

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15365

研究課題名(和文) アルツハイマー病リスク遺伝子SV2BによるシナプスA β の産生調節機構の解明

研究課題名(英文) Research on the regulatory mechanism of synaptic amyloid beta production by SV2B

研究代表者

宮本 将和 (Miyamoto, Masakazu)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：80816736

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：シナプスにおけるA β オリゴマーは認知症の発症と関連があることが報告されており、シナプスにおけるBACE1によるAPPの切断を制御することは新たなAD治療の戦略になり得ると考えられる。我々はシナプスにおけるBACE1の制御因子として、シナプス小胞タンパク2B(SV2B)を同定し、SV2BはシナプスにおけるBACE1の局在に参与していることを見出した。SV2B/BACE1の相互作用に参与するタンパクを探索した結果、Tubulin alpha 1C、Myelin proteolipid protein、60kDa Heat shock proteinが候補タンパクとして同定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病は認知症の大部分を占め、その制圧と対応は世界的に、特に我が国のような高齢化に直面し認知症患者が増加している国々においては特に喫緊の問題となっている。アルツハイマー型認知症の根本的治療としてアミロイド 蛋白(A β)抗体療法が近年期待されているが、多額のコストの問題などを孕んでおり、その他の治療方法の開発は今後も重要であり続けるものと考えられる。シナプスにおけるBACE1によるAPP切断を生理的に制御する分子機序の解明はシナプスを標的とした新規モジュレーター型BACE1阻害剤の開発研究の礎になることが期待され、本研究の成果がその一助となるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：A β oligomers at synapses have been reported to be associated with the development of dementia, and controlling the cleavage of APP by BACE1 at synapses could be a new AD treatment strategy. We identified synaptic vesicle protein 2B (SV2B) as a regulator of BACE1 at synapses and found that SV2B is involved in the localization of BACE1 at synapses. As a result of searching for proteins involved in the interaction of SV2B / BACE1, Tubulin alpha 1C, Myelin proteolipid protein, and 60 kDa Heat shock protein were identified as candidate proteins.

研究分野：医学

キーワード：アルツハイマー病 セクレターゼ シナプス シナプス小胞タンパク2B

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病は認知症の大部分を占め、その制圧と対応は世界的に、特に我が国のような高齢化に直面し認知症患者が増加している国々においては特に喫緊の問題となっている。近年の各種バイオマーカー研究から、AD では認知症発症の 20 年ほど前よりアミロイド 蛋白(A) が脳内で凝集し、シナプス機能障害が始まることが明らかとなり、「前臨床期アルツハイマー病」としてクローズアップされている。実際、認知症発症時には脳内 A 蓄積はほぼ完成しており、前臨床期からの抗 A 療法による先制治療の必要性が指摘されている。アルツハイマー型認知症の根本的治療としてアミロイド 蛋白(A) 抗体療法が近年期待されているが、対象患者の選定の問題や多額のコストの問題など解決すべき問題は山積している。このような背景の中で、その他の治療方法の開発は今後も重要であり続けるものと考えられる。A はアミロイド前駆体蛋白質 (APP) が、セクレターゼによる連続切断を受け産生され、細胞外へ分泌されるが、セクレターゼとしては膜結合型のアスパラギン酸プロテアーゼである BACE1 が同定された。以前より神経活動依存性に A がシナプスより生理的に分泌することが報告されていたが、近年、APP や BACE1、PS1/ セクレターゼ複合体などの A 産生の鍵分子がシナプスに局在し、神経活動依存的にシナプスで A を産生、分泌することが明らかとなった。また AD 脳では早期からアミロイド 前駆体タンパク質 (APP) 切断酵素である BACE1 の発現増加が認められること、AD 脳を用いた検討ではシナプスにおける可溶性 A オリゴマーの局在が神経原線維変化の形成よりも早期に生じ、かつ認知機能障害の発症に関与することが報告されている。このような背景からシナプスにおける BACE1 活性は AD の発症に関与している可能性があるかと推察される。我々は野生型ラット脳由来シナプトニューロソームを用いたプロテオーム解析にて、BACE1 の新規結合シナプス蛋白としてシナプス小胞蛋白 2B (SV2B) を同定した。BACE1 阻害薬は AD 治療薬の有力な候補の 1 つであり、国内外において MCI を含む早期 AD 患者や認知機能正常の AD 発症高リスク群 (家族性 AD 変異のキャリアヤリスク遺伝子 *APOE4* ホモ接合体など) を対象とした複数の臨床試験が進行中であるが、未だ実用化されていない。BACE1 は APP 以外にも生理活性を有する多くの基質が存在しており、長期的な BACE1 阻害効果による副作用が懸念されている。シナプスにおいて BACE1 が APP を切断するメカニズムの解明はシナプスを標的とした新規モジュレーター型 BACE1 阻害剤の開発研究の基盤になることが期待されるところと考えられる。

2. 研究の目的

先行研究で BACE1 の新規結合シナプス蛋白として同定した SV2B に着目し、シナプスにおける A 産生のメカニズム、特に BACE1 による APP 切断の分子機構の解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) SV2B が BACE1 による APP の切断を抑制的に制御するメカニズムを解明するため、SV2B ノックアウトマウス及び野生型マウスの脳のライセートを使用して、密度勾配法とウェスタンブロット法を用いて BACE1 の局在の変化を検証する。また BACE1 による APP 切断に与える影響について SV2B、SV2A のアイソフォーム間で差があるかどうかを細胞実験系で検証を行う。

(2) SV2B が BACE1 を制御するメカニズムに関与する新規のパートナー分子の探索のため、SV2B ノックアウトと野生型マウス脳を用いた抗 BACE1 抗体による免疫沈降、1D SDS-PAGE、ゲル銀染色、目的バンドのゲル内消化、質量分析の実験を行う。SV2B ノックアウトマウスサンプルでは検出

されず、内因性 SV2B を発現している野生型マウスサンプルでのみ検出される BACE1 と共沈する候補蛋白を同定する。

4 . 研究成果

(1)野生型マウスと比較して、SV2B ノックアウトマウスにおいては特定の分画間で BACE1 が有意に移動しており、局在の変化が示唆された。一方、APP については同様の変化は認められなかった。また SV2B ノックアウトマウスと野生型マウスにおいては BACE1 の発現量及び、BACE1 活性に有意差はなかった。以上のことから SV2B は BACE1 の発現量や活性化に影響するのではなく、その局在を制御することにより、BACE1 による APP 切断を抑制的に制御していると考えられた。次に SV2B のアイソフォームである SV2A と SV2B との間で BACE1 に与える影響が違うかを細胞実験系で検証した。HEK293 細胞に BACE1 及び SV2A と SV2B のいずれかを過剰発現させた。コントロール群では BACE1 のみを過剰発現させた。免疫沈降実験では SV2B は SV2A に比べ BACE1 に対して強い親和性を有していることが確認され、細胞上清中の A β 、sAPP は SV2B 強制発現群、SV2A 強制発現群、コントロール群の 3 群間の比較において、SV2B 強制発現群ではコントロールに対して有意に減少が認められた。SV2A 強制発現においてはコントロールに対して減少、SV2B 強制発現に対して増加の傾向が認められたが有意差が認められなかった。以上より、SV2B は SV2A よりも BACE1 を強力に制御していることが示唆された。興味深いことに SV2A を標的とする抗てんかん薬であるレベチラセタムは AD モデルマウスで認められる脳の異常興奮を抑制することが報告されており、少量のレベチラセタムの投与は軽度認知障害患者における海馬の過剰興奮を抑制し、認知機能も改善させるということが報告されている。今回の研究成果から SV2A と同様に SV2B を標的とする薬剤は AD の病態を改善させる可能性があるものと推察されるが今後更なる検証が必要であると考えられる。

(2) SV2B ノックアウトマウスと野生型マウスの脳サンプルについて BACE1 抗体による免疫沈降、1D SDS-PAGE、ゲル銀染色を行った結果、再現性を持って (n=3) 野生型マウスのサンプルで同定できるが SV2B ノックアウトマウスのサンプルでは同定できないバンドが 60kDa 付近に認められた。このバンドを切り出しゲル内消化し質量分析にかけた結果、Tubulin alpha 1C、Myelin proteolipid protein、60kDa Heat shock protein が SV2B/BACE1 の相互作用に關与する候補タンパクとして同定された。これらのタンパクと BACE1 との相互作用についての報告はこれまでになく、今後検証していく必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Miyamoto Masakazu, Kuzuya Akira, Noda Yasuha, Ueda Sakiho, Asada-Utsugi Megumi, Ito Shinji, Fukusumi Yoshiyasu, Kawachi Hiroshi, Takahashi Ryosuke, Kinoshita Ayae	4. 巻 Apr 6
2. 論文標題 Synaptic Vesicle Protein 2B Negatively Regulates the Amyloidogenic Processing of A β PP as a Novel Interaction Partner of BACE1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's Disease	6. 最初と最後の頁 1~13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3233/JAD-200071	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Masakazu Miyamoto
2. 発表標題 SV2B can regulate BACE1 localization
3. 学会等名 第59回神経学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masakazu Miyamoto
2. 発表標題 SV2B can regulate BACE1 localization and its activity
3. 学会等名 第41回神経科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masakazu Miyamoto
2. 発表標題 A search for novel synaptic proteins associated with BACE1/SV2B interaction
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------