

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23700425

研究課題名（和文）ER ストレス応答機構 ERAD による Rer1 分解を介した A β 産生制御研究課題名（英文）A β generation regulated by the degradation of Rer1 through ERAD

研究代表者

田邊 千晶 (Tanabe Chiaki)

岩手医科大学・薬学部・助教

研究者番号：00552902

研究成果の概要（和文）：アルツハイマー病は、 γ セクレターゼによって産生される A β の蓄積を特徴とする。先行研究において、ER ストレス応答機構である小胞体関連分解(ERAD)に関わる因子（Herp、Synoviolin(Syn)）が A β 産生を増加させることが示唆されたが、そのメカニズムは明らかではない。本研究では、Syn が、 γ セクレターゼの複合体形成を負に制御している Rer1 を分解へと導くことによって、 γ セクレターゼ複合体形成を促進し、A β 産生を増加させることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Alzheimer's disease (AD) is characterized by the deposition of A β , which is generated by γ -secretase. We previously reported that synoviolin and/or Herp, which are involved in ER-associated degradation (ERAD), enhance A β generation, but the mechanism is unknown. In this study, we clarified that Syn regulates the assembly of the γ -secretase complex via the degradation of Rer1, which results in the generation of A β .

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：老化性痴呆疾患

1. 研究開始当初の背景

(1) アルツハイマー病 (AD) は、アミロイド β タンパク質 (A β) の蓄積による老人斑の形成を特徴とする神経変性疾患である。発症の原因である A β は、アミロイド前駆体 (APP) から、 β セクレターゼと γ セクレターゼによる連続的な切断によって産生される。

(2) γ セクレターゼは、活性中心である presenilin (PS)、基質認識部位である nicastrin (NCT) に加え、anterior pharynx defective 1 (APH-1)、PS enhancer 2 (PEN-2) の 4 分子複合体から成る。この複合体は小

胞体 (ER) における APH-1 と NCT の会合から始まり、これに PS、PEN-2 が結合し、分子内切断によって PS が活性型に変わり、トランスゴルジへと輸送される。そこでさらに NCT の糖鎖修飾による成熟化を経て、活性のある γ セクレターゼ複合体となる (Dries D.R., *et al.*, *Curr. Alzheimer Res.* 5:132-146, 2008)。このほとんどは ER/ゴルジ間に存在し、一部がエンドソーム、リソソーム、エクソソームへと輸送され、基質を切断する。この一連の過程において、 γ セクレターゼ複合体を形成できなかった因子は、ER への逆行輸送や、プロテアソームによる分解によって制御されて

いる。

(3) 先行研究において、ER ストレス誘導性膜タンパク質である Herp が、PS との相互作用を介して A β 産生を促進することを明らかにした (Sai X. *et al.*, J. Biol. Chem. 277:12915-20, 2002)。また、Herp が糖鎖修飾の不完全な未成熟型 NCT (imNCT) の分解促進にも関与していることを示した。ER に蓄積した異常タンパク質が細胞質へ逆行輸送され、プロテアソームによって分解されるという小胞体関連分解 (ERAD) という分解機構があるが、Herp が ERAD の促進に関与するという報告から (Schulze A. *et al.*, J. Mol. Biol. 354:1021-1027, 2005)、ここで見られた imNCT の分解は、ERAD によるものであると考えられた。さらに我々は、Herp に結合し、ERAD に関与するユビキチンリガーゼ (E3) である Synoviolin (Syn) もまた、imNCT の分解に関与することを見出した (Maeda T., Marutani T., Zou K., Araki W., Tanabe C., *et al.*, FEBS J. 276(20):5832-5840, 2009)。さらに A β 産生に対する Syn の影響を検討したところ、Syn の過剰発現によって A β 産生の増加が見られた。

2. 研究の目的

我々は、 γ セクレターゼによる A β 産生制御を目的として、その活性調節機構を明らかにしたいと考えている。

先行研究において、ERAD 関連因子 (Herp, Syn) による imNCT の直接的な分解を介した γ セクレターゼの活性化が示唆された。しかし、imNCT が分解されるにもかかわらず、A β 産生の増加が引き起こされる詳細なメカニズムは明らかではない。そのメカニズムとして、以下の2つが考えられ、これらを明らかにすることを目的とした。

- (1) ERAD 関連因子による imNCT の積極的な分解により、成熟型 NCT (mNCT) の γ セクレターゼ複合体が効率良く形成された可能性
- (2) Syn の別の基質のユビキチン化などによる、間接的な制御である可能性

NCT の細胞膜貫通ドメインに存在する APH-1 結合部位に、ゴルジ体から ER への逆行輸送に関与する retrieval to ER 1 protein (Rer1) が結合し、APH-1 と複合体を形成しない NCT の ER への引き戻しを制御しているという興味深い報告がある (Spasic D., *et al.*, J. Cell. Biol. 176:629-640, 2007)。また、複合体を形成しない Pen2 もまた Rer1 によって ER に戻されるという報告がある (Kaether C. *et al.*, EMBO. Rep. 8:743-748, 2007)。以上の報告から、Syn による間接的な制御とし

て、Rer1 が Syn の基質となっているのではないかと考え、Rer1 に着目した。

3. 研究の方法

(1) A β 産生への影響

APP を安定発現したマウス線維芽細胞に Syn の RNAi を行い、あるいは Syn の dominant negative mutant C307A を過剰発現し、分泌される A β を ELISA によって定量した。

(2) Syn 欠失型線維芽細胞における Rer1 蓄積細胞は、Syn 欠失型 (-/-) と野生型 (WT) マウス線維芽細胞を用い、Rer1 レベルをウェスタンブロット法により定量した。

また、Rer1 の mRNA レベルをリアルタイム RT-PCR 法により定量した。

さらに、タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドを用いて、Rer1 の安定性を比較した。

(3) Syn による Rer1 の分解

Syn (-/-) マウス線維芽細胞に、Syn あるいは Syn の dominant negative mutant である C307A を過剰発現し、Rer1 レベルをウェスタンブロット法で比較した。

また、Syn と Rer1 の結合について、免疫沈降法を用いて調べた。

さらに、プロテアソーム阻害剤であるラクタシスチン、リソソーム分解阻害剤であるクロロキンをを用いて、Syn のユビキチンリガーゼ活性依存的にユビキチン化 Rer1 レベルが増加するか免疫沈降法を用いて調べた。

(4) Syn (-/-) における細胞表面に局在する NCT と \square セクレターゼ複合体レベルの減少

Syn (-/-) と WT マウス線維芽細胞を用いて、Iodixanol 密度勾配遠心法により細胞内分画を行い、ウェスタンブロット法によって Rer1、NCT の細胞内局在を調べた。

また、細胞表面タンパク質をビオチン化して単離し、細胞表面に局在する NCT レベルを調べた。

さらに、Blue-Native PAGE によって、 \square セクレターゼ複合体レベルを比較した。

4. 研究成果

研究の方法に対応して番号を用いた。

(1) A β 産生への影響

Syn の RNAi、また Syn の dominant negative mutant C307A を過剰発現した結果、分泌される A β が減少したことから、Syn がユビキチンリガーゼ活性依存的に A β 産生を増加させることが示唆された。

(2) Syn 欠失型線維芽細胞における Rer1

Syn 欠失型 (-/-) と野生型 (WT) 線維芽細胞で Rer1 レベルを比較した結果、欠失型

において Rer1 の分解が低下し、蓄積がみられた。

(3) Syn による Rer1 の分解

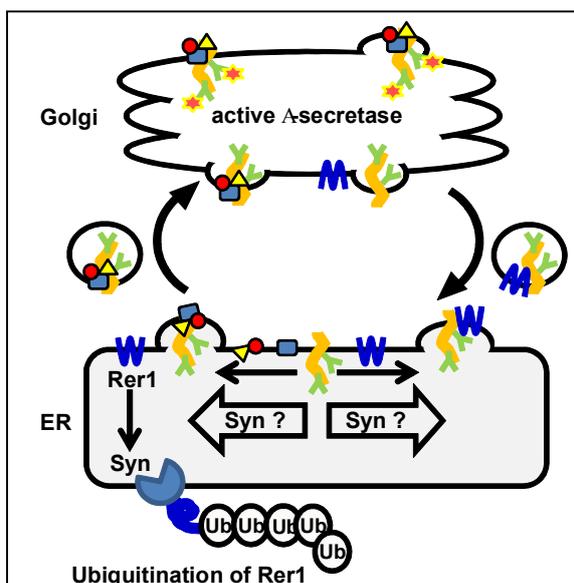
Syn(-/-)に、Syn あるいは C307A を過剰発現した結果、Syn のユビキチンリガーゼ活性依存的に Rer1 レベルが減少していた。そこで、Syn が Rer1 を基質として結合し、ユビキチン化しているのではないかと考え、その結合を調べた結果、結合が認められた。さらに、プロテアソーム阻害剤あるいはリソソーム分解阻害剤を用いて、ユビキチン化 Rer1 を検出したところ、Syn のユビキチンリガーゼ活性依存的にユビキチン化 Rer1 レベルの増加がみられた。これらの結果から、Syn は Rer1 をユビキチン化し、プロテアソーム系、リソソーム系の両経路における分解へと導いていることを示唆した。

(4) Syn(-/-)における細胞表面に局在する NCT と γ セクレターゼ複合体レベルの減少

Syn(-/-)と WT マウス線維芽細胞を用いて、細胞内分画、細胞表面ビオチン化アッセイを行った結果、細胞膜に局在する NCT レベルが、Syn(-/-)において減少していた。また、 γ セクレターゼ複合体形成への影響を調べた結果、 γ セクレターゼ複合体の形成もまた、Syn(-/-)において減少がみられた。

(1)-(4)の結果から、Syn が Rer1 を分解へと導くことによって γ セクレターゼ複合体形成を促進し、A β 産生を増加させることが示唆された(図1)。

図1: Syn が Rer1 分解によって γ セクレターゼ複合体形成を促進し、 γ セクレターゼを活性化へ導くモデル



Syn は ER の品質管理に重要な ERAD における E3 ユビキチンリガーゼであり、ER ストレスによって誘導され、ER に蓄積したタンパク質を分解へと導くことによって ER ストレスの抑制に寄与している。

本研究において、Syn が Rer1 を分解へと導くことを示した。Rer1 は膜タンパク質の膜貫通ドメインの極性アミノ酸を認識し、ER において複合体を形成していないサブユニットの局在を調節している。Rer1 レベルが減少することによって、その標的膜タンパク質を分泌経路へ移行させることから、Rer1 が ER-Golgi 品質管理に機能している可能性が示唆される。

また、通常ユビキチン化タンパク質はプロテアソーム経路で分解されるが、ユビキチン化 Rer1 がリソソーム経路においても分解されたことから、ユビキチン化タンパク質がリソソーム経路においても分解されることが示唆された。最近の報告において、オートファジー経路がユビキチン-プロテアソーム系の代償として機能する報告があることから、オートファジー-リソソーム系との関連性について、今後展開していきたい。

本研究において、Rer1 が ERAD に関与する Syn による A β 産生制御に重要であることが明らかとなった。本研究成果は、ERAD と A β 産生の関連性を示す新たな証拠となり、アルツハイマー病の新たな診断法や治療への応用に期待できる。

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4件)

(1) 田邊千晶、前田智司、駒野宏人、アルツハイマー病にかかわるプロテアーゼ活性調節機構の解明を目指して、臨床検査 vol. 57. p110 (2013) 査読なし

(2) Tanabe, C., Maeda, T., Zou, K., Liu, J., Liu, S., Nakajima, T. and Komano, H. The ubiquitin ligase synoviolin up-regulates amyloid β production by targeting a negative regulator of β -secretase, Rer1, for degradation. J. Biol. Chem. 287: 44203-44211 (2012) 査読有、DOI:10.1074/jbc.M112.365296

(3) Sato, K., Tanabe, C., Yonemura, Y., Watahiki, H., Zhao, Y., Yagishita, S., Ebina, M., Suo, S., Futai, E., Murata, M. and Ishiura, S. Localization of mature neprilysin in lipid rafts. J. Neurosci. Res. 90: 870-877 (2012) 査読有、DOI:10.1002/jnr.22796

(4) Marutani, T., Maeda, T., Tanabe, C., Zou, K., Araki, W., Kokame, K., Michikawa, M. and Komano, H. ER-stress-inducible Herp, facilitates the degradation of immature nicastrin. *Biochim. Biophys. Acta*, 1810: 790-798 (2011)

査読有、DOI:10.1016/j.bbagen.2011.04.017

(4) 田邊千晶、前田智司、駒野宏人、アルツハイマー病にかかわるプロテアーゼ活性調節機構の解明を目指して、臨床検査 vol.57. p110 (2013) 査読なし

〔学会発表〕(計4件)

- (1) Chiaki Tanabe, Tomoji Maeda, Kun Zou, Junjun Liu, Syuyu Liu, Toshihiro Nakajima, Hiroto Komano. Synoviolin is involved in the ubiquitination of Rer1 and regulates the generation of amyloid beta. XIIIth International Symposium on Proteinase inhibitors and Biological Control. Slovenia, (September 22-26, 2012)
- (2) 田邊千晶、前田智司、鄒鶴、劉俊俊、劉姝余、中島利博、駒野宏人、「Synoviolin による Rer1 分解を介した A β 産生制御」第17回日本病態プロテアーゼ学会、オークラクトシティホテル浜松、静岡、2012年8月10-11日
- (3) 田邊千晶、前田智司、鄒鶴、Liu Junjun、Liu Shuyu、駒野宏人、「Synoviolin is involved in the degradation of Rer1, thereby modulating A β generation」第84回日本生化学会、国立京都国際会館、京都、2011年9月21-24日
- (4) 田邊千晶. α と γ セクレターゼの解析. 日本認知症学会主催ー認知症研究を知る若手研究者の集まり、あいち健康プラザ、愛知県大府市、2011年7月30-31日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田邊 千晶 (Tanabe Chiaki)
岩手医科大学・薬学部・助教
研究者番号：00552902