

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月24日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500343

研究課題名（和文） γ セクレターゼのA β 40/A β 42切断制御因子の探索と機能解析

研究課題名（英文）Identification of a regulatory factor for gamma-secretase activity generating Abeta40/Abeta42 and its functional analyses

研究代表者

森島 真帆（MORSHIMA MAHO）

北海道大学・大学院薬学研究院・特任准教授

研究者番号：50204722

研究成果の概要（和文）：

本研究では、 γ セクレターゼ切断制御因子を同定するために、可逆性架橋剤で処理した野生型マウス繊維芽細胞からラフト（コレステロールとスフィンゴ脂質に富む膜領域）画分を調製し、そこに局在する活性型を主とする γ セクレターゼ複合体を免疫沈降法により精製して、LC-MS/MS法を用いてタンパク質化学的に解析した。その結果、アネキシンを含む6つの新規 γ セクレターゼ構成（結合）因子候補が同定された。現在、培養系を用いてこれらの候補因子のA β 産生に関する機能解析を行なっている。

研究成果の概要（英文）：

In this study, the lipid rafts were prepared from wild-type mouse embryonic fibroblasts pretreated with a reversible cross-linker and (active) gamma-secretase complexes localized there were isolated by immunoprecipitation and analyzed proteinchemically through LC-MS/MS to identify a regulatory factor for the gamma-secretase activity. Six novel candidates for gamma-secretase components (binding factors) including annexin have been identified. Functional analyses of these candidate molecules involving in Abeta generation are now on-going in cultured cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経生化学

科研費の分科・細目：神経科学、神経化学・神経薬理学

キーワード：アルツハイマー病・アミロイド β タンパク質・ γ セクレターゼ・脳神経疾患、

1. 研究開始当初の背景

老年期の認知症として最も頻度が高いアルツハイマー病は、脳内にアミロイド β タンパク質（A β ）が増加・蓄積することが原因

で発症すると考えられている。A β は、アミロイド β タンパク質前駆体（APP）が β セクレターゼおよび γ セクレターゼにより段階的に切断されて産生される分子量約4,000のペプチドであり、主要な分子種としてA β 40

と A β 42 が存在する。細胞で産生・分泌される A β は、A β 40 が約 90% を占めるが、脳内では、凝集性が高い A β 42 が主に沈着する。また、遺伝性アルツハイマー病では A β 42 の産生・沈着が亢進しており、このことが早期の発症を促すと考えられている。従って、A β の C 末端側を切断し A β 40 と A β 42 の産生を切り分ける酵素である γ セクレターゼは、アルツハイマー病発症原因に深く関わる A β 産生の要となる酵素であり、 γ セクレターゼの活性を制御して A β 42 の産生を減少させることは、アルツハイマー病の治療および予防戦略として非常に重要である。しかしながら、それにもかかわらず、 γ セクレターゼによる膜内切断の分子メカニズムや APP 切断の制御機構については、まだよく分かっていない。

γ セクレターゼは、新規タイプの膜結合型アスパラギン酸プロテアーゼであり、その構成因子にプレセニリン、ニカストリン、Aph-1、PEN2 の少なくとも 4 つの膜結合タンパク質を含む高分子量複合体である。構成因子の一つで家族性アルツハイマー病の原因遺伝子でもあるプレセニリンが、活性中心を構成する。その大きさは数百キロダルトンとも数メガダルトンとも推定されている。上記 4 つの構成因子はいずれも活性の必須因子であるが、これ以外にもサブユニット分子が含まれていて、 γ セクレターゼの活性を制御している可能性が示唆されている。

私達はこれまで基質である APP 切断産物、特に切断中間産物を同定してその詳細な解析を行うことにより、 γ セクレターゼによる APP の切断分子機構を明らかにしてきた。しかしながら、A β 40/A β 42 の切断制御メカニズムを解明するためには、このようなアプローチからだけでは限界がある。そこで、酵素分子そのものを精製して直接、解析することにより、その活性を制御する因子を探索・同定し、A β 40/A β 42 切り分けの分子制御機構を明らかにすることを計画した。

2. 研究の目的

本研究では、A β 40/A β 42 の切断制御メカニズムを解明するために、 γ セクレターゼを直接的に精製し、その構成因子を同定して機能解析を行なうことにより、A β 40/A β 42 の切断制御因子を探索/同定し、その作用機序を明らかにする。その際、架橋剤で処理を行ない、内在性の活性型 γ セクレターゼを精製することにより、活性型 γ セクレターゼ複合体に結合している分子をタンパク質化学的に網羅的に同定する。同定した各分子は、培養細胞系に導入してその A β 産生に及ぼす影響を調べ、細胞内環境において A β 産生に関するそれらの機能を検証する。これにより、

A β 40/A β 42 切り分けの制御に関与する新規因子を探索し、切断制御の分子メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

本研究では、活性型 γ セクレターゼが多く局在するラフト膜画分から γ セクレターゼ構成因子の一つである PEN2 に対する抗体を用いて活性型 γ セクレターゼを精製し、 γ セクレターゼ複合体に含まれる構成因子およびそれに結合する分子を、電気泳動法と質量分析法を組み合わせてタンパク質化学的に網羅的に解析し、同定する。この際に、可逆性架橋剤による分子間架橋を行い、周辺分子や緩く結合する分子を含めて全ての結合構成因子の同定を目指す。そして、同定された分子の中から、 γ セクレターゼ活性の制御に関わることが予測される候補分子を選択して、これを細胞内環境に戻し γ セクレターゼ活性に対する影響を検証することで、新しい活性制御因子を探索し、その作用機序を明らかにする。

(1) PEN2 抗体の作成

PEN2 由来アミノ酸配列を持つ合成ペプチドを作成し、これを抗原としてウサギ 2 匹に免疫を行ない、PEN2 に対するポリクローナル抗体を作成した。

(2) 活性型 γ セクレターゼを保持するラフト画分の調製

培養細胞を回収し、遠心法によりミクロソーム膜画分を調製した。膜画分を 1% CHAPS0 に懸濁し、CHAPS0 存在下でショ糖密度勾配遠心法を行い、ラフト画分を調製した。 γ セクレターゼ複合体を精製するための細胞には、野生型マウス由来の繊維芽細胞 (MEF) を用い、ネガティブコントロールとしてプレセニリン 1/プレセニリン 2 ダブルノックアウトマウス由来の MEF を使用した。

(3) 架橋剤処理

架橋剤は、ホルマリン、DSP などの可逆性架橋剤を用いた。細胞を直接あるいは膜画分調製後に、架橋剤で処理を行なった。架橋の有効性と細胞あるいは膜からの抽出効率とのバランスから、処理濃度、処理時間などの条件を決定した。

(4) γ セクレターゼの免疫沈降法による精製

ラフト画分より γ セクレターゼを抽出し、作成した PEN2 抗体あるいはニカストリン抗体を用いて、免疫沈降法により精製した。抽出には種々の可容化剤を試し

た。また、 γ セクレターゼ複合体の解析には、高分子量タンパク質の解析に適する Blue native 電気泳動法を利用した。抽出条件、免疫沈降条件などについて検討し、最適な条件を決定した。最終的な精製では、免疫沈降に用いる抗ニカストリン抗体を磁気ビーズに結合させ、架橋試薬で固定して用いた。

- (5) LC-MS/MS 法によるタンパク質化学的解析
免疫沈降法により精製した γ セクレターゼをビーズから溶出し、トリプシンで消化処理した後に生じたペプチド断片を LC-MS/MS 法により解析した。

4. 研究成果

(1) PEN2 抗体の作成

PEN2 合成ペプチドを免疫したウサギ 2 匹から抗血清を採取した。アフィニティークラムを用いて抗体を精製し、ウェスタンブロット法と免疫沈降法により検討した結果、2 匹の内の 1 匹の抗体が使用可能であることが分かった。

(2) 活性型 γ セクレターゼを保持するラフト画分の調製

培養マウス繊維芽細胞から膜画分を調製し、ショ糖密度勾配遠心法によりラフト画分を調製した。この画分には、既知の 4 つの γ セクレターゼ複合体構成因子が含まれており、37°C でインキュベートすることにより γ セクレターゼ依存的に A β が産生されること分かった。従って、この画分に活性型 γ セクレターゼが含まれることが確認された。

(3) 架橋剤処理

DSP とホルムアルデヒドの 2 種類の架橋剤のそれぞれについて、処理するタイミング、濃度、処理時間等の検討を行い、処理条件を決定した。DSP で架橋した場合には、プレセニン抗体および PEN2 抗体で反応する高分子量 γ セクレターゼ複合体の形成を確認することができたが、免疫沈降法でこの複合体を単離することができなかった。ホルムアルデヒド処理の場合は、細胞を直接処理した時に、少なくとも PEN2 とニカストリンを含む高分子量の架橋複合体が形成されていることが分かった。これは、 β ME 存在下でサンプルを加熱処理すると、複合体が解離して PEN2 およびニカストリン単量体が増加することから明らかになった。

(4) γ セクレターゼの免疫沈降法による精製

上記の架橋処理により細胞や膜からのタンパク質抽出効率が非常に低下したが、中程度の強さで架橋処理を行うことと可溶化力が比較的高い溶液を用いて抽出することで、ある程度改善することができた。 γ セクレターゼ複合体は、ミクロソーム膜画分とラフト画分の両方で検出された。PEN2 抗体では γ セクレターゼ複合体を免疫沈降できなかったが、ニカストリン抗体を用いることにより免疫沈降された。

それぞれの膜画分から γ セクレターゼを抽出し、Blue native 電気泳動法を用いて解析した結果、ミクロソーム膜画分の γ セクレターゼは架橋剤で処理しても分子量が変化しないのに対し、ラフト画分の γ セクレターゼは架橋剤処理により分子量が約 240 kDa から約 480 kDa に変化することが分かった。このことは、ラフト画分 γ セクレターゼに架橋剤処理が有効に働いていることを示す。また、Blue native 電気泳動法での分離後にゲルを切り出し SDS 電気泳動法でさらに展開してウェスタンブロット法を行なうことにより、この複合体中には γ セクレターゼの構成因子であるニカストリン、プレセニン、PEN2 が含まれていることが分かった。

そこで次に、ラフト画分から RIPA を用いて γ セクレターゼを抽出し、抗ニカストリン抗体を用いて免疫沈降した後に Blue native 電気泳動法で解析した。しかしながら、この操作により得られる γ セクレターゼの量が著しく減少することが分かった。その原因が Blue native 電気泳動法の際の操作過程にあることが判明したため、当初の計画を変更して、免疫沈降後の精製 γ セクレターゼ複合体を酸性溶液で溶出し、電気泳動法による構成因子の分離を行わずに、直接 LC-MS/MS により解析することにした。また、免疫沈降には磁気ビーズを用い、抗体をビーズに共有結合させて用いることにした。

(5) LC-MS/MS 法によるタンパク質化学的解析

抗ニカストリン抗体結合磁気ビーズを用いてラフト画分から免疫沈降した γ セクレターゼ複合体を、酸性溶液により抽出した。中和後にトリプシンで消化し、得られた消化産物を LC-MS/MS を用いて分離し、各ピークに含まれるペプチドの質量解析を行なった。その結果、 γ セクレターゼの既知の構成因子の他に、6 つの新規構成(結合)因子の候補を同定することができた。その一つとしてアネキシンが含まれていた。

γ セクレターゼに含まれる活性制御因子の探索研究は国内外の多くの研究室で

行われてきたが成功例は少なく、複数の結合分子が報告されているが活性に関与することが証明されているものはまだない。本研究は、架橋剤を用いることで、 γ セクレターゼの周辺分子を含めて、また（架橋剤無しでは複合体が解離してしまうような）より強い条件で抽出することによりラフト画分から活性型 γ セクレターゼを単離することで、活性に関わる新規構成因子の同定を目指したものである。本研究で見つかったアネキシンは、 γ セクレターゼに結合していることが以前に報告されているが、その機能解析はなされていない。このことは、本研究で得られた成果の確かさを証明するとともに、ここで見つかった6つの因子の機能解析（現在進行中）の重要性を示唆する。

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2件）

- ① Takamura A, Kawarabayashi T, Yokoseki T, Shibata M, Morishima-Kawashima M, Saito Y, Murayama S, Ihara Y, Abe K, Shoji M, Michikawa M, Matsubara E. (2011) Dissociation of beta-amyloid from lipoprotein in cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease accelerates beta-amyloid-42 assembly. **J Neurosci Res**, 89, 815-821 (査読有) DOI: 10.1002/jnr.22615
- ② Takami M, Nagashima Y, Sano Y, Ishihara S, Morishima-Kawashima M, Funamoto S, Ihara Y. (2009) Gamma-secretase: Successive tripeptide and tetrapeptide release from the transmembrane domain of beta-carboxyl terminal fragment. **J Neurosci**, 29, 13042-13052 (査読有) <http://www.jneurosci.org/content/29/41/13042.long>

〔学会発表〕（計3件）

- ① 松村展敬, 高見真子, 井原康夫, 森島真帆. DRMにおける γ セクレターゼのAPP切断機序. 日本薬学会第132年会, 北海道大学(札幌市), 2012.3.29
- ② 宮本一仁, 孫瑜, 松村展敬, 森島真帆. マウス脳 γ セクレターゼ活性の解析. 第30回日本認知症学会, タワーホール船堀(東京都), 2011.11.12
- ③ 松村展敬, 宮坂知宏, 千野拓, 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. 第28回日本認知症学会, 東北大学百周年記念会館(仙台市), 2009.11.20

〔図書〕（計2件）

- ① Ihara Y, Morishima-Kawashima M, Nixon R. (2012) The Ubiquitin-Proteasome System and the Autophagic-Lysosomal System in Alzheimer Disease. In **The Biology of Alzheimer Disease**, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 511 total pages (pp 359-385)
- ② 森島真帆. (2011) ユビキチン. **認知症学(上)**—その解明と治療の最新知見—, 日本臨床, 総ページ数 620 (74-78)

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし
研究者番号：

(3) 連携研究者

なし
研究者番号：