

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06855

研究課題名(和文)新規ユビキチンリガーゼを標的とするアルツハイマー病の治療薬開発に向けた基盤研究

研究課題名(英文) Basic research for the development of therapeutic drugs for Alzheimer's disease targeting a novel ubiquitin ligase

研究代表者

安川 孝史 (Yasukawa, Takashi)

高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・助教

研究者番号：60291936

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病(AD)は、アミロイド(A β)の蓄積が引き金となる。A β の生成と凝集は、抗AD因子であるBR12とBR13によって抑制される。私たちは、NRBP1が、Cullin-RINGユビキチンリガーゼの基質認識タンパク質として機能し、BR12/BR13を選択的に分解に導くことを見出した。さらに神経細胞においてNRBP1をノックダウンすると、BR12/BR13タンパク量が増加し、A β 産生が有意に抑制された。そこで、NRBP1とその基質BR12/BR13との相互作用の阻害は、ADの治療戦略として有用であると考えられたため、その阻害剤探索のためのスクリーニング系の構築を図った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

まだ詳細な機能がよく分かっていないNRBP1が、基質認識タンパク質として2量体化してCul2ならびにCul4Aと結合してヘテロ2量体型のユビキチンリガーゼ複合体を形成、抗アルツハイマー病因子であるBR12/BR13を選択的にユビキチン化して分解に導くことを明らかにした。そして、NRBP1-ユビキチンリガーゼと基質BR12/BR13間の相互作用を阻害する化合物が、細胞内BR12/BR13のタンパク質量を増加させることで両因子のもつ抗AD作用を増強する新規アルツハイマー病治療薬になり得る可能性があることを示した。

研究成果の概要(英文)：Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disease caused by accumulations of A β peptides. Production and fibrillation of A β are downregulated by BR12 and BR13, which are physiological inhibitors of amyloid precursor protein (APP) processing and A β oligomerization. We identify nuclear receptor binding protein 1 (NRBP1) as a substrate receptor of a Cullin-RING ubiquitin ligase (CRL) that targets BR12 and BR13 for degradation. Furthermore, NRBP1 knockdown in neuronal cells results in an increase in the abundance of BR12 and BR13 and significantly reduces A β production. Thus, disrupting interactions between NRBP1 and its substrates BR12 and BR13 may provide a useful therapeutic strategy for AD.

We therefore set out to develop a screening system for the discovery of inhibitors.

研究分野：分子生物学

キーワード：アルツハイマー病 ユビキチンリガーゼ NRBP1

1. 研究開始当初の背景

Nuclear receptor binding protein 1 (NRBP1) は、TSC22 ドメインファミリータンパク質メンバーの D3 と D4 存在下で、Elongin B/Elongin C (EloBC) の橋渡しにより Cullin 2 (Cul2) と結合して NRBP1-ユビキチンリガーゼ複合体 (NRBP1-E3) を形成することが判明した。その基質の探索を行ったところ BRI2 と BRI3 が候補として同定された。アミロイド前駆体タンパク質 (APP) 結合タンパク質である BRI2 とその相同因子 BRI3 は、 β アミロイド ($A\beta$) の産生、分解、凝集、ならびに 2 型糖尿病および同病患者に合併する AD の発症に深く関与する膵島アミロイドポリペプチド (IAPP) の分解、凝集、の複数の過程を制御することにより抗アルツハイマー病 (AD) 因子として機能する。そこで、NRBP1 と BRI2/BRI3 との相互作用を阻害する化合物は、BRI2/BRI3 の抗 AD 作用を増強することで、AD 治療薬になり得るのではと着想した。

2. 研究の目的

NRBP1-E3 を標的とする新規 AD 治療薬創出のための基盤研究として、NRBP1-E3 複合体の解析と、NRBP1 と BRI2/BRI3 間の相互作用を阻害する化合物探索のためのスクリーニング系の構築を目的とする。

3. 研究の方法

1) NRBP1-E3 複合体の解析

FLAG タグあるいは HA タグを付加した NRBP1、Cullin 等を 293T 細胞に共発現させた後、細胞抽出液をタグに対する抗体で免疫沈降し、検出対象タンパク質の抗体でウェスタンブロット (WB) を行った。

2) NRBP1-E3 による BRI2/BRI3 ユビキチン化の解析

293T 細胞に NRBP1、TSC22D3/D4、BRI2/BRI3、HA-TR-TUBE (トリプシン抵抗性ユビキチン鎖結合タンパク質) を共発現させた後、細胞抽出液を抗 HA 抗体で免疫沈降し、抗 BRI2/BRI3 抗体で WB を行った。

3) NRBP1 と BRI2/BRI3 間の相互作用の解析

Sf9 細胞に FLAG タグを付加した NRBP1 の野生型あるいは種々の欠失変異体を発現するバキュロウイルスと VSVG タグを付加した BRI2/BRI3 を発現するバキュロウイルスを感染させた後、細胞抽出液を抗 VSVG 抗体で免疫沈降し抗 FLAG 抗体による WB を行った。

4) $A\beta$ の測定

細胞の培養上清を回収し ELISA を用いて測定した。

4. 研究成果

1) NRBP1-E3 複合体の解析

NRBP1 が E3 として機能するか検証を行った。NRBP1 と TSC22D3/D4 の安定共発現 293T 細胞に各 Cullin あるいはそれらのドミナントネガティブ (DN) 変異体と HA-TR-TUBE、BRI2/BRI3 を共発現させ、その細胞抽出液を抗 HA 抗体で免疫沈降後、抗 BRI2/BRI3 抗体による WB を行った。その結果、E3 活性は、DN-Cul2 の過剰発現により抑制され、Cul2 の過剰発現により促進された。興

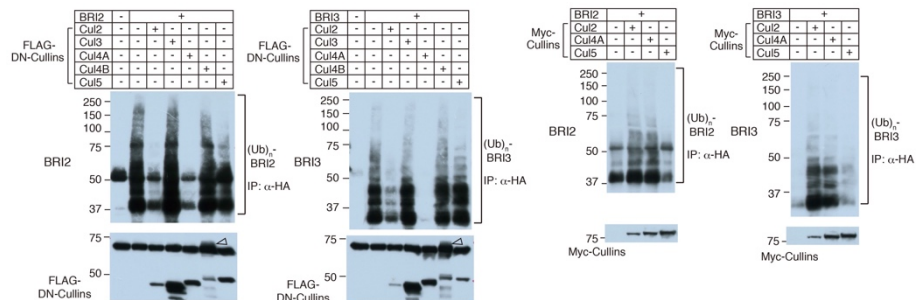


図 1 NRBP1-E3 による BRI2/BRI3 のユビキチン化には Cul2 に加えて Cul4A も関与する

味深いことに、NRBP1-E3 による BRI2/BRI3 のユビキチン化には Cul2 に加えて Cul4A も関与することが判明した(図1)。

そこで、NRBP1 が Cul4A とも複合体を形成するのか検証を行った。293T 細胞に FLAG-NRBP1、TSC22D3/D4、Cul4A を共発現させ、その細胞抽出液を抗 FLAG 抗体で免疫沈降後、各抗体による WB を行った。その結果、TSC22D3/D4 により NRBP1 とアダプタータンパク質 DDB1 を介した Cul4A との結合が著名に促進されることが判明した(図2)。

さらに、NRBP1のC末にはタンパク質の二量体化に重要なアミノ酸配列LisHモチーフが存在することを見出したので、同モチーフがNRBP1の二量体形成に重要であるか解析を行った。293T細胞にV5タグを付加した野生型NRBP1と、FLAGタグを付加したLisHモチーフの点変異体ならびに欠失変異体を共発現させ、その細胞抽出液を抗V5抗体で免疫沈降後、抗FLAG抗体によるWBを行った。その結果、全ての変異体において二量体化が抑制され、NRBP1の二量体化にはLisHモチーフが重要であることが判明した(図3)。

つぎに、HAタグを付加したCul2/Cul4AとMycタグを付加したCul2/Cul4Aと野生型NRBP1あるいはNRBP1-LisH M2変異体[二量体化(-)変異体]を、図に示した組みあわせで293T細胞に共発現させたのち、細胞抽出液を抗HA抗体により免疫沈降しWBを行ったところ、二量体化したNRBP1の橋渡しによりCul2とCul4Aが同一複合体に取り込まれることが明らかになった。また、NRBP1二量体の橋渡しによりCul2/Cul4A型だけでなくCul2/Cul2型、Cul4A/Cul4A型の複合体も形成されることが判明した(図4)。

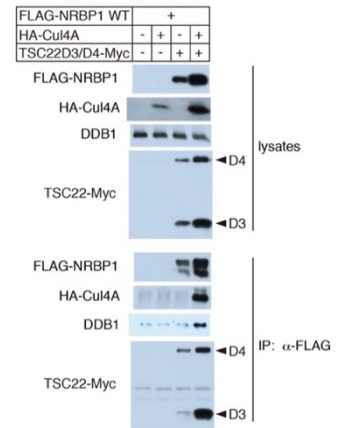


図2 TSC22D3/D43 により NRBP1 とアダプター DDB1 を介しての Cul4A の結合が著名に促進される

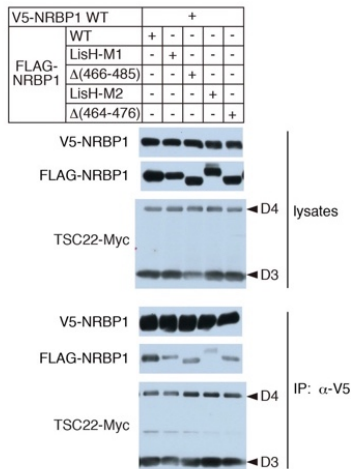
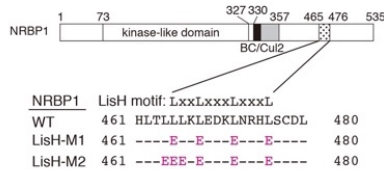


図3 NRBP1 の二量体化には LisH モチーフが重要である

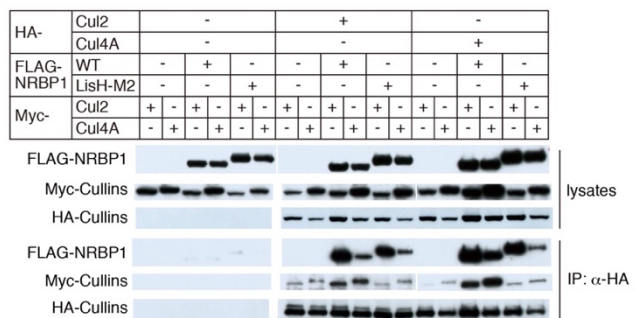


図4 二量体化 NRBP1 の二量体化を介して Cul2 と Cul4A が同一複合体に取り込まれる

さらに、NRBP1のBC-boxのアミノ酸配列にオーバーラップしてCul4AのアダプターDDB1の結合配列であるH-boxが存在することを見出した(図5A)。そこで、二量体化能を欠失したNRBP1のH-boxに種々の変異を導入したものを作製し、IPL[Cul2結合能(-)]、H-box-

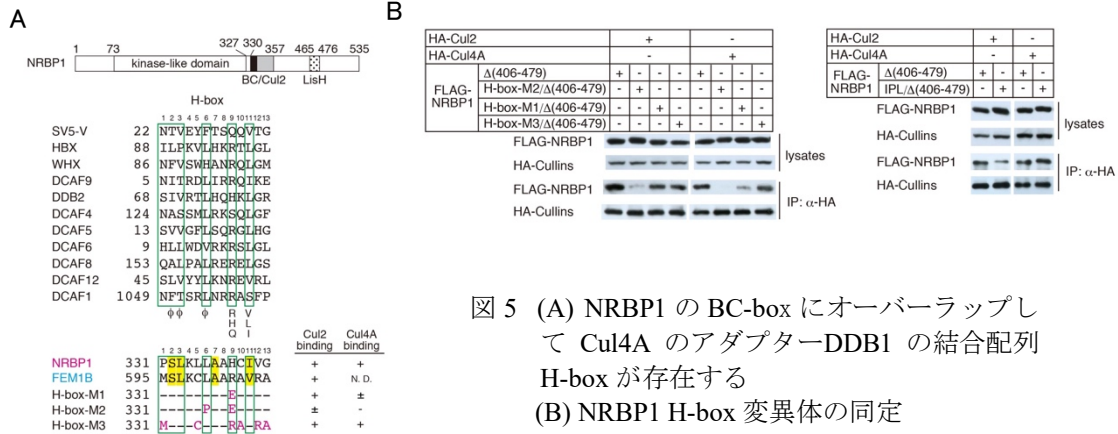


図5 (A) NRBP1のBC-boxにオーバーラップしてCul4AのアダプターDDB1の結合配列H-boxが存在する
(B) NRBP1 H-box変異体の同定

M2[Cul2,Cul4A結合能(-)]、H-box-M1[Cul4A結合能(-)]等のH-box変異体を用いてBRI2/BRI3に対するユビキチン化活性をTR-TUBE法により解析したところ、NRBP1-E3によるBRI2/BRI3の高度のユビキチン化には、NRBP1の二量体化とCul2およびCul4Aとの結合が必要であることが判明した(図6)。

ついでNRBP1とBRI2/BRI3との結合に必要な領域の同定を行った[研究の方法3]。NRBP1のアミノ酸配列(328-535)の領域がBRI2/BRI3との相互作用に重要であり(図7)、BRI2/BRI3の内腔側のC末ペプチド部分を除いた領域がNRBP1との相互作用に重要であ

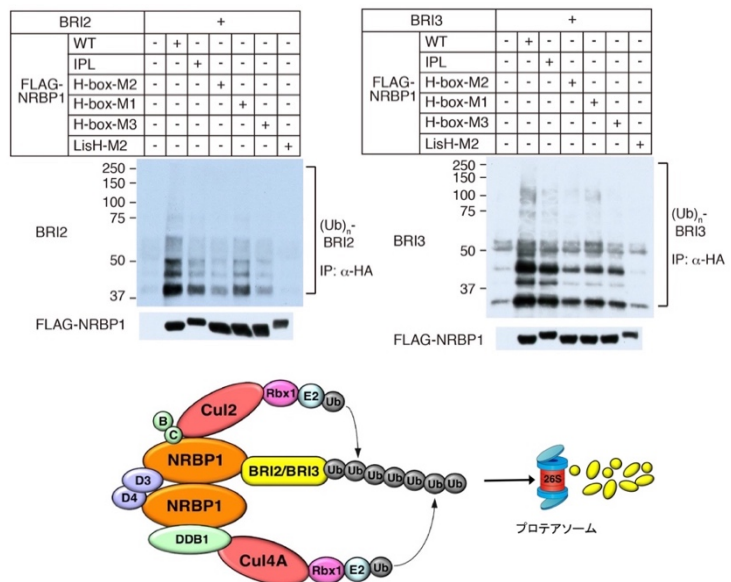


図6 NRBP1-E3によるBRI2/BRI3の高度のユビキチン化には、NRBP1の二量体化とCul2及びCul4Aとの結合が必要である

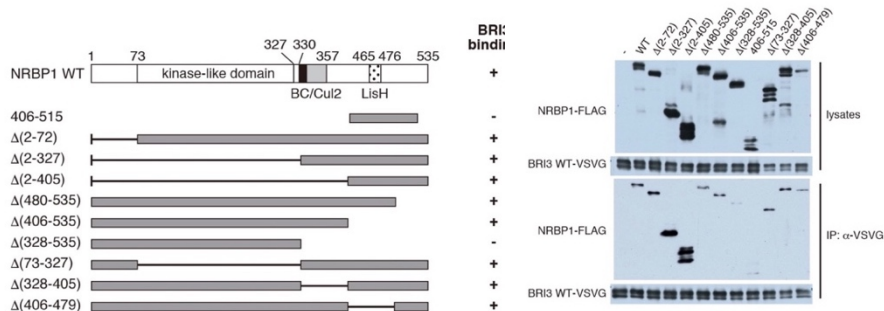


図7 NRBP1のアミノ酸配列(328-535)の領域がBRI2/BRI3との相互作用に重要である

ることが判明した(図 8)。

マウス大脳皮質の神経初代培養細胞において NRBP1-E3 の構成因子の発現が確認されたので、内在性 NRBP1 の機能障害が APP のプロセッシングに影響を与えるか解析を行った。神経系細胞 F11 で siRNA による NRBP1 のノックダウンを行ったところ、内在性 BRI2/BRI3 の増加と Aβ 産生の抑制が認められ、siRNA 抵抗性 NRBP1 の導入により、この BRI2/BRI3 安定化ならびに Aβ 産生抑制が解除された(図 9)。

2) NRBP1 と BRI2/BRI3 間の相互作用を阻害する化合物のスクリーニング系の構築

分泌型 *Gaussia* ルシフェラーゼ (Gluc) を N 末端側 (Gn) と C 末端側 (Gc) の 2 つの断片に分割、各々 BRI2 と NRBP1 に連結した発現用コンストラクトを作製した。培養細胞内で共発現させると両タンパク質が結合した場合に Gn と Gc が近接して培養上清中の Gluc の活性が回復し発光が検出されるが、化合物の添加により結合が阻害されると発光が見られなくなる二分子発光補完法を用いて構築した(図 10A)。NRBP1-Gc と BRI2-Gn1 あるいは BRI3-Gn 2 の組みあわせで高い S/B 比を得ることが出来た(図 10B) [特許申請中: 特願 2019-088444]。

この阻害剤探索のテーマは、理化学研究所の創薬・医療技術基盤プログラム (理研 DMP) の創薬テーマに選定されており、現在、理研 DMP 支援のもと、本スクリーニング系を用いた同化合物の探索に着手している。

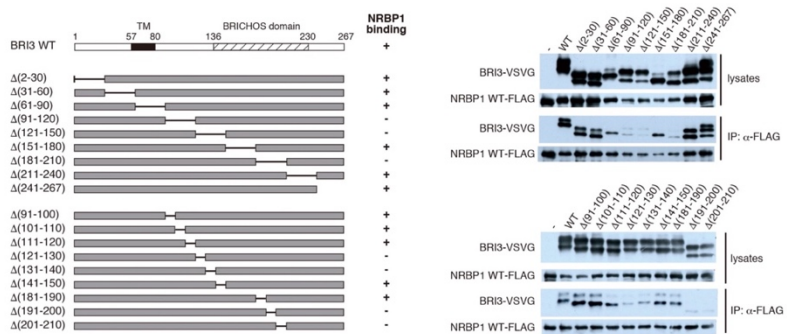
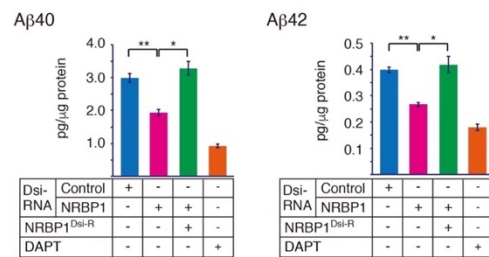
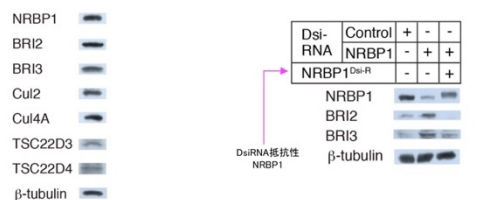


図 8 BRI2/BRI3 の内腔側の C 末ペプチドを除いた領域が NRBP1 との相互作用に重要である



DsiRNA: Dicer-substrate short interfering RNA

図 9 神経系細胞での NRBP1 のノックダウンにより内在性 BRI2/BRI3 の増加と Aβ 産生の低下が誘導される

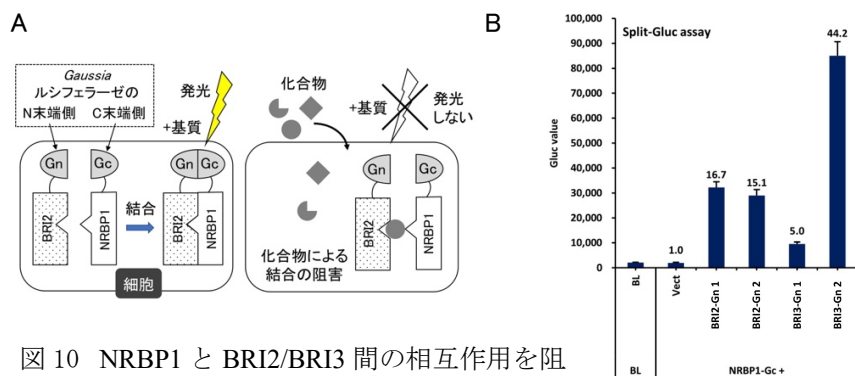


図 10 NRBP1 と BRI2/BRI3 間の相互作用を阻害する化合物のスクリーニング系の構築

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yasukawa T, Tsutsui A, Tomomori-Sato C, Sato S, Saraf A, Washburn MP, Florens L, Terada T, Shimizu K, Conaway RC, Conaway JW, Aso T.	4. 巻 30
2. 論文標題 NRBP1-Containing CRL2/CRL4A Regulates Amyloid Production by Targeting BRI2 and BRI3 for Degradation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 3478-3491
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2020.02.059.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 認知症治療薬のスクリーニング方法	発明者 麻生 悌二郎、安川 孝史	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-88444	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

講座紹介 遺伝子機能解析学 http://www.kochi-u.ac.jp/kms/courses/06/ アルツハイマー病創薬への応用が期待される新たな酵素複合体を発見 https://www.kochi-u.ac.jp/information/2020031300014/
--

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------