

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06468

研究課題名(和文) ゴルジストレス応答性Syx5と低分子化合物によるAbeta分泌調節と神経細胞保護

研究課題名(英文) Regulation of Abeta secretion and protective mechanisms by Golgi stress responsive factor Syx5 and chemical compound in neuronal cells

研究代表者

須賀 圭 (Suga, Kei)

杏林大学・医学部・講師

研究者番号：30306675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Syx5はゴルジストレス応答性をもち、新規タンパク合成が促進され、Ab量比の変化を来すことを明らかにした。ゴルジストレスを誘導するMonensinとGCAはCaspase3の活性化を引き起こした。Caspase3の活性化に対するPBAの効果を検討した。PBAはGCAによるCaspase3の活性化に対しても有意に抑制したため、ゴルジストレス負荷に伴うAbの産生量に対する効果を調べた。様々なゴルジストレス負荷により、Abの分泌抑制をきたした。細胞内残留および細胞外に分泌されたトータルのAb量は減少したが、Ab42の比は増加した。PBAは細胞外に分泌されるAb42の量を抑制できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病態の脳において見受けられるAβ42比の上昇は、神経細胞におけるゴルジストレス誘発の結果を反映している可能性もあると考えた。一方、他のグループから報告されているようなPBAの神経細胞保護効果は、家族性ADに関連する変異を持たない野生型ペータAPPプロセッシング経路においては限定的なものであることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have demonstrated that Syntaxin 5 (Syx5), an ER-Golgi SNARE is a novel Golgi-stress responsive factor. Golgi stress induced upregulation of de novo synthesis of Syx5 protein. Transcriptional induction of Syx5 mRNA was regulated by the GASE (Golgi Apparatus Stress Element) sequence present in the 5 prime region of Stx5 gene in human cells. Long exposure of neuron-glia hybrid cell line NG108-15 cells with Golgi stress inducers Monensin and GCA resulted in activation of Caspase3. Chemical chaperone PBA was used to examine the protective properties against Caspase3 activation and the production of Ab42 peptides in NG108-15 cells. Various Golgi stress inducers suppressed the secretion of Ab peptides. Total amount of secreted and intracellular Ab peptides were decreased and the ratio of Ab42 /Ab40 was increased. PBA had the ability to inhibit the Ab42 secretion and the Caspase3-dependent apoptosis in neuronal cells.

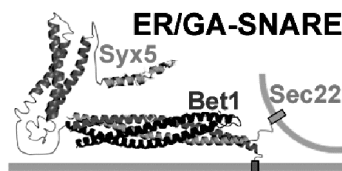
研究分野：神経科学

キーワード：神経変性疾患 アルツハイマー病 Aβペプチド ゴルジストレス SNARE Syx5 神経細胞保護

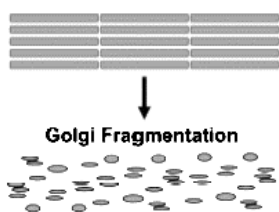
## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) 治療に向けた研究と臨床応用の最前線の動向においては、家族性 AD (FAD) 家系の長期観察と原因遺伝子産物を標的とした抗体医薬の臨床試験が行われた。それらの結果は、AD 治療はいわゆるプレクリニカルステージへの

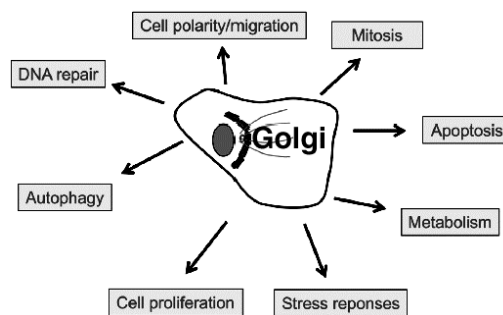


介入が重要で、アミロイド前駆体蛋白( $\beta$ APP)からできる  $A\beta$ ペプチドの産生・分泌の早期の過程に対処する必要があることを認識させてくれた。代表者は、遺伝子変異を伴わない孤発性 AD (SAD) では神経細胞にそもそも内在する蛋白質輸送システムに障害が起こり、Syx5 (シンタキシン 5) 発現量の増減はその発症や病態の進行を左右する因子の 1 つではないかという仮説に基づき研究を行ってきた。前課題研究では、神経細胞において Syx5 を含む ER/GA-SNARE が小胞体(ER)ストレスにより発現誘導される新規応答因子であり、細胞内蛋白質輸送とオートファジー系を介して  $\beta$ APP プロセッシングを調節することを示した。また細胞死の実行段階では、Syx5 が積極的に活性型 Caspase3 により分解され、ER ストレスに伴う Syx5 発現誘導を抑制すると神経細胞の脆弱性が増すことも見出した。このように ER ストレスに伴う細胞死に対抗して、Syx5 の発現上昇は神経細胞の生存維持に重要な役割を担っている証拠を見



いだすことができた。一方、AD に限らず ALS, PD 等の疾患において、細胞死の前に左図のように神経細胞内のオルガネラであるゴルジ体の断片化：通称“ゴルジフラグメンテーション”が、しばしば観察される。これはゴルジがストレスを受けた証であり、ゴルジ体の構造は右図のように多様な細胞機能に影響を与える。申請者の神経細胞の例も含め、ゴルジに由来する通称“ゴルジストレス”が様々な細胞で起こることが報告され始めた。ER・核・ミトコンドリアのストレス研究は活発に行われているが、国内外を問わずゴルジに注目している者は依然として少ない。ER と違い、センサー分子も同定されていないゴルジストレス応答の研究は、まだ始まったばかりの未開の分野であった。

い



### 2. 研究の目的

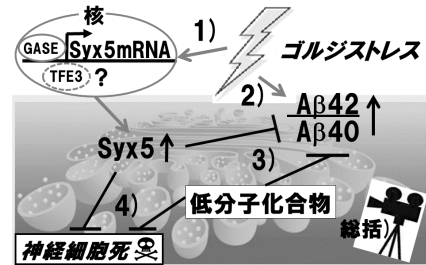
神経変性疾患の中でも、特に SAD の発症や進行の機序は依然不明である。神経変性疾患は、神経細胞に特有な折りたたみ不良蛋白質の蓄積や細胞内小器官の機能障害などが引き金となり、オルガネラ間コミュニケーションの破綻が原因で細胞死に至ることによると考えられる。その細胞死が、どのオルガネラを起源とするストレスで、どのように蛋白質輸送機構の乱れなどのオルガネラネットワークの異常を来たすのか？を見極めることは、SAD に代表される神経変性疾患の発症メカニズムの理解と根本的治療法の開発に向けて重要である。本課題は神経変性疾患の新規治療法開発に向けた基盤研究に位置づけられる。ゴルジストレス応答因子と想定される Syx5 の誘導機構を解明するだけにとどまらず、SAD でとりわけ注目される  $A\beta$  産生量と生成比への Syx5 発現およびケミカルシャペロンである低分子化合物の効果と共に解析するものである。本研究は、化合物と Syx5 の機能から細胞内ストレスと SAD 発症メカニズムの関係性の一端を明らかにし、それらの保護効果にまで踏み込む基盤研究である。そこで本課題では、

ゴルジが選択的にストレスを受けるゴルジストレス下でも Syx5 発現上昇とその効果および ER ストレス阻害剤として知られる低分子化合物 4PBA に神経細胞保護効果が見られるかを検証するのが目的である。

目標に向けた3年間の研究構想の概要を右図に示した。

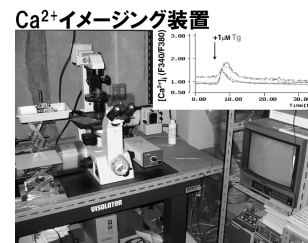
目標は大きく下記の4つに分けられる。

- (1) ゴルジストレス応答性 Syx5 の発現誘導機構の解明。
- (2) ゴルジストレスがもたらす Aβ量比変化の機序の解明。
- (3) Syx5 と低分子化合物による Aβ量比調節効果の検討。
- (4) ゴルジストレスによる神経細胞死に対する保護効果の検討。



### 3. 研究の方法

神経細胞モデルとして使用した細胞は、主として初代培養ラット海馬神経細胞、ラット/マウス神経芽細胞腫 NG108-15 細胞である。ゴルジストレス誘導は以前から使用している H<sup>+</sup>イオノフォアである Monensin, Nigericin、他の酸性小器官(lysosome 等)への作用を排除するために GolgicideA (GCA)や Exo2 も用いてストレス負荷を行った。ゴルジストレス応答性 Syx5 の発現誘導の解析は、mRNA の上昇を RT-PCR、ルミノメーターを用いたレポーターアッセイ、各種タンパク質発現はウエスタンブロット(WB)で定量した。ゴルジストレスを負荷した系で、前駆体βAPP からのプロセッシングを、生成して細胞内に蓄積した BAPP は WB で定量し、細胞内分布は免疫組織化学(IHC)で調べた。細胞外および細胞内 Aβはサンドイッチ ELISA で定量した。ゴルジストレス負荷に伴う Caspase3 の活性化は、タイムラプスイメージングを用いた解析や WB ならびに IHC で定量した。ER およびゴルジから Ca<sup>2+</sup>放出は Fura2 をインジケータとした右図のような Ca<sup>2+</sup>イメージング装置を用いた Ratio イメージングにより解析した、またゴルジ体構造変化を蛍光標識したゴルジを蛍光タイムラプスイメージングで解析した。これらの実験系を用いて、ゴルジストレス負荷に対するケミカルシャペロンである低分子化合物 4PBA の神経細胞保護効果も検討した。また、蛍光タンパク質の細胞内動態解析を右図のようなタイムラプスイメージングシステムで行うことや、ルミノメーターを用いた生存率測定を行い、ゴルジストレス誘発から細胞死に至る過程を可視化し、4PBA による保護機構の時空間的な解析も行った。

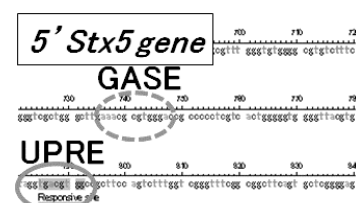


### 4. 研究成果

本研究により、Syx5はERストレスに应答するだけにとどまらず、ゴルジストレス応答性をも有し、ゴルジストレス下においてもSyx5タンパク質の新規合成を促進し、Aβ量比の変化をもたらすことを明らかにすることができた。

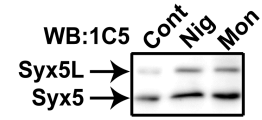
ゴルジストレス応答の機序を検討した結果、Syx5遺伝子の転写開始領域上流に右図のようなゴルジストレス誘導性の転写因子が結合するGASE (Golgi Apparatus Stress Element) 配列を見出した。同領域約2kbをルシフェラーゼと融合させたレポーター

ベクターを作製してプロモーターアッセイを行ったところ、ゴルジストレスに应答して転写活性が上昇した。ERストレス应答の際に駆動されるSyx5遺伝子上流の应答配列(UPRE)とは別に、ゴルジストレス下では、ゴルジストレス应答配列(GASE)により発現調節されることがわ

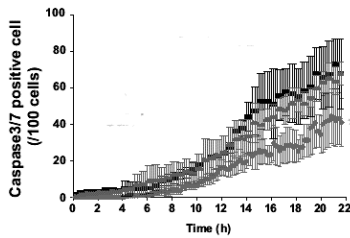


かり、Syx5が異なるオルガネラのストレスに応答する配列をタンデムに有するユニークな分子であることがわかった。

ゴルジストレスに長時間暴露された神経細胞においてアポトーシスが誘導されるかを検討した。ゴルジストレス負荷に伴うCaspase3の活性化を、タイムラプスイメージングを用いて解析すると、ゴルジストレスの長期誘発はCaspase3の活性化によって引き起こされるアポトーシスを誘導することが明らかになった。またゴルジストレス負荷によるCaspase3の活性化に対するケミカルシャペロン



4PBAの効果を検討した。4PBAはMonensinによるCaspase3の活性化を有意に抑制することができた。また作用機序の異なる誘導剤による効果も検討した。ERストレス負荷の際に用いた



BrefeldinAと類似した機構によりゴルジストレスを誘導するGCAもCaspase3の活性化を引き起こしたが、機序が異なる誘導剤Exo2では活性化が見られなかった。Exo2はSyx5の転写調節による発現上昇を起こさなかったため、それらストレス応答の制御機構のシグナル伝達経路が異なると考えられた。

4PBAはGCAによるCaspase3の活性化に対しても有意に抑制することができたので、GCAなど種々のゴルジストレス負荷に伴うAβの産生量に対する4PBAの効果を検討した。Aβ40とAβ42の生成比について検討すると、どのゴルジストレス負荷によっても、両種のAβの分泌抑制をきたした。細胞内残留および細胞外に分泌されたトータルのAβ量は減少したが、Aβ42の比は増大した。トータルの量に対しては顕著な効果は見られなかったが、4PBAは細胞外に分泌されるAβ42の量を抑制する傾向が見られた。これらは、AD病態の脳で見られるAβ42比の上昇が、神経細胞におけるゴルジストレス誘発の結果を反映している可能性があると考えた。一方、他のグループから報告されているように様々な変異を原因とする不良タンパク質のもたらす細胞障害に対する4PBAの神経細胞保護効果は、代表者の実験系で用いた神経細胞のように、FADに関連する変異を持たない野生型βAPPプロセッシング経路においては極めて限定的な保護効果しかないことが分かった。

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 0件）

1. 著者名 Takahashi Toshiaki, Minami Setsuya, Tsuchiya Yugo, Tajima Kazu, Sakai Natsumi, Suga Kei, Hisanaga Shin ichi, Ohbayashi Norihiko, Fukuda Mitsunori, Kawahara Hiroyuki	4. 巻 20
2. 論文標題 Cytoplasmic control of Rab family small GTPases through BAG6	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e46794 ~ e46794
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embr.201846794	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Suga K, Yamamoto S., Terao Y., Akagawa K., Ushimaru M.
2. 発表標題 Effect of chemical chaperone PBA on Golgi stress induced changes in Abeta peptide production and caspase3-dependent apoptosis in neuronal cells
3. 学会等名 第63回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Suga K, Yamamoto S., Nishino M., Terao Y., Akagawa K., Ushimaru M.
2. 発表標題 Golgi stress affects betaAPP processing and induces caspase3-dependent apoptosis in neuronal cells
3. 学会等名 第62回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本 幸子、須賀 圭、菅田 晴夫、丑丸 真
2. 発表標題 分泌経路型Ca <sup>2+</sup> /Mn <sup>2+</sup> ATPaseの特異的阻害剤の探索
3. 学会等名 第92回日本生化学学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Suga K, Yamamoto S., Nishino M., Terao Y., Akagawa K., Ushimaru M
2. 発表標題 Effect of Chemical chaperone on ER-Golgi SNARE expression and Abeta peptide production in neuronal cells
3. 学会等名 第61回日本神経化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nishino M., Suga K., Yamamoto S., Ushimaru M
2. 発表標題 Effect of ER and Golgi stress inducers on apoptotic cells assessed by Caspase3 activation using Time lapse imaging analyses
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小久保友絵、中曾一裕、須賀圭、杉本温子、渡辺匡史、藤室雅弘
2. 発表標題 ヘルペスウイルス感染細胞から神経細胞傷害活性をもつユビキチンや -シヌクレイン凝集物が産生される
3. 学会等名 第139回日本薬学会年会
4. 発表年 2019年

〔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
研究 分担者	山本 幸子  (Yamamoto Sachiko)  (70434719)	杏林大学・医学部・講師    (32610)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	丑丸 真  (Ushimaru Makoto)  (40265765)	杏林大学・医学部・教授    (32610)	

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