

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17025008

研究課題名（和文）  $\gamma$ セクレターゼの酵素学的性質の解明研究課題名（英文） Characterization of the enzymatic properties of  $\gamma$ -secretase

研究代表者

井原 康夫 (IHARA YASUO)

同志社大学・生命医科学部・教授

研究者番号：60114386

研究成果の概要（和文）：

われわれは、 $\gamma$ セクレターゼによる APP (BCTF) の切断は、 $\epsilon$  切断が起こったあとに、TMD の  $\alpha$  ヘリックス構造（1ターンは3.6残基）にそって3残基ごとに連続的に起こり、その結果 AB が生じると考えた。CHAPSO-reconstituted  $\gamma$ -secretase assay system では、5種類のトリペプチド、IAT、VIV、ITL、TVI、VIT が  $\gamma$ セクレターゼによって特異的に遊離してくることを LC-MS/MS にて確認した。さらに、A $\beta$ 42 産生経路においては A $\beta$ 42 から tetrapeptide, VVIA が除かれて A $\beta$ 38 に行く経路があることを見いだした。以上から  $\gamma$ セクレターゼによる CTF からの A $\beta$  産生は  $\epsilon$  部位から stepwise に  $\gamma$  部位に進むと結論された(下図参照)。

研究成果の概要（英文）：

How the cleavage proceeds within the membrane has long been enigmatic. We previously hypothesized that  $\beta$ CTF is cleaved first at the membrane-cytoplasm boundary, producing two long A $\beta$ s, A $\beta$ 48 and A $\beta$ 49, which are processed further by releasing three residues at each step to produce A $\beta$ 42 and A $\beta$ 40, respectively. To test this hypothesis, we used LC-MS/MS to quantify the specific tripeptides that are postulated to be released. Using CHAPSO-reconstituted  $\gamma$ -secretase system, we confirmed that A $\beta$ 49 is converted to A $\beta$ 43/40 by successively releasing two or three tripeptides, and that A $\beta$ 48 is converted to A $\beta$ 42/38 by successively releasing two tripeptides or these plus an additional tetrapeptide.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	32,700,000	0	32,700,000
2006年度	34,000,000	0	34,000,000
2007年度	34,000,000	0	34,000,000
2008年度	30,000,000	0	30,000,000
2009年度	30,000,000	0	30,000,000
総計	160,700,000	0	160,700,000

研究分野：神経内科学

科研費の分科・細目：神経科学、神経解剖学・神経病理学

キーワード：Alzheimer disease； $\gamma$ セクレターゼ； $\gamma$ 切断； $\epsilon$ 切断；トリペプチド仮説；アミロイド $\beta$ タンパク

## 1. 研究開始当初の背景

APP切断が、そしてA $\beta$ 産生がpresenilin 1欠失細胞にて非常に減弱し、 $\gamma$  secretaseの直接の基質であるC99, 83が蓄積することから、presenilin 1が $\gamma$  secretaseの活性に必須の分子であることが判明した。さらに、presenilin 1 knockout miceはNotch knockoutのphenotypeに類似していることから多くの発生生物学者の興味をひき、presenilin 1欠失細胞では、Notchのsite 3 cleavageが起こらないことが突き止められた。この発見は、今まで、APPからのA $\beta$ 産生を説明するために仮定されていた $\gamma$  secretaseが突然に実体化してきた。Notch 1は、type 1 membrane proteinとして合成され、Golgi体にてfurinによって大きなectodomainが切断されるが、切断された2つの断片は、結合したままreceptorとして機能する。リガンドが結合するとTMで切断が起こり(site 3 cleavage)、生じたNICD (Notch intracellular domain)は核内に移行し、転写を制御する。このsite 3はTMD(transmembrane domain)内細胞質境界から数残基の部位に存在する。APPの $\gamma$  cleavageおよびNotchのsite 3 cleavageがいずれもpresenilin-dependentであることが示されたとき、おそらく多くの研究者はそのTM内における切断部位の違いにとまどったことと思う。APPの $\gamma$  cleavage部位はTMDのちょうど真ん中に位置し、Notchの切断部位は膜の細胞質境界の近くに存在する。

2000年の暮れから私の研究室では、 $\gamma$  secretaseの研究に入り、まずcell-free

assay systemを立ち上げることに全力をそそいだ。ヒト胎児脳でA $\beta$ 濃度が非常に高いという事実に基づき、成熟ラットではなく、day 1 fetal brainを用いて膜画分の調製をおこなった。Cell-free系でCTF $\gamma$ （と考えられる断片の）産生が見られるようになり、さらにその産生がA $\beta$ のそれとパラレルであり、かつ現在知られている最も特異性の高い阻害剤の一つ、L-685, 458、にてブロックされることを確認した後に、産生されるCTF $\gamma$ の検討にはいった。分子量は約6,000ほどで、可溶性画分、膜画分とも同じように、L49, V50から始まるCTF $\gamma$ が得られた。理論的には、 $\gamma$  cleavageの後、I41, T43からのペプチドが回収されるはずであり、得られた結果に直ちには納得がいかなかったが、Notchの切断部位の部位に気づくにおよびCTF $\gamma$ 精製時に生じた分解ではないと思うに至った。さらにこの見方を強くしたのは、APLP (amyloid precursor like protein)1, APLP2が同じ抗体で免疫沈降されてきており、同様の部位で切断されていたという事実であった。APP, APLP1, APLP2, Notch 1が細胞質側の数残基の部位で切断されているとすると、この部位がtype 1 membrane proteinの共通の切断部位ではないかと考えるのが普通であろう。この切断をK Beyreutherにならって、 $\epsilon$ 切断と呼ぶとすると以下の特徴が挙げられる。

1 presenilin-dependentである。これまでに知られている、または開発された $\gamma$ 阻害剤によって $\epsilon$  cleavageは阻害される。

2 ほとんどの場合、CTF $\gamma$ とA $\beta$ の産生はパラレルである。すなわち、 $\gamma$  cleavageと $\epsilon$

cleavage はリンクしているらしい。

3 これまでの基質の特徴は、1) type 1 membrane protein であること; 2) ectodomain は、切断を受け shedding される; 2) stop-transfer シグナルがあること

## 2. 研究の目的

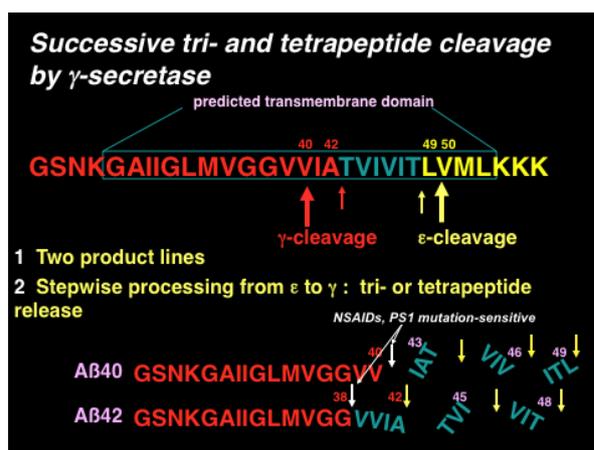
本研究は、このように  $\epsilon$  切断と  $\gamma$  切断の関係、すなわち  $\gamma$  secretase による CTF $\beta$  の切断様式、を明らかにすべく企画された。その切断様式は他の多くの基質にも適用できる。このことはこれまで全く未知であった膜蛋白質の分解様式を解明することでもある。

## 3. 研究の方法

主として培養細胞、stable tranfectant を用いて検討した。技術的には Long Abeta を分離・同定するために、1 残基の違いで分離できる SDS/urea gel electrophoresis を開発した。仮説の最終的検証、遊離されたトリペプチドのためには LC-MS/MS (Waters) を用いた。

## 4. 研究成果

概要に述べたごとくである。 $\gamma$  secretase の CTF $\beta$  分解様式を図示すると下図のようになる。この stepwise processing model は脳内アミロイド蓄積における mutant presenilin、さらには wild presenilin の役割を検討する上で重要な基盤となるであろう。一般生物学的には、膜内蛋白質分解機構解明の第 1 歩となるだろう。



## 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 20 件)

1) Takami M, Nagashima Y, Sano Y, Ishihara S, Morishima-Kawashima M, Funamoto S, Ihara Y:  $\gamma$ -Secretase: Successive tri- and tetrapeptide release from the transmembrane domain of  $\beta$ CTF. J Neurosci 29:13042-52, 2009 査読有

2) Osawa S, Funamoto S, Nobuhara M, Wada-Kakuda S, Shimojo M, Yagishita S, Ihara Y: Phosphoinositides suppress gamma-secretase in both the detergent-soluble and -insoluble states. J Biol Chem 283:19283-92, 2008 査読有

3) Shimojo M, Sahara N, Mizoroki T, Funamoto S, Morishima-Kawashima M, Kudo T, Takeda M, Ihara Y, Ichinose H, Takashima A: Enzymatic characteristics of I213T mutant presenilin-1/gamma-secretase in cell models and knock-in mouse brains: familial Alzheimer disease-linked mutation impairs gamma-site cleavage of amyloid precursor protein C-terminal fragment beta. J Biol Chem 283:16488-96, 2008 査読有

4) Yagishita S, Morishima-Kawashima M, Ishiura S, Ihara Y: AB46 is processed to AB40 and AB43,

but not to A $\beta$ 42, in the low-density membrane domains. J Biol Chem 283: 733-738, 2008 査読有

5) Sato T, Diehl TS, Narayanan S, Funamoto S, Ihara Y, De Strooper B, Steiner H, Haass C, Wolfe MS: Active gamma -secretase complexes contain only one of each component. J Biol Chem 282: 33985-33993, 2007 査読有

6) Morishima-Kawashima M, Han X, Tanimura Y, Hamanaka H, Kobayashi M, Sakurai T, Yokoyama M, Wada K, Nukina N, Fujita SC, Ihara Y: Effects of human apolipoprotein E isoforms on the amyloid  $\beta$ -protein concentration and lipid composition in brain low-density membrane domains. J Neurochem 101: 949-958, 2007 査読有

7) Kakuda N, Funamoto S, Yagishita S, Takami M, Osawa S, Dohmae N, Ihara Y: Equimolar production of amyloid  $\beta$ -protein and APP intracellular domain from  $\beta$ -carboxyl terminal fragment by  $\gamma$ -secretase. J Biol Chem 281: 14776-14786, 2006 査読有

8) Yagishita S, Morishima-Kawashima M, Tanimura Y, Ishiura S, Ihara Y: DAPT-induced intracellular accumulations of longer amyloid  $\beta$ -proteins: further implications for the mechanism of intramembrane cleavage by  $\gamma$ -secretase. Biochemistry 45: 3952 -3960, 2006 査読有

9) Miyasaka T, Ding Z, Gengyo-Ando K, Oue M, Yamaguchi H, Mitani S, Ihara Y: Progressive neurodegeneration in *C. elegans* model of tauopathy. Neurobiol Dis 20: 372-383, 2005 査読有

10) Miyasaka T, Watanabe A, Saito Y, Murayama S, Mann DMA, Yamazaki M, Ravid R, Morishima-Kawashima M, Nagashima K, Ihara Y: Visualization of newly deposited tau in neurofibrillary tangles and neuropil threads. J Neuropathol Exp Neurol 64: 665-674, 2005 査読有

11) Sato T, Tanimura Y, Hirotsu N, Saido TC, Morishima-Kawashima M, Ihara Y: Blocking the cleavage at midportion between  $\gamma$ - and  $\epsilon$ -sites remarkably suppresses the generation of amyloid  $\beta$ -protein. FEBS Lett 579: 2907-2912, 2005 査読有

12) Nakaya Y, Yamane T, Shiraishi H, Wang HQ, Matsubara E, Sato T, Dolios G, Wang R, De Strooper B, Shoji M, Komano H, Yanagisawa K, Ihara Y, Fraser P, St George-Hyslop P, Nishimura M: Random mutagenesis of presenilin 1 identifies novel mutants exclusively generating long amyloid beta peptides. J Biol Chem 280:19070-19077, 2005 査読有

13) Katsuno T, Morishima-Kawashima M, Saito Y, Yamanouchi H, Ishiura S, Murayama S, Ihara Y: Independent accumulations of tau and amyloid  $\beta$ -protein in the human entorhinal cortex. Neurology 64: 687-692, 2005 査読有

14) Qi-Takahara Y, Morishima-Kawashima M, Tanimura Y, Hirotsu N, Horikoshi Y, Maeda M, Saido TC, Ihara Y: Longer forms of amyloid  $\beta$ -protein: implications for the mechanism of intramembraneous cleavage by  $\gamma$ -secretase. J Neurosci 25:436-445, 2005 査読有

[学会発表] (計 24 件)

- 1) 井原康夫 : キーノートレクチャー「認知症研究への期待と展望」第 28 回日本認知症学会、仙台、2009.11.20.
- 2) 宮下哲典、斎藤祐子、初田裕幸、村山繁雄、井原康夫、桑野良三 : アルツハイマー病のバイオマーカー探索 : ヒト死後脳の網羅的な遺伝子発現解析による試み. Ibid
- 3) 松村展敬、宮坂知宏、吉名佐和子、中台枝里子、三谷昌平、井原康夫、森島真帆 : Protein-fragment complementation アッセイ法を用いたタウの凝集体形成過程の解析. Ibid
- 4) 月江珠緒、井原康夫、桑野良三 : 血漿中のアミロイド  $\beta$ 40 および 42 の測定. *ibid*
- 5) 温 雅楠、宮下哲典、北村信隆、赤澤宏平、井原康夫、桑野良三 : 晩期発症型アルツハイマー病と SORL1 の相関解析. *ibid*
- 6) 井原康夫 :  $\gamma$  セクレターゼの酵素学的性質. Stepwise processing of APP by g-secretase. 特別講演、第 32 回日本神経科学大会、名古屋、2009.9.16
- 7) 井原康夫 : アルツハイマー病の発症機序. 一歴史的視点から一第 11 回日本ヒト脳機能マッピング学会、新潟、2009.5.28
- 8) 井原康夫、岡本幸市 : オーバービュー. シンポジウム 4 「アルツハイマー病の診断と治療開発」日本神経学会総会、仙台、2009.5.20
- 9) 宮下哲典、斎藤祐子、柿田明美、荻島創一、田中 博、村山繁雄、高橋 均、井原康夫、桑野良三 : 死後脳を用いた晩期発症型アルツハイマー病の網羅的遺伝子発現解析. 第 27 回日本認知症学会、前橋、2008.10.10-11
- 10) 堀越 (櫻庭) 優子、角田伸人、井原康夫、長池一博 : 血液および脳脊髄液中における A $\beta$ N3pE 分子の測定. *ibid*
- 11) 月江珠緒、松田敬子、井原康夫、桑野良三 : ヒト血漿中のアミロイド  $\beta$ 40 および 42 定量法の確立. *Ibid*
- 12) Takami M, Sano Y, Funamoto S, Tsuji S, Morishima M, Ihara Y: APP cleavage by g-secretase: To test the tripeptide hypothesis using LC-MS/MS. ICAD, Chicago, 2008.7.26-31
- 13) Miyashita A, Saitoh Y, Kakita A, Ogishima S, Tanaka H, Takahashi H, Murayama S, Ihara Y, Kuwano R: Gene expression profiling of postmortem brain tissues affected by Alzheimer's disease. *Ibid*
- 14) Ihara Y: How gamma cleavage and epsilon cleavage are related to each other? Symposia-19, Recent progress in Alzheimer's disease research. IBRO, Melbourne, Australia, 2007.7.13
- 15) Ihara Y: Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. Alzheimer 100 years and beyond. 11.2-5, 2006, Tuebingen, Germany
- 16) 井原康夫 : わが国におけるアルツハイマー病研究—70年代から90年まで. 特別シンポジウム—アルツハイマー病100周年記念—「本邦におけるアルツハイマー病研究の歩みと最近の動向」第25回日本認知症学会、広島、2006.10.7
- 17) Takami M, Morishima M, Okochi M, Ihara Y: The mechanism of APP cleavage by  $\gamma$ -secretase: To test the tripeptide hypothesis

using LCMSMS. 第25回日本認知症学会、広島、2006.10.6

18) Yagishita S, Morishima M, Ishiura S, Ihara Y: Stepwise processing of  $\beta$ CTF in A $\beta$  production: Analysis using lipid rafts. Ibid

19) Morishima M, Tanimura Y, Hamanaka H, Nukina N, Fujita S, Ihara Y: Effects of human apoE isoforms on the A $\beta$  concentration and lipid composition in low-density membrane domains of the brain. ICGP and JSDS joint meeting, Hiroshima, 2006.10.6

20) Kuwano R, Miyashita A, Arai H, Asada T, Imagawa M, Shoji M, Higuchi S, Urakami K, Kakita A, Takahashi H, Tsukie T, Funamoto S, Toyabe S, Akazawa K, Kanazawa I, Ihara Y: Genetic association of dynamin-binding protein gene with late-onset Alzheimer's disease. ibid

21) Morishima-Kawashima M, Ihara Y. g-Secretase: Relationship between g-cleavage and e-cleavage. The 10th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders, Madrid (Spain), 2006. 7.15-20

22) Morishima-Kawashima M, Ihara Y. Stepwise processing of  $\beta$ -amyloid precursor protein by  $\gamma$ -secretase. International Symposium on "Medical and Biological Perspectives in Proteases and Their Inhibitors", Awaji, Hyogo, 2006. 6.26

23) 柳下聡介、森島真帆、石浦章一、井原康夫:  $\gamma$  セクレターゼ阻害剤 DAPT の細胞内 A $\beta$  に対する影響. 第24回日本痴呆学会、大阪、2005.9.30

24) 宮坂知宏、渡邊 淳、斉藤祐子、村山繁雄、マンデビッド、山崎峰雄、レイビッドリブカ、森島真帆、井原康夫: Visualization of newly deposited tau in neurofibrillary tangles and neuropil thread. Mini-symposium、第48回神経化学会、福岡、2005.9.28-9.30

〔図書〕(計1件)

1) 井原康夫: 変性疾患に共通する神経変性過程の基礎背景. 浦上克哉編 (大内尉義監修) 「老年医学の基礎と臨床 II」ー認知症学とマネジメントー. pp15-19, ワールドプランニング, 2009

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

井原 康夫 (IHARA YASUO)  
同志社大学・生命医科学部・教授  
研究者番号: 60114386

### (2) 研究分担者

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  
森島 真帆 (MORISHIMA MAHO)  
北海道大学・薬学研究院・特任准教授  
研究者番号: 50204722

### (3) 連携研究者

無し