

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590359

研究課題名(和文)新規 アミロイド産生調節蛋白の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of the novel modulator of gamma secretase

研究代表者

長谷川 浩史(Hasegawa, Hiroshi)

滋賀医科大学・医学部・客員助教

研究者番号：40432299

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：日本の認知症は460万人、その予備軍の軽度認知障害は400万人とされ、予想を超える速度で増加している。この傾向は欧米各国でも同様で、その大部分を占めるアルツハイマー病(AD)の根本的治療法の確立が急務となっている。

過去の研究で、ADではアミロイド蛋白(A β)の異常増加が認められ、A β 産生増加でマウスの認知機能低下すること示されており、A β 産生調節は大きな鍵を握る。本研究では、A β の産生酵素の新規調節蛋白を同定し、重大な副作用の起こしにくい選択的調節であること、この蛋白の増加は、個体レベルでもA β 産生を軽減させることを発見した。以上より、同定蛋白がAD根本治療の標的となる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：The recent report revealed that 4.6 million Japanese suffer with dementia and more than 4 million, with minimal cognitive impairment. This huge number by this etiological research surprised us and the establishment of fundamental therapeutics of Alzheimer's disease is strongly desired in Japan as well as in the countries where the aged are increasing. A lot of evidence have realized that the increase in amyloid beta is a culprit. The genetic modulation of Abeta production in mice mimics the AD brain pathology and deteriorates the cognitive function. This study identified the novel modulating protein of A beta producing enzyme. The identified modulator is specific to Abeta production, not to another pivotal Notch production. We also confirmed that transgenic mouse of the novel modulator decreased Abeta production in the mouse brain. These findings suggest that the identified modulator is a therapeutic target of AD.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：アルツハイマー病 調節蛋白 治療 アミロイド蛋白 セクレターゼ

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) は痴呆をきたす神経変性疾患の第 1 位を占め、高齢化とともに更に増加すると予想されている。これまでの家族性アルツハイマー病 (FAD) の遺伝子研究及び遺伝子改変マウスの解析より、アミロイド (A β) の産生異常、蓄積が AD の一次的病因とする「アミロイド仮説」が有力視されている。アミロイド前駆体蛋白 (APP) は、糖化等の翻訳後修飾後、又は切断により細胞外部が除かれ、切断より生じた断片から最終的に γ -セクレターゼにより A β が産生される。

しかし、 γ -セクレターゼの基質は APP だけでなく Notch 等複数の重要な蛋白が切断されるので、非特異的な酵素阻害薬は重大な副作用を生じることとなる。生体では、このような多岐にわたる基質の切断調整を巧妙に行っており、酵素活性を有する 4 つの蛋白複合体としての γ -セクレターゼに対する調節機構が存在することが予想される。我々は γ -セクレターゼの内在性結合蛋白である TMP21 (p246i)、p246a2 が Notch 切断活性に影響を与えずに A β 産生を調節することを示してきた。一方、酵素精製から予想される細胞内の γ -セクレターゼ複合体分子量は、既知の蛋白の分子量合計より大きく、恒常的または一過性に内在性調節蛋白が結合し、基質特異性や切断タイミングを調節していることが示唆されていた。

我々は免疫精製法を用いた結合蛋白精製法を新たに確立し、 γ -セクレターゼ複合体の構成蛋白の 1 つである PEN-2 の結合として ILEI/FAM3c を同定した。系統細胞を用いた実験系で siRNA を用いて ILEI/FAM3c 蛋白の発現を特異的に抑制させると、A β 産生量の有意な増加が認められたこと、逆に過剰発現により A β 産生量の減少を認めたことから、生理的には A β 産生抑制蛋白であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、この修飾機能を持つ γ -セクレターゼ結合蛋白 ILEI/FAM3c の A β 産生調節メカニズムの解明、in vivo における A β 産生調節機能の検討を行う。

また、ILEI/FAM3c 蛋白は、興味深いことにウエスタンブロッティングにて培養細胞上清への分泌が確認されたことから、生体内では髄液、血液中にも分泌されている可能性が示唆される。従って、生体において A β 産生量との相関が認められれば、決定的なバイオマーカーが存在しない AD の有力バイオマーカー候補となる可能性がある。このことからバイオマーカー及び治療標的蛋白としての可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 新規蛋白の調節メカニズムの解明

標的分子の同定： γ -セクレターゼ結合蛋白

の探索において、過剰発現させた系統細胞を使用していることから、始めに系統細胞レベルで内在性蛋白においても、ILEI/FAM3c 蛋白が γ -セクレターゼ複合体蛋白と生理的結合を示すことを、免疫沈降法とウエスタンブロッティングで確認する。

基質 APP への影響の検討：ILEI/FAM3c 蛋白の A β 産生抑制機能のメカニズムとして APP の段階的切断への影響、分解速度の変化による酵素反応速度への影響、基質との結合親和性の変化、細胞内局在の変化 (γ -セクレターゼを含めて) 等を系統細胞を用いたウエスタンブロッティング、メタボリックラベル、免疫沈降法、密度勾配を用いた細胞分画法で解析する。

他の基質切断に対する検討： γ -セクレターゼは、A β ペプチドを切り出す切断とそれに先立つ切断の 2 つの切断に不可欠であることが分かっており、切断からは APP のカルボキシル末端である AICD と呼ばれる断片が産生され、いくつかの蛋白の転写活性に影響を与えることが報告されている。PS をロックアウトして γ -セクレターゼ活性を消失させた場合や、 γ -セクレターゼ阻害剤をマウスに投与した場合、Notch シグナルの抑制に似た変化を示すことから、種々の基質の中でも特に Notch が重要と考えられる。Notch シグナルは切断による NICD 産生を介して起こることより、APP 及び Notch の切断を中心に系統細胞を用いたレポーターアッセイ、セルフリーアッセイ、メタボリックラベルを用いて AICD、NICD 産生への影響を検討する。

(2) 遺伝子改変動物の作製と解析：

in vivo における ILEI/FAM3c 蛋白の A β 産生抑制機能を確認するために、また AD 治療標的としての可能性を探るために、遺伝子改変マウスを用いた実験を行う。始めに ILEI/FAM3c 蛋白を安定過剰発現させたマウスを樹立し、病理的变化と ILEI/FAM3c 蛋白の発現状態を確認する。ILEI/FAM3c 蛋白の増加による影響を免疫組織化学的手法で確認し、個体レベルでも A β 産生抑制蛋白として機能しているか、他の基質である Notch 切断への影響を明らかとする。一方、これまでに家族性 AD の原因遺伝子変異を安定発現させたマウスはヒト AD の病理像の一部、認知機能の経時的低下をよく再現しており AD モデルマウスとして確立されている。この 2 種の遺伝子改変マウスを交配させることにより、ILEI/FAM3c 蛋白の増加による AD 病理への影響を、免疫組織化学的手法で確認し、個体レベルでも A β 産生抑制蛋白として機能しているかどうかを検討する。

(3) バイオマーカー、治療標的蛋白としての可能性の検討：

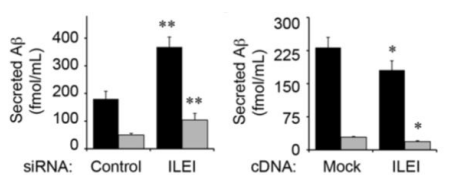
アミノ酸一次配列の情報と系統細胞の培養上清中に分泌が認められることより、

ILEI/FAM3c 蛋白は分泌蛋白であることが強く示唆される。従って、 γ -セクレターゼへの調整作用として、細胞外からの作用が予想されることから、ILEI/FAM3c 蛋白発現細胞の培養上清よりタグを用いた分泌型 ILEI/FAM3c 蛋白を部分精製し、 $A\beta$ を産生している細胞培養上清に添加することにより、 $A\beta$ 産生への効果を観察する。培養細胞を用いた系では、特に刺激を与えなくても培養上清中に分泌が認められることより、恒常的な分泌が行われている可能性もあるが、 $A\beta$ 産生に対するフィードバック機構の可能性もある。そこで、生体における生理的な、ILEI/FAM3c 蛋白と $A\beta$ 産生の関連を見るために、カニクイザルの間欠的髄液採取による、ILEI/FAM3c 蛋白量と $A\beta$ 産生を測定する。

4. 研究成果

(1) 新規蛋白の調節メカニズムの解明:

標的分子の同定: HEK293 細胞を 1% CHAPSO で可溶化した膜分画を用いた免疫沈降法で、内在性 ILEI/FAM3c 蛋白と γ -セクレターゼ複合体構成蛋白 (presenilin, nicastrin, APH-1, PEN-2) との結合は確認できた。従って、ILEI/FAM3c 蛋白と γ -セクレターゼ複合体との結合は生理的なものと考えられた。また、非還元下での分子量評価を Blue-native PAGE で行うと、ILEI/FAM3c 蛋白は高分子量領域に γ -セクレターゼ複合体構成蛋白と共に分布し、各構成成分に別々に結合しているのではなく、成熟した複合体に結合していると示唆された。また、複数の細胞系で、ILEI/FAM3c 蛋白の siRNA による発現現象による $A\beta$ 産生の増加、強制発現による ILEI/FAM3c 蛋白の増加による $A\beta$ 産生の現象を確認され、生理的には、 $A\beta$ 産生抑制蛋白と考えられた。



A 40/42

基質 APP への影響の検討:

APP は、アミロイド前駆体蛋白 (APP) は、糖化等の翻訳後修飾後、 γ 切断により細胞外部位が除かれ、 γ 切断より生じた断片 APP-CTF を直接の基質として γ -セクレターゼにより $A\beta$ が産生される。APP の mRNA レベル及び基質となる APP-CTF の産生酵素である BACE (γ 切断酵素) 活性は、siRNA による ILEI/FAM3c 蛋白発現抑制で $A\beta$ 産生が増加するにもかかわらず、変化は認められなかった。ところが、興味あることに APP-CTF 自体の蛋白レベルは ILEI/FAM3c 蛋白の減少で増加し、発現を増加させることにより減少した。そこで、メタボリックラベルにより

APP-CTF の代謝を検討したところ、ILEI/FAM3c 蛋白の減少で APP-CTF の分解が遅延することが明らかとなった。一方 APP-CTF の細胞内ドメインは ϵ 切断で AICD が生成され核での転写活性に関与することが示唆されている。以上のことから ILEI/FAM3c 蛋白は、基質である APP-CTF の代謝を促進することにより、 $A\beta$ 産生を抑制的に調節していることが示唆された。

他の基質切断に対する検討: γ -セクレターゼのもう一つの重要な基質である Notch 切断の影響をルシフェラーゼリポーターアッセイとウエスタンブロッティングで検討した。Notch 切断における γ -セクレターゼの作用部位は、段階的切断である NEXT から NICD を切断する ϵ 切断である。すなわち、APP 切断経路における APP-CTF からの AICD 産生に相当する。APP と異なり、ILEI/FAM3c 蛋白の siRNA による減少は、NICD 産生には影響を与えなかった。このことから、ILEI/FAM3c 蛋白の作用機序は γ 切断、 ϵ 切断といった γ -セクレターゼ活性を直接非特異的に調節するのではなく、APP という基質特異的に $A\beta$ 産生を調節していることが明らかとなった。

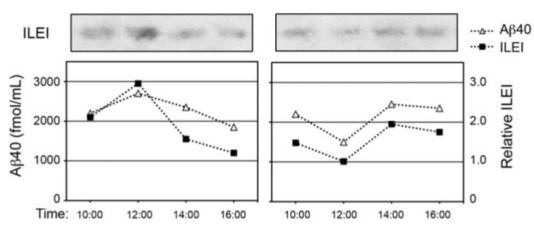
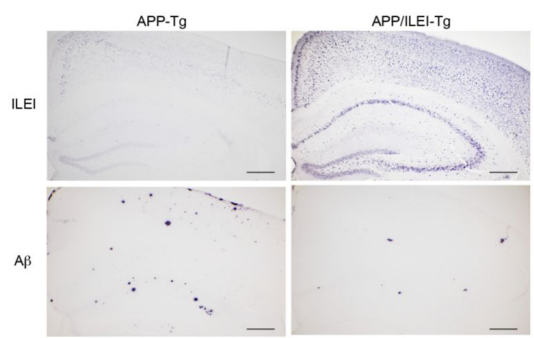
(2) 遺伝子改変動物の作製と解析

始めに、野生型マウスにおける、ILEI/FAM3c 蛋白の発現を検討した。ILEI/FAM3c 蛋白は神経細胞に広く分布していたが、大脳皮質の錐体細胞、海馬の神経細胞には特に強い発現が認められた。細胞内分布では、核周囲に Golgi 体様の分布として認められ、細胞分画における cis-Golgi ~ TGN マーカーとの共存と一致する結果であった。また、マウス PrP プロモーターを用いた ILEI/FAM3c 蛋白の過剰発現させた遺伝子改変マウスを作成したが、発生学的、形態学的異常は認められなかった。ILEI/FAM3c 蛋白の発現レベルは野生型の 3 倍以上であったが組織分布は野生型と同一であった。この Tg マウスにおいて、 $A\beta$ 産生の有意な減少が認められた。一方、Notch 切断は細胞レベルと同様野生型と同様で変化が認められなかった。AD モデルマウスと Tg ILEI/FAM3c マウスの交配により、 $A\beta$ 産生低下と $A\beta$ 蓄積病理は有意に軽減した。以上より、 $A\beta$ 産生調節機能は、個体レベルでも証明された。

(3) バイオマーカー、治療標的蛋白としての可能性の検討: カニクイザルの間欠的髄液採取を行い、髄液内 $A\beta$ と ILEI/FAM3c 蛋白をそれぞれ ELISA ウエスタンブロッティングで測定した。髄液内 $A\beta$ は一定ではなく、日内変動を示すことが知られているが、ILEI/FAM3c 蛋白は髄液内 $A\beta$ の増減と平行して変動することがわかった。ILEI/FAM3c 蛋白は $A\beta$ に対して抑制的作用を持つことから、ネガティブフィードバックをかけている

可能性が示唆された。

以上より、ILEI/FAM3c 蛋白は神経細胞において A β 産生に抑制的に作用する内在性調節因子で、その作用は APP 基質に選択的で AD 治療ターゲットとなる可能性があることが明らかとなった。また、これまで報告されている調節蛋白と異なり、分泌蛋白であること、髄液 A β と増減を同じくすることから、AD の有効なバイオマーカーとなり得ることが示された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Hasegawa H, Liu L, Tooyama I, Murayama S, Nishimura M. The FAM3 superfamily member ILEI ameliorates Alzheimer's disease-like pathology by destabilizing the penultimate amyloid- β precursor. Nat Commun, in press, doi:10.1038/ncomms4917 査読有

〔学会発表〕(計2件)

劉 磊、長谷川浩史、遠山育夫、村山繁雄、西村正樹. ILEI はアルツハイマー病モデルマウスのアミロイド沈着と記憶障害を軽減させる. 第33回日本認知症学会、横浜、Nov 29-Dec 1, 2014

劉 磊、長谷川浩史、遠山育夫、村山繁雄、西村正樹. ILEI は APP-C99 を不安定化することによりアミロイド産生を減少させる. 第37回日本神経科学会、横浜、Sep 11-13, 2014

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

長谷川 浩史 (HASEGAWA Hiroshi)

滋賀医科大学 医学部 客員助教

研究者番号: 40432299

(2)研究分担者

西村 正樹 (NISHIMURA Masaki)

滋賀医科大学 分子神経科学研究センター-
准教授

研究者番号: 40322739