

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23657082

研究課題名(和文) 認知症などの病態をもたらす膜内切断プロテアーゼの活性調節機構の解析

研究課題名(英文) Molecular mechanism in regulation of the intramembrane proteases

研究代表者

二井 勇人 (Futai, Eugene)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90447459

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：膜内タンパク質限定分解を司る膜内切断プロテアーゼは膜貫通領域に活性中心を持つため、精製と活性の評価が難しく、酵素機能が明らかではない。研究代表者は、膜内切断プロテアーゼのうち、ヒト セクレターゼ複合体を酵母において再構成し、試験管内で セクレターゼ活性を測定できる系を世界で初めて開発した。本研究では、この系を用いて セクレターゼの酵素学的性状、サブユニット構成が活性に及ぼす影響、リン脂質や薬剤による活性の変化など、酵素としての重要な性質を明らかにした。セクレターゼの機能不全はアルツハイマー病の原因となる。酵母を「生きた試験管」として使った本研究の成果を、認知症の治療に役立てたい。

研究成果の概要(英文)：Since intramembrane proteases possess these active sites buried in the lipid bilayer, it is difficult to purify and measure their activities. We introduced human gamma-secretase complex in yeast and succeeded in measuring its activity in vitro with the yeast microsomes. In this research, we utilized the reconstitution system and analyzed the enzymatic character of the gamma-secretase. We found the relationship between proteolytic activities and subunit composition, and we screened the modulator of the protease activities from lipids and natural compounds. Malfunction of gamma-secretase leads to Alzheimer's disease. We would like to expand our research to the treatment of the disease.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：酵素 プロテアーゼ 脳・神経 認知症 酵母

1. 研究開始当初の背景

RIP (膜内蛋白質限定分解) は、細胞膜あるいはオルガネラ膜を超えて、情報を伝達する分子機構としてきわめて重要であり、機能不全により認知症をはじめ様々な病態をもたらす。しかし、RIPを司る膜内切断プロテアーゼは膜貫通領域に活性中心を持つため、精製と活性の評価が難しく、その酵素機能が明らかではない。研究代表者は、膜内切断プロテアーゼのうち、アルツハイマー病の原因遺伝子であるプレセニリンからなるヒト セクレターゼ複合体を酵母において再構成することに成功し、試験管内で セクレターゼ活性を測定できる系を世界で初めて開発していた。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者が開発したプロテアーゼ評価系を使って、膜内切断プロテアーゼの活性調節機構明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) セクレターゼ再構成系-1 ; ヒト セクレターゼを構成する4つの遺伝子(プレセニリン、ニカストリン、Aph-1、Pen2)と、ヒトアミロイド前駆体(APP)断片を酵母細胞内に導入し、その膜画分(ミクロソーム)を調製することにより、試験管内でA₄₂を生成する事が可能である。この酵素アッセイ系を用いて、試験管内での反応条件【pH条件、金属イオンや薬剤(NSAIDsなど)の添加】を様々に変化させ、A₄₂生成への影響を解析する。また、セクレターゼのサブユニットのうち、触媒サブユニットであるプレセニリンアイソフォーム(PS1とPS2)、家族性アルツハイマー病家系から見つかったプレセニリン変異体、Aph-1アイソフォーム(Aph-1a, Aph-1-b, Aph-1-c)を導入して、各々の複合体のプロテアーゼ活性と基質特異性を比較、解析する。また、ヒトAPP断片を発現させたチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞の培地にNSAIDsを添加し、分泌するA₄₂分子種からNSAIDsの効果解析した。

(2) セクレターゼ再構成系-2 ; 転写因子Gal4をカルボキシ末端に融合した人工基質(APP-Gal4やNotch-Gal4)を酵母に導入すると、レポーター遺伝子の発現、すなわち酵母の生育を指標にセクレターゼ活性を評価することができる。この系を用いて、天然物ライブラリーから薬剤探索を行った。酵母の生育で効果が見られた薬剤については、酵素アッセイ系を用いて試験管内での効果を解析した。

(3) site-2プロテアーゼ再構成系 ; ヒトsite-2プロテアーゼと、転写因子Gal4をアミノ末端に融合した人工基質(Gal4-SREBPやGal4-ATF6)を酵母に導入すると、レポーター遺伝子の発現、すなわち酵母の生育を指

標にセクレターゼ活性を評価することができる。また、酵母膜画分(ミクロソーム)を調製して、試験管内で切断反応を検出することを試みた。(SREBPはコレステロール調節因子結合タンパク質の略。)

4. 研究成果

(1) セクレターゼ再構成系-1

ヒトセクレターゼ再構成系を用いて、セクレターゼの詳細な酵素学的性状を解析した。その結果、アルツハイマー病患者脳で減少するリン脂質、プラズマローゲンによって、セクレターゼが阻害されることが分かった。また、プロリン異性化酵素(Pin1)により、産生A₄₂分子種が変化する(毒性の強いA₄₂とA₄₃が増加し、A₄₀が減少する。数字はアミノ酸の長さ。)ことを明らかにした。

セクレターゼ複合体のサブユニット構成が活性に及ぼす影響を解析した。はじめにプレセニリンアイソフォーム(PS1とPS2)を比較した結果、PS2の活性が著しく低い(10分の1)こと、低活性の理由は複合体形成効率の悪さに起因するということが明らかになった(Yonemura et al., 2011, J. Biol. Chem)。続けて、Aph-1アイソフォーム(Aph-1a, Aph-1-b, Aph-1-c)を比較したところ、PS2とAph-1-cと組み合わせることで、活性の高いセクレターゼ複合体となることが明らかとなった(Yonemura et al., 投稿中, J. Biol. Chem)。

セクレターゼモジュレーター

(NSAIDs)の作用機構を解析した。酵母A₄₂生成系へのNSAIDs添加では、A₄₂生成活性が著しく阻害された。また、APPを導入したチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞の培地にNSAIDsを投与する実験を行ったところ、NSAIDsはA₄₂分子種のうち、毒性の高いA₄₂の生成量を大きく下げることが明らかとなった。野生型APPからは、A₄₀が9割程度、A₄₂が1割程度生成する。様々なAPP断片から生成するA₄₂分子種を解析した結果、C末端を欠失する断片では、A₄₂のみが生成する一方で、NSAIDsが効かなくなることが明らかとなった(Watahiki et al., 2012, Neurosci. Lett.)。

(2) セクレターゼ再構成系-2

酵母内に再構成したセクレターゼの切断活性は、酵母の生育を指標に評価することも可能であるため、スクリーニング系としても有用である。セクレターゼの活性中心を担うプレセニリンに見出されているアルツハイマー病変異体を解析し、アミロイド前駆体(APP)の切断活性は著しく低下する一方で、Notchの切断活性はあまり影響を受けておらず、基質認識に影響が与えていることが明らかとなった。そのため、家族性アルツハイマー病プレセニリン変異体に、さらに変異を導入

することによって、低下したAPP切断活性を回復させる復帰変異体を同定した。この復帰変異体は、アルツハイマー病におけるプロテアーゼ活性変化を解析する上で、重要な変異体である。

さらに、1) 切断活性に影響を与える調節因子をヒトcDNAライブラリーから、2) 活性を阻害する薬剤を天然物ライブラリーから、それぞれ探索している。この内、天然物ライブラリーを用いた探索では、抗生物質を母核とした誘導体78個、天然物抽出物からの単離品1344個から、セクレターゼに阻害薬剤1種の同定に至った。今後、周辺化合物の解析を行いたい。

(3) site-2プロテアーゼ再構成系

膜内切断プロテアーゼのうち、ヒトsite-2プロテアーゼの活性評価系の開発を行った。Site-2プロテアーゼはコレステロール調節因子結合タンパク(SREBP)や、ATF6などの小胞体ストレスセンサーを基質として切断する。細菌のホモログについては立体構造も解明されているが、ヒトsite-2プロテアーゼの立体構造は不明で、基質切断を解析するアッセイ系も充分整備されていない。SREBPやATF-6と酵母の転写因子Gal4を融合した人工基質を酵母細胞の中に導入し、切断を簡便に測定できる系の構築を行った。

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4件)すべて査読有り

Watahiki, H., Yagishita, S., Futai, E. & Ishiura, S. (2012) CTF1-51, a truncated carboxyl-terminal fragment of amyloid precursor protein, suppresses the effects of A β -lowering γ -secretase modulators. *Neurosci. Lett.* 526, 96-99.

Sato, K., Tanabe, C., Yoneyama, Y., Watahiki, H., Zhao, Y., Yagishita, S., Ebina, M., Suo, S., Futai, E., Murata, M. & Ishiura, S. (2012) Localization of mature neprilysin in lipid rafts. *J. Neurosci. Res.* 90, 870-877.

Nagara, Y., Hagiwara, M., Hatano, N., Futai, E., Suo, S., Takaoka, Y., Murakami, Y., Ito, A. & Ishiura, S. (2012) Tumor suppressor cell adhesion molecule 1 (CADM1) is cleaved by a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10) and subsequently cleaved by γ -secretase complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 417, 462-467

Yonemura, Y., Futai, E., Yagishita, S., Suo, S., Tomita, T., Iwatsubo, T. & Ishiura, S. (2011) Comparison of presenilin 1 and presenilin 2 γ -secretase activities using a yeast reconstitution system. *J. Biol. Chem.*

286, 44569-44575.

[学会発表](計7件)

米村洋而、二井勇人、柳下聡介、石浦章一、「プレセニンとAph1分子の違いがセクレターゼの機能に及ぼす影響」、第36回日本分子生物学会年会、2013年12月5日、神戸

米村洋而、二井勇人、柳下聡介、周防諭、石浦章一、「酵母再構成系を用いたセクレターゼの機能解析」、第17回病態プロテアーゼ学会学術集会、2013年8月10日、浜松

佐々木広美、二井勇人、内田隆史、「プロリン異性化酵素Pin1はPresenilinに結合し、活性を制御する」、2013年度日本農芸化学会大会、2013年3月25日、仙台

米村洋而、二井勇人、柳下聡介、周防諭、石浦章一、「酵母再構成系によるセクレターゼ活性の評価」、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月14日、福岡

小野寺智子、佐々木広美、二井勇人、内田隆史、神尾好是、金子淳、「エタノールアミン型リン脂質のセクレターゼのin vitro活性への影響」、2012年度日本農芸化学会大会、2012年3月25日、京都

米村洋而、二井勇人、柳下聡介、周防諭、富田泰輔、岩坪威、石浦章一、「酵母再構成系によるセクレターゼにおけるPS1とPS2の比較」、第34回日本分子生物学会年会、2011年12月15日、横浜

佐々木広美、内田隆史、二井勇人、「セクレターゼによるA β 生成へのPin1の作用機構解析」、第34回日本分子生物学会年会、2011年12月14日、横浜

[図書](計1件)

石浦章一、笹川昇、二井勇人、裳華房、「脳-分子・遺伝子・生理-」2011、8-26ページと75-87ページを担当(全128ページ)

[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

二井勇人 (FUTAI, EUGENE)
東北大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：90447459

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：