

研究種目：若手研究 (A)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19680019
 研究課題名 (和文) ガンマセクレターゼの活性制御因子の探索と制御機構
 研究課題名 (英文) Regulation of gamma-secretase activity
 研究代表者
 舟本 聡 (FUNAMOTO SATORU)
 同志社大学・生命医科学部・准教授
 研究者番号：10345034

研究成果の概要 (和文)：

γ セクレターゼはアルツハイマー病原因物質として知られるアミロイド β タンパク質 (A β) を産生するアスパラギン酸プロテアーゼである。最近、培養細胞においてホスフォイノシチド [PI(4,5)P₂]の上昇が A β 分泌を低下させることが報告された。本研究ではホスフォイノシチドによる γ セクレターゼ活性の影響を検討した。その結果、CHAPSO 可溶化膜や免疫沈降 γ セクレターゼ、さらに培養細胞において、PI(4,5)P₂濃度依存的に A β 産生が抑制することを見いだした。

研究成果の概要 (英文)：

γ -Secretase is an aspartic protease to hydrolyze type I transmembrane protein in hydrophobic environment of lipid bilayer. In this study, we analyzed effects of phosphoinositides on γ -secretase activity. We found that phosphoinositides inhibited γ -secretase activity in the CHAPSO-solubilized assay system and detergent insoluble fraction, in dose dependent manner.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2008年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2009年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
年度			
年度			
総計	18,500,000	5,550,000	24,050,000

研究分野：神経病理学

科研費の分科・細目：神経科学・神経病理学

キーワード：アルツハイマー病、アミロイド β タンパク質、ガンマセクレターゼ、プレセニリン、ホスフォイノシチド

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病は神経変性疾患の一つで、80歳から患者数が急増する老人性認知

症である。世界の80歳以上の人口が50年後には4億人近くにも達すると推定されていることから、人類の発展にとってアルツハ

イマー病の克服が避けられないものとなった。アルツハイマー病は脳内のアミロイドペータタンパク質（以下、 $A\beta$ ）の沈着が原因と考えられており（アミロイドカスケード仮説）、 $A\beta$ はアミロイド前駆体タンパク質（以下 APP）がペータセクレターゼとガンマセクレターゼによる二段階の切断で生じるペプチドである。ガンマセクレターゼによる APP 膜貫通ドメインの切断（ガンマ切断）部位の違いから主に 40 残基の $A\beta_{40}$ と 42 残基の $A\beta_{42}$ を生じ、 $A\beta_{42}$ がより強い細胞毒性と凝集性を示し脳に沈着する。

ガンマセクレターゼは Presenilin 等を含む膜に存在する巨大な複合体で、家族性アルツハイマー病では Presenilin に変異が多数報告され、 $A\beta_{42}$ 産生比を上昇させることが知られている。生体膜の主な構成成分であるホスファチジルコリンやホスファチジルエタノールアミンをガンマセクレターゼに添加すると酵素活性を上昇させ、ホスファチジルイノシトール（以下 PI）の添加では活性に変化がなかった。しかし、リン酸基の付加したホスファチジルイノシトールリン酸（以下 PIP）を添加する活性が低下することがわかった。近年、 PIP_2 や PIP_3 は脂質ラフトにも存在することが報告され、受容体やリン酸化酵素などと共局在し効率のシグナル伝達の場合を構成していると考えられる。さらに、ガンマセクレターゼ自身も脂質ラフトに存在することが報告され、当研究室においても脂質ラフト分画でのガンマセクレターゼを確認した。以上のことから生体内においてもガンマセクレターゼ活性が PIP などにより制御されている可能性が充分にあると考え、本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

$A\beta$ はアミロイドカスケード仮説の最上流に位置する分子で、これの産生を抑えることがアルツハイマー病の発症を阻止する最も有効な方法と考えられる。 $A\beta$ の産生抑制にはその産生機構の解明が不可欠で、本研究では $A\beta$ 産生を担うガンマセクレターゼの活性制御因子の探索と制御機構の解明を目的としている。応募者はガンマセクレターゼ活性が脂質組成によって変化することを見だし、さらに PIP がガンマセクレターゼ活性を低下させることをつきとめた。本研究はまず、

(1) 膜可溶化分画などにおいて各種 PIP のガンマセクレターゼ活性への影響を検討する。同時に $A\beta_{40}$ や $A\beta_{42}$ 産生の産生比も検討し、 $A\beta_{42}$ 産生に影響のある PIP 種を同定する。PIP は脂質二重層の細胞質側に存在することから、ガンマ切断よりも細胞質側に近いイプシロン切断に影響する可能性がある。

(2) ガンマ切断とイプシロン切断の PIP に対する感受性を検討するために、既にイプシ

ロン切断された $A\beta_{49}$ を基質としてガンマセクレターゼ活性を調べる。ガンマセクレターゼ活性に影響を与える PIP 種が決定されれば、(3) 生体膜で PIP とガンマセクレターゼが相互作用しているか否か検討する。一方、ガンマセクレターゼ活性に対する PIP の効果を生体膜でも再現するために、(4) PIP 導入キャリアーまたは PIP 産生経路を活性化させて、ガンマセクレターゼ活性を低下させる実験を試みる。(5) 最後に生細胞で PIP 上昇とガンマセクレターゼ活性に負の相関があるか否か検討する。

3. 研究の方法

(1) 膜可溶化分画に各種 PIP を添加して、ガンマセクレターゼ活性を産生 $A\beta$ 量と他の基質として Notch の切断から検討した。また、 $A\beta_{40}$ や $A\beta_{42}$ の産生も特異抗体を利用して定量する。

(2) $A\beta_{49}$ を基質としてガンマセクレターゼ活性を調べ、ガンマセクレターゼ活性に影響を与える PIP 種を同定する。

(3) 生体膜で PIP とガンマセクレターゼが相互作用しているか否か検討する。

(4) PIP 導入キャリアーまたは PIP 産生経路を活性化させて、ガンマセクレターゼ活性を低下させる実験を試みる。

(5) 生細胞に PIP 特異的 PLC 阻害剤を投与し、PIP 上昇とガンマセクレターゼ活性を検討する。

4. 研究成果

(1) CHAPSO 可溶化膜や免疫沈降 γ セクレターゼにおいて、 $PI(4,5)P_2$ の添加により濃度依存的に $A\beta$ 産生が抑制することを見いだした。さらに $PI(4)P$ や $PI(3,4,5)P_3$ など他のホスフォイノシチド添加でも $A\beta$ 産生が抑制され、イノシトール環のリン酸基の増加に伴い $A\beta$ 産生に対する抑制が強くなる傾向が認められた。しかし、PI や IP_3 の添加では抑制が見られないことから、 $A\beta$ 産生抑制にはイノシトール環に脂肪酸部分が結合していることが必要だと考えられる。いずれのホスフォイノシチドを添加しても、 $A\beta_{40}$ と $A\beta_{42}$ の産生は同程度に抑制され、 γ 切断部位の変化には影響がないことがわかった。また、ガンマセクレターゼの直接的な基質となる短縮型の Notch 受容体断片（N 末端と C 末端の短縮型、 ΔE Notch-FLAG）を調整した。 ΔE Notch-FLAG がガンマセクレターゼによる切断で短縮型の細胞質ドメイン（sNICD-FLAG）に変換されることを確認後、ホスフォイノシチド存在下で再び

sNICD-FLAG 産生について評価した。その結果、APP の場合と同様に Notch もホスフォイノシチド添加によりガンマセクレターゼによる切断が抑制されることがわかった。

(2) ホスフォイノシチドは Σ 切断と γ 切断の双方に影響していることがわかった。

(3) ホスフォイノシチドは CHAPSO 不溶性の γ セクレターゼや、生体膜の γ セクレターゼの活性も抑制することがわかった。

(4) 生細胞におけるホスフォイノシチドの γ セクレターゼに対する影響を検討するために、細胞に PIP2 の導入を試みた。PIP2 のキャリアにはヒストンタンパク質を用いたが、導入に適切な条件を見いだすには至らなかった。この手法により γ セクレターゼ活性を評価するのは困難と判断した。

(5) ホスフォイノシチド特異的 PLC 抑制剤 Edelfosine を細胞に添加すると、PI(4,5)P₂ の産生を抑え分泌 A β 量を減少させた。以上のことから生体でホスフォイノシチド濃度がガンマセクレターゼ活性を制御していることを示唆した。

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 4 件)

- ① γ -Secretase: Successive tripeptide and tetrapeptide release from the transmembrane domain of @-carboxyl terminal fragment. Mako Takami, Yu Nagashima, Yoshihisa Sano, Seiko Ishihara, Maho Morishima-Kawashima, Satoru Funamoto, Yasuo Ihara. *J. Neurosci.* 査読有 29 13042-13052, 2009
 - ② Phosphoinositides suppress γ -secretase in both the detergent-soluble and insoluble states. Satoko Osawa, Satoru Funamoto (corresponding author), Mika Nobuhara, Satoko Wada-Kakuda, Masafumi Shimojo, Sosuke Yagishita and Yasuo Ihara. *J. Biol. Chem.* 査読有 283, 19283-19292. 2008
 - ③ Enzymatic Characteristics of I213T Mutant Presenilin-1/ γ -Secretase in Cell Models and Knock-in Mouse Brains FAMILIAL ALZHEIMER DISEASE-LINKED MUTATION IMPAIRS γ -SITE CLEAVAGE OF AMYLOID PRECURSOR PROTEIN C-TERMINAL FRAGMENT β . Masafumi Shimojo, Naruhiko Sahara, Tatsuya Mizoroki, Satoru Funamoto, Maho Morishima -Kawashima, Takashi Kudo, Masatoshi Takeda, Yasuo Ihara, Hiroshi Ichinose, and Akihiko Takashima. *J. Biol Chem.* 査読有 283, 16488-16496. 2008
- ④ Active gamma-secretase complexes contain only one of each component. Toru Sato, Thekla S. Diehl, Saravanakumar Narayanan, Satoru Funamoto, Yasuo Ihara, Bart De Strooper, Harald Steiner, Christian Haass and Michael S. Wolfe. *J. Biol Chem.* 査読有 282, 33985-33993. 2007
- [学会発表] (計 4 件)
- ①発表代表者: 舟本聡
発表標題: アミロイド β タンパク質産生機序 トリペプチド仮説の検証・
学会等名: 第 8 2 回日本生化学会大会シンポジウム
発表年月日: 平成 2 1 年 1 0 月 2 3 日
発表場所: 神戸市、兵庫県、日本
 - ②発表代表者: 舟本聡
発表標題: γ セクレターゼ活性におけるホスフォイノシチドの影響
学会等名: 第 3 0 回日本分子生物学会年会・第 8 0 回日本生化学会大会 合同大会
発表年月日: 平成 1 9 年 1 2 月 1 1—1 5 日
発表場所: 横浜市、神奈川、日本
 - ③発表代表者: 舟本聡
発表標題: Effects of phosphoinositides on γ -secretase activity in detergent soluble/insoluble states
学会等名: Society for Neuroscience meeting 2007
発表年月日: 平成 1 9 年 1 1 月 3-7 日
発表場所: San Diego, CA USA
 - ⑤発表代表者: 舟本聡
発表標題: Effects of phosphoinositides on γ -secretase activity in detergent soluble/insoluble states
学会等名: 第 2 6 回日本認知症学会学術集会
発表年月日: 平成 1 9 年 1 0 月 1 7—1 8 日
発表場所: 大阪市、大阪、日本
- [その他]
ホームページ等
<http://biomedical.doshisha.ac.jp/staff/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

舟本 聡 (FUNAMOTO SATORU)
同志社大学・生命医科学部・准教授
研究者番号：10345043

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し