

令和元年5月31日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10209

研究課題名(和文) アルツハイマー病抵抗遺伝子BRI2に由来するペプチドを用いた記憶分子複合体の探索

研究課題名(英文) In search of memory complexes using a BRI2-derived peptide

研究代表者

松田 修二 (Matsuda, Shuji)

岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：70296721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病は、もっとも罹患者の多い痴呆ですが、病態・治療とも未解明です。アルツハイマー病に特徴的なアミロイドという脳内沈着物は、APPという前駆体から代謝されてできません。私どもは、APPに結合し、APPの代謝を抑制するBRI2という蛋白質を見出し、細胞や動物実験でアルツハイマー病の進行を抑えることを確認しています。

本研究では、BRI2蛋白質の配列から作り出したBRI2ペプチドが、APPの代謝経路の一つを抑えることを基にして、そのペプチドの標的蛋白質として、抗酸化作用をもつ酵素であるPRDX1を同定し、APPの代謝をBRI2が抑制する機能にPRDX1が必要であると示しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病(AD)の研究の焦点は、患者脳内に蓄積したベータアミロイドが毒性を呈するというアミロイド仮説に基づいているものが大部分です。しかし、アミロイドを患者脳内から除去しても病状が改善しないなど、アミロイド仮説では、理解も治療も成功しておりません。

本研究は、ADの進行を抑えるBRI2に注目し、他の研究とは別方面からADの病態を解明しようとするものです。BRI2に基づくペプチドを用いて、抗酸化作用を持つ標的蛋白質を同定し、抗酸化作用とAPPの代謝の関連を見つけています。老化のシグナルである酸化的ストレスに対抗する酵素とAPPの代謝の関連は、新しい治療の基礎になります。

研究成果の概要(英文)：Alzheimer Disease (AD) is the most prevalent dementia in modern societies. The pathogenesis of AD is poorly understood, and its therapies have much room to be improved.

Amyloid beta deposits found in the brains of AD patients are processed from the precursor protein of amyloid beta, termed Alzheimer Protein Precursor (APP). We had identified BRI2, which binds and inhibits the processing of APP. This BRI2 inhibits APP processing in cultured cells, and slows the Amyloid beta deposition in AD model mice.

In this research we focused on the BRI2 peptide, which is derived from the amino acid sequence of BRI2 and inhibits the beta pathway of APP processing. We identified peroxiredoxin 1 (PRDX1), an anti-oxidative stress enzyme, as a target protein of this peptide. We also found PRDX1 is functionally required for the inhibition of APP processing by BRI2, hinting a possible link between oxidative stress and APP processing.

研究分野：解剖学、生化学、分子生物学

キーワード：アルツハイマー病 BRI2 ペプチド

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

### 1. 研究開始当初の背景

痴呆症で罹患者のもっとも多い認知症 = アルツハイマー病 (AD) は、早発性痴呆としてアロワ・アルツハイマーにより約 100 年前に発見された。AD は老人斑、神経原繊維変化、広範な神経細胞死を特徴とする。AD の第一の特徴である老人斑は、アミロイド (A) の沈着がその実態である。

40 残基ほどの短いペプチドである A は、700 残基ほどの一回膜貫通構造をもつアルツハイマーアミロイド前駆体蛋白質 (APP) から、蛋白質分解酵素であるセクレターゼで C 末端 99 残基 (C99) として切り出され、その C99 が更にセクレターゼで切断されることによって産生されてくる。一方、APP は細胞膜上でセクレターゼにより切断されて C 末端 83 残基 (C83) になったのち C83 がセクレターゼで代謝され p3 を産生する経路もある。このセクレターゼは、アミロイドの内部で切断するので、この経路からは A は産生されない。

AD の病態仮説は諸説あるが (1) APP 自体の点変異によっておこる家族性 AD があること、(2) APP 以外の家族性 AD の遺伝子変異が、すべて APP を代謝するセクレターゼの構成因子であることから、APP の代謝異常が AD の病態の中心であることはまちがいない。

### 抗アルツハイマー遺伝子としての BRI2 の同定

申請者らは、APP と結合する蛋白質を検索し、そのなかに BRI2 という二型の一回膜貫通蛋白質を見出した。細胞レベルでは BRI2 は、APP、C99 と結合し、C83 とは結合しない。BRI2 はセクレターゼの APP と C99 へのドッキングを阻害することで、APP 及び C99 の、セクレターゼによる代謝をすべて阻害する (Matsuda, 2005)。また、個体レベルでは、BRI2 のトランスジェニックマウスと AD のモデルマウスを掛け合わせると、脳内 A の沈着は減少し、逆に BRI2 のノックアウトマウスと AD モデルマウスを掛け合わせると、APP の代謝は亢進する (Matsuda, 2008 ; Matsuda, 2009)。従って、BRI2 は、細胞レベル、個体レベルで抗アルツハイマー遺伝子として働いている。

APP と BRI2 の最小結合領域を決定するため、APP を定常的に発現している HEK293 細胞 (HEK-APP) に様々な BRI2 の C 末端欠損変異をトランスフェクションし、BRI2 で免疫沈降すると、最小結合領域は BRI2 の N 末端 102 残基ほどであることがわかった (右図)。

すでに、BRI2 と APP の結合領域は細胞外であることがわかっていたので (Matsuda, 2009) BRI2 の N 末端 102 残基までの、細胞外に相当する領域を覆うように、一連の 10 残基ほどのペプチドを合成し、HEK-APP 細胞の培地に添加して、培地に分泌される sAPP (セクレターゼ活性を表す) と sAPP (セクレターゼ活性を表す) を調べると、ごく一部の領域がセクレターゼを強く抑制し、セクレターゼを弱く抑制することがわかった。

さらに、この短い 10 残基のペプチドにアラニン点変異を入れて同様の実験を行うと、セクレターゼをさらに強く抑制するものが見出された。

すでに、申請者らの作成した痴呆症のモデルマウス (家族性デンマーク痴呆症、FDD) で海馬 LTP が減弱することがわかっていたので (Tamayev and Matsuda et al, 2010) そこにこの BRI2 ペプチドを加えると、FDD マウスでの海馬 LTP の減弱が回復することがわかった (Tamayev and Matsuda et al, 2012)。

以上を総合すると、申請者らの見出した抗アルツハイマー遺伝子である BRI2 に由来するペプチドは、APP のセクレターゼによる代謝を強く阻害するとともに、痴呆症モデルマウスでの減弱した海馬 LTP を回復する生理機能を持つと結論できる。

### 2. 研究の目的

アルツハイマー病 (AD) は、痴呆症の第一の原因であり、高齢化する社会でその対策は急務である。AD に特徴的な老人斑の主成分であるアミロイドはその前駆体である APP の代謝により産生される。申請者らは、2 型膜貫通蛋白質である BRI2 が APP の代謝を細胞レベル、個体レベルで抑制することを世界に先駆けて示した。また、その BRI2 の配列に由来するペプチドが痴呆症モデルマウスにおこる海馬長期増強の低下を改善することを示した。予備実験では BRI2 ペプチドが特定の脳内蛋白質と結合する結果を得た。その結合蛋白質が海馬の『記憶分子複合体』ではないかと仮説をもとに、標的蛋白質の同定、性状解析を行う。

### 3. 研究の方法

BRI2 ペプチドの C 端にグリシンと FLAG の配列 (GDYKDDDDK) をつけて、標的蛋白質を回収する組織と混ぜて培養し、培養後に結合していないペプチドを洗浄した後、Triton X-100 を含む溶液で可溶化する。BRI2 ペプチドを含む可溶化した蛋白質溶液を FLAG 抗体ビーズで免疫沈降し、精製された蛋白質を酸で溶出し、アセトン沈殿する。アセトン沈殿物を DTT で還元したのち、ヨードアセトアミドで自由な SH 基をアルキル化した後、トリプシンで分解する。トリプシン断片を Waters 社製の、Xevo QT of MS システムで、解析する。このシステムは、C18 逆相ラムでトリプシン断片を分離した後、連続して質量分析計にかける。Waters 社の ProteinLynx Globa Server Version 2.4 を用いて、uniprot データベースに対して得られたトリプシン断片

のデータを検索し、BR12 ペプチドにより免疫沈降されてきた蛋白質の同定を行った。その他、生化学的、分子生物学的、細胞生物学的な手法は標準的なものを用いている。

#### 4. 研究成果

BR12 ペプチドを、BR12 もしくは BR13 を発現させた培養細胞の培養液に添加して、結合してくる蛋白質を精製すると、BR12 ペプチドは BR12 には結合するが、BR12 の近いホモログである BR13 には結合しない。従って、BR12 ペプチドは、特異的に蛋白質と結合する能力がある。

この BR12 ペプチドとコントロールペプチドを用いて、BR12 ペプチド特異的に結合する蛋白質をマウス脳から精製すると、特定の蛋白質が得られた。その蛋白質を質量解析すると、一群の蛋白質が得られたが、脳に大量に存在するチューブリンなどの構造蛋白質が混じって解析が困難であった。

そこで、APP 代謝の経路を阻害する現象が BR12 を発現させていない培養細胞で見られることを踏まえ、HEK293T 細胞と HeLa 細胞を用いて、培養細胞内在性に存在する蛋白質を同定することにした。

HEK293T 細胞と HeLa 細胞の培養液に BR12 ペプチドを加え、結合してくる蛋白質を精製し、質量解析すると、ペロキシレドキシシンである PRDX1 が得られた。PRDX1 は(1)BR12 ペプチドの結合実験には全て見られ、コントロールペプチドには結合しない。(2) HEK293T と HeLa 細胞の両方から得られた。(3) 全ての場合ではないが、PRDX1 の近いホモログである PRDX2 も BR12 ペプチドに結合してくることがある。コントロールペプチドでは PRDX2 は検出されていない。(4) 内在性の BR12 は PRDX1 の結合物として検出されなかった。以上のことから、PRDX1 は BR12 ペプチドの標的である可能性が示唆された。BR12 ペプチドの結合精製物を PRDX1 抗体でウエスタンブロットすると、確かに BR12 ペプチドの結合物として PRDX1 の存在が確認できた。

PRDX1 が APP の代謝経路に関係するかを調べるために、BR12 による APP の代謝経路が PRDX1 により変化するかを調べた。PRDX1 は HeLa 細胞に多量に存在し、トランスフェクションにより強発現させても全体の量に変化はない。従って、PRDX1 を増やして APP の代謝の変化を見ることはできなかった。そこで、PRDX1 に対する siRNA を作成し、内在性の PRDX1 が減少するものを探索し同定した。以前の研究で、APP の経路産物である C99 が BR12 存在下の定常状態で増加することは、すでに見出している。この C99 が増加する条件下で、3種類の siRNA を用いて PRDX1 のノックダウンを行うと、増加していた C99 が減少した。これは、BR12 による APP 代謝経路の抑制には、PRDX1 が必要とされることを示唆する。PRDX1 がどのような機構で BR12 による APP の代謝経路に干渉しているのかの詳細は、解明すべき問題として残っている。

PRDX1、ペロキシレドキシシン 1 は、もともと過酸化水素 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を分解する抗酸化作用をもつ酵素である。AD の原因説の一つに酸化ストレスがあり、その説では、細胞内の蛋白質が酸化を受けることで神経細胞死を起こすと考えられている。酸化ストレスに対して抗酸化作用をもつ PRDX1 が、BR12 による APP の代謝抑制に必要であると判明したことは、酸化ストレスと APP の代謝が BR12 を介して関連している可能性を示す。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Med Mol Morphol. 2019 Mar;52(1):1-7. doi: 10.1007/s00795-018-0191-1. Epub 2018 Apr 23. BR12 as an anti-Alzheimer gene. Matsuda S, Senda T.

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 松田修二、山田名美、千田隆夫：アルツハイマー病抵抗遺伝子 BR12 に関連する PRDX1 の作用. 第 124 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 新潟, 2019.3.28.
2. 松田修二、千田隆夫：抗アルツハイマー遺伝子としての BR12. 第 49 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会, 岐阜, 2017, 9.15
3. 松田修二、山田名美、千田隆夫：抗アルツハイマー遺伝子 BR12 に由来するペプチドの性状解析. 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 長崎, 2017, 3.29.
4. 松田修二、山田名美、千田隆夫：アルツハイマー病抵抗遺伝子 BR12 に由来するペプチドの性状解析. 第 76 回日本解剖学会中部支部学術集会, 長野, 2016, 10.9.
5. 松田修二、山田名美、千田隆夫：アルツハイマー病抵抗遺伝子 BR12 に由来するペプチドの性状解析. 第 48 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会, 熊本, 2016, 9.23.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.gifu-u.ac.jp/kaibou/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：千田 隆夫

ローマ字氏名：SENDA TAKAO

所属研究機関名：岐阜大学

部局名：医学系研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：10187875

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。