

令和元年6月6日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07290

研究課題名(和文) 認知症治療薬の開発を目指した膜内切断プロテアーゼ調節機構の解析

研究課題名(英文) Characterization of intramembrane proteases by the yeast reconstitution system

研究代表者

二井 勇人 (Eugene, Futai)

東北大学・農学研究科・准教授

研究者番号：90447459

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、認知症の原因となるアミロイド(A_β)ペプチドを産生するヒトセクレターゼ複合体を酵母に再構成し、セクレターゼの触媒サブユニット、プレセニリン1(PS1)と調節サブユニットAph1aLから、プロテアーゼ活性を上昇させる活性化変異を同定した。酵母と哺乳類細胞を使った生化学的解析の結果、変異はセクレターゼによる段階的な切断活性(切断とトリミング)を上昇させ、特にトリミングの上昇により認知症発症に関わる長鎖A₄₂を減少させること、活性化に伴い各サブユニットのコンホメーションが変化することを明らかにした。高毒性A₄₂の生成を減少させる認知症治療薬開発において重要な知見となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膜内切断プロテアーゼは、疎水的な膜内で加水分解を行う特殊なタンパク分解酵素で、どのようにして反応を遂行するのか、そのメカニズムが分かっていない。セクレターゼ複合体は、アルツハイマー病の原因となる脳内アミロイドを作り出す、認知症治療において重要なターゲット分子です。本研究では、モデル生物である出芽酵母を使った独創的な解析手法をとり入れ、セクレターゼ複合体とそのモデルとなる単量体膜内切断プロテアーゼによる分解機構を解析しました。私達の研究成果は、膜内タンパク分解機構を解明する重要な知見であり、セクレターゼ複合体の活性調節機構を解明することにより認知症治療薬の開発への戦略を提案します。

研究成果の概要(英文)：-secretase generates amyloid peptide (A_β) from amyloid precursor protein (APP) through multi step cleavage, such as endoproteolysis and trimming. In the study, we reconstituted human -secretase complex and APP in yeast and identified activating mutations in the catalytic subunit of -secretase presenilin 1 (PS1), and the regulatory subunit Aph1aL. We introduced these mutants in yeast and mammalian cells and found that the mutations increase the stepwise cleavage activity (cleavage and trimming), and in particular, decrease long-chain A₄₂ by raising trimming. We also clarified the conformational changes of each subunit with activation. It has become an important finding in the development of antidementia drugs that reduce the production of highly toxic A₄₂ involved in the onset of dementia.

研究分野：機能生物化学

キーワード：酵素 脳神経疾患 神経科学 応用微生物 バイオテクノロジー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞膜を通過して情報の伝達を行うことは、細胞の生理機能の維持に非常に重要である。膜内でのタンパク質限定分解は、ストレス応答や細胞分化の過程で情報を伝達する分子機構として、生物種を超えて保存されている。基質となる膜貫通タンパク質は、膜内で切断され、膜から遊離した断片が情報伝達、遺伝子発現、細胞内輸送などにおいて様々な細胞機能を担う。ヒトにおいては、膜内切断プロテアーゼとして、アスパラギン酸プロテアーゼ (γ セクレターゼとシグナルペプチドペプチダーゼ (SPP))、メタロプロテアーゼ (Site-2 プロテアーゼ)、セリンプロテアーゼ (ロンボイド) が知られているが、酵素学的性質については未知なことが多く、疎水的な膜内での加水分解機構や活性の調節機構についての基本的な疑問が未解決である。

2. 研究の目的

膜内でタンパク質を限定分解する膜内切断プロテアーゼは膜貫通領域に活性中心を持つため、生成と活性の評価が難しく、酵素機能・機構が明らかではない。研究代表者は、膜内切断プロテアーゼを酵母に導入し、活性を評価する系を開発した。本研究では、認知症の原因となるアミロイド β ペプチドを産生するガンマセクレターゼ複合体とそのモデルとなる単量体膜内切断プロテアーゼ (ロンボイド等) について、活性調節や基質認識に必要な領域を同定し、詳細な酵素学的性状から基質導入機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

酵母に膜内切断プロテアーゼと基質 Gal4 転写因子を結合した人工基質を導入した。基質の切断に伴う Gal4 レポーター遺伝子の転写活性化を、酵母の生育と β -ガラクトシダーゼ活性で評価することができる。この酵母発現系を用いて、酵母の生育を指標に、膜内切断プロテアーゼ変異体と活性調節タンパク質を同定し、酵母膜画分を用いて酵素学的解析を行い、膜内切断プロテアーゼの酵素機能・反応機構を明らかにする。さらに、酵母での解析結果を確認するため、哺乳類細胞 (PS1/PS2 DKO もしくは Aph1a/Aph1b/Aph1c TKO ノックアウトマウス胚性線維芽 (MEF) 細胞) において変異体の切断活性を解析し、細胞機能に与える影響を明らかにする。この3つの手法を用い、 γ セクレターゼ複合体の活性調節と基質認識の分子機構を解明し、認知症発症に関わる長鎖 A β 42 の生成との関連を明らかにする。また、単量体膜内切断プロテアーゼのうちロンボイドと Site-2 プロテアーゼについて酵母の系を構築し、立体構造と変異の相関解析から、基質が疎水環境から親水性の活性中心に導入される機構を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 酵母発現系を用いた γ セクレターゼ活性化変異の同定

酵母 γ セクレターゼ発現系を用いて、ヒト γ セクレターゼの触媒サブユニット PS1 と調節サブユニット Aph1aL の活性化変異体をスクリーニングした。触媒サブユニットである nicastrin を含まない複合体でも高活性を持つことを指標にして、PS1 の活性化変異と Aph1 の活性化変異を同定することに成功した。薬剤開発においても重要な変異が集中するホットスポットの情報を得た。酵母の膜画分をインキュベートし、A β の生成量と分子種を解析したところ、PS1 と Aph1aL の活性化変異により、A β のトリミングが進み、認知症の発症に関わる長鎖 A β が減少することを明らかにした。A β の生成総量が増加する変異体も見られた。

(2) 哺乳類細胞を用いた γ セクレターゼ活性化変異解析

PS1/PS2 DKO 細胞に PS1 活性化変異体、Aph1a/Aph1b/Aph1c TKO 細胞に Aph1aL 変異体をそれぞれ導入し、生成される $A\beta$ 量と分子種を解析した。その結果、PS1 活性化変異体と Aph1aL 変異のいずれも、短鎖 $A\beta$ 分子種の割合が増加し、長鎖 $A\beta$ 分子種の割合が減少することが明らかとなった。哺乳類細胞では $A\beta$ の生成総量には増加は見られず、 $A\beta$ のトリミング活性を特異的に上昇させたことが示唆された。

(3) 単量体プロテアーゼの解析

ロンボイドと Site-2 プロテアーゼの活性評価系では、転写因子 Gal4 を接続した人工基質 (Spitz もしくは SREBP) をロンボイドもしくは Site-2 プロテアーゼと一緒に酵母に導入し、Gal レポーターの発現をもとに、生育や β ガラクトシダーゼ活性で活性の評価を試みた。ロンボイドと Site-2 プロテアーゼの活性を β ガラクトシダーゼ活性で半定量的に捉えることに成功した。当初の計画は達成したが、人工基質が導入した膜内切断プロテアーゼだけでなく、酵母の内在性のプロテアーゼによって切断されてしまい、生育での評価は困難であった。今後、酵母の内在性プロテアーゼの遺伝子を破壊するなどして、発現系を最適化する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Imai, S., Cai, T., Yoshida, C., Tomita, T., and Futai, E. (2019) Specific mutations in presenilin 1 cause conformational changes in γ -secretase to modulate amyloid γ trimming. *J. Biochem.* 165: 37-46. doi: 10.1093/jb/mvy081. 査読有り .
2. Yonemura, Y., Futai, E., Yagishita, S., Kaether, C., and Ishiura, S. (2016) Specific combination of presenilins and Aph1s affect the substrate specificity and activity of γ -secretase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 478: 1751-1757. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.09.018. 査読有り .
3. 二井 勇人 (2016) 『酵母を用いたアルツハイマー病の病因研究』「化学と生物」**54**: 530-532. doi.org/10.1271/kagakutoseibutsu.54.530. 査読無し .
4. 二井 勇人 (2016) 『酵母発現系を用いたアルツハイマー病関連プロテアーゼ (γ セクレターゼ) の解析』日本生化学会 「生化学」**88**: 215-219. doi:10.14952/SEIKAGAKU.2016.880215. 査読無し .

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 吉田知加、今井創、二井 勇人 『 γ セクレターゼ複合体構成因子 Aph1 による活性調節機構の解析』、日本農芸化学会東北北海道合同支部会、2018 年 9 月山梨県甲府市
2. 吉田知加、今井創、二井 勇人 『 γ セクレターゼ複合体構成因子 Aph1 による活性調節機構の解析』、第 23 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会、2018 年 8 月山梨県甲府市
3. 二井 勇人 『膜内切断プロテアーゼによるタンパク質分解の制御機構の解明』、酵素研究助成第 43 回研究発表会、2017 年 8 月大阪府大阪市
4. 今井創、二井 勇人 『プレセニリン 1 変異の解析による γ セクレターゼ活性制御機構へのアプローチ』、第 35 回日本認知症学会学術集会、2016 年 12 月東京都千代田区
5. 今井創、二井 勇人 『プレセニリン 1 変異の解析による γ セクレターゼ活性制御機構

- へのアプローチ』、第 89 回日本生化学会大会、2016 年 9 月宮城県仙台市
6. 二井勇人『酵母を用いた γ セクレターゼの機能スクリーニングの有用性』、第 21 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会 (シンポジウム)、2016 年 8 月大阪府豊中市
 7. 今井創、二井勇人『プレセニン 1 の変異による γ セクレターゼ活性の変化と毒性 $A\beta$ の減少』、第 21 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会、2016 年 8 月大阪府豊中市

〔図書〕(計 0 件)

〔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.agri.tohoku.ac.jp/enzyme-futai/HOME.html>

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：新谷 尚弘

ローマ字氏名：Takahiro Shintani

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。