

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430072

研究課題名(和文) ERストレス応答性ERGA-SNAREのAD蛋白分解とオートファジーにおける役割

研究課題名(英文) Role for ER stress responsive ER-Golgi SNARE in processing of Alzheimer's disease-related protein and autophagy

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) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病(AD)関連蛋白質の細胞内輸送やプロセッシングを調節するSyx5を含むER-Golgi SNAREに着目し、神経細胞のERストレス誘導性オートファジーにおけるSyx5の機能とbAPPプロセッシングへの効果を検討した。ERストレス負荷に伴うbAPPプロセッシングの阻害は、Syx5発現抑制により回復でき、ERストレス誘導性オートファジー活性化とSyx5発現量の間には正の相関があり、Syx5発現上昇はオートファジーフラックスの後期プロセスに重要であった。よってSyx5は後期のERストレス誘導性オートファジー経路に関与し、同経路とAD関連蛋白質分解系を仲介する役割があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：I am focusing on the role of Syntaxin 5 (Syx5), one of the ER-Golgi SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor-attachment protein receptor) protein, in the trafficking and processing of Alzheimer's disease (AD)-related proteins. In this study, I examined the role of Syntaxin5 (Syx5) in the ER stress-induced autophagy and its effect on the processing of endogenous b-amyloid precursor protein (bAPP) in neuronal cells. I found that the inhibition of bAPP processing caused by ER stress was reversed by the knockdown of Syx5 expression. In addition, there was a positive correlation between the activation of the autophagy flux and the expression level of Syx5 protein. Furthermore, upregulation of Syx5 protein was important for the late stages of autophagy flux. These results suggest that, among ER-Golgi SNAREs, Syx5 is likely to have a role in mediating ER stress-induced autophagy and affecting bAPP processing in neuronal cells.

研究分野：神経化学

キーワード：神経科学 脳・神経 ERストレス アルツハイマー オートファジー SNARE syntaxin 細胞死

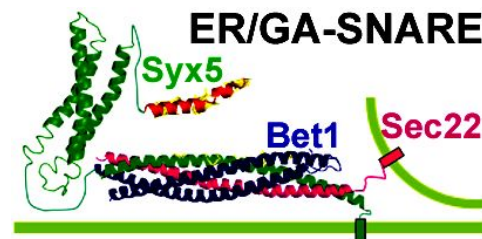
1. 研究開始当初の背景

孤発性のアルツハイマー病(AD)のみならず神経変性疾患の原因の1つに、異常蛋白質の蓄積に伴う ER ストレス誘導性の神経細胞死がある。ここ数年、ER ストレス応答経路とオートファジー経路のクロストークが注目されてきている。各々の経路に固有な分子と両者をつなぐアダプター分子の同定がなされたが、両経路がどのように AD 関連蛋白質分解系に関わり神経細胞死に至るかは未だ不明な点が多い現状がある。

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、家族性 AD に関連した原因遺伝子産物を直接標的とした抗体医薬の臨床試験も行われた。しかし最新の結果は良好とはならなかった状況が、逆に新たな因子を標的とする治療方法を模索する必要性を再認識させたともいえる。

私は、細胞内輸送に関与するいわゆる SNARE 蛋白質群に属する Syntaxin (Syx)ファミリー(Hong 総説参照)の構造(Suga K. *et al*, 2003)と神経系における機能を研究してきた。その過程で ER(小胞体)-GA(ゴルジ装置)間に局在する Syx5 (シンタキシン 5)が家族性 AD の原因遺伝子である Presenilin (PS1, 2)の全長鎖と結合すること、それは家族性 AD に関連した点変異には依存しないというユニークな特性を持つことを見いだした(Suga K. *et al*, 2004)。さらに AD 関連蛋白質であるアミロイド前駆体蛋白(β APP)の輸送やプロセッシングへの関与(Suga K. *et al*, 2005a)、GA 構造維持と膜蛋白質輸送への Syx5 の関与を示して来た(Suga. K. *et al*, 2005b)。また、Syx5 の過剰発現はアミロイド β ペプチド($A\beta$)分泌を抑制することを見出した(Suga K. *et al*, 2005a, 2009)。以来、遺

伝的変異のない孤発性 AD においては、神経細胞にそもそも内在する蛋白質輸送システムの障害が疾患の発症や進行の原因の1つになり得るのではないかという作業仮説に基づいた研究を一貫して行ってきた。私が同定した ER ストレス応答因子である Syx5 を中心とした ER/GA-SNARE (小胞体/ゴルジ-スネア)が機能的にストレスに対抗するために重要な蛋白質である可能性を考えた。



2. 研究の目的

本研究は、神経変性疾患の新規治療戦略の開発という大きな目標に向けた基盤の研究である。神経変性疾患の中でも特に孤発性 AD の発症機構や進行を調節しうる有力な分子標的は未だ確立できていない。神経細胞にそもそも内在する蛋白質輸送システムを調節する ER/GA-SNARE が、ER ストレス誘導性オートファジー経路に関与し、その経路と AD 関連蛋白質分解系を仲介する役割があるという仮説を検証することを目的とした。ER ストレスとオートファジーのクロストークに関わると想定される ER/GA-SNARE の役割を AD 関連蛋白質分解系において示すことは、ER ストレス応答とオートファジー経路のクロストークを担う分子の実体として ER/GA-SNARE を位置づけられるだけでなく、両経路を介してプロセッシングされる AD 関連蛋白質の分解機序の統合的な理解にもつながると考えた。また、それは神経変性疾患の進行を調節しうる1つの因子の同定につながり、

現在の -セクレターゼおよび産生される A β を標的とした治療法とは異なる新たな分子治療の道を開き、新たな AD 治療戦略の創出の一翼を担えればと考えた。

3. 研究の方法

神経細胞のモデル系としては、神経芽細胞腫由来の株化培養細胞NG108-15ならびにラット海馬由来の初代培養海馬神経細胞を用いた。それら株化培養細胞ならびに初代培養細胞にERストレス負荷を与えた系において、各種蛋白質の発現量の変化をWestern blottingを用いた生化学的手法を用いて解析した。また、mRNA発現量の定量はRT-PCR法を用いた分子生物学的手法を用いて定量した。ERストレス負荷は糖鎖修飾を阻害するTunicamycin (Tm)やER内Ca²⁺ホメオスタシスの攪乱を引き起こすThapsigargin (Tg)ならびにCyclopiazonic acid (CPA)、さらにはER -ゴルジ間の小胞輸送を阻害する毒素であるBFA (BrefeldinA)処理することにより行った。ERストレス負荷を与えた細胞におけるSyx5を中心としたER/GA-SNAREの細胞内局在の変化は、シヨ糖密度勾配遠心法とWestern blottingを用いた生化学的手法と、直接・間接蛍光抗体法を主体とした免疫組織化学的手法を用いて蛍光顕微鏡下で観察して解析した。各種ER/GA-SNAREの発現抑制系としては、それぞれに特異的なsiRNAを導入したknock-down細胞を用いて上記発現量の変化を解析した。細胞生存率の評価は、細胞内ATP量の測定により行い、Luminometer (Promega)を用いた発光を測定することにより行った。細胞内におけるCa²⁺ imagingは指示薬としてはratio imaging できるFura-2を用いたArgus50 細胞内Ca²⁺ imaging system (Hamamatsu Photonics) を用いて解析した。リアルタイムの細胞内Caspase3活性化およびAutophagy flux (Life Technologies)

の解析は培養チャンバー (Tokai Hit) をステージ上に配置した倒立蛍光顕微鏡 (Olympus) に Cooled CCD camera (Roper Scientific), fluorescence excitation system (CoolLED)等を組み合わせたシステムを用いたlive cell imagingを行い、MetaMorph software (Universal Imaging)およびマニュアルcountingにより解析した。アポトーシスの直接誘導はStaurosporine処理することにより行い、ERストレス誘導性オートファジーの活性化はmTOR kinase 阻害剤 (Rapamycin) やmTOR非依存的な新規のPhenoxazine誘導体10-NCPなどの誘発剤を用いて行った。またER/GA-SNAREについて、それらの過剰発現や発現抑制系において、以下の項目を指標に生化学的・免疫組織化学的な解析を行った。オートファジー関連遺伝子群や主要なマーカーであるLC3の分布とドットの増減およびリソソームマーカーLAMP-1, -2との共同在を解析。オートファジー活性化をLC3-Iから-II変換およびp62/SQSTM1の発現量増加を指標としたオートファジーの阻害をWBで定量。オートファジー阻害剤 (3メチルアデニン, Chloroquine, BafilomycinA1) の効果をER/GA-SNARE発現抑制細胞において検討した。

上記の実験と並行して、内在性の β APPプロセッシングへの影響も検討した。手法はWestern blotting を用いた生化学的手法により各種フラグメントを同定できる抗体で検出することや、 β APP から産生される A β peptide の分泌の測定は各 A β 1-40 A β 1-42 に特異的な sandwich ELISA (IBL) を用いて定量することにより行った。

4. 研究成果

神経変性疾患の中でも特に遅発性のアルツハイマー病(AD)の発症機構や進行を調節しうる新たな分子標的の候補の一つとして、

我々は AD 関連蛋白質の細胞内輸送やプロセッシングを調節することを示した Syx5 (シタキシン 5)を含む ER/GA-SNARE (小胞体/ゴルジ-スナア)に主に焦点を当てて研究を行った。神経芽細胞腫由来の株化培養細胞ならびにラット海馬由来の初代培養海馬神経細胞において ER ストレス負荷を行うと、Syx5 アイソフォームを含めた一部の ER/GA-SNARE の新規蛋白合成が誘導され、それは転写レベルの上昇に起因することを見出した(Suga K. *et al*, *Exp. Cell Res.*, 2015a)。同時に、ER ストレス負荷は内在性の β APP プロセッシングを阻害すること、ならびにそれは、Syx5 蛋白質を発現抑制させることにより回復できることを明らかにしたので報告した (Suga K. *et al*, *Neurosci. Lett.*, 2015b)。さらにそれら ER/GA-SNARE の発現量の増大は調べた他の Syx では見られない特異的なものであった(Suga K. *et al*, *Data in Brief*, 2015c, d)。またアポトーシスを直接誘導することや ER ストレス誘導性の細胞死が実行されると Syx5 は積極的に活性型 Caspase3 により分解されて機能を失うこと、ER ストレスによる 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示した(Suga K. *et al*, *Neurosci. Lett.*, 2015b, Saito A., Suga K. *et al*, *Data in Brief*, 2016)。Syx5 の発現抑制は、オートファゴソーム形成に重要な LAMP (Lysosome Associated Membrane Protein)の翻訳後修飾に影響すること (Suga K. *et al*, 投稿中) や $A\beta$ 分泌を逆に亢進すること(Suga K. *et al*, *Exp. Cell Res.*, 2015a, Suga K. *et al*, *Neurosci. Lett.*, 2015b)を明らかにした。ER ストレスによりオートファジーが誘導され、その誘導も Syx5 の発現上昇を来たすことを見出した。ER ストレス誘導性オートファジーの活性化と Syx5 の発現量との間には正の相関があり、Syx5 の発現上昇はオートファジーフラックスの後期プロセスにおいて重要であることを見出した (Suga K. *et al*, 投稿中)。

このように本課題研究により私は AD 関連蛋白質の細胞内輸送やプロセッシングを調節することを示した Syx5 を含む ER/GA-SNARE が、ER ストレス応答だけでなくオートファジー経路も介したAD関連蛋白質分解系に関与して細胞死の実行以前の過程すなわち積極的に神経細胞の生存維持に携わる可能性を示唆した。細胞はストレスに対抗して全般的な翻訳抑制を行うので、発現誘導される蛋白質は希少であり生存維持に欠かせないごく一部の蛋白質のみが増加する。その数少ない蛋白質の1つが ER ストレスとオートファジーのクロストークに関わる ER ストレス応答因子 Syx5 であることがわかった。

ER/GA-SNARE の中でも特に Syx5 が新規の ER ストレス応答因子であり、後期の ER ストレス誘導性オートファジー経路に関与し、同経路と AD 関連蛋白質分解系を仲介する役割があること明らかにできた。しかしごく最近、他の細胞内小器官であるゴルジ体(GA)に由来するストレス通称“GA ストレス”が存在することが(吉田ら総説参照) が注目され始めた。最近、我々も Syx5 が ER ストレスだけでなく GA ストレスによっても誘導されることを発見し速報した(Suga K. *et al.*, 2015a, b)。GA 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り詳細は不明である。今後さらに ER と異なる細胞内コンパートメントであるゴルジ体に由来したストレスだけでなく、Lysosome 等の post Golgi コンパートメントのストレスに対する効果まで発展させて調べていく必要性も出てきたので、以降の研究計画の課題として考えている。

<引用文献>

Hong, W., (2005) *B.B.A.*1744(3), 493-517: 総説;
Suga K. *et al.*, (2003) *J. Biochem.* 133(3), 325-34
Suga K. *et al.*, (2004) *Biochem. J.* 381(3), 619-28
Suga K. *et al.*, (2005a) *J. Neurochem.* 94, 425-39
Suga K. *et al.*, (2005b) *FEBS lett.* 579, 4226-34

Suga K. *et al.*, (2009) *J. Biochem.* 146(6), 905-15
Suga K. *et al.*, (2010) *Neurosci.Res.* 268, e257
Yoshida H. *et al.*, (2015) *J. Biochem.* 157, 185-95

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 6 件)

Saito A, Suga K, Ono-Nakagawa R, Sanada M, and Akagawa K

Time lapse imaging analysis of the effect of ER stress modulators on apoptotic cell assessed by caspase3/7 activation in NG108-15 cells

Data in Brief Vol. 6, 20 - 27 (2016) 査読有, 10.1016/j.dib.2015.11.030

Suga K., Saito A., Akagawa K.

Data supporting ER stress response in NG108-15 cells involves upregulation of syntaxin 5 expression and reduced amyloid β peptide secretion

Data in Brief Vol. 5, 782 - 788 (2015d) 査読有, 10.1016/j.dib.2015.10.025

Suga K., Saito A., Mishima T., Akagawa K.

Data for the effects of ER and Golgi stresses on the ER-Golgi SNARE Syntaxin5 expression and on the β APP processing in cultured hippocampal neurons

Data in Brief Vol. 5, 114 - 123 (2015a), 査読有, 10.1016/j.dib.2015.08.023

Suga K., Saito A., Mishima T., Akagawa K.

ER and Golgi stresses increase ER-Golgi SNARE Syntaxin5: Implications for organelle stress and β APP processing

Neurosci. Lett. Vol. 604, 30-35 (2015b), 査読有,

doi: 10.1016/j.neulet.2015.07.017

Suga K., Saito A., Akagawa K.

ER stress response in NG108-15 cells involves upregulation of syntaxin 5 expression and reduced amyloid β peptide secretion

Exp. Cell Res. Vol. 332(1), 11-23 (2015c), 査読有, 10.1016/j.yexcr.2015.01.001

Nakazawa H., Nishimura A., Suga K.,

Mishima T., Yorozu T., Iijima T.

FRET-based evaluation of Bid cleavage in a single primary cultured neuron.

Neurosci. Lett. Vol. 536, 24-28 (2013), 査読有, 10.1016/j.neulet.2012.11.059

〔学会発表〕(計 5 件)

大津 昌弘、須賀 圭、山本 幸子、赤川 公朗、丑丸 真

ヒト Secretory Pathway Ca^{2+}/Mn^{2+} -ATPase2 (SPCA2)は細胞質側 N 末端に ER export signal を持つ

第 38 回日本分子生物学会大会、神戸、2015 年、12 月 1 日

Suga K, Saito A, Mishima T, Akagawa K:

Upregulation of ER-Golgi SNARE Syntaxin5 by ER stress and its relationship with APP processing

第 58 回日本神経化学学会大会、大宮、2015 年、9 月 11 日

土屋 悠吾、須賀 圭、川原 裕之

小胞輸送系の制御における BAG6 複合体の機能解明

第 37 回日本分子生物学会大会、横浜、2014 年、11 月 26 日

Suga K, Saito A, Mishima T, Akagawa K:

Upregulation of ER-Golgi SNARE Syntaxin5 by
ER stress and its relationship with APP
processing

第 57 回日本神経化学会大会、奈良、2014 年、
9 月 30 日

Suga K, Saito A, Mishima T, Akagawa K:

ER stress suppress A β secretion and induces the
expression of ER-Golgi SNARE including
Syntaxin5 proteins in neuronal cells

第 56 回日本神経化学会大会、京都、2013 年、
6 月 22 日

〔その他〕

ホームページ等

http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/faculty/medicine/labo/cell_physiology.html

6 . 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

三嶋 竜弥 (MISHIMA, Tatsuya)
杏林大学・医学部・助教
研究者番号：40317095

小藤 剛史 (KOFUJI, Takefumi)
杏林大学・医学部・助教
研究者番号：40365200

齋藤 綾子 (SAITO, Ayako)
杏林大学・医学部・実験助手
研究者番号：80424109