

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16919

研究課題名(和文) ムーンライト解糖系酵素による脳アミロイドアンギオパチーの進行抑制機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of cerebral amyloid angiopathy by moonlighting glycolytic enzyme

研究代表者

井上 泰輝 (Inoue, Yasuteru)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・特任助教

研究者番号：00806408

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)： $\alpha$ -エノラーゼのセリンプロテアーゼ活性を介したA $\beta$ タンパクの断片化作用によって、A $\beta$ 線維形成能が顕著に抑制され、A $\beta$ 線維が減少する可能性を示した。A $\beta$ は、はじめ単量体として存在し、凝集する過程で形成されるA $\beta$ 線維が強力な細胞毒性を示す。申請者の検討により $\alpha$ -エノラーゼがA $\beta$ 線維形成を抑制し、A $\beta$ の細胞毒性を軽減させるメカニズムの一端を解明した。AD患者の $\alpha$ -エノラーゼ活性は健常人と比較して減少していることが既に示されているがその意義は不明であった。 $\alpha$ -エノラーゼの酵素活性がADやCAAの病態進行に關与する可能性を示した(論文投稿中)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

$\alpha$ -エノラーゼを治療ターゲットとした核酸医薬を開発することで、A $\beta$ タンパク質の蓄積の制御につながる治療法を創出できる可能性がある。その他、早期診断のためのバイオマーカーなど新たな医療シーズへの発展・展開が見込まれる意義ある研究成果と考える。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we focused on  $\alpha$ -enolase (ENO1), well known glycolytic enzyme crucial for glucose metabolism, which is identified as up-regulated protein in brain samples from AD and CAA by proteomic analyses. Although ENO1 has been shown to possess multifunctional roles as a heat-shock protein and binding protein of cytoskeleton or chromatin structure, exact function of ENO1 in AD and CAA pathogenesis are not determined. We identified the novel function of ENO1 to directly interact with A $\beta$  and inhibit its fibril formation, disrupt A $\beta$  fibrils, and further to attenuate its cytotoxicities. In addition, we found that enzymatically inactivated ENO1 failed to inhibit A $\beta$  fibril formation and disruption of A $\beta$  fibrils. The proteolytic activity of ENO1 may underlie cytoprotective effect and clearance of A $\beta$  from brain in AD and CAA and may be valuable therapeutic target.

研究分野：脳神経内科学

キーワード：アミロイド 脳出血 認知症 アルツハイマー病

### 1. 研究開始当初の背景

脳アミロイドアンギオパチー (CAA) は、アルツハイマー病 (AD) 患者の 90% に随伴し、A $\beta$  が脳血管に沈着、脆弱化し脳出血を発症する (文献 1)。高齢化社会が社会問題となる中、CAA 患者が増加する一方で、CAA の予防や治療法は未確立であり、その開発は急務である。CAA や AD は病原タンパク質である A $\beta$  が脳に沈着するアミロイドーシスという疾患概念に含まれる。アミロイドーシスは、難溶性のタンパク質であるアミロイド線維が全身諸臓器の細胞外に沈着し、様々な機能障害を起こす疾患群の総称であり AD と CAA を総じて脳アミロイドーシスと呼ぶ。近年、アミロイドーシスの研究領域では、病原タンパク質と共存するタンパク質が分子基盤の解明と治療薬開発の鍵として認識されるようになった。しかし、CAA の共存タンパク質の研究は、これまで日本、および諸外国を含め報告がなかった。申請者はこの問題を解明すべく、世界に先駆けて CAA における共存タンパク質を同定した。具体的には、CAA 罹患血管から、レーザーマイクロダイセクションを用い精密に切り出した脳血管に含まれるタンパク質のプロテオミクス解析を行い、CAA 罹患血管に特異的に発現する分子を同定した (文献 2)。その中で、A $\beta$  に次いで 2 番目に多く発現する  $\alpha$ -エノラーゼに着目し検討を行い、 $\alpha$ -エノラーゼが ① A $\beta$  の線維形成を抑制 ② A $\beta$  線維を分解、さらに ③ A $\beta$  の細胞毒性を抑制するというこれまでに報告のない全く新しい作用機序を見出し、治療応用への可能性を示した。

### 2. 研究の目的

なぜ  $\alpha$ -エノラーゼが A $\beta$  の線維形成を抑制するのか、A $\beta$  線維を分解するのか、ひいては、A $\beta$  の細胞毒性を抑制するのかという根本的問いに答えるための基礎的研究を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

$\alpha$ -エノラーゼの A $\beta$  毒性制御機構の解明に向けて、プロテアーゼ活性に着目し検討を行った。まず、 $\alpha$ -エノラーゼがプロテアーゼ作用を介して、A $\beta$  タンパクを切断するとの仮説を立てた。そこで、複数のプロテアーゼ阻害剤を用いて、 $\alpha$  エノラーゼによる A $\beta$  線維形成抑制効果が減弱するか否かを検討した。セリンプロテアーゼ阻害剤として Pefabloc、アスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤として PepstatinA、システインプロテアーゼ阻害剤として E-64、金属プロテアーゼとして Phosphoramidon と EDTA を用いた。

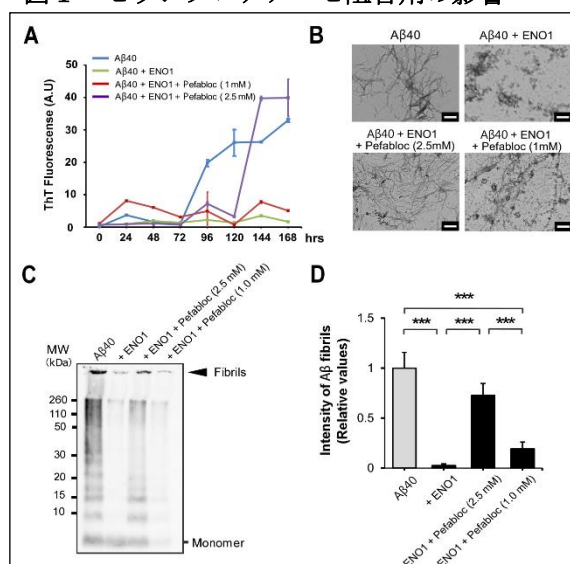
### 4. 研究成果

#### 1. $\alpha$ -エノラーゼによる A $\beta$ 線維形成抑制メカニズムの解明

セリンプロテアーゼ阻害剤である Pefabloc SC を用いた検討で、 $\alpha$  エノラーゼの線維形成抑制効果が阻害されることが判明した。

まず、チオフラビン T 吸光度を用いた解析を行った。チオフラビン T はアミロイドの  $\beta$  シート構造を認識し、それに応じて吸光度が上昇し線維形成を間接的にモニタリングする測定手法である。 $\alpha$  エノラーゼの添加により抑制されていた吸光度の上昇 (図 1 A, 緑) が、セリンプロテアーゼ阻害剤 (Pefabloc SC, 2.5mM) の添加によって、一転して吸光度の上昇がみられるようになった (図 1 A, 紫)。このことは透過型電子顕微鏡を用いた検討でも示され、 $\alpha$ -エノラーゼによって抑制されていた A $\beta$  線維形成 (図 1 B, 右上) が Pefabloc SC, 2.5mM の添加によって線維形成がみられるようになった (図 1 B, 左下)。さらにウェスタンブロット法を用いた検討において、 $\alpha$ -エノラーゼの添加により A $\beta$  線維に該当するバンドが消失するが (図 1 C, 矢頭, 2 レーン目) (図 1 D, 右から 2 つ目の棒グラフ)、Pefabloc SC, 2.5mM の添加によって A $\beta$  線維に該当するバンドが出現することを確認した (図 1 C, 矢頭, 3 レーン目) (図 1 D, 右から 3 つ目の棒グラフ)。(論文投稿中)

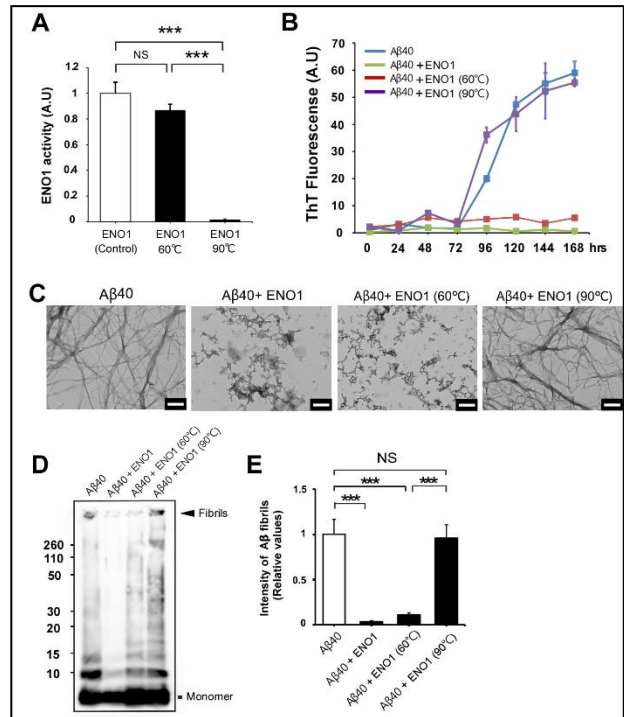
図 1 セリンプロテアーゼ阻害剤の影響



## 2. $\alpha$ -エノラーゼの酵素活性がA $\beta$ 線維形成メカニズムに与える影響の解明

次に、 $\alpha$ -エノラーゼによるA $\beta$ 線維形成抑制作用が、その酵素活性に依存するとの仮説を立てた。まず、 $\alpha$ -エノラーゼに対して90°C、5分間の熱処理を加えたところ、その酵素活性が完全に消失した(図2A)。そこで、図1と同様にチオフラビンTによる吸光度測定、および透過型電子顕微鏡を用いた検討を行ったところ、90°Cの熱処理で失活させた $\alpha$ -エノラーゼは、そのA $\beta$ 線維形成抑制効果が失われ、線維形成に至ることを示した(図2B, 紫)(図2C, 右端)。ウェスタンブロット法においても、90°Cの熱処理で失活させた $\alpha$ -エノラーゼを添加した群において、A $\beta$ 線維が確認された(図2D, Eの右端)。(論文投稿中)

図2  $\alpha$ -エノラーゼの酵素活性の影響



## 文献

1. Viswanathan A, Greenberg SM. Cerebral amyloid angiopathy in the elderly. *Ann Neurol* ; 70:871–880, 2011.
2. Inoue Y, Ueda M, Tasaki M, Takeshima A, Nagatoshi A, Masuda T, Misumi Y, Kosaka T, Nomura T, Mizukami M, Matsumoto S, Yamashita T, Takahashi H, Kakita A, Ando Y. Sushi repeat-containing protein 1: a novel disease-associated molecule in cerebral amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol*; 134: 605-617, 2017.
3. Sultana R., Boyd-Kimball D., Poon H. F., Cai J., Pierce W. M., Klein J. B., Merchant M., Markesbery W. R., and Butterfield D. A. Redox proteomics identification of oxidized proteins in Alzheimer's disease hippocampus and cerebellum: an approach to understand pathological and biochemical alterations in AD. *Neurobiol Aging*; 27: 1564–1576, 2006.
4. Butterfield DA, Poon HF, St Clair D, Keller JN, Pierce WM, Klein JB, Markesbery WR. Redox proteomics identification of oxidatively modified hippocampal proteins in mild cognitive impairment: insights into the development of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*; 22: 223-232, 2006.

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 noue Y, Ando Y, Misumi Y, Ueda M.	4. 巻 22
2. 論文標題 Current Management and Therapeutic Strategies for Cerebral Amyloid Angiopathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 3869
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22083869	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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