかった。 〔総 括〕 sAPPsはp75^{NTR}に結合する。 sAPPαはp75^{NTR}に結合し、PKAを介して軸索伸長を促進する。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 長谷部 紀子	
論文審査担当者	(職) 氏 名
	主 査 大阪大学教授 山下 俊英
	副 査 大阪大学教授 佐藤 真
	副 査 大阪大学教授 金井 好克
論文審査の結果の要旨 上記申請者は、soluble β-amyloid precursor protein α (sAPPα)がp75 neurotrophin receptor (p75^{NTR})に結合して軸索伸長を促進する事を示すため研究を進めてきた。学位審査論文において、Pull down assay、免疫細胞化学的方法、ELISAでsAPPα、sAPPβ、C末端sAPPαがp75^{NTR}に結合する事を明らかにした。ELISAではこれらとp75^{NTR}の結合親和力を求めた。次にsAPPαが軸索伸長を促進する事を示した。p75^{NTR}siRNAを導入したニューロンではsAPPα添加で軸索伸長が抑制される事からp75^{NTR}がsAPPαによる軸索伸長に必要なsAPPαの機能的受容体である事を明らかにした。更にPKA阻害剤でsAPPα添加による軸索伸長が抑制される事からPKAがsAPPα、p75^{NTR}の下流にある事を示した。以上の研究結果は神経科学の領域で重要な成果であり、PLOS ONE誌に掲載された。博士(医学)の学位授与に値する研究成果である。	