

機関番号：32620

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21700396

研究課題名（和文） $\alpha$ セクレターゼ複合体解析によるPKC依存性アミロイド産生抑制機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of PKC-dependent amyloid-beta reduction mechanism by alpha-secretase complex

研究代表者

櫻山 拓 (KASHIYAMA TAKU)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：90338343

研究成果の概要（和文）：

アルツハイマー病の主要原因と考えられているアミロイドベータ（A $\beta$ ）は、アミロイド前駆体蛋白質（APP）の $\beta$ 切断と $\gamma$ 切断により生ずる。

一方、A $\beta$ の内部配列を切断する $\alpha$ 切断は $\beta$ 切断と競合しA $\beta$ 産生を抑制する。

したがって $\alpha$ 切断の亢進はアルツハイマー治療戦略のひとつとして期待される。

本研究ではAPPに特異的な $\alpha/\beta$ 切断調節機構を明らかにするために、同様に $\alpha$ 切断と $\beta$ 切断を受ける基質蛋白質の切断調節を明らかにするためのツールを開発した。

研究成果の概要（英文）：

Amyloid-beta (A $\beta$ ), which plays a major role in Alzheimer disease, is generated by  $\beta$  and  $\gamma$  cleavage of Amyloid precursor protein (APP). While  $\beta$  cleavage, which occur within A $\gamma$ , competitively reduces A $\beta$  production. Therefore, acceleration of  $\alpha$  cleavage may be one of the therapeutic strategies for Alzheimer disease. To determine a cleavage mechanism specific for APP, we developed a tool for analyzing cleavage mechanism in other substrates, which is also cleaved by  $\alpha$ - and  $\beta$ - secretase.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,350,000

研究分野：薬理学

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：神経変性疾患、アミロイドベータ

## 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病の主な原因と考えられる A $\beta$  産生において、ADAM ファミリープロテアーゼによる  $\alpha$  切断が、A $\beta$  産生に対して抑制的に働くことが報告されている。

$\alpha$  切断は PKC 依存的に亢進するが、詳細な機構は明らかにされていない。

このメカニズムの解明は新たなアルツハイマー治療戦略の標的の発見につながると期待される。

我々は界面活性剤不溶性膜画分 (DRM) の解析において APP と同じ分画に  $\alpha$  切断酵素に結合する蛋白質を見出した。

この蛋白質のアイソフォームが非神経系細胞において  $\alpha$  切断酵素との結合が報告されているため、PKC 活性化と APP 切断の亢進を調節している可能性が示唆された。

## 2. 研究の目的

アルツハイマー病治療を目的とした ADAM ファミリープロテアーゼの活性化では、APP 以外の基質の切断にも影響を与えうることが懸念される。

本研究では APP 切断特異的な切断の PKC 活性化機構を調べると共に、APP 以外の基質の  $\alpha/\beta$  切断の調節を評価するツールの開発を平行して行なう。

## 3. 研究の方法

### (1) ADAM 結合蛋白質の探索

ADAM 細胞内ドメインを含む GST 融合蛋白質をプローブとして、これに結合する蛋白質を探索する。

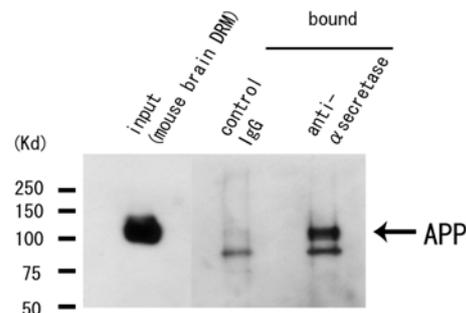
### (2) APP 以外の基質の切断調節の解析

APP 同様に ADAM と BACE1 の切断を受ける基質蛋白質として、電位依存性ナトリウム

チャンネル  $\beta$  サブユニットとニューレグリンの切断調節について調べる。

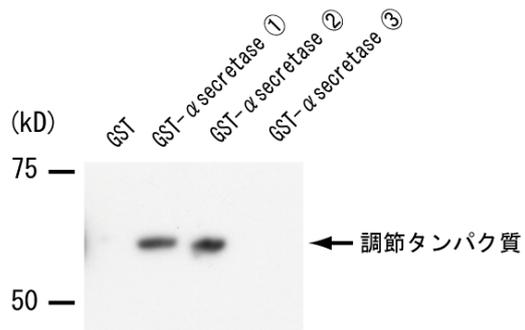
## 4. 研究成果

(1) Lubrol を用いた DRM と  $\alpha$  切断酵素に対する抗体を用いた免疫沈降において、APP が共沈してくることを見出した。(下図)



次に、我々が Lubrol DRM に存在することを見出した蛋白質 PACSIN と  $\alpha$  切断酵素の結合について検討した。

APP の  $\alpha$  切断を担う酵素の候補として考えられる 3 種類 ADAM ファミリープロテアーゼ (ADAM10, ADAM17, ADAM19) の細胞内ドメインをそれぞれ GST 融合蛋白質として発現させ結合アッセイを行ったところ、このうち 2 種類が PACSIN と結合することが確認された。(下図)



今後、リン酸化による結合調節などを視野に入れて PKC 依存的な切断亢進にどのように関わるのか調べる予定である。

(2) APP 以外に  $\alpha$  切断と  $\beta$  切断を受ける基質の切断を評価することは、APP 切断をター

ゲットとした治療薬の特異性や副作用の予測に役立つと考えられる。

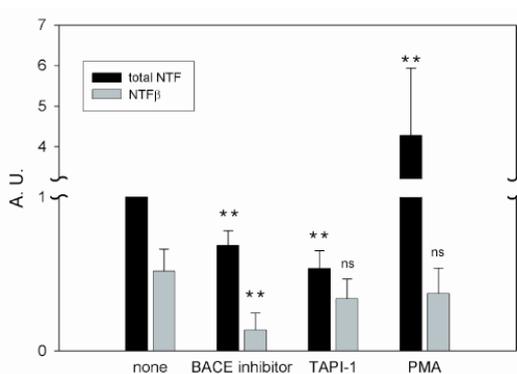
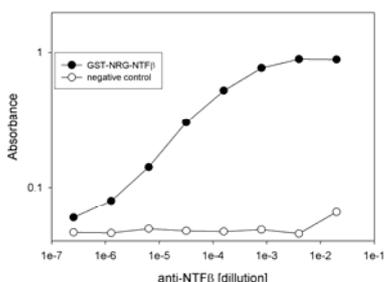
本研究ではニューレグリンのα切断とβ切断を区別することのできるツールとして、切断端特異的な抗体を作製した。

ニューレグリン細胞外ドメインの膜近傍配列からなるペプチドをリコンビナント BACE1 および ADAM17 で *in vitro* 切断し切断部位を同定した。

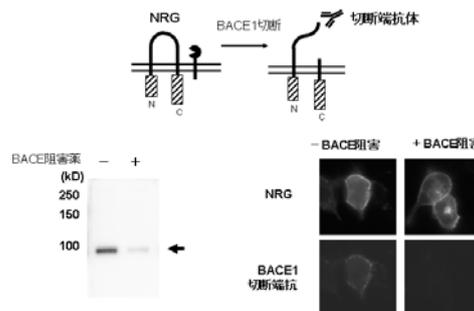
この断端を持つ短いペプチドを抗原として切断端特異的な抗体を作成した。

作製した抗体は ELISA にて α 切断と β 切断を定量化することができた。(下図)

anti-NTFβ antibody specifically reacts with BACE1 mediated cleaved end of NRG1



また、同抗体はウェスタンブロットや免疫染色においても特異的に切断端を認識することが示された。(下図)



NRGを発現する培養細胞において、ウェスタンブロット、蛍光抗体染色においてNRGのBACE1切断端が認識された。BACE1阻害薬によりこれらのシグナルは減少した。

これらはニューレグリンの切断と細胞間シグナル解析にも有用であることが示された。

## 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)

櫻井 隆、樫山 拓、貫名 信行 マイクロドメインスイッチング：アミロイド前駆体蛋白質のマイクロドメイン依存性代謝調節とシンタキシン 1、生体の科学、査読無、2010: 61(3) 252-256

[学会発表] (計 3 件)

樫山 拓、櫻井 隆 切断端を特異的に認識する抗体を用いたニューレグリン切断機構の解析 日本薬理学会関東部会 自治医科大学地域医療情報研修センター 2010 年 10 月 23 日

Taku Kashiya, Takashi Sakurai, Detection of BACE1-mediated activation of neuregulin 1-erbB signaling using a cleavage site specific antibody, Inaugural International Academy of Sportology, Juntendo University, March 5, 2011

Kashiya T, Sakurai T, Detection of BACE1 dependent neuregulin 1 signal

using cleaved end specific antibody, 第 84  
回日本薬理学会年会 パシフィコ横浜  
March 22

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

榎山 拓 (KASHIYAMA TAKU)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：90338343

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし