

平成 21 年 6 月 1日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591025
 研究課題名（和文） 神経細胞における セクレターゼの活性・発現・細胞内局在の制御機構の解明
 研究課題名（英文） Elucidation of the regulation mechanisms of activity, expression and cellular localization of β -secretase in neuronal cells
 研究代表者
 荒木 亘（ARAKI WATARU）
 国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第六部・室長
 研究者番号：60311429

研究成果の概要：

セクレターゼ BACE は アミロイド（A）産生に必須な膜結合型プロテアーゼである。BACE の機能と細胞内局在の制御機構の解明を目的として、神経系培養細胞、モデルマウスを用いた研究を行った。その結果、膜タンパク Reticulon（RTN）による BACE 活性抑制の分子機構、RTN3 のヒト脳内発現、生体内の A 産生抑制能を明確化できた。さらに、翻訳後修飾の一つパルミチル化が BACE の脂質ラフト局在や代謝に関与することを見出した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：神経内科学

キーワード：アルツハイマー病，認知症，プロテアーゼ，アミロイド

1. 研究開始当初の背景

セクレターゼ（BACE）は アミロイド蛋白（A）の生成過程において、アミロイド前駆体蛋白（APP）を A のN末部で切断するプロテアーゼである。BACE は 501 アミノ酸からなる一回膜貫通構造を持つアスパラギン酸プロテアーゼであり、細胞外の触媒ドメイン、膜貫通ドメイン及び短い細胞内ドメインからなる。BACE は糖鎖付加、リン酸化、パルミチル化などの翻訳後修飾を受けて

成熟する。細胞内ではゴルジ体，Trans-Golgi Network（TGN），エンドソームに多く存在しているが、細胞膜上にも存在する。BACE の阻害は効果的で安全なアルツハイマー病（AD）の治療法として有望視される。しかし、BACE の発現・活性の制御メカニズムについては解明が進んでいなかった。

本研究者はこの問題に焦点を当て、BACE と相互作用する膜蛋白をプロテオミクス手法を用いて検索し、Reticulon ファミリーに

属する膜蛋白である RTN3, RTN4-B/C が BACE と相互作用すること, これらの Reticulon の過剰発現が BACE 活性, A 生成を抑制することなどを明らかにしてきた (Murayama ら, 2006)。しかし, RTN と BACE の相互作用メカニズムにはまだ不明点が多く残っていた。

BACE の発現調節機構については, BACE 発現が複数の転写因子による調節を受けること, 転写後の翻訳レベルの調節も受けることなどがわかってきていた。しかし, 神経細胞において BACE 発現がどのように調節されているか, 特に神経・シナプス活動との関連については不明であった。

一方, BACE が細胞内で脂質ラフト (別名 Detergent-insoluble microdomain など) と呼ばれるスフィンゴ脂質に富む特異的膜ドメインに多く分布していることが報告された。脂質ラフトは A 蓄積との関連で重要な細胞内部位と考えられるが, BACE がなぜ選択的に脂質ラフトに局在するのか, そのメカニズムはまだ明らかでなかった。また, 本研究者は神経系細胞における BACE の動態を分析し, BACE が細胞膜上で shedding を受けて可溶性 BACE が分泌されること, それとともに全長型 BACE も細胞外に放出されることを見出していた (Murayama ら, 2005)。

2. 研究の目的

本研究の主な目的はアルツハイマー病 (AD) の治療標的の一つである セクレターゼ BACE の機能と局在の制御機構を解明することである。そのため, 次の3つの課題を中心とした研究を計画した。

(1) RTN による BACE 制御の分子メカニズムの解明

RTN3, RTN4-B/C がどのような分子メカニズムで細胞内で BACE と相互作用し, その活性を抑制するのかを明らかにするため, 分子生物学的な手法を用いて, BACE との結合, BACE 活性抑制のために重要な RTN 分子内の領域を特定することを試みた。

RTN3 のヒト脳における発現の解析, AD 病理への関与の有無を明らかにすることを目的に, ヒト剖検脳 (対照および AD) における RTN3 発現を生化学的, 免疫組織学的に

検討した。

RTN3 の生体内における役割, 特に A 生成抑制能について明らかにするため, トランスジェニック (Tg) マウスを用いた実験を計画した。具体的には, AD モデルマウスである APP Tg マウスと我々が作製した RTN3 Tg マウスから, APPxRTN3 ダブル Tg マウスを作成して, RTN3 過剰発現の A 産生・蓄積への影響を調べた。

(2) BACE の翻訳後修飾が神経細胞内局在, 代謝に果たす役割の検討

リン酸化, パルミチル化が BACE の脂質ラフト局在, 代謝に及ぼす影響について検討するために, リン酸化またはパルミチル化が起こらないような BACE 変異体の細胞内局在・動態を野生型 BACE と比較した。

(3) BACE 発現の調節因子の同定

神経細胞において BACE 発現がどのように調節を受けているかを明らかにするため, 初代培養神経細胞・神経系細胞株を用いて, BACE 発現を変化させるような因子の同定を試みた。また, 酸化ストレスと AD 病態の関連性を考慮し, 酸化ストレス刺激の BACE 発現への影響についても検討した。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養・遺伝子導入

一過性トランスフェクション: HEK293 細胞または Swedish 変異 APP を安定発現する HEK293 細胞 (HEK293-swAPP) にリポフェクタミン 2000 試薬を用いて cDNA をトランスフェクションした。

安定的トランスフェクション: 既報に従って, 神経細胞腫 SH-SY5Y 細胞に cDNA をトランスフェクションし, 安定発現株を G418 により選択した。

(2) cDNA コンストラクト

C 末に Rhodopsin タグを持つヒト野生型 BACE1 cDNA 及びその変異体 (図 1), C 末に myc タグを持つヒト RTN3-myc 及びその変異体, RTN4-C-myc 及びその変異体, *C. elegans* RTN (図 2) を pcDNA3 ベクターに組み込んだ。

(3) A の定量

HEK293-swAPP 細胞に RTN を一過性発現させ, 上清中の A₄₀, A₄₂ をサンドイ

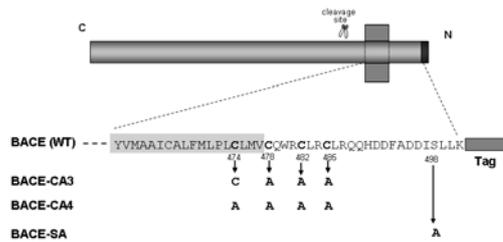


図 1 BACE 変異体の構造

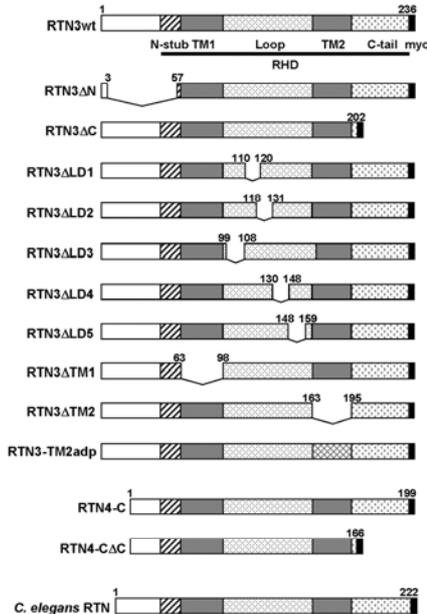


図 2 RTN3 変異体の構造

ッチ ELISA キット (IBL 社) を用いて定量した。

(4) 免疫共沈実験

BACE1, RTN を一過性発現した HEK293 細胞から膜蛋白を 0.5%NP-40 を含むバッファで抽出し, Rhodopsin タグに対する抗体 (1D4) で免疫沈降後, myc 抗体によるウエスタンブロット解析を行った。

(5) 細胞下分画

生化学的な細胞下分画は Iodoxanol 密度勾配遠心法を用いて行った。各画分をウエスタンブロットで解析した。

(6) 脂質ラフトの分離

細胞を 1%CHAPS を含むバッファで処理した後, ショ糖密度勾配遠心で分離し, 各画分をウエスタンブロット解析した。

(7) ³H-パルミチン酸標識

BACE発現細胞の培養液に³H-パルミチン酸を添加, 培養後, 細胞をRIPAバッファで溶解し, タグ抗体で免疫沈降した。沈降物をSDS-PAGEで分離, DPOで増感処理後, フルオログラフィーで検出した。

(8) 免疫組織化学

脳組織をパラホルムアルデヒド固定した後, 凍結切片を作製した。切片は ABC キットを用いる DAB 法で免疫組織化学染色した。あるいは2重免疫蛍光法を用いて染色後, 共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(9) 剖検脳

ヒト剖検脳(対照, AD 各 5 症例)は Sun Health Research Institute より供与を受けた。AD の診断は CERAD 神経病理基準によりなされた。

(10) トランスジェニックマウス

動物実験は国立精神・神経センター神経研究所の動物実験倫理委員会の承認の下に行った。RTN3 Tg マウス: マウス Thy-1.2 プロモーター, ヒト RTN3 cDNA, SV40 polyA シグナルを接続した cDNA 断片を精製(マウス Thy-1.2 プロモーター, SV40 polyA シグナルは富山医科薬科大学 加藤一郎, 平賀紘一博士より提供)し, 定法に従い, C57BL/6 マウス受精卵にマイクロインジェクションし, Tg マウスを作出した。

APP Tg マウス: 大塚製薬研究所より供与を受けた (Shin ら, 2007)。このマウスは9ヶ月令から脳に A 斑の沈着を呈することが示されている。

4. 研究成果

(1) RTN による BACE 制御の分子メカニズムの解明: RTN 内のどの部位が BACE との相互作用および BACE 活性抑制に重要であるかを明らかにするために, RTN 内の C 末部, N 末部, ループ部の一部を欠失する変異体を作成して, それらの BACE 結合性, A 生成抑制効果について分析した。その結果, これらの変異 RTN3 も野生型と同様に BACE と結合し, A 生成を抑制した。従って RTN の C 末部, N 末部, ループ部は BACE の制御に必須ではなく, 膜貫通部が重要であることが示唆された。次いで, RTN3 の第 1 あるいは第 2 膜貫通部を欠損するか, 無関係

な膜蛋白 (adoplín-2) の膜貫通部と置換した変異体を作製して、BACE 結合性、A 生成抑制効果について分析した。これらの変異体は BACE との結合性は持つが、A 抑制効果を欠いていた。さらに、ヒト BACE と相同性の低い線虫 (*C. elegans*) の RTN は BACE 結合性、A 抑制効果をとともに保持していた。以上の結果、RTN による BACE の制御には 2 個の膜貫通部両方を含む三次構造が重要であることが明らかとなった。

	BACE 結合性	A 抑制効果
野生型 RTN3	+	+
RTN3AN	+	+
RTN3AC	+	+
RTN3ALD	+	+
RTN3ΔTM1	+	-
RTN3ΔTM2	+	-
RTN3TM2adp	+	-
野生型 RTN4-C	+	+
RTN4-CDC	+	+
<i>C. elegans</i> RTN	+	+

表 1 RTN3 変異体の BACE に対する作用

(2) RTN3 の AD 病態への関与について調べるため、ヒト (対照, AD) 大脳皮質を RTN3 特異抗体を用いて免疫染色した。RTN3 免疫反応性は錐体神経細胞に主に認められた (図 3)。神経細胞内では小胞体、ゴルジ体に局在していた。RTN3 蛋白発現量、発現パターンには対照、AD で差がなく、老人斑部位に RTN3 免疫反応性を認めなかった。この事より、RTN3 は老人斑形成には関与しないことが示唆された。さらに、生化学的な細胞下分画の結果、RTN3 と BACE が小胞体、ゴルジ体などの画分で共存していることが示唆された。

(3) 我々が確立した RTN3 発現 Tg マウスと APP 発現 Tg マウスを交配し、ダブル Tg マウスを作出した。約 15 ヶ月齢の APP Tg マウス、ダブル Tg マウスの脳凍結切片を A 抗体を用いて免疫染色し、A 沈着の程度

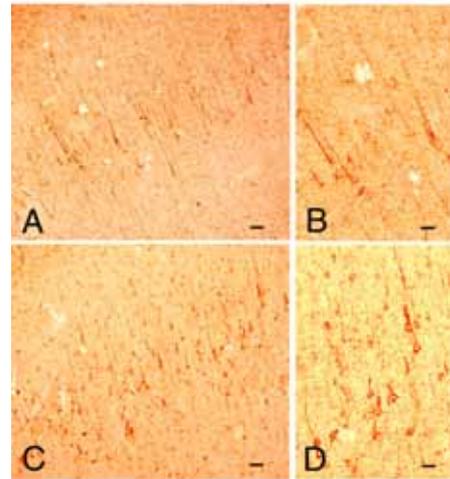


図 3 ヒト大脳皮質における RTN3 発現

A, B:AD; C, D: 対照.

を比較したところ、ダブルマウスでは、APP マウスに比べて、A 斑の数が海馬などの部位で低下していた。組織中の A 量は未解析であるが、RTN3 が *in vivo* でも A 産生を抑制することが示唆された。

(4) パルミチル化が起こると予想される BACE の C 末部の 3 または 4 個の Cys 残基を Ala に置換した変異体 (BACE-CA3, BACE-CA4) を安定発現する SH-SY5Y 細胞を樹立した。3H-パルミチル酸標識実験の結果、パルミチル化が BACE-CA3 では著明に低下、BACE-CA4 では消失することが確認された。BACE-CA3 の脂質ラフト分布量は野生型と同様であったが、BACE-CA4 では野生型に比べて著しく減少していた (図 4)。また、2 種の変異体は野生型に比べて細胞外切断 (shedding) が起こりにくいことが判明した。これらの結果から、パルミチル化は BACE の脂質ラフト局在や shedding を制御する因子であることが示唆された。

一方、リン酸化の起こる 498 位の Ser 残基を Ala に置換した変異体 (BACE-SA) を安定発現する細胞において、BACE の脂質ラフト分布は変化せず、リン酸化は脂質ラフト局在に関与しないと考えられた。

(5) 種々の神経栄養因子、神経伝達物質、神経ペプチド、その他ホルモン類などの因子をラット大脳皮質由来の初代培養神経細胞に添加して、BACE 発現が変化するかを

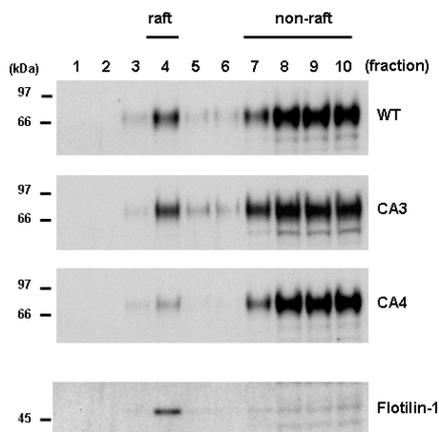


図4 BACE 変異体の脂質ラフト分布

検討したが、明らかな変化は検出されなかった。一方、SH-SY5Y 細胞を用いて、酸化ストレス負荷が BACE 発現に及ぼす影響を検討した。その結果、酸化ストレス物質である ethacrynic acid (EA) 負荷により、BACE 蛋白レベルは変化しなかったが、プレセリリン 1 (PS1) 蛋白レベルが対照に比べて有意に増加することを見出した。さらに、RT-PCR 法による解析から、この PS1 蛋白発現の増加は PS1 の mRNA 発現の増加によることが示唆された。

(6) 上記の解析中に Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) が A 生成促進作用を持つことを見出し、そのメカニズムについて検討を行った。その結果、IGF-1 の A 生成促進機序は セクレターゼ、セクレターゼに非異存的であること、その機序には APP の 668 位の Thr 残基のリン酸化の亢進が深く関与していることを明らかにした。

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 5 件)

Kume H, Konishi Y, Murayama KS, Kametani F, Araki W: Expression of reticulon 3 in Alzheimer's disease brain. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 35, 178-188, 2009.

Kume H, Murayama KS, Araki W: The two-hydrophobic domain tertiary

structure of reticulon proteins is critical for modulation of β -secretase BACE1. *J. Neurosci. Res.* 2009 (In press).

Araki W, Kume H, Oda A, Tamaoka A, Kametani F: IGF-1 promotes beta-amyloid production by a secretase-independent mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 380, 111-114, 2009.

Araki W, Takahashi-Sasaki N, Chui DH, Saito S, Takeda K, Shirotani K, Takahashi K, Murayama KS, Kametani F, Shiraiishi H, Komano H, Tabira T: A family of membrane proteins associated with presenilin expression and gamma-secretase function. *FASEB J.* 22, 819 - 827, 2008.

荒木 亘, 織田彰子: アルツハイマー病と脂質ラフト. *鳥取臨床科学研究会誌* 1, 143-151, 2008

以上査読有り

〔学会発表〕(計 6 件)

久米秀明, 村山紀代子, 荒木 亘: Reticulon タンパクによる β セクレターゼ制御メカニズムの解析. 第 27 回日本認知症学会, 前橋 10.10, 2008

Araki W, Hideaki H, Murayama KS, Kametani F, Konishi Y: Molecular mechanisms by which reticulon 3 regulates β -secretase BACE1. International Conference on Alzheimer's Disease, Chicago, 7.29, 2008

織田彰子, 荒木 亘, 玉岡 晃: 脂質ラフトの BACE1 に対する酸化ストレスの影響. 第 49 回日本神経学会総会, 横浜, 5.15, 2008

Araki W, Kume H, Murayama K, Kametani F, Konishi Y: Expression of reticulon 3 in Alzheimer's disease brain. 第 26 回日本認知症学会 大阪, 10.17-18, 2007

荒木 亘, 久米秀明, 村山紀代子, 亀谷富由樹: Reticulon 3 と BACE1 の相互作用メカニズムの解析. 第 50 回日本神経化学学会大会, 第 30 回日本神経科学大会, 第 17 回日本神経回路学会大会合同大会, 横浜, 9.11, 2007

荒木 亘, 久米秀明, 亀谷富由樹: IGF-1 はヒト神経系細胞において アミロイド産生をセクレターゼ非依存的なメカニズムにより促進する. 第 82 回日本薬理学会年会, 横浜 3.17, 2009

〔図書〕(計 1 件)

Araki W: Regulation mechanisms of beta-secretase activity. In Recent advances in the biology of secretases, key proteases in Alzheimer's disease. (Eds. Araki W) Research Signpost, Kerala, pp47-60, 2008.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r6/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒木 亘 (ARAKI WATARU)

国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第六部・室長

研究者番号：6 0 3 1 1 4 2 9

(2) 研究分担者

湯浅 茂樹 (YUASA SHIGEKI)

国立精神・神経センター 神経研究所 微細構造研究部・部長

研究者番号：7 0 1 2 7 5 9 6

(3) 連携研究者

亀谷富由樹 (KAMETANI FUYUKI)

研究者番号：7 0 1 8 6 0 1 3

東京都医学研究機構 東京都精神医学総合研究所・主任研究員

小西吉裕 (KONISHI YOSHIHIRO)

滋賀医科大学 分子神経化学研究センター・客員准教授

研究者番号：9 0 1 7 0 2 9 0

(4) 研究協力者

久米秀明 (KUME HIDEAKI)

国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第六部・流動研究員

伊藤雅之 (ITOH MASAYUKI)

国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第二部・室長

玉岡 晃 (TAMAOKA AKIRA)

筑波大学 人間総合科学研究科・教授

織田彰子 (ODA AKIKO)

国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第六部・研究生

荻野晃一 (OGINO KOICHI)

大塚製薬 探索第二研究所・主任研究員