

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007 -2008

課題番号：19790049

研究課題名 (和文) 内膜輸送系を介した セクレターゼ基質特異的制御機構の解析

研究課題名 (英文) Substrate specific modulation of the γ -secretase activity by vesicular trafficking

研究代表者

高杉 展正 (TAKASUGI NOBUMASA)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号：60436590

研究成果の概要：

アルツハイマー病 (AD) 患者脳に蓄積するアミロイド (A β) 蛋白質を産生する責任酵素である セクレターゼは、AD の根本的治療法のターゲットとして注目されている。しかしその単純な阻害は Notch などのシグナルの阻害による副作用を誘発する。我々はショウジョウバエ細胞を用い、Notch、A β 産生を特異的に制御する遺伝子を RNAi 法によるスクリーニングをおこない、候補遺伝子について個々に解析を進めた。本研究成果は副作用のない AD 治療薬の開発・および生体内シグナルの重要な因子である Notch の制御機構の解析に道筋をつける研究であると考えている。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	2,000,000	0	2,000,000
平成 20 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：アルツハイマー病・ γ セクレターゼ・APP・Notch

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) 患者脳内に蓄積する老人斑の主要構成成分であるアミロイド蛋白質 (A β) 産生を担う酵素 セクレターゼは、AD 予防・治療薬の開発において、重要な創薬ターゲットとなると考えられる。

我々は多くの研究者に先駆けて、家族性ADの原因遺伝子の一つであるプレセニリン (Presenilin; PS) が γ セクレターゼ活性に必要な分子であることを見出し (Tomita et al., *PNAS* 1997)、PSがNicastrin、Aph-1、Pen-2 と高分子量複合体を形成して γ セクレターゼ

活性を発揮すること、さらにその機構が哺乳類のみならずショウジョウバエにおいても保存されていることを明らかにしてきた (Takasugi et al, *JBC* 2002; Takasugi et al, *Nature* 2003; Niimura et al, *JBC* 2005)。

これまでに γ セクレターゼがAPPのみならず、Notchなどの様々な膜蛋白の膜内配列切断を遂行すること、その結果生体膜より遊離する細胞質内領域 (ICD) が直接核内へ移行し、転写を直接制御することでこれらの分子のシグナル伝達に関与していることが知られている。すなわち γ セクレターゼは蛋白限定分解依存性の新しいシグナル伝達機構を担っているプロテアーゼであると考えられている。このようなシグナル伝達形式は「Regulated Intramembrane Proteolysis (RIP)」シグナルという概念として提唱され、注目を浴びている。実際、ショウジョウバエなどのモデル動物において γ セクレターゼ複合体構成因子を欠失すると、発生・分化に重要な役割を果たしているNotchシグナルの低下による重篤な発生異常が起こることが示されている。

したがって γ セクレターゼ活性の単純な阻害は、 $A\beta$ 産生抑制のみならず、Notchをはじめとする他の基質の切断阻害による副作用を生じることが懸念されており、AD創薬にはAPPを切断する活性の特異的な阻害機構の解明が必要と考えられる (Tomita *Expert Rev Neurother* 2009)。これまでにショウジョウバエを用いた検討から、眼原基においては細胞の分化に従ってNotchとAPPの γ セクレターゼによる切断活性について、基質特異性が変化することが報告されている (Loewer et al., *EMBO rep* 2004)。さらに阻害剤を用いた解析から、哺乳類細胞においては細胞表面膜上の γ セクレターゼはNotch切断に関与する一方で、内膜系に存在する γ セクレターゼはAPP切

断に寄与していることが報告されている (Tarassishin et al., *PNAS* 2004)。したがって γ セクレターゼ活性に対して基質特異性を付与する何らかの分子機構の存在が予想され、その同定・解析が待たれていた。

2. 研究の目的

我々はショウジョウバエ細胞を利用したRNAi法によるゲノムワイドスクリーニングにより γ セクレターゼによるNotch・APPの切断活性を制御する遺伝子候補群GAMMA secretase MOdulator (GAMMO)を同定に成功した。本研究では個々のGAMMOの機能について、特にNotch切断選択的制御を行うGAMMO3 (Surf4)を中心として解析を行い、Notch、又はAPP選択的な切断活性の制御機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

各GAMMO、特にGAMMO3について以下の手法で解析を進めた。

(1)ショウジョウバエ細胞を用いた生化学的解析

APP、Notch 両基質由来の γ セクレターゼ活性測定レポーター細胞系の樹立とRNAi法を用いたGAMMOによる活性制御系の解析

免疫沈降法・細胞免疫染色等による、GAMMOと基質、 γ セクレターゼとの相互作用または局在変化の解析

(2)ショウジョウバエ個体を用いた分子遺伝学的手法

(3)哺乳類細胞を用いたRNAi法による解析

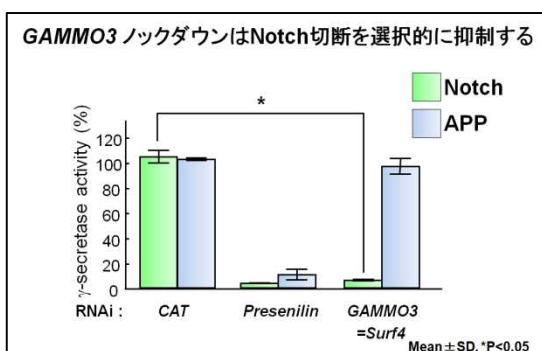
4. 研究成果

我々は14のGAMMO遺伝子群のなかで膜タンパク質であり、種間で保存性の高いGAMMO3

について解析を進めた。

GAMMO3 は酵母 Erv29p、哺乳類では Surf4 として知られている遺伝子のショウジョウバエホモログであった。Surf4 は小胞体とゴルジ体の中間に位置する ERGIC (ER-Golgi intermediate compartment) に局在することが知られており、ER からゴルジへの蛋白質の選択的輸送に関与していると考えられている。我々は GAMMO3 が Notch のゴルジ体への選別輸送を制御しているとの仮説を立てて検討し、以下の知見を得た。

(1) GAMMO3 のノックダウンにより Notch 選択的な γ セクレターゼ切断の阻害が観察された。



(2) GAMMO3 はショウジョウバエ細胞においても小胞体-ゴルジ体間に局在する。

(3) Notch は GAMMO3 の含まれる小胞体を選択的に濃縮されていた。

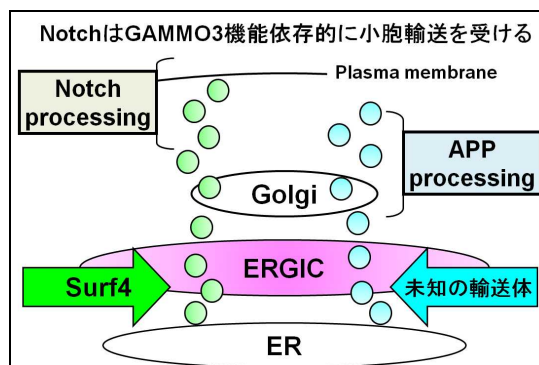
(4) GAMMO3 のノックダウンにより Notch の形質膜への輸送が阻害された。

これらの結果から Surf4 機能依存的に Notch は選択的な小胞輸送を受け、形質膜近傍で γ セクレターゼによる切断を受けるものと考えられた。

本研究により小胞輸送の基質選択性による Notch 切断活性の制御機構が存在することが明らかにされた。現在ショウジョウバエ個体

のみならず、線虫・マウスについて個体の GAMMO3 変異体の解析により、生体内における Notch シグナルに GAMMO3 が影響しているかを検討中である。

本研究では、重要なシグナル伝達因子である Notch の γ セクレターゼ切断が、小胞体からの特異的な小胞輸送によって制御されるといふ、新たな Notch シグナル制御機構を見出した。今後 GAMMO3 の相互作用因子・類縁体の解析を介し、APP 選択的な小胞輸送制御因子を見出す端緒となる可能性があり、副作用の無いアルツハイマー病根本治療薬の創出につながることを期待される。



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)

[学会発表](計 4件)

(1) The 15th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience
2008年12月2日~3日 東京
Identification and analysis of a substrate specific genetic modulator for γ -secretase activity.

一色隼人 高杉展正 鈴木邦道 富田泰輔 岩坪威

(2) SFN 38th Annual Meeting
2008年11月15~19日 Washington DC
Identification and analysis of a substrate specific genetic modulator for γ -secretase activity.

一色隼人 高杉展正 鈴木邦道 富田泰輔 岩坪威

(3) 第3回 Notch 研究会 ~若手の会~
2008年7月17日~18日 三島
Identification and analysis of a substrate specific genetic modulator

for γ secretase activity.

一色隼人 高杉展正 富田泰輔 岩坪威

(4)第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回
日本生化学会大会 合同大会

2007 年 12 月 14 日 横浜

ゲノムワイド RNAi スクリーニングによる
セクレターゼ活性制御因子の同定

一色隼人 高杉展正 富田泰輔 岩坪威

〔その他〕

本研究成果の一部は第 15 回武田財団シンポジウムにおいて発表し、ポスター賞を受賞した。

6. 研究組織

(1)研究代表者

高杉 展正

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号：60436590

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

岩坪 威

東京大学・大学院医学系研究科・教授

富田 泰輔

東京大学・大学院薬学系研究科・准教授

松野 建治

東京理科大学・大学院基礎工学研究科・教授

三谷 昌平

東京女子医科大学・医学部・教授