

令和元年6月14日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07044

研究課題名(和文) アミロイド 産生酵素 セクレターゼの基質選択性に関する糖鎖の同定

研究課題名(英文) Identification of glycosylation site involving into substrate preference of gamma-secretase

研究代表者

舟本 聡 (Funamoto, Satoru)

同志社大学・生命医科学部・准教授

研究者番号：10345043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Nicastrin(NCT)は、アミロイド 産生酵素の セクレターゼ複合体中で唯一糖鎖修飾を受ける。しかし、糖鎖の役割は不明である。我々はCHO細胞の糖鎖修飾変異細胞(Lec-1)を用いて、NCT糖鎖修飾の セクレターゼ活性等を検証した。Lec-1細胞ではglycosyltransferase-1を欠損している。この細胞では、Ab産生とNotch切断がともに減少していたが、Ab産生の方が有意に減少していた。これらの細胞から セクレターゼを抽出し、人工基質を添加して調べても同様の結果を得た。これらの結果はNCTの糖鎖修飾の違いが酵素活性や基質選択性に影響を与えていることを示していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病予防・治療のために セクレターゼ活性を阻害すると、生体内の重要なタンパク質分解も阻害され重篤な副作用を引き起こす。Abの産生のみを阻害する セクレターゼ阻害薬を開発するためには、この酵素の基質選択性の理解が必要である。この観点から、本研究は、 セクレターゼの基質選択決定に糖鎖が関与することを始めて示すこととなり、この知見が今後創薬研究に活かされる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Nicastrin is one of components of γ -secretase complex, catalyzes the cleavage of amyloid precursor protein to generate amyloid- β protein (A β). NCT becomes matured through complex glycosylation and play important role in γ -secretase activity. However, the role of NCT glycosylation on γ -secretase activity and substrate specificity is still unknown. We investigated the effect of NCT glycosylation on γ -secretase activity and substrate specificity in a group of glycosylation mutant lectin resistant CHO (Lec) cells. CHO Lec-1 cells lack glycosyltransferase-1, thus N-glycan on NCT are all oligomannose type. We found that mutant CHO Lec-1 and Lec-2 reduced γ -secretase activity in both cell-based and biochemical assays, and that CHO Lec-1 preferentially reduced A β generation. Our data suggests that thorough glycosylation of NCT is critical for enzymatic activity and substrate preference of γ -secretase.

研究分野：神経病理学

キーワード：アルツハイマー病 アミロイド セクレターゼ 糖鎖修飾 基質選択性

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

γ セクレターゼは、Presenilin、Nicastrin、Pen-2、Aph-1 の4つの膜タンパク質から構成され、I型膜タンパク質の膜貫通領域を加水分解する特異なアスパラギン酸プロテアーゼである。 γ セクレターゼの基質タンパク質として知られるアミロイド前駆体タンパク質 (APP) は、最初のプロセッシングとして β セクレターゼによる切断 (β 切断) を受ける (図1)。こうして、APPはその細胞外領域の大部分を失い、膜上に残ったAPP断片は99アミノ酸のC99となる。C99は、直接的な γ セクレターゼ基質として、 γ セクレターゼの切断 (γ 切断) を受けて、 $A\beta$ へと変換される。 $A\beta$ は40アミノ酸ほどのペプチドで、主に38~42アミノ酸の分子種がある。特に42アミノ酸からなる $A\beta_{42}$ は、凝集性や毒性が高く、これが脳内に蓄積することで、アルツハイマー病が発症すると考えられている。したがって、 $A\beta$ の産生を抑制すればアルツハイマー病を予防できることは言うまでもない。しかし、 γ セクレターゼにはNotchなどの多数の基質タンパク質が知られており (Beel & Sanders, Cell Mol.Life Sci. 2008)、これらの切断は生理的に非常に重要である。このため、単なる γ セクレターゼの活性阻害では、重篤な副作用を引き起こす。アルツハイマー病の予防には、基質選択的な γ セクレターゼ活性阻害方法の確立が期待されている。

これまでに、毒性のある $A\beta_{42}$ の産生を抑え、毒性の無い $A\beta_{38}$ の産生を高める γ モジュレーターの開発が行われてきた。しかし、過去実施されたMyriad社のFlurizanの第三相試験では、期待された成果を得られずに終了した。現在も他の γ モジュレーターの開発研究が続いている。しかし、 γ モジュレーターは、一般的な培養細胞では効率よく $A\beta_{42}$ の産生を抑制するが、iPS細胞から分化させた神経細胞では、その効果が極めて低いことがわかってきた。また、家族性アルツハイマー病変異をもつ γ セクレターゼや孤発性アルツハイマー病患者由来の γ セクレターゼでは、 γ モジュレーターの効果が高いことも知られている (Page et al., JBC. 2008; Kakuda et al., Neurobiol. Aging 2013)。このことから、 γ モジュレーターの臨床での効果に疑問の声もある。

申請者は、培養細胞や脳組織内の γ セクレターゼが基質のアミノ末端を捕捉し、細胞外ドメインの短い基質を優先的に切断することを発見した (Funamoto et al., Nat.Comm. 2013、筆頭著者兼責任著者)。この発見は、 γ セクレターゼに基質選択性があることを示し、 γ セクレターゼが基質の細胞外ドメイン部分を認識していることを意味している。また、申請者は基質選択的 γ セクレターゼ阻害剤開発の取組みとして、C99基質の細胞外ドメインに特異的に結合するペプチド (C99結合ペプチド) を開発し、C99特異的な γ セクレターゼ切断阻害を示した (Funamoto et al., Nat.Comm. 2013、筆頭著者兼責任著者; 特願 2012-208277; PCT/JP2013/50663; Patent No. US 9,045,525, B2)。この過程で、C99に結合する γ セクレターゼには、糖鎖修飾が未成熟なNicastrinが含まれ、一方、Notchに結合する γ セクレターゼには、成熟型のNicastrinが含まれることがわかった (Funamoto et al., Nat.Comm. 2013)。この発見は、糖鎖修飾の違いが γ セクレターゼの基質選択性を決定している可能性を示唆した。

2. 研究の目的

申請者の先行研究から、糖鎖が基質結合・基質選択性に関与していると考えられることから、本研究では γ セクレターゼの糖鎖の機能的役割を解明することを目的とし、 γ セクレターゼにおける構造・機能の解明を補完することを目指している。

3. 研究の方法

「1. C99結合 γ セクレターゼとNotch結合 γ セクレターゼの分離」C99基質とNotch基質をそれぞれ磁気ビーズに結合させて、これを可溶性膜に添加することでそれぞれの基質に結合する γ セクレターゼ複合体の分離を試みた。

「2. 各基質結合 γ セクレターゼのNicastrin糖鎖修飾と基質選択性の検討」分離した γ セクレターゼ複合体について、C99やNotchを添加して基質選択性を検討した。

「3. 各基質結合 γ セクレターゼの $A\beta$ 分子種産生の検討」C99結合 γ セクレターゼとNotch結合 γ セクレターゼに対して、産生する $A\beta$ 分子種を質量分析で検討した。

「4. 糖鎖付加変異細胞による γ セクレターゼの基質選択性の変化の検討」Lec-1細胞を可溶化して可溶性 γ セクレターゼを得て、これにC99やNotch基質を添加して、基質選択性を検討した。また、細胞にC99やNotch基質を発現させて、産生される $A\beta$ やNotch- β ($N\beta$)の量を検討した。

「5. グリコシダーゼ処理による糖鎖除去 Nicastrin 含有 γ セクレターゼの基質選択性の変化の検討」野生型 CHO 細胞から Nicastrin のアフィニティー精製で得た γ セクレターゼを PNGase や EndoF 処理し、基質選択性の比較検討を試みた。

「6. N結合型糖鎖/O結合型糖鎖欠損 Nicastrin 発現細胞と Nicastrin 欠損細胞の作製」において、15カ所の予測される糖鎖付加部位について、個々にアラニン置換した Nicastrin コンストラクトを作製した。しかし、これを細胞に発現させても内在性の Nicastrin があるため、変異導入の結果を反映できない。そこで、Nicastrin の欠損細胞の樹立を試みた。

「7. γ セクレターゼの基質選択に関する Nicastrin 糖鎖修飾部位の同定」において、上記 Nicastrin 欠損細胞に15種類の各糖鎖欠損 Nicastrin を発現させた。

「8. γ セクレターゼの基質選択に関与する糖鎖同定」において、糖鎖欠損変異体を利用

して同定を試みる。

「9. γ セクレターゼの C99 選択性に関与する糖鎖結合レクチンの探索」において、糖鎖欠損変異体を利用して同定を試みる。

4. 研究成果

「1. C99 結合 γ セクレターゼと Notch 結合 γ セクレターゼの分離」C99 基質と Notch 基質に結合する γ セクレターゼ複合体の分離に成功した。

「2. 各基質結合 γ セクレターゼの Nicastrin 糖鎖修飾と基質選択性の検討」分離した γ セクレターゼ複合体について、C99 や Notch を添加して基質選択性を検討したところ、両者に大きな違いが無いことが判明した。

「3. 各基質結合 γ セクレターゼの A β 分子種産生の検討」C99 結合 γ セクレターゼと Notch 結合 γ セクレターゼに対して、産生する A β 分子種を質量分析で検討したところ、分子種に違いがないことが判明した。

「4. 糖鎖付加変異細胞による γ セクレターゼの基質選択性の変化の検討」CHO 細胞の糖鎖付加変異細胞 Lec-1 と Lec-2 について、 γ セクレターゼの直接的な基質の C99 と Notch を導入して、A β と Notch β (N β) の産生を検討したところ、Lec-1 において N β よりも A β の産生が有意に低下していることがわかった。また、これらの細胞の膜フラクションを CHAPSO により可溶化し可溶化 γ セクレターゼにおいて検討すると、細胞レベルと同様に Lec-1 において N β よりも A β の産生が有意に低下していることがわかった。Lec-2 ではこのような現象がみられなかったため、Lec-1 に C99 に選択性を欠く糖鎖が欠乏していると考えられる。いずれにせよ、この結果は糖鎖が γ セクレターゼの基質選択性に何らかの影響を与えていることを示唆していた。

「5. グリコシダーゼ処理による糖鎖除去 Nicastrin 含有 γ セクレターゼの基質選択性の変化の検討」野生型 CHO 細胞から Nicastrin のアフィニティー精製で得た γ セクレターゼを PNGase や EndoF 処理し、基質選択性の比較検討を試みた。その結果、いずれの処理においても γ セクレターゼの活性を得ることができなかった。これらのグリコシダーゼ処理時に微量の SDS や還元剤を添加したことが原因と考えられる。そこで、糖鎖修飾阻害剤の Kifunensine を細胞に処理して γ セクレターゼの基質特異性を検討した。まず、Kifunensine 処理により Nicastrin の糖鎖修飾の未成熟を確認した。そこで、C99 からの A β 産生や Notch 切断を検討すると、いずれの場合も減少していることがわかった。

「6. N 結合型糖鎖/O 結合型糖鎖欠損 Nicastrin 発現細胞と Nicastrin 欠失細胞の作製」において、15カ所の予測される糖鎖付加部位について、個々にアラニン置換した Nicastrin コンストラクトを作製した。しかし、これを細胞に発現させても内在性の Nicastrin があるため、変異導入の結果を反映できない。そこで、Nicastrin の欠失細胞の樹立を試みた。CRISPR/Cas9 法により Nicastrin 遺伝子にフレームシフトが導入されていることを確認できた。

「7. γ セクレターゼの基質選択に関する Nicastrin 糖鎖修飾部位の同定」において、上記 Nicastrin 欠失細胞に15種類の各糖鎖欠損 Nicastrin を発現させた。その結果、2つの変異体で A β 産生が低下し、3つの変異体で Notch 切断が向上していた。

「8. γ セクレターゼの基質選択に関与する糖鎖同定」と「9. γ セクレターゼの C99 選択性に関与する糖鎖結合レクチンの探索」については、現在遂行中である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

① Moniruzzaman M, Ishihara S, Nobuhara M, Higashide H, Funamoto S. Glycosylation status of nicastrin influences catalytic activity and substrate preference of γ -secretase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018 Jul 7;502(1):98-103. 査読有
doi: 10.1016/j.bbrc.2018.05.126.

② Higashide H, Ishihara S, Nobuhara M, Ihara Y, Funamoto S. Alanine substitution in the GXXXG motif alter C99 cleavage by γ -secretase but not its dimerization. *J. Neurochem.* 2017 140: 955-962. 査読有 doi: 10.1111/jnc.13942

[学会発表] (計 7 件)

① Funamoto S. Glycosylation status of nicastrin influences catalytic activity and substrate preference of γ -secretase. ADPD2019 (リスボン、ポルトガル), 2019年3月

② モニルツザマン モハマド、石原聖子、延原美香、舟本 聡. Glycosylation deficiency of nicastrin induces cleavage defect of γ -secretase. 日本認知症学会 (札幌)、2018年10月

③ Moniruzzaman M, Nobuhara M, Ishihara S, Funamoto S. Modulator of Amyloid beta by Tetraspanin 7. ConBio2017 (日本分子生物学会), 2017年12月

④ 高見真子、石原聖子、延原美香、井原康夫、舟本 聡. APP ϵ 切断部位から読み解く A β 分子種産生機序. 日本認知症学会 (金沢)、2017年11月

⑤ Funamoto S. Ishihara S, Nobuhara M, Ihara Y. Potential determination mechanism of ϵ -cleavage sites: Implication for determinants of A β 40 and A β 42 product lines. ADPD2017 (ウィーン、オーストリア), 2017年3月

⑥ Higashide H, Ishihara S, Nobuhara M, Ihara Y, Funamoto S. Alanine substitution in the

GXXXG motif alter C99 cleavage by γ -secretase but not its dimerization. ADPD2017 (ウィーン, オーストリア), 2017年3月

⑦高見真子, 石原聖子, 延原美香, 井原康夫, 舟本 聡. 挿入・欠失型 C99 を利用した A β 産生経路決定機構についての考察. 日本認知症学会 (東京) 2016年12月

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1件)

名称: A β タンパク質特異的産生抑制剤
発明者: 舟本 聡, 延原美香, 河村聖子
権利者: 学校法人同志社
種類:
番号: 特願 2018-154788
出願年: 2018
国内外の別: 併願

○取得状況 (計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号 (8桁):

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: Mohammad Moniruzzaman

ローマ字氏名: Mohammad Moniruzzaman

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。