

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14883

研究課題名(和文) アミロイド タンパク質産生を特異的に抑制する新たな機序の解析

研究課題名(英文) Analysis of a new mechanism to specifically inhibit amyloid-beta protein production

研究代表者

日比野 絵美 (Hibino, Emi)

名古屋大学・大学院創薬科学研究科・特任助教

研究者番号：00803371

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病はアミロイド タンパク質(A β)の脳内蓄積が原因とされている。分泌タンパク質ILE1はA β およびAPP-CTFの前駆体であるAPP-CTFの産生を抑制することが報告されている。本研究では、まず培養細胞を用いたILE1の簡便なアルツハイマー病予防機能評価系を構築し、続いてその評価系を用いてILE1の活性中心と思われる部位を特定した。ILE1は、がん化を引き起こすことも知られているが、本研究により、ILE1のA β 産生抑制作用とがん化作用の活性中心はそれぞれ別にあることが強く示唆された。本研究の成果はアルツハイマー病の治療・予防薬の開発の土台につながる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年開発されたアルツハイマー病治療薬は承認が見送られるなど、その開発は非常に難航している。ILE1は、全く新しい機構でA β 産生を抑制する。治療ターゲットとして着目されたセクレターゼ阻害薬では、Notchシグナルの抑制により重大な副作用が見られたが、ILE1においてはNotchシグナル抑制を呈さないことから、期待される分子である。しかしながらILE1はがん化促進作用を有するため、ILE1そのものの標的化は多大なるリスクを伴う。本研究では、この両極端の面が分割可能であることを示すことができた。

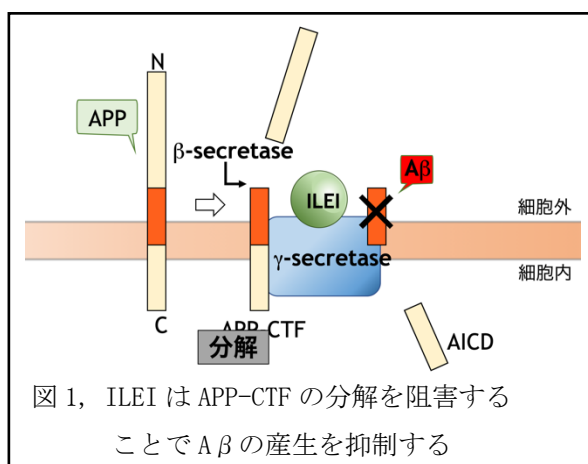
研究成果の概要(英文)：Alzheimer's disease is associated with the accumulation of amyloid-protein (A β) in the brain. The secreted protein ILE1 has been reported to inhibit the production of A β and APP-CTF, a precursor of A β . In this study, I first established a simple evaluation system for the Alzheimer's disease-preventive function of ILE1 using cultured cells, and then used the evaluation system to identify the site that appears to be the active center of ILE1. Although ILE1 is also known to cause oncogenesis, this study strongly suggests that the active centers of ILE1's inhibitory and oncogenic effects on A β production are separate. The results of this research will provide the foundation for the development of therapeutic and preventive drugs for Alzheimer's disease.

研究分野：生物物理学

キーワード：アルツハイマー病 プレセニリン-1 FAM3C ILE1 NMR セクレターゼ

1. 研究開始当初の背景

日本におけるアルツハイマー病患者数は増加の一途を辿っているが、治療薬は未だ開発途上である。アルツハイマー病の原因とされるアミロイドβタンパク質 (Aβ) は、前駆体である APP からβおよびγセクレターゼによる2段階切断を経て産生される (図1)。近年γセクレターゼ阻害薬の開発が盛んであったものの、細胞の分化に参与するNotchの活性化にもγセクレターゼによる切断が必須であり、Notchシグナルも同時に阻害されることによる重篤な副作用が問題となっていた。ところが最近申請者の研究室で約25kDaの内在性分泌タンパク質 ILEI (別名: FAM3C) が、γセクレターゼ活性やNotchの切断は阻害せず、APP-C99の切断を選択的に阻害することを見出した¹。ILEIの存在下ではAPP-C99はAβ産生経路ではなく非特異的分解経路による代謝が優位となる、すなわちAPP-C99が不安定化することでその結果Aβ産生量が減少する (図1)。これまでわかっていることは、ILEIは活性発揮のためにはγセクレターゼの構成分子の一つであるプレセニン-1への結合が必須であること、APP-C99に直接結合はしないことであるが、ILEIとプレセニン-1との結合様式やAPP-C99の不安定化の詳細な分子機構は未解明のままである。これらのことは「ILEIとγセクレターゼとの結合がどのようにAβ産生を特異的に抑制するのか?」という重要な問いを提起する。本研究でILEIとプレセニン-1との相互作用を構造生物学的に明らかにしAPP-C99の選択的不安定化を解明することで、副作用が少ない新しい作用機序のアルツハイマー病治療薬の創薬に結びつく。なおILEIは分泌タンパク質であり、リコンビナントタンパク質の培養細胞の培養液中への投与によるAβの産生量低下や、マウスの脳室投与による老人斑の減少から、細胞外からの投与で十分作用することはすでに確認されている^{1,2}。



2. 研究の目的

本研究の目的は、γセクレターゼによるAPP-C99からのAβ産生をILEIが特異的に制御する分子機構を生物物理学的手法により明らかにし、副作用が少ない新規のアルツハイマー病治療薬開発に向けた基礎的知見を得ることである。

3. 研究の方法

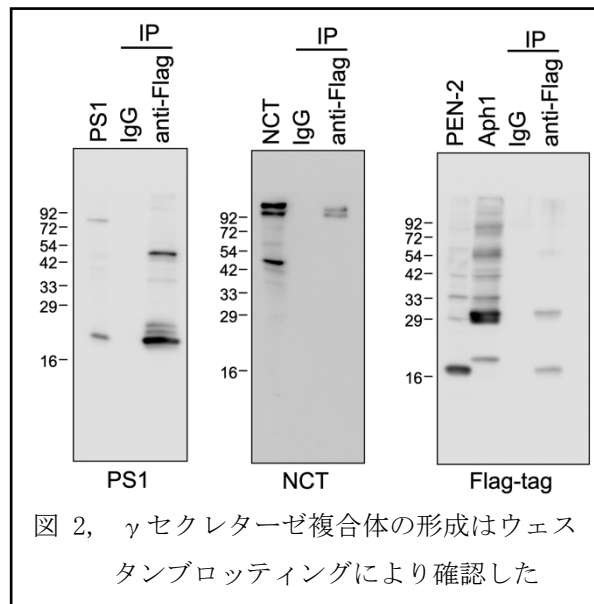
ILEIのリコンビナントタンパク質の調製

ILEIは、6×Hisタグを融合したILEIをコードする遺伝子を含むプラスミドを大腸菌株Rosetta-gami B(DE3)pLysSに形質転換し培養することで合成した。¹⁵N標識タンパク質は¹⁵N塩化アンモニウムを含むM9最小培地にて、非標識タンパク質はLB培地にて培養し、OD₆₀₀~0.6でIPTGを終濃度0.2mMとなるように添加し、20°Cで終夜培養した。得られた菌体の超音波破碎上清を、Ni-NTAレジンおよびサイズ排除クロマトグラフィーにて精製することで、¹⁵N標識されたILEIのリコンビナントタンパク質溶液を得た。

細胞培養

ILEI ノックアウト HEK293 細胞は、DMEM/10%FBS 中、5%CO₂、37° C で培養した。遺伝子は、細胞を 6 × 10⁴/cm² で播種し、24 時間後にプラスミド溶液とポリエチレンジイミンを混合した OPTI-MEM 培地を滴下することで導入した。

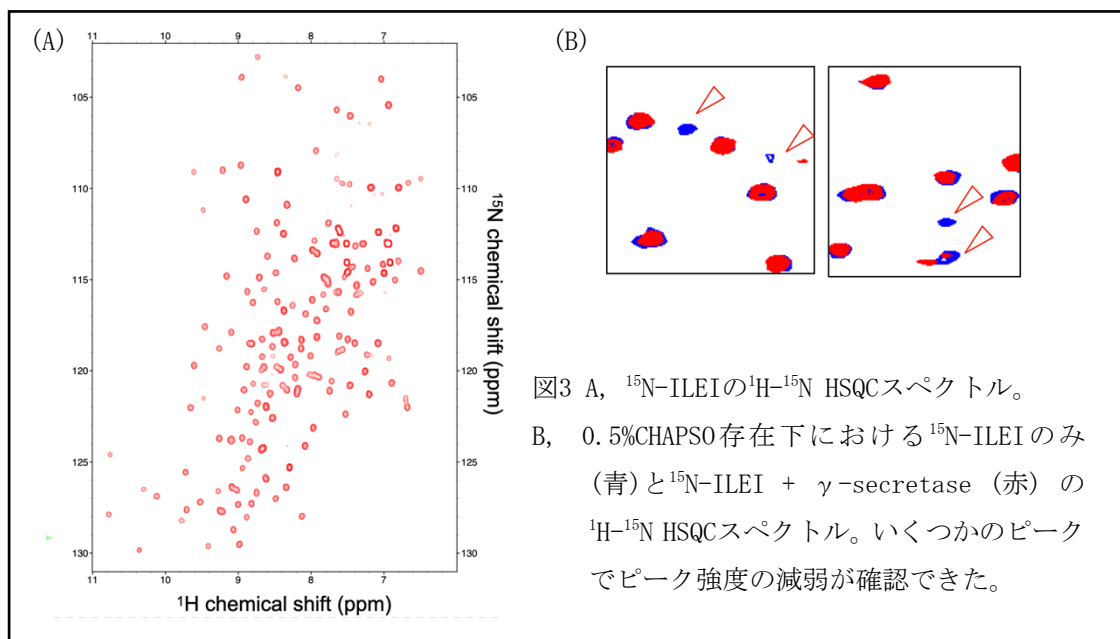
γセクレターゼ複合体は、ILEI ノックアウト HEK293 細胞に、プレセニリン 1、ニカストリン、Aph1-Flag、Pen-2-Flag をコードする遺伝子を含むプラスミド 4 種類を等量ずつ遺伝子導入し、2 日後細胞を回収し、0.5%CHAPS0 溶液にて膜画分を分画したのち、Aph1 および Pen-2 に融合していた Flag タグを介したアフィニティー精製によって得た。得られた溶液に複合体が含まれていることは、それぞれの分子を認識する抗体を用いたウェスタンブロッティングにて確認した(図 2)。



4. 研究成果

(1) NMR による直接相互作用の確認

まず、¹⁵N-ILEI の ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルを取得し、問題なくピークが確認できることを確認した (図 3A)。続いて、膜画分溶液に含まれる 0.5%CHAPS0 条件で ¹⁵N-ILEI の ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルを取得したところ、ピーク強度はやや減少したものの、大きくは変化しなかったことから、ILEI の構造は保持されていることが確認できた。そこで ¹⁵N-ILEI の ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルを、γセクレターゼ複合体添加前後で比較したところ、ピークの変化が見られたことから、ILEI が γセクレターゼに直接結合することが確認できた (図 3B)。



(2) 培養細胞を用いた評価系の構築

ILEI の機能を簡便に確認するための、ILEI ノックアウト HEK293 細胞を用いた評価系を構築した。ILEI ノックアウト HEK293 細胞に APP および ILEI をコードする遺伝子を含む2種類のプラスミドを同時に遺伝子導入し、その後 A β 40 の ELISA による定量または APP-CTF のウェスタンブロッティングによる定量的解析によって、

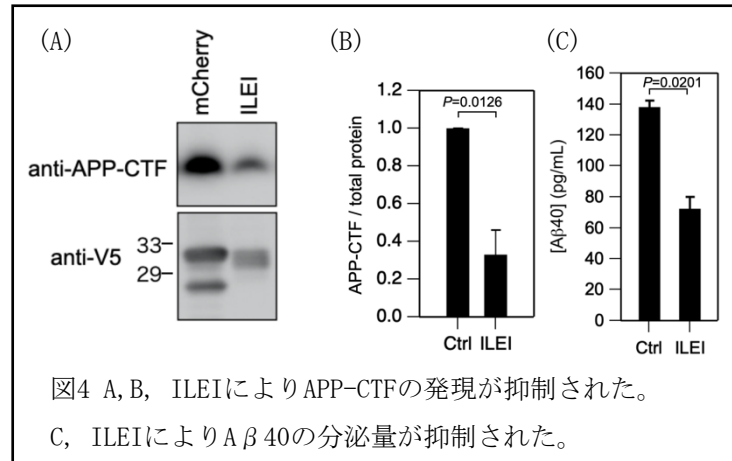


図4 A, B, ILEIによりAPP-CTFの発現が抑制された。
C, ILEIによりA β 40の分泌量が抑制された。

ILEI の機能を確認することができると考えた。APP および ILEI のプロモータ、プラスミド導入量を最適化し、再現よく確認できる評価系の構築に成功した (図 4)。

(3) ILEI の他の機能との関連

ILEI は二量体を形成すること^{3,4}、またその二量体形成能は C185A 変異により喪失することが報告されている。また、二量体形成能喪失に伴い、ILEI のがん促進作用も喪失することが報告されている。

本研究では、C185A 変異が A β 産生抑制機能に影響するかどうかを、(2)で構築した評価系にて確認した。その結果、A β 産生抑制機能は C185A の影響を受けない、すなわち二量体形成と関係ないことが判明した。すなわち、ILEI はがん促進作用を持たずに A β 産生抑制作用のみを発揮することが可能であることが判明した。

(4) 活性中心の同定

タンパク質の活性中心を同定する手法の一つとして、1 アミノ酸のアラニン置換体を作製し、機能が喪失する変異体を調べることで活性中心を同定するアラニンスキャンという方法がある。本研究では、(2)で構築した評価系を用いて ILEI の活性中心を同定するためのアラニンスキャンを実施した結果、ILEI が構造を保っているにもかかわらず ILEI の機能が喪失する変異を1つ発見することができた。この箇所が ILEI の A β 産生抑制機能の活性中心である可能性が高いと考えられる。

<引用文献>

1. Hasegawa H *et al.*, *Nat. commun.* (2014) **5**:3917.
2. Liu L *et al.*, *Neuroscience* (2016) **330**:236-246.
3. Kral M *et al.*, *FEBS Journal* (2017) **284**:3484-3505.
4. Jansson A *et al.*, *J. Biol. Chem.* **292** (37):15501-15511.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kawatsuki Akihiro, Morita Shin-ya, Watanabe Naoki, Hibino Emi, Mitsuishi Yachiyo, Sugi Takuma, Murayama Shigeo, Nishimura Masaki	4. 巻 20
2. 論文標題 Lipid class composition of membrane and raft fractions from brains of individuals with Alzheimer's disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100704 ~ 100704
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2019.100704	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 -

1. 著者名 Nakano Masaki, Mitsuishi Yachiyo, Liu Lei, Watanabe Naoki, Hibino Emi, Hata Saori, Saito Takashi, Saïdo Takaomi C., Murayama Shigeo, Kasuga Kensaku, Ikeuchi Takeshi, Suzuki Toshiharu, Nishimura Masaki	4. 巻 80
2. 論文標題 Extracellular Release of ILE1/FAM3C and Amyloid- Is Associated with the Activation of Distinct Synapse Subpopulations	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's Disease	6. 最初と最後の頁 159 ~ 174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/jad-201174	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishimura Masaki, Watanabe Naoki, Hibino Emi, Nakano Masaki, Mitsuishi Yachiyo, Liu Lei, Sugi Takuma	4. 巻 2
2. 論文標題 FAM3C in Alzheimer's disease: a risk-related molecule and potential therapeutic target	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Neuroscience of Dementia	6. 最初と最後の頁 293 ~ 307
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/B978-0-12-815868-5.00019-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 日比野 絵美, 西村正樹
2. 発表標題 A 産生抑制タンパク質 ILE1 の活性中心の同定
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Emi Hibino
2. 発表標題 Analysis of the active center of ILEI/FAM3C for the suppression of A β production
3. 学会等名 第2回CIBoGリトリート (第13回NAGOYAグローバルリトリート)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山上智也、日比野絵美、守島健、井上倫太郎、杉山正明、西村正樹
2. 発表標題 A β 分泌抑制タンパク質ILEIの構造安定化に対するシステイン残基の役割
3. 学会等名 第92回 日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 日比野絵美、杉田昌武、三ツ石弥千代、渡邊直希、中野将希、杉拓磨、西村正樹
2. 発表標題 Structre-based analysis of ILEI/FAM3c activity to inhibit A β generation.
3. 学会等名 第56回 日本生物物理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 日比野絵美
2. 発表標題 ILEI/FAM3C suppresses amyloid- β generation by a unique mechanism
3. 学会等名 the 24th Molecular Neuroscience Research Center International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 日比野絵美、渡邊直希、西村正樹
2. 発表標題 特異な機序でアミロイド 産生を抑制する ILE1 / FAM3Cとアルツハイマー病リスク
3. 学会等名 第91回日本生化学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 日比野絵美、杉田昌武、三ツ石弥千代、渡邊直希、中野将希、杉拓磨、西村正樹
2. 発表標題 A 産生抑制タンパク質 ILE1の構造および機能の解析
3. 学会等名 第37回日本認知症学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 日比野絵美
2. 発表標題 アミロイド タンパク質の蓄積を細胞内で抑制するタンパク質 ILE1に関する研究
3. 学会等名 第10回 タンパク質の異常凝集とその防御・修復機構に関する研究
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------