

平成 23 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19770101

研究課題名 (和文) COPII 小胞形成とアルツハイマー病における小胞輸送の解析

研究課題名 (英文) COPII vesicle formation and the membrane trafficking in Alzheimer's disease.

研究代表者

二井 勇人 (FUTAI EUGENE)

東北大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：90447459

研究成果の概要 (和文)：本研究では、Sec16 による COPII 小胞形成の制御機構を解析し、Sec16 が Sar1GTPase による GTP 加水分解を阻害し、小胞形成を促進することを明らかにした。また、アルツハイマー病における膜輸送の重要性を明らかにするため、アルツハイマー病の原因となる膜蛋白質複合体  $\gamma$  セクレターゼとアミロイド前駆体を酵母に導入し、A $\beta$  生成を評価する酵母  $\gamma$  セクレターゼアッセイ法を世界ではじめて構築した。

研究成果の概要 (英文)：We identified a novel function of Sec16 in the generation of COPII vesicles from synthetic liposomes. In the presence of Sec16, nucleotide hydrolysis by Sar1 was inhibited, enabling Sar1 atabilization on the membranes. To clarify the importance of the membrane trafficking in Alzheimer's disease, we introduced  $\gamma$  secretase, a multisubunit membrane protein complex, and the amyloid precursor in yeast and established an *in vitro*  $\gamma$  secretase assay system and a screening system based on yeast growth.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	0	2,100,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	390,000	3,790,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：膜輸送と輸送蛋白質

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 小胞体における COPII 小胞輸送機構  
小胞輸送に必要な分子の同定には、酵母における遺伝学的手法と生化学的手法を組み合わせた解析が非常に有効である。このアプローチにより、カリフォルニア大学の

Schekman 研究室が中心となり、小胞形成・融合に必要な蛋白質を同定してきた。COPII 小胞は、小胞体からゴルジ体への蛋白質輸送を担う。COPII 小胞形成に必要な因子としては、COPII コート蛋白質 (Sec23/24GAP (GTPase 活性化因子)、Sec13/31 ヘテロマー、

Small G 蛋白質 (Sar1 GTPase)、Sec12 GEF (ヌクレオチド交換因子)、加えて Sec16 が同定されていた。酵母から単離した小胞体膜画分や人工膜 (リボソーム) を使った COPII 小胞形成実験から、小胞形成におけるコート蛋白質の機能 (膜の変形、積み荷蛋白質の選択、GTPase の活性調節など) が明らかになってきていたが、Sec16 の機能については明らかではなかった。

(2) アルツハイマー病における膜蛋白質輸送の重要性

アルツハイマー病の原因は、アミロイド前駆体 (APP) に由来するアミロイド  $\beta$  蛋白質 ( $A\beta$ ) と呼ばれる小ペプチドの沈着であると考えられている。遺伝性のもも加齢に伴うものも  $A\beta$  の生成が発症の鍵を握るため、 $A\beta$  の蓄積を防ぐことができれば、病気の治療につながる事が期待される。APP のプロセシングを行うセクレターゼ分子には、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  セクレターゼの3種類が知られている。正常な脳では  $\alpha$  セクレターゼによって切断が起こり、 $A\beta$  の沈着は起こらない。ところが、アルツハイマー病では、 $A\beta$  ペプチドのアミノ末端側が  $\beta$  セクレターゼによって、次いでカルボキシル末端側が  $\gamma$  セクレターゼによって切断され、40-43 アミノ酸からなる  $A\beta$  が生成される ( $A\beta$  40、 $A\beta$  42、 $A\beta$  43。このうち  $A\beta$  42 と  $A\beta$  43 の毒性が高い事が知られている。)。APP とセクレターゼのいずれもが膜蛋白質であるため輸送の異常は  $A\beta$  生成に影響を与える事が考えられるが、アルツハイマー病と蛋白質輸送との関連は全く明らかになっていない。それだけでなく、 $A\beta$  がどのオルガネラで生成され分泌されるのかと言った基本的な疑問にも未だ議論があり明確でない。また、膜内で切断を行う  $\gamma$  セクレターゼは、4つの膜蛋白質からなる複合体プロテアーゼであり、生化学的な解析が困難であり、その酵素機能は不明である。

## 2. 研究の目的

本研究では、酵母をモデル細胞として用い、小胞体からゴルジ体への輸送を担う COPII 小胞形成における Sec16 の分子機構を明らかにすることを目的とした。さらに、酵母での知見を活かして、アルツハイマー病発症のメカニズムに迫ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) Sec16 による COPII コートの GAP 活性阻害機構の解析

COPII 小胞の解析は、(A) Sar1 の活性を測定するトリプトファン蛍光法 (B) コートの形成を測定する散乱光法の2つのリアルタイムアッセイを用いて行った (Futai et al., 2004, EMBO J.)。いずれのアッセイでも、蛍光分光光度計を用い、リアルタイムでの測

定を行った。アッセイに用いる蛋白質は、大腸菌 (Sar1 と Sec12) および、酵母 (Sec23/24 と Sec13/31) から精製した。Sec16 の精製は、酵母および大腸菌から行った。GST を融合した Sec16 全長、Sec16 断片の蛋白質を強制発現して、精製を行った。

(2)  $A\beta$  生成の酵母細胞内での再構成

ヒト  $\gamma$  セクレターゼの4成分であるプレセニリン、ニカストリン、Aph1、Pen2 と基質であるアミロイド前駆体 (APP) もしくは Notch を酵母細胞に導入し、ヒト  $\gamma$  セクレターゼを、酵母細胞内で再構成する実験を行った。

## 4. 研究成果

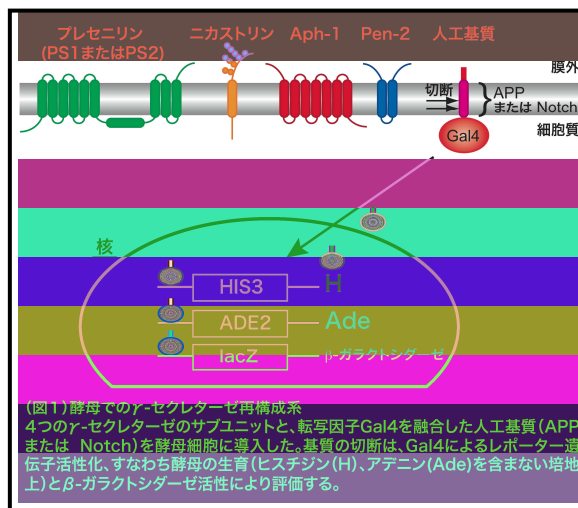
(1) Sec16 による COPII コートの GAP 活性阻害機構の解析

これまで、COPII コートによるリボソーム (人工膜) からの COPII 小胞形成は、酵母小胞体膜画分からの COPII 小胞形成に比べて、著しく効率が低かった。そこで、小胞体表面在性膜蛋白質、Sec16 に小胞形成を促進する活性がないかと考え、解析を行った。トリプトファン蛍光法と散乱光法を用いて、Sar1 GTPase の活性化とコートの形成をリアルタイムで検出した。全長 Sec16 と様々な Sec16 の断片をアッセイ内に加えて解析した結果、Sec16 が Sar1 の GAP (GTPase 活性化因子) 活性を阻害する活性を持ち、また、リボソーム膜上のコートを安定化する事が示された。GAP 阻害活性とコートの安定化は、全長 Sec16 に比べて、Sec16 のアミノ末端領域を欠く断片 (Sec16  $\Delta$ N(565-1235)) で顕著であり、アミノ末端領域が GAP 阻害において調節的な役割を果たす事が示唆された。Sec16 による GAP 阻害活性は、放射性ラベルした  $\gamma$ -<sup>32</sup>P GTP を用いた GTP 加水分解実験で直接的に証明した。また、Sec16 と COPII コート蛋白質の間の相互作用を解析し、Sec16 が Sar1、Sec23/24、Sec13/31 と結合している事を明らかにした。酵母細胞内では、Sec16 は小胞体上の出芽部位に濃縮している事が明らかとなっている。Sec16 は出芽部位でコートと相互作用するだけでなく、GTPase の活性を阻害して、COPII 小胞形成を促進している事が、本研究で明らかとなった。以上の成果は、Nat. Cell Biol. 誌に投稿し、現在 Revise 中である。

(2)  $A\beta$  生成の酵母細胞内での再構成

アルツハイマー病の原因となるアミロイド蛋白質 ( $A\beta$ ) は、 $\gamma$  セクレターゼによる切断をうけて生成する。しかし、 $\gamma$  セクレターゼは4つの蛋白質からなる膜蛋白質複合体であり、生化学的な解析が困難である事から、酵素学的性質は未知であった。私は、ヒ

トγセクレターゼの4成分であるプレセニリン、ニカストリン、Aph1、Pen2と、基質であるアミロイド前駆体 (APP) もしくは Notch を酵母細胞に導入し、ヒトγセクレターゼ活性を再構成することに成功した。これにより、酵母膜画分を用いて試験管内でγセクレターゼ活性を測定する事が世界で初めて可能になった。また、転写因子 (Gal4) を融合した人工基質 (APP-Gal4 または Notch-Gal4) を導入する事により、酵母の生育から Aβ 生成量を評価する事が可能になった。この生育を指標にしたスクリーニング法 (図1) は、恒常的活性化型プレセニリン変異体の同定に威力を発揮し、プロテアーゼ活性中心近傍に変異を有する活性化型プレセニリン変異体を同定した。この活性化型変異体は、活性に必須であると考えられていたニカストリンが無くても独自に活性を持つ事を証明した。そのため、γセクレターゼ活性に必須と考えられていたニカストリンは、γセクレターゼ活性のモジュレーターであることがわかり、アルツハイマー病で一番重要な Aβ 40 産生と Aβ 42 産生の特異性の違いを説明できる可能性が出てきた。本研究で開発した“酵母γセクレターゼアッセイ法”は、γセクレターゼの活性を調節する因子や阻害剤の探索に非常に有用であり、国内外で高く評価されている。J. Biol. Chem., Biochem. Biophys. Res. Commun.において、この方法を用いた解析結果を発表している。



##### 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8件)

1. Yamakawa, H., Yagishita, S., Futai, E., and Ishiura, S., beta-secretase inhibitor potency is decreased by aberrant beta-cleavage location of the “Swedish mut

ant” amyloid precursor protein., **J. Biol. Chem.**, 査読有り, Vol. 285, 2010, 1634-1642.

2. Ishii-Katsuno R., Nakajima, A., Katsuno, T., Nojima, J., Futai, E., Sasagawa, N., Yoshida, T., Watanabe, Y., and Ishiura, S., Reduction of amyloid beta-peptide accumulation in Tg2576 transgenic mice by oral vaccination., **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 査読有り, Vol. 399, 2010, 593-599.

3. Futai, E., Yagishita, S., and Ishiura, S., Nicastrin is dispensable for γ secretase protease activity in the presence of specific presenilin mutations., **J. Biol. Chem.**, 査読有り, Vol. 284, 2009, 13013-13022.

4. Yagishita, S., Futai, E., and Ishiura, S., In vitro reconstitution of γ-secretase activity using yeast microsomes., **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 査読有り, Vol. 377, 2008, 141-145.

5. Ebina, M., Futai, E., Tanabe, C., Sasagawa, N., Kiso, Y., and Ishiura, S., Inhibition by KMI-574 leads to dislocalization of BACE1 from lipid rafts., **J. Neurosci. Res.**, 査読有り, Vol. 87, 2008, 360-368.

6. Tanabe, C., Ebina, M., Asai, M., Futai, E., Sasagawa, N., Katano, K., Fukami, H., and Ishiura, S., 1,3-Capryloyl-2-arachidonoyl glycerol activates alpha-secretase activity and suppresses Abeta40 secretion in A172 cells., **Neuroscience Letter**, 査読有り, Vol. 450, 2008, 324-326.

7. Mitsuhashi H, Futai E., Sasagawa N, Hayashi Y, Nishino I, and Ishiura S., Csk-homologous kinase interacts with SHPS-1 and enhances neurite outgrowth of PC12 cells., **J. Neurochem.**, 査読有り, Vol. 105, 2008, 101-112.

[学会発表] (計6件)

1. 二井 勇人, 柳下 聡一, 石浦 章一, 酵母γセクレターゼ再構成系を用いた presenilin 変異体の解析、酵母遺伝学フォーラム、2010年9月9日、ならまちセンター (奈良)

2. 二井 勇人, 柳下 聡一, 石浦 章一, 酵母でのγセクレターゼ再構成系を用いた presenilin 変異体の解析 (Nicastrin is

dispensable for gamma-secretase activity in the presence of specific presenilin mutations)、第 82 回日本生化学大会、2009 年 10 月 23 日、神戸国際会議場 (兵庫)

3. 二井 勇人、柳下 聡一、石浦 章一、アルツハイマー病治療を目指した $\gamma$ セクレターゼ活性評価系の開発、第 14 回日本病態プロテアーゼ学会、2009 年 8 月 21 日、千里ライフサイエンスセンター (大阪)

4. Futai, E., Yagishita, S., and Ishiura, S., Nicastrin is dispensable for protease activity of  $\gamma$ -secretase., Society for Neuroscience 2008 (北米神経科学会 2008)、2008 年 11 月 17 日、ワシントン D.C. (米国)

5. Yagishita, S., Futai, E., and Ishiura, S., Reconstitution of  $\gamma$ -secretase activity using yeast microsomal fraction., Society for Neuroscience 2008 (北米神経科学会 2008)、2008 年 11 月 17 日、ワシントン D.C. (米国)

6. Futai, E., Hamamoto, S., and Schekman, R., Sec16 inhibits GAP activity of COPII coat on synthetic liposomes., 第 80 回日本生化学会大会、2007 年 12 月 13 日、パシフィコ横浜 (神奈川)

[図書] (計 2 件)

1. 二井 勇人、石浦 章一、金芳堂社、『脳 2 1』、膜結合型メタロプロテアーゼ (MMP、ADAM) ファミリー、13 巻 (No. 1)、2010 年、33-38.

2. 石浦 章一、山川 英訓、二井 勇人、裳華房社、生物の科学『遺伝』、家族性自閉症の遺伝子変異、61 巻 (No. 3)、2007 年、106-110

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

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

○取得状況 (計 0 件)

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

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

二井 勇人 (FUTAI EUGENE)  
東北大学・大学院農学研究科・准教授  
研究者番号：90447459

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：