

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06558

研究課題名(和文) 膜内切断プロテアーゼの活性制御と基質導入機構の解明

研究課題名(英文) Characterization of intramembrane proteases by yeast reconstitution system

研究代表者

二井 勇人 (Eugene, Futai)

東北大学・農学研究科・准教授

研究者番号：90447459

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、認知症の原因となるアミロイド(A β)ペプチドを産生するヒトセクレターゼ複合体を酵母に再構成し、セクレターゼのAph1サブユニットと基質であるアミロイド前駆体タンパク質(APP)から、切断効率を上昇させる変異を同定した。酵母と哺乳類細胞を使った生化学的解析の結果、Aph1の変異は切断効率を上昇させ、A β の総量を増加させた。Aph1がセクレターゼの活性調節機能を持つことを初めて明らかにした。一方、APPの変異のいくつかはA β のトリミングに作用し、認知症発症に関わる長鎖A β 42を減少させた。高毒性A β 42の生成を減少させる認知症治療薬開発において重要な知見となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膜内切断プロテアーゼは、疎水的な膜内で加水分解を行う特殊なタンパク分解酵素である。立体構造が解明され研究が進んできたが、どのようにして反応を遂行するのかについて、メカニズムの詳細が分かっていない。セクレターゼは、アルツハイマー病の原因となる脳内アミロイドを作り出す、認知症治療において重要なターゲット分子である。本研究では、モデル生物である出芽酵母を使った独創的な解析手法をとり入れ、セクレターゼによる分解機構を解析した。私達の研究成果は、膜内タンパク分解機構を解明する重要な知見であり、セクレターゼの活性調節機構を解明することにより認知症治療薬の開発に向けた新たな戦略を提案する。

研究成果の概要(英文)： γ -secretase generates amyloid peptide (A β) from amyloid precursor protein (APP) through multi step cleavage, such as endoproteolysis and trimming. In the study, we reconstituted human γ -secretase complex and APP in yeast and identified cleavage-enhancing mutations in APP and the scaffold subunit of γ -secretase Aph1aL. We introduced these mutants in yeast and mammalian cells and found that the Aph1 mutations increase cleavage efficiency and increased the total amount of A β . We clarified that Aph1 has regulatory function directly acting on catalytic subunit, PS1. APP mutations acted on A β trimming activity and decrease long-chain A β 42. It has become an important finding in the development of antidementia drugs that reduce the production of highly toxic A β 42 involved in the development of dementia.

研究分野：機能生物化学

キーワード：酵素 脳神経疾患 神経科学 応用微生物 バイオテクノロジー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞膜を介して情報を伝達することは、細胞の生理と恒常性の維持に重要である。膜内におけるタンパク質限定分解 (RIP) は、ストレス応答や細胞分化の過程で情報を伝達する分子機構として、大腸菌などの原核生物からヒトまで、生物種を超えて保存されている。基質となる膜貫通タンパク質は、膜内で切断され、膜から遊離した断片が情報伝達、遺伝子発現、細胞内輸送などにおいて様々な細胞機能を担う。ヒトの膜内切断プロテアーゼとしては、アスパラギン酸プロテアーゼ (γ セクレターゼとシグナルペプチドペプチダーゼ (SPP))、メタロプロテアーゼ (Site-2 プロテアーゼ)、セリンプロテアーゼ (ロンボイド) 等が知られている。近年、親水性のポア (細孔) に触媒中心を持つチャネル状の立体構造が明らかになってきたが、酵素学的性質については未知なことが多く、疎水的な膜内での加水分解機構や活性の調節機構についての基本的な疑問が未解決である。

2. 研究の目的

膜内でタンパク質を限定分解する膜内切断プロテアーゼは膜領域で特殊な加水分解反応を行うため、精製と活性の評価が難しく、活性調節のメカニズムが明らかではない。研究代表者は、膜内切断プロテアーゼを酵母に導入し、活性を評価する独自の系を開発した。酵母に構築したモデル系は変異や活性調節因子を発見する系として極めて有用である。本研究の目的は、認知症の原因となるアミロイド β ペプチドを生成する γ セクレターゼ複合体と基質であるアミロイド前駆体タンパク質 (APP)、さらに、 γ セクレターゼのモデルとなる単量体膜内切断プロテアーゼ (Site-2 プロテアーゼとロンボイド) について、基質認識、活性調節、切断部位決定に必要な領域を同定し、膜内切断プロテアーゼの活性制御を解明することである。

3. 研究の方法

酵母に、ヒト γ セクレターゼ複合体を構成するプレセニリン (PS1)、ニカストリン (NCT)、Aph1、Pen2 と、アミロイド前駆体 (APP) もしくは Notch に Gal4 転写因子を融合した人工基質を導入した (参考文献①, ②)。基質の切断に伴う Gal4 レポーター遺伝子の転写活性化を、酵母の生育と β -ガラクトシダーゼ活性で評価することができる。この酵母発現系を用いて、①酵母の生育を指標に、APP と Aph1 の変異体、さらに活性調節タンパク質を同定し、②酵母膜面分を用いて酵素学的解析を行い、膜内切断プロテアーゼの酵素機能・反応機構を明らかにする。遺伝子変異は、error-prone PCR で導入した。さらに、酵母での結果を確認するため、③哺乳類細胞 (Aph1a/Aph1b/Aph1c TKO ノックアウトマウス胚性線維芽 (MEF) 細胞, ヒト神経芽細胞腫 (SH-SY5Y) 細胞, もしくはチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞) において変異体の切断活性を解析し、細胞機能に与える影響を明らかにする。この3つの手法を用い、 γ セクレターゼ複合体の活性調節と基質認識の分子機構を解明し、認知症発症に関わる長鎖 A β 42 の生成との関連を明らかにする。また、単量体膜内切断プロテアーゼのうちヒト Site-2 プロテアーゼ (S2P) とロンボイド (RHBDD1) について、酵母の系を構築し、変異体の相関解析から、基質が疎水環境から親水性の活性中心に導入される機構を明らかにする。また、酵母の小胞輸送関連遺伝子等の破壊株を用いた解析から、小胞輸送を介した γ セクレターゼの調節機構についても解析する。

4. 研究成果

(1) γ セクレターゼ Aph1 活性化変異の同定と解析

酵母 γ セクレターゼ発現系を用いて、ヒト γ セクレターゼの Aph1aL サブユニットの変異

体をスクリーニングした。Aph1 は他のサブユニット (PS1 と NCT) と相互作用する足場タンパク質と考えられている。NCT を含まない複合体では活性が著しく低下するが、その条件でも活性を持つ Aph1 変異を同定することに成功した。NCT を含む完全な複合体での活性を測定したところ、L30F/T164A 変異は、野生型よりも活性が高く、活性化変異であることが明らかとなった。酵母の膜画分を用いた酵素学的解析、哺乳類細胞 (Aph1 TKO ノックアウト MEF) に Aph1 変異体を導入した解析により A β の生成量と分子種を解析したところ、Aph1aL の活性化変異により、A β の生成総量が増加し、認知症の発症に関わる長鎖 A β の生成割合には変化が見られなかった。一方、Aph1 の複合体形成能には変化が見られなかった。Aph1 の変異は触媒サブユニットである PS1 の近傍に存在することから (図 1)、PS1 の構造を変化させ、活性を上昇させたと考えられる (引用文献 ③)。従来、足場タンパク質と考えられていた Aph1 が、触媒部位に作用して活性を調節することが初めて示された。Aph1 を標的にした γ セクレターゼ阻害剤の開発につながる成果である。

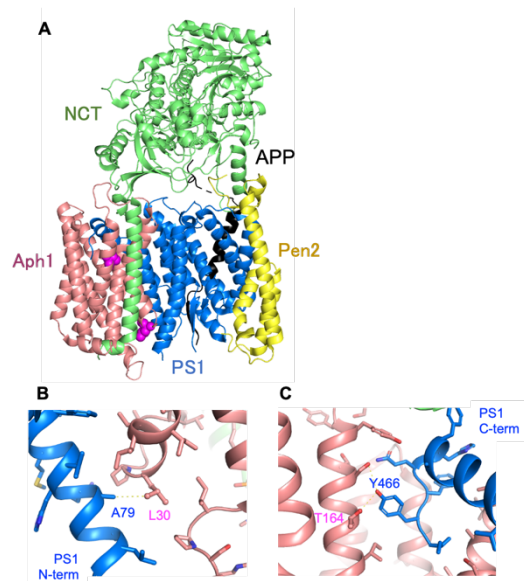


図1) γ セクレターゼ構造モデルにおけるAph1活性化変異部位(A; 球状モデル, B,C; 棒モデル)。Aph1のL30とT164は、PS1に近接している。

(2) APP の切断感受性変異の同定と解析

酵母 γ セクレターゼ発現系を用いて、アミロイド前駆体 (APP) の変異体をスクリーニングした。APP の中に見つかっている家族性アルツハイマー病 (FAD) 変異を解析した結果、切断効率が低下することが明らかとなった。この FAD 変異の切断効率を回復させる変異を、APP の切断部位近傍からスクリーニングした結果、プロリンやアスパラギン酸を含む変異を多数同定した。同じ変異を野生型の APP に導入したところ、切断活性が上昇し、APP の切断感受性を上昇させる変異であることが明らかとなった。この変異体を、ヒト神経芽細胞腫 (SH-SY5Y) 細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞に導入し、A β の生成量と分子種を解析したところ、認知症の発症に関わる長鎖 A β の生成量に関わる変異が取れていることが明らかとなった。これらの成果は、現在、投稿準備中である。長鎖 A β の生成量を減少させる γ セクレターゼ調節剤の開発に向けた基盤的な知見となる。

(3) 小胞輸送による γ セクレターゼ活性調節機構の解析

アルツハイマー病リスク因子として知られる小胞輸送関連因子について、酵母ホモログ遺伝子破壊株を使って、 γ セクレターゼ活性への影響を解析した。その結果、PICALM, CD2AP, BIN1 のホモログ遺伝子破壊により切断活性が低下し、多胞エンドソームの形成に関わる ESCRT の遺伝子破壊によっても切断活性が低下した。切断活性の低下がトリミング活性に作用し、長鎖 A β の生成量を上昇させていると考えられた。また、A β 産生を抑制することが知られている Curcumin の誘導体、GT863 について、酵母の膜画分を用いた試験管内アッセイ系を用いて、酵素学的解析を行った。GT863 は γ セクレターゼの活性を直接阻害しないという結果が得られ、 γ セクレターゼの小胞輸送を阻害することによって、A β の産生を抑制するメカニズ

ムが明らかになった（引用文献④）。小胞輸送が γ セクレターゼの活性制御に重要な役割を果たすことを明らかにした。

（４）単量体プロテアーゼの解析

ヒト Site-2 プロテアーゼ (S2P) とヒトロンボイド (RHBDD1) による、基質タンパク質 (SREBP, ATF6, Spitz) の切断を酵母内で再構成した。Gal4 レポーター遺伝子 lacZ の転写活性化を β ガラクトシダーゼ活性で評価した結果、S2P による SREBP の切断を検出することに成功したが、そのほかの組み合わせでは再構成できなかった。ATF6 と Spitz の切断では内在性プロテアーゼによる切断が障害となっていたため、酵母の膜局在性プロテアーゼの遺伝子破壊株を作製して解析に用いた。しかし、単一の遺伝子破壊によって内在性の切断が大きく低下することはなかった。再構成がうまく行った S2P の解析でも、生育を指標にした変異体の活性評価は困難であり、変異体のスクリーニングは行えなかった。APP や Notch とは異なり、SREBP, ATF6, Spitz は酵母の内在性プロテアーゼで切られやすく、膜タンパク質のプロテアーゼ感受性が一次構造で規定されることを示す新たな知見となった。

<引用文献>

- ① Futai, E. (2019) Advanced yeast models of familial Alzheimer disease expressing FAD-linked Presenilin to screen mutations and γ -secretase modulators. *Methods. Mol. Biol.* 2049: 403-417. doi: 10.1007/978-1-4939-9736-7_23.
- ② 二井勇人 (2020) アミロイド β 産生酵素 γ セクレターゼの活性制御と創薬, *Precision Medicine* (北隆館), 3: 1015-1020.
- ③ Watanabe, H., Yashida, C., Hidaka, M., Ogawa, T., Tomita, T., and Futai, E. (2022) Specific mutations in Aph1 cause γ -secretase activation. *Intl. J. Mol. Sci.* 23: 507(pp.1-14). doi: 10.3390/ijms23010507.
- ④ Urano, Y., Takahachi, M., Higashiura, R., Fujiwara, H., Funamoto, S., Imai, S., Futai, E., Okuda, M., Sugimoto, H., and Noguchi, N. (2020) Curcumin derivative GT863 inhibits amyloid-beta production via inhibition of protein N-glycosylation. *Cells.* 9: 349(pp.1-14). doi: 10.3390/cells9020349.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Futai Eugene	4. 巻 2049
2. 論文標題 Advanced Yeast Models of Familial Alzheimer Disease Expressing FAD-Linked Presenilin to Screen Mutations and γ -Secretase Modulators	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 403 ~ 417
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-4939-9736-7_23	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 Urano Yasuomi, Takahachi Mina, Higashiura Ryo, Fujiwara Hitomi, Funamoto Satoru, Imai So, Futai Eugene, Okuda Michiaki, Sugimoto Hachiro, Noguchi Noriko	4. 巻 9
2. 論文標題 Curcumin Derivative GT863 Inhibits Amyloid-Beta Production via Inhibition of Protein N-Glycosylation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 349; pp.1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells9020349	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 Ogawa Tomohisa, Tobishima Yu, Kamata Shizuka, Matsuda Youhei, Muramoto Koji, Hidaka Masafumi, Futai Eugene, Kuraishi Takeshi, Yokota Shinichi, Ohno Motonori, Hattori Shosaku	4. 巻 12
2. 論文標題 Focused Proteomics Analysis of Habu Snake (<i>Protobothrops flavoviridis</i>) Venom Using Antivenom-Based Affinity Chromatography Reveals Novel Myonecrosis-Enhancing Activity of Thrombin-Like Serine Proteases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 766406; pp.1~13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphar.2021.766406	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 Watanabe Hikari, Yoshida Chika, Hidaka Masafumi, Ogawa Tomohisa, Tomita Taisuke, Futai Eugene	4. 巻 23
2. 論文標題 Specific Mutations in Aph1 Cause γ -Secretase Activation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 507; pp.1~14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23010507	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 二井勇人	4. 巻 3
2. 論文標題 アミロイド 産生酵素 セクレターゼの活性制御と創薬	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Precision Medicine (北隆館)	6. 最初と最後の頁 1015-1020
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 鈴木涼太, 高橋春香, 日高將文, 小川智久, 二井勇人
2. 発表標題 セクレターゼによるアミロイド前駆体タンパク質の膜内切断感受性を変化させる配列要因
3. 学会等名 第40回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木涼太, 高橋春香, 日高將文, 小川智久, 二井勇人
2. 発表標題 アミロイド前駆体タンパク質の切断感受性変異の獲得と解析
3. 学会等名 日本農芸化学会東北支部 第156回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川崎創, 日高將文, 小川智久, 二井勇人
2. 発表標題 ハブメタロプロテアーゼのアミロイド に対する分解活性
3. 学会等名 第26回日本病態プロテアーゼ学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木涼太, 高橋春香, 日高將文, 小川智久, 二井勇人
2. 発表標題 セクレターゼによるアミロイド前駆体タンパク質の膜内切断感受性を变化させる配列要因の解析
3. 学会等名 日本生化学会東北支部 第87回例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 角田俊揮, 日高將文, 小川智久, 新谷尚弘, 二井勇人
2. 発表標題 出芽酵母ロンボイドPcp1pの生理機能解明と基質探索
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 関正義, 小川智久, 日高將文, 二井勇人
2. 発表標題 セクレターゼ変異体の解析に向けた酵母発現系・精製系の構築
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡辺ひかり, 吉田知加, 蔡哲夫, 日高將文, 小川智久, 富田泰輔, 二井勇人
2. 発表標題 酵母を用いたスクリーニングによる セクレターゼサブユニットAph1の機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡辺ひかり, 吉田知加, 蔡哲夫, 富田泰輔, 二井勇人
2. 発表標題 セクレターゼ複合体構成因子Aph1による活性調節機構の解析
3. 学会等名 第39回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 角田俊揮, 日高將文, 小川智久, 新谷尚弘, 二井勇人
2. 発表標題 出芽酵母ロンボイドPcp1pの生理機能解明と基質探索
3. 学会等名 日本農芸化学会東北支部 第155回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡辺ひかり, 吉田知加, 蔡哲夫, 日高將文, 小川智久, 富田泰輔, 二井勇人
2. 発表標題 セクレターゼ複合体構成因子Aph1による活性調節機構の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会東北支部 第155回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今井創, 吉田知加, 蔡哲夫, 富田泰輔, 二井勇人
2. 発表標題 PS1変異体の解析による セクレターゼの構造変化とトリミング活性の上昇の解明
3. 学会等名 第38回 日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 二井 勇人、今井 創、吉田 知加、蔡 哲夫、富田 泰輔
2. 発表標題 Presenilin 1活性化変異による セクレターゼのトリミング促進と構造変化の解明
3. 学会等名 第24回日本病態プロテアーゼ学会学術集会
4. 発表年 2019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
研究協力者	新谷 尚弘 (Shintani Takahiro)		

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