

令和 3 年 5 月 8 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：18K06959

研究課題名(和文) BR12/3-ユビキチンリガーゼを標的とする新規認知症治療薬開発のための基盤研究

研究課題名(英文) Basic study for development of novel anti-dementia drug which selectively targets BR12/3-ubiquitin ligase

研究代表者

麻生 悌二郎 (Aso, Teijiro)

高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・教授

研究者番号：20291289

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)：機能未知であったNRBP1がTSC22D3とTSC22D4の分子シャペロン機能により二量体化し、基質認識タンパク質としてCul2及びCul4Aと結合してヘテロ二量体構造のNRBP1-ユビキチンリガーゼ(E3)複合体を形成することを見出した。さらに、NRBP1-E3がAmyloid betaの産生及び凝集の生理的抑制因子であるBR12とBR13を選択的にユビキチン(Ub)化してプロテアソームによる分解へと導くことを明らかにした。また、神経系細胞におけるNRBP1の機能阻害が、細胞内BR12/BR13量の増加とAmyloid beta産生量の有意な減少を誘導することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義：NRBP1のBC-boxに重複してDDB1の結合配列H-boxが存在することを見出し、ホモ二量体化したNRBP1がBC-box、H-boxを介してそれぞれCul2、Cul4Aと結合、ヘテロ二量体構造のCullin-RING型E3を形成することを世界で初めて示した。さらに、基質の高度のUb化に当該E3の非対称な構造が有利に働くこと、他の多くの基質認識タンパク質のBC-boxにもH-boxが重複して存在することを示した。  
社会的意義：NRBP1とBR12/BR13間の相互作用の阻害は、両因子機能の人為的な活性化に繋がり、アルツハイマー病に対する根本治療薬の開発に資する可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Production and fibrillation of Amyloid beta (Abeta) are down-regulated by BR12 and BR13, which are physiological inhibitors of amyloid precursor protein (APP) processing and Abeta oligomerization. Here, we identify NRBP1 as a substrate receptor of a Cullin-RING ubiquitin ligase (CRL) that targets BR12 and BR13 for degradation. Moreover, we demonstrate that (i) dimerized NRBP1 assembles into a functional Cul2- and Cul4A-containing heterodimeric CRL through its BC-box and an overlapping cryptic H-box, (ii) both Cul2 and Cul4A contribute to NRBP1 CRL function, and (iii) formation of the NRBP1 heterodimeric CRL is strongly enhanced by chaperone-like function of TSC22D3 and TSC22D4. NRBP1 knockdown in neuronal cells resulted in an increase in the abundance of BR12 and BR13, and significantly reduced Abeta production. Thus, disrupting interactions between NRBP1 and its substrates BR12 and BR13 may provide a useful therapeutic strategy for AD.

研究分野：病態医化学

キーワード：認知症 アルツハイマー病 ユビキチンリガーゼ NRBP1 BR12/ITM2 BR13/ITM2C Cullin-RING ligase Elongin

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) は、認知症の中で最も多い疾患であり、アミロイドβ(Aβ)を主要構成成分とする老人斑が脳内に多数出現することを特徴とする。Aβは、アミロイド前駆体タンパク質 (APP)がβ-セクレターゼとγ-セクレターゼによる二段階の切断を受けて産生されるが、このAβの産生亢進と分解の遅延によるAβの脳内濃度上昇と、これに続く凝集の促進によるAβオリゴマーを始めとするAβ凝集体の過剰な形成がADの発症に深く関与していると考えられている<sup>1)</sup>。

一方、AβのAPPからの切り出しの過程はAPP結合タンパク質であるBRI2とその相同因子BRI3がβ/γ-両セクレターゼのAPPへのアクセスを阻害することにより抑制されることが知られている。加えて、これらBRI2、BRI3はAβとも結合してその凝集を抑制する機能も有している。BRI2はさらに、Aβ分解酵素であるInsulin degrading enzyme (IDE)の細胞からの分泌を促進してAβの分解をも誘導する。また、BRI2遺伝子の片方のアレルの変異は、正常なBRI2タンパク質量の減少を招き、アルツハイマー病と類似の臨床症状と神経病理学的所見を示す常染色体優性遺伝性の家族性英国型認知症 (FBD) 並びにデンマーク型認知症 (FDD)の原因となることが知られている<sup>2)</sup>。

NRBP1は、その配列中にCullin-RING型ユビキチンリガーゼ (CRL)の足場タンパク質Cul2 あるいはCul5が基質認識サブユニットに結合する際にアダプター役を果たすElongin BCの結合配列BC-boxを有することから、基質は未同定ではあるもののCRL2 あるいはCRL5において基質認識に関わる可能性が指摘されていた。また、NRBP1はTSC22ドメインファミリー (TSC22DF)に属するタンパク質とも相互作用することが報告されているが、その意義については明らかにされていない<sup>3)</sup>。

### 2. 研究の目的

本研究では、NRBP1-ユビキチンリガーゼ複合体 (NRBP1-E3)の生理機能とADの病態との関連の解明を目指して、以下の課題に取り組む。

- (1) NRBP1を基質認識サブユニットとするNRBP1-E3の構成因子を同定すると同時に、TSC22DFメンバーとNRBP1との相互作用が当該E3の形成に果たす役割を明らかにする。
- (2) NRBP1-E3の基質を網羅的探索により同定する。
- (3) NRBP1-E3の各構成因子が基質のユビキチン (Ub) 化に果たす役割を明らかにする。
- (4) NRBP1と基質間の相互作用に重要な配列を決定する。
- (5) NRBP1の機能阻害がAPPのプロセッシングに及ぼす影響について明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 各種変異型タンパク質の発現用プラスミドDNAの作製

点変異あるいは欠失変異を有するNRBP1、BRI2、BRI3等のタンパク質を発現させるための各種プラスミドDNAは、Gibson Assembly Master Mix (New England BioLabs)並びにQuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies)を用いて作製した。

#### (2) NRBP1-E3の標的基質の網羅的探索

TSC22D3およびTSC22D4と野生型NRBP1 あるいはCul2結合(-)型NRBP1を共発現する2種類の293T安定細胞株にHA-tagを付加したTR-TUBE (トリプシン抵抗性Ub鎖結合タンパク質)を一過性発現させる。細胞抽出液を調製後、抗HA抗体で免疫沈降 (IP)を行いUb化タンパク質を濃縮する。次いで、免疫沈降物をトリプシンで消化後、Ub化修飾部位を含むペプチドの濃縮のため、基質のLys残基に2つのGly残基がイソペプチド結合した部位を認識可能なanti diGly抗体でIPを実施する。免疫沈降物を質量分析計により解析し、Cul2結合(-)型に比べて野生型のNRBP1を発現する細胞でより多くのUb化ペプチドが検出されたタンパク質をNRBP1-E3の基質候補として同定する。

#### (3) 培養上清中Aβ濃度の測定

F11神経細胞株培養上清中のAβ濃度は、Human/Rat β Amyloid(40/42) ELISA kits (Fuji Film/Wako)を用いて測定し、各サンプルの細胞抽出液中タンパク質濃度で補正して算出した。

### 4. 研究成果

#### (1) NRBP1-E3の構成因子の同定と当該E3形成に果たすTSC22DFメンバーの役割の解明

NRBP1のC末領域にタンパク質の二量体形成に関わるLisH配列が存在すること、また、BC-box配列にオーバーラップする形でCRL4の足場タンパク質であるCul4A あるいはCul4Bのアダプター役をするDDB1の結合配列H-boxが存在することを見出した。次いで、TSC22DFメンバーの内TSC22D3とTSC22D4とが分子シャペロン様の機能を発揮して、NRBP1のLisH配列を介した二量体化を促進すると同時に、形成されたNRBP1ホモ二量体へのElongin BC/Cul2、並びにDDB1を介したCul4Aの

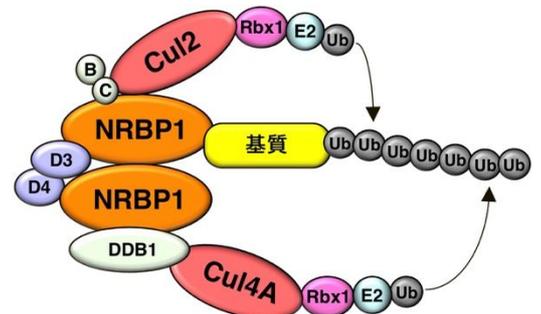


図1. NRBP1はTSC22D3/TSC22D4の存在下で二量体を形成し、Cul2およびCul4Aと結合してヘテロ二量体型のNRBP1-ユビキチンリガーゼ(E3)複合体を形成する

表1. 同定したNRBP1-E3の基質候補のタンパク質

Protein	Ub-peptide count	
	NRBP1 WT	NRBP1 IPL
BRI3 / integral membrane protein 2C (ITM2C)	17	2
heat shock 70 kDa protein 1A/1B (HSPA1A)	19	2
elongation factor 2 (EEF2)	25	1
geminin (GMNN)	20	0
ATP-citrate synthase (ACLY)	9	0
4F2 cell-surface antigen heavy chain (SLC3A2)	9	0
mortality factor 4-like protein 1 (MORF4L1)	7	1
TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2)	6	0
calmodulin	6	0
protein SET	4	0
microfibril-associated glycoprotein 3 (MFAP3)	5	0
nucleophosmin	3	0
bax inhibitor 1	11	0
poly [ADP-ribose] polymerase 1	3	0
BTB/POZ domain-containing adapter for CUL3-mediated RhoA degradation protein 3 (KCTD10)	2	0
X-ray repair cross-complementing protein 6 (XRCC6)	2	0

結合を促進し、CRL2/CRL4A-ヘテロ二量体型のNRBP1-ユビキチンリガーゼ複合体(NRBP1-E3)が形成されることを明らかにした(図1)。基質認識タンパクのホモ二量体と異なる2種類のCullinから成るE3についてはこれまで報告がなく、今回が初めての例である。

### (2) NRBP1-E3の標的基質の同定

NRBP1-E3の標的となる基質を明らかにするために、Ub鎖結合プローブであるTR-TUBEとプロテオーム解析とを組み合わせた方法(図2)を用いて網羅的な探索を行った結果、抗AD因子であるBRI2の相同因子BRI3を含む複数の基質の候補分子がとれてきた(表1)。次いで、それぞれの候補分子毎にNRBP1との結合性や同酵素によって実際にUb化されるかどうかについて確認した結果、BRI3に加えてBRI2も同酵素の基質となり、強くUb化されて分解へと導かれることが明らかになった(図3)。

### (3) NRBP1の二量体化並びにNRBP1とCu12/Cu14Aとの会合がBRI2/BRI3のUb化に果たす役割の解明

NRBP1のLisH配列、或いはBC/H-box配列に変異を導入した各種変異型NRBP1を作製してNRBP1-E3の酵素活性について比較検討した結果、NRBP1の二量体化、NRBP1とCu12の結合、NRBP1とCu14Aの結合の3つの条件全てが揃った場合(これはCRL2/CRL4Aが形成されることを意味する)にのみBRI2/BRI3が強くUb化されることが明らかとなり(図4)、基質や伸長していくUb鎖への効率的なUbの転移にCRL2/CRL4A-ヘテロ二量体もつ非対称な構造が有利に働く可能性が示唆された。

### (4) NRBP1とBRI2/BRI3間の相互作用に重要な配列の決定

NRBP1の欠失変異型タンパク質を作製してBRI2並びにBRI3との相互作用に必要な配列について免疫沈降/免疫プロット法により解析した結果、NRBP1のN末端の配列は不要であり、アミノ酸配列(328-535)の領域が重要であることが明らかとなった(図5A)。次いで、BRI2およびBRI3の欠失変異型タンパク質を多数作製してNRBP1との相互作用に必要な配列について同様の方法で解析した結果、BRI2/BRI3のアミノ酸配列(121-140)と(191-210)の2つの領域が重要であることが判明した(図5B)。

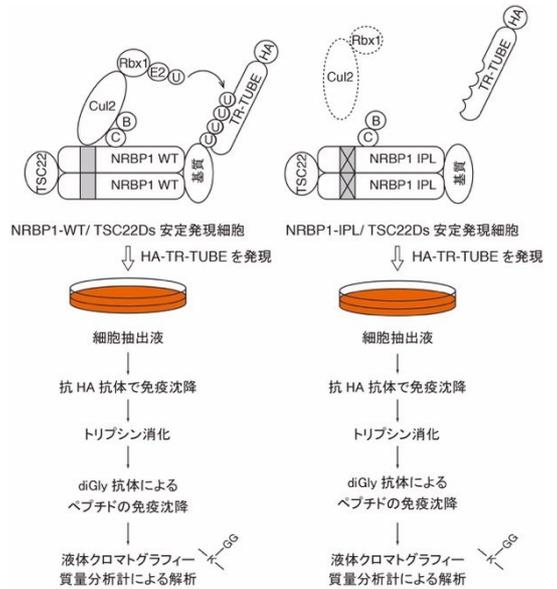


図2. NRBP1-E3の標的基質の網羅的探索法

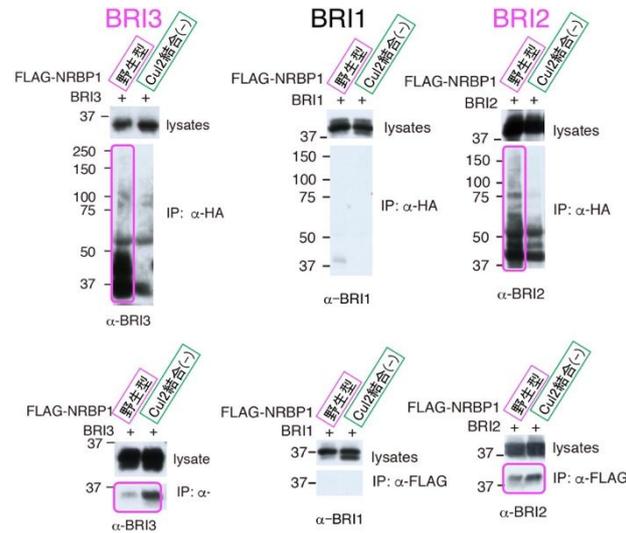


図3. BRI2とBRI3が、NRBP1-E3により高度にUb化され分解へと導かれる

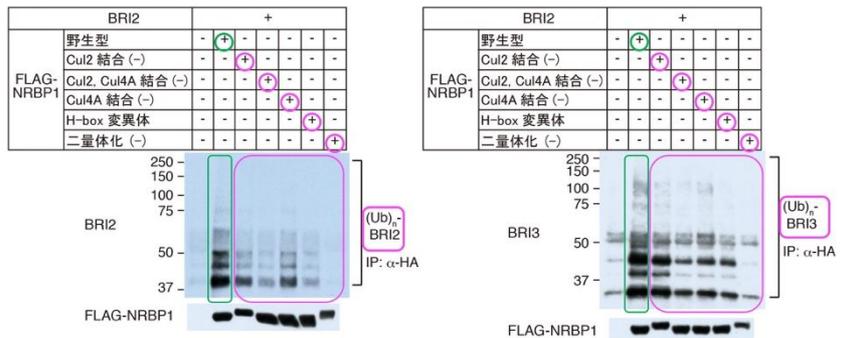


図4. NRBP1-E3によるBRI2/BRI3の高度のUb化には、NRBP1の二量体化とCu12およびCu14Aとの結合が必要である

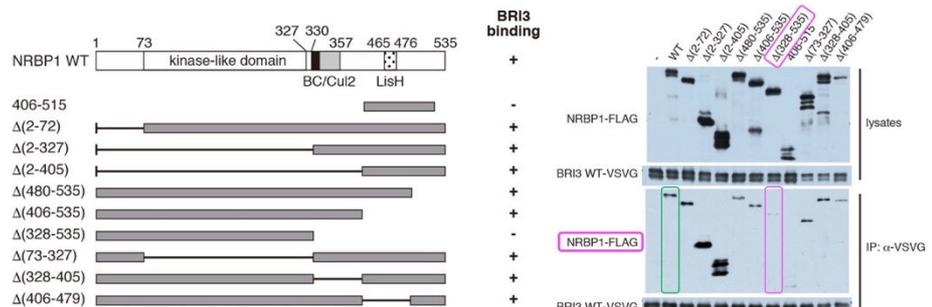


図5A. NRBP1とBRI2/BRI3との結合には、NRBP1のアミノ酸配列(328-535)の領域が重要である

(5) NRBP1の機能阻害がAPPのプロセシングに及ぼす影響の解析

NRBP1-E3の各構成因子と基質であるBRI2/BRI3は神経細胞においても発現が認められる。そこで、神経系細胞株F11においてNRBP1の機能を阻害してみたところ、細胞内BRI2/BRI3タンパク質量の増加が認められると同時にAPPのプロセシングが抑制され、培養上清中のAβ40およびAβ42の濃度の有意な低下が認められることが明らかになった(図6)。

以上より、NRBP1とBRI2/BRI3間の相互作用を特異的に阻害する化合物を開発すれば、両BRI因子が示す多様な作用機序に基づく抗AD作用を一括して活性化することが可能となり、ADに対する根本治療薬の創出に繋がると期待される。

<引用文献>

Haass, C., Kaether, C., Thinakaran, G., and Sisodia, S. (2012). Trafficking and Proteolytic Processing of APP. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a006270.

Del Campo, M., and Teunissen, C.E. (2014). Role of BRI2 in dementia. *J. Alzheimer's Dis.* 40, 481-494.

Mahrouf, N., Redwine, W.B., Florens, L., Swanson, S.K., Martin-Brown, S., Bradford, W.D., Staehling-Hampton, K., Washburn, M.P., Conaway, R.C., and Conaway, J.W. (2008). Characterization of Cullin-box sequences that direct recruitment of Cul2-Rbx1 and Cul5-Rbx2 modules to elongin BC-based ubiquitin ligases. *J. Biol. Chem.* 283, 8005-8013.

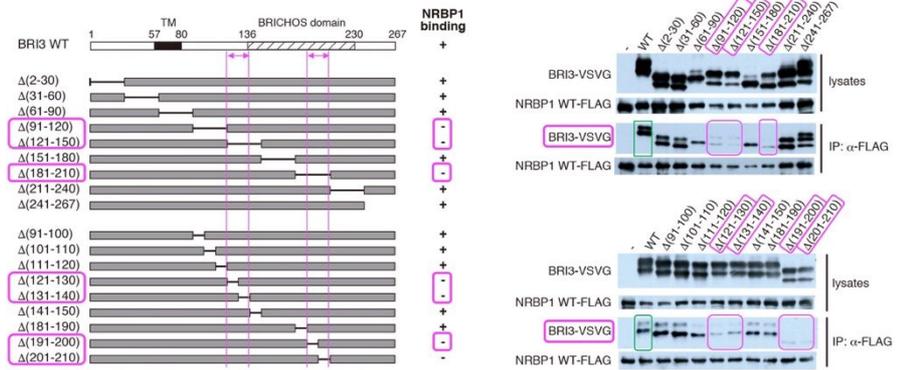


図5B. NRBP1とBRI2/BRI3間の結合には、BRI2/BRI3のアミノ酸配列(121-140)と(191-210)の2つの領域が重要である

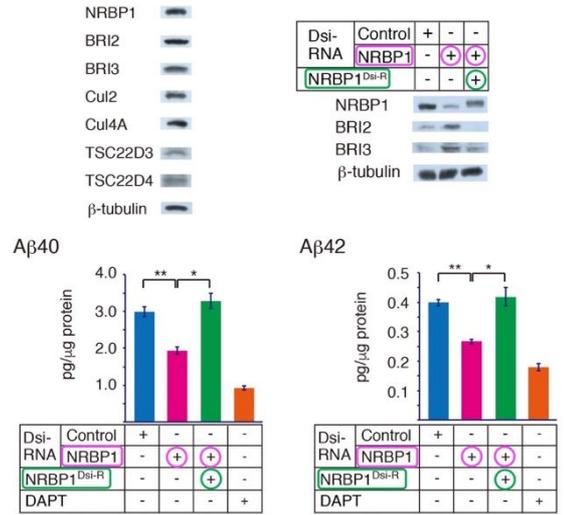


図6. 神経系細胞でのNRBP1のknockdownにより細胞内BRI2/BRI3タンパク質量の増加とAβ産生量の有意な低下が誘導される

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 Takashi, Tsutsui Aya, Tomomori-Sato Chieri, Sato Shigeo, Saraf Anita, Washburn Michael P., Florens Laurence, Terada Tohru, Shimizu Kentaro, Conaway Ronald C., Conaway Joan W., Aso Teijiro	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.e6
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 麻生梯二郎、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〕

<a href="http://www.kochi-u.ac.jp/information/2020031300014/">http://www.kochi-u.ac.jp/information/2020031300014/</a>
---

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
研究協力者	筒井 文  (Tsutsui Aya)		

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			
米国	Stowers Institute for Medical Research			