

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28日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790061

研究課題名（和文） 細胞内小胞輸送を介した γ セクレターゼの基質選択性制御メカニズムの解明

研究課題名（英文） Mechanism of substrate selectivity of gamma-secretase regulated by membrane trafficking

研究代表者

諸橋 雄一（YUICHI MOROHASHI）

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号：40568169

研究成果の概要（和文）：アルツハイマー病（AD）患者脳に老人斑として蓄積する β アミロイドタンパク質（A β ）を産生する γ セクレターゼはAD治療薬ターゲットとして有力視されている。しかしながら副作用の無いAD治療薬の開発に向けて、複数の基質を有する γ セクレターゼの基質選択性の理解は不可欠である。我々は γ セクレターゼの基質の一つであるNotchの輸送を選択的に制御する分子Surf4を同定し、Surf4がNotchの細胞質領域を特異的に認識して結合してER出芽部位へと誘導し、そのER-ゴルジ間の輸送を制御している事を明らかにした。

研究成果の概要（英文）： γ -Secretase is a membrane embedded protease responsible for the production of pathogenic A β peptide accumulated in the brains of AD patient, therefore it has been regarded as a promising druggable target for the treatment of AD. γ -Secretase has a number of substrates, so it is crucial to understand its molecular mechanism of substrate selectivity. To this end, we have identified Surf4 that specifically regulates Notch receptor trafficking. Surf4 recognizes the cytosolic portion of Notch receptor and recruits it to the ER-exit site, and regulate its ER-to-Golgi trafficking.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：細胞生物学

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 β アミロイド蛋白（A β ）産生を担うプロテアーゼである γ 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。

我々は世界に先駆けて、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須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., *Nature* 2003)。

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を切断すること、その結果生成する細胞質領域断片 (ICD) が核内へ移行し、遺伝子発現を制御することで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 セクレターゼはタンパク質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。実際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Notchをはじめ他の基質の切断阻害による副作用が懸念され、AD創薬にはAPPを切断する活性を特異的に阻害する必要があると考えられる (Tomita *Expert Rev Neurother* 2009)。これまでにショウジョウバエ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 (Loewer et al., *EMBO rep* 2004)、さらに哺乳類細胞においては、細胞表面膜上の γ セクレターゼがNotchを切断する一方、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想定され、その同定・解析が待たれていた。

2. 研究の目的

γ セクレターゼはADの病因タンパク質であるA β ペプチドを産生するプロテアーゼであり、重要な創薬ターゲットである。しかし γ セクレターゼはA β の前駆体であるAPP以外にもNotchを始めとする様々な膜貫通蛋白質の切断にも関与する事から、単純な活性阻害では副作用が生じる懸念がある。申請者らのグループはゲノムワイドRNAiスクリーニン

グにより基質選択性 γ セクレターゼ活性調節因子としてSurf4を同定した。本研究計画においては、Notch切断のみを特異的に制御するSurf4に焦点を当て、 γ セクレターゼの基質選択性の分子メカニズムを明らかにし、最終的に副作用の無いAD治療薬の開発を目指して研究を遂行する。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞を用いた、選別輸送に関わるSurf4およびカーゴの分子機能ドメインの解明

(2) 線虫を用いた、遺伝学的アプローチによるSurf4機能相互作用因子の同定

(3) 線虫およびショウジョウバエを用いた、Surf4の生理的機能解析

分子細胞生物学と遺伝学を駆使し、Surf4による γ セクレターゼの選択的基質切断特性の分子機構を明らかにすると同時に、モデル生物を利用しその生理機能の解明を試みた。

4. 研究成果

我々の同定したSurf4は酵母ではErv29p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) に局在することから、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。我々は培養細胞やモデル生物として線虫を用いて様々な検討を行い、以下の知見を得た。

まず培養細胞を用いた免疫共沈降実験などにより、Surf4が直接的にNotch受容体を認識していること、この認識にはNotchの細胞質側領域が重要であることを明らかにした。また、このようなSurf4による基質選別輸送機構をライブセルイメージング法などの細胞生物学的手法によっても検討するため、NotchやAPPなど γ セクレターゼの代表的基質の細胞質側にGFPを融合した変異体を作製し、これらを恒常的に発現する細胞株を樹立した。また、線虫を用いた検討により

(1) 線虫生体内においてもSft-4 (線虫Surf4ホモログ) がNotchシグナルを制御しており、sft-4 RNAiによりNotchシグナル依存的プロセスである事が知られる陰門形成

に異常が生じる事

(2) 生理的条件下において陰門前駆細胞 (VPC) のアピカル膜上に局在する Notch が、sft-4 RNAi によりバソラテラル膜にも局在を示すようになり極性輸送が障害される事

(3) Sft-4 RNAi の表現型が線虫の Notch オルソログである Lin-12 RNAi のそれと若干異なることから、Sft-4 は Notch 以外にもその輸送を制御する分子がある可能性があること、などが明らかになった。さらに、ショウジョウバエや哺乳類の培養細胞を用いた検討から、Surf-4 と Notch の相互作用は pH 依存性であり、輸送小胞/小器官内部が低 pH になると解離する可能性がある事も明らかになった。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うけ、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し、それが Notch 細胞質領域を介したものであることが明らかにされた。また線虫個体の Surf4 変異体の解析により、生体内のある特定の細胞群において Surf4 が膜輸送を介して Notch シグナルを制御していることも明らかになった。

本研究では、シグナル伝達因子として生体内で重要な役割を果たしている Notch の γ セクレターゼ切断が、小胞体からの特異的選別輸送によって制御されるという、新たな機構を見出した。今後 Surf4 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事が期待される。

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 6 件)

(1) 4th East Asia C. elegans Meeting

2010 年 7 月 11 日-14 日 東京

Functional analysis of SFT-4 in the C. elegans Notch pathway

石渡智之 一色隼人 桑原知樹

諸橋雄一 三谷昌平 富田泰輔 岩坪威

(2) 第 5 回 Notch 研究会

2010 年 11 月 8 日~9 日 千葉

Functional analysis of SFT-4 in the C. elegans Notch pathway

石渡智之 一色隼人 桑原知樹

諸橋雄一 三谷昌平 富田泰輔 岩坪威

(3) 第 30 回 日本認知症学会学術集会

2011 年 11 月 11 日-13 日 東京

Identification and functional analysis of a genetic regulator for γ -secretase substrate trafficking.

一色隼人 山下雄大 石渡智之

諸橋雄一 富田泰輔 岩坪威

(4) 第 30 回 日本認知症学会学術集会

2011 年 11 月 11 日-13 日 東京

Functional analysis of SFT-4 in the C. elegans Notch pathway

石渡智之 一色隼人 桑原知樹

諸橋雄一 三谷昌平 富田泰輔 岩坪威

(5) 第 6 回日本 Notch 研究会

2011 年 11 月 14 日-15 日 千葉

Identification and functional analysis of a genetic regulator for γ -secretase substrate trafficking.

一色隼人 山下雄大 石渡智之

諸橋雄一 富田泰輔 岩坪威

(6) 第 6 回日本 Notch 研究会

2011 年 11 月 14 日-15 日 千葉

Functional analysis of SFT-4 in the C. elegans Notch pathway

石渡智之 一色隼人 桑原知樹

諸橋雄一 三谷昌平 富田泰輔 岩坪威

[その他]

東京大学大学院薬学系研究科 臨床薬学教室 HP

<http://web.f.u-tokyo.ac.jp/~neuropsic/en/tranceja.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

諸橋 雄一 (YUICHI MOROHASHI)
東京大学・大学院薬学系研究科・助教
研究者番号：40568169

(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 (TAKESHI IWATSUBO)
東京大学・大学院医学系研究科・教授

富田 泰輔 (TAISUKE TOMITA)
東京大学・大学院薬学系研究科・准教授