

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21700392

研究課題名(和文) γ セクレターゼ結合蛋白質による酵素活性制御の研究

研究課題名(英文) Analysis of the gamma-secretase interactome and regulation mechanisms of the enzymatic activity.

研究代表者

若林 朋子(WAKABAYASHI TOMOKO)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：20530330

研究成果の概要(和文)：

本研究では、アルツハイマー病脳に蓄積するA β の産生を担う酵素である γ セクレターゼに関して、プロテオミクスの手法を用いて結合蛋白質を同定し、 γ セクレターゼの酵素活性や細胞内局在に影響を及ぼす蛋白質を多角的なスクリーニング方法を用いて探索した。その結果、特殊なリピッドマイクロドメイン(テトラスパニンウェブ)を形成することが知られるテトラスパニンおよび関連蛋白質を同定し、これらの分子が γ セクレターゼの酵素活性発揮の足場となり、活性を制御している可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：

In this study, we searched for γ -secretase interacting proteins using proteomic analysis, and screened for proteins that affected either enzymatic activity or subcellular localization of γ -secretase. As a result, we identified tetraspanins and tetraspanin-associated proteins that have been known to form the lipid microdomain in the cellular membranes (called tetraspanin web or TEM). We found the possibility that tetraspanins and tetraspanin-associated proteins provide a platform for γ -secretase cleavage and regulate its enzymatic activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：脳神経疾患、アルツハイマー病

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎え、アルツハイマー病(Alzheimer's disease:AD)の病態解明と治

療法開発は急務である。AD脳には老人斑と呼ばれる特徴的な病理構造物が出現する。老人斑はアミロイド β ペプチド(A β)を主成分とするアミロイド線維から形成されるが、老

人斑には A β 以外にも多くの成分が存在し、それらの蓄積過程は病因と密接な関係が想定されている。一方 A β の産生過程も病因と深く関わっている。

A β はアミロイド前駆体蛋白 (APP) より分泌されるが、その切断を担う酵素である γ セクレターゼは、家族性 AD の原因遺伝子産物であるプレセニリン (PS) を活性サブユニットに持つアスパラギン酸プロテアーゼである。A β には γ セクレターゼによる γ 切断の位置に応じて C 末端長の異なる複数の分子種 (主に A β 40、42) が存在する。疎水性の高い A β 42 は A β 40 に比して産生量が少ないにもかかわらず、 β シート構造を有するアミロイド線維を形成し易く、老人斑中の A β の主要な分子種となる。PS の家族性 AD 変異は、酵素活性を変化させることで C 末端が長い A β 42 の産生率を増加し、アミロイド形成・AD 発症を促進すると考えられている。近年、APP の他にも発生や免疫系の制御に重要な役割を担う Notch 受容体をはじめとする多数の I 型膜蛋白が γ セクレターゼの基質として報告されている。 γ セクレターゼは AD 治療薬開発の有望な標的であるが、APP 特異的な阻害剤の開発が必要不可欠であるといえる。この問題を解明するにあたって考慮すべき要因として、酵素活性の制御メカニズムと、 γ セクレターゼ切断が生じる細胞内コンパートメントが挙げられる。 γ セクレターゼは PS を含む 4 つの膜蛋白質からなる高分子量の複合体で、小胞体に於いて段階的に結合したサブユニットが複合体を形成し、ゴルジ体以降の細胞内コンパートメントに運ばれて酵素活性を発揮する。 γ セクレターゼの酵素活性は主にゴルジ体から細胞表面膜にかけて分布し、一部はエンドソームにも存在すると考えられている。このような知見に基づき、 γ セクレターゼに結合することでその活性の調節および細胞内輸送に関わる分子を探索・解析し、 γ セクレターゼの制御メカニズムや基質選択性との関連を検討することにより、酵素学的に大変ユニークで興味深い γ セクレターゼ活性制御機構に迫るとともに、その分子を標的とする新規 AD 治療法の開発につながることを期待される。

2. 研究の目的

本研究はアルツハイマー病 (AD) 脳に蓄積する A β の産生を担う酵素である γ セクレターゼに関して、プロテオミクス的手法により γ セクレターゼ結合蛋白質を同定し、 γ セクレターゼ活性や細胞内局在に影響を及ぼす蛋白質の探索を行うことで、 γ セクレターゼの制御メカニズムを解明し、ひいては γ セクレターゼを標的とした AD 治療法開発の手が

かりをつかむことを目指すものである。

γ セクレターゼは疎水性が高く、界面活性剤による複合体の解離や酵素活性の消失を招きやすいために生化学的な精製が困難であり、研究開始時において、結合蛋白質の網羅的解析は報告されていなかった。本研究では、タンデムアフィニータグを付加した PS1 または PS2 を発現した PS^{-/-}マウス由来の線維芽細胞より、TAP (tandem affinity purification) 法を用いて複合体を精製し、LC-MS/MS により同定された γ セクレターゼ結合蛋白質が酵素活性の制御に関与するメカニズムの解明を目指した。

本研究開始時に於いて同定された結合蛋白質の中には、過去に yeast two-hybrid 法や免疫沈降法などで同定されていた PS 結合蛋白質のうち、報告も多く機能との関連も示されている β -catenin をはじめとするアルマジロファミリー蛋白質や、膜輸送に関わる Tmp21/p24 など複数が含まれていた。約 50 の未報告の γ セクレターゼ結合蛋白質について、機能に基づき γ セクレターゼ結合蛋白質を分類すると、細胞内膜輸送に関わる蛋白質群、イオン・アミノ酸等のトランスポーター蛋白質群、細胞接着に関わる蛋白質群、そしてリピッドマイクロドメインに関連する蛋白質群などに大別された。

この中でも特に本研究で注目したのが、リピッドマイクロドメイン関連蛋白質である。脂質と AD 発症の密接な関わりは、ApoE を代表とする脳内コレステロール代謝関連因子と AD の遺伝学的検討から長らく示唆されてきた。これまで幾つかの報告で、PS および γ セクレターゼが脂質ラフト画分に存在することが示唆されている。また、近年 *in vitro* の γ セクレターゼ活性測定系の確立に伴い、脂質の組成と γ セクレターゼ活性との密接な関連が明らかになってきた。このことから、現在では γ セクレターゼの一部は典型的脂質ラフトに存在し、APP を含む基質を切断するのではないかという説が一般化しつつある。しかし、同定したリピッドマイクロドメイン関連蛋白質には典型的脂質ラフトに存在する分子は含まれず、脂質結合・膜内蛋白質ネットワーク形成能を持つと示唆されるテトラスパニンなどを含む蛋白質群が同定された。これまでの報告では厳密な意味で γ セクレターゼが脂質ラフトのどのようなサブタイプに局在するのか示されていない。本研究では γ セクレターゼは典型的脂質ラフトではなく、むしろ異なる性質や蛋白質・脂質構成を持つテトラスパニンなどからなる膜内微小環境に親和性があるのではないかと考え、研究を進めることとした。

本研究では、プロテオミクス解析により得られた γ セクレターゼ結合蛋白質について、(1) 培養細胞系を用いて内因性 γ セクレタ

一ゼ結合蛋白質のノックダウンを行い、 γ セクレターゼ活性の測定を行うことにより、 γ セクレターゼ結合蛋白質の酵素活性に対する影響を多角的にスクリーニングする。また、(2)上述のリピッドマイクロドメイン関連分子について、 γ セクレターゼの典型的脂質ラフトとの局在の違いを生化学的、免疫化学的に明らかにする。更に(3)上記で得られた γ セクレターゼ調節分子のノックアウトマウス由来細胞を用い、APPを始めとする γ セクレターゼ基質に与える影響を検討する。そして、これらの結果を通じ、新たなAD治療法のターゲットを模索する。

3. 研究の方法

本研究は以下の項目に大別される。

(1)プロテオミクス解析により得られた γ セクレターゼ結合蛋白質の γ セクレターゼ複合体形成・活性および細胞内局在に対する影響のスクリーニング。(2)結合蛋白質のうち、細胞膜での脂質との関連が示されているものに関して、 γ セクレターゼとの関連の検討。(3) γ セクレターゼ調節因子のノックアウトマウス由来細胞を用いた γ セクレターゼ基質の影響の検討。

(1) γ セクレターゼ結合蛋白質の γ セクレターゼに対する影響の多角的なスクリーニング

培養細胞を用い、RNAiによる内因性 γ セクレターゼ結合蛋白質のノックダウンを行い、 $A\beta$ 産生量の変化をELISAにより測定する。また、APP代謝産物(APP CTF、AICD)をウェスタンブロットにより解析する。

(2)リピッドマイクロドメインと γ セクレターゼの関連

培養細胞もしくは組織を用い、様々な強度の界面活性剤を用いて可溶化した細胞をショ糖密度勾配遠心法により分画し、DRM

(detergent resistant membrane)画分を調製する。 γ セクレターゼと脂質ラフトもしくはその他リピッドマイクロドメイン関連蛋白質との生化学的性質(界面活性剤への耐性)を指標とした局在の違い、および免疫沈降法を用いた蛋白間結合を検討する。

(3)上記の結果を受け、テトラスパニンノックアウト動物由来の細胞を用いた解析
 γ セクレターゼ結合蛋白質のうち、(1)および(2)における検討において顕著な γ セクレターゼ活性への影響が確認された蛋白質で、中枢神経形における発現が認められるものについて、ノックアウトマウス由来の細胞を

用い、APPおよびその他の γ セクレターゼ基質の切断への影響を検討する。また、これらのテトラスパニン蛋白質の機能阻害抗体を用い、 γ セクレターゼ活性に対する影響を検証する。

4. 研究成果

本研究では、AD脳に特異的に蓄積する $A\beta$ の産生を担う酵素である γ セクレターゼに関して、プロテオミクスの手法を用いて γ セクレターゼ結合蛋白質を同定し、 γ セクレターゼの酵素活性や細胞内局在に影響を及ぼす蛋白質を多角的なスクリーニング方法を用いて探索する。その中でも特にリピッドマイクロドメインへの γ セクレターゼ複合体の局在に着目し、リピッドマイクロドメインを構成する蛋白質による γ セクレターゼの機能制御メカニズムの解明を目指し、ひいては γ セクレターゼを標的としたAD治療法開発の手がかりをつかむことを目指すものである。

培養細胞から活性型 γ セクレターゼを生化学的に精製する方法を確立し、LC-MS/MS解析により、 γ セクレターゼ複合体に結合するタンパク質を網羅的に同定した。その中から、複数回の解析で同定されたテトラスパニンおよびテトラスパニン結合蛋白質に着目した。これらの蛋白質は細胞膜状に脂質ラフトに類似したテトラスパニンウェブ・TEMと呼ばれるリピッドマイクロドメインを形成し、様々な蛋白質の機能制御を行っていることが明らかになっている。

これらの分子を培養細胞においてRNAi法を用いてノックダウンし、 $A\beta$ 分泌量を指標として γ セクレターゼ活性の測定を行ったところ、ノックダウンにより酵素活性が変化することを見出した。

また、免疫共沈降法を用いた検討を行った結果、これらのテトラスパニン関連分子は培養細胞系において内因性発現のレベルで γ セクレターゼ複合体に結合していることが示された。

γ セクレターゼとの結合が示されたテトラスパニンおよび関連蛋白質について、細胞膜を異なる強度の界面活性剤を用いて可溶化し、ショ糖密度勾配遠心法により分画を行った結果、いずれも、弱い界面活性剤を用いた場合のみDRM画分に分離され、そのパターンは γ セクレターゼのサブユニット蛋白質の性質に一致するものであった。また、その性質は典型的脂質ラフトとは異なり、これまでに報告されているテトラスパニンウェブの性質に一致するものであった。このことから、生化学的性質の面からも、これらの蛋白質が γ セクレターゼと同様の膜ドメインに

存在することが示唆された。

γ セクレターゼとの結合が明らかになったテトラスパニン蛋白質のうち、細胞に主に発現する CD81 および CD9 を欠損したマウス由来の細胞および脳組織を用いた検討を行った結果、AD 発症に関わる A β の前駆体である APP のみならず、カドヘリンや APLP 等、複数の γ セクレターゼの内因性基質蛋白質の切断が減少していることが明らかになった。このことは、テトラスパニンが形成するドメインが γ セクレターゼの局在に影響し、酵素活性発揮の場になっている可能性を示唆している。

また、テトラスパニンに対する抗体を用いた機能阻害実験を行ったところ、抗テトラスパニン抗体の添加により、 γ セクレターゼによる基質の切断が減少することが分かった。

これらの結果から、内因性のテトラスパニンが形成する細胞膜上のリピッドマイクロドメイン (テトラスパニンウェブ、TEM) が、 γ セクレターゼと基質の切断の場となっており、酵素活性を制御している可能性があることを示した。

γ セクレターゼの切断機構の解明は AD 創薬研究の重要なターゲットであり、今後はこのマイクロドメインによる γ セクレターゼ活性の調節機構を細胞内タンパク質輸送や構造的な観点からより詳細に解析していくことで、本研究で明らかにした結合タンパク質が AD 治療薬開発の有望な標的となる可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Wakabayashi T, Craessaerts K, Bammens L, Bentahir M, Borgions F, Herdewijn P, Staes A, Timmerman E, Vandekerckhove J, Rubinstein E, Boucheix C, Gevaert K, De Strooper B., Analysis of the gamma-secretase interactome and validation of its association with tetraspanin-enriched microdomains., Nature Cell Biology, 査読 有, 11, 2009, 1340-1346

[学会発表] (計 1 件)

① Wakabayashi T, Biochemical analysis of gamma-secretase interacting proteins and its effects on the gamma-secretase activity, Society for Neuroscience 2009, 2009 年 10 月 21 日, 米国・シカゴ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若林 朋子 (WAKABAYASHI TOMOKO)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：20530330

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし