

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590110

研究課題名(和文) プレセナリン複合体の成熟・分化機構を基盤とした新規アルツハイマー病治療戦略の開発

研究課題名(英文) The development of new diagnostic and therapeutic tools for AD based on regulation of the gamma-secretase complex assembly.

研究代表者

前田 智司 (Maeda, Tomoji)

岩手医科大学・薬学部・准教授

研究者番号：60303294

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病では、アミロイドベータの脳内蓄積が病因と考えられている。アミロイドベータはアミロイド前駆体タンパクからベータとガンマセクレターゼと呼ばれるプロテアーゼによって切断され生成される。このうち、ガンマセクレターゼ活性は、プレセナリンを含むタンパク質複合体が担っていることが明らかにされている。そこで、プレセナリン複合体の1つであるニカストリンの成熟・分解についてユビキチンリガーゼであるシノビオリンに焦点をあてて研究を遂行した。

研究成果の概要(英文)：Alzheimer disease is characterized by the deposition of amyloid beta, which is generated from the amyloid precursor protein (APP) through its cleavage by beta- and gamma-secretases. The gamma-secretases complex component nicastrin (NCT) plays significant roles in the assembly and proper trafficking of the gamma-secretases complex and in the recognition of APP. Unassembled NCT is retrieved or retained in the ER by the protein Retention in endoplasmic reticulum 1 (Rer1). We hypothesized, therefore, that Synoviolin (Syvn), an E3 ubiquitin ligase, regulates the assembly or localization of the gamma-secretases complex by ubiquitinating Rer1 resulting in its subsequent degradation. Our findings that the level of Rer1 was increased in Syvn-knockout fibroblasts due to inhibition of its degradation support this hypothesis. Thus, it is likely that Syvn regulates the assembly of the gamma-secretases complex via the degradation of Rer1, which results in the generation of amyloid beta.

研究分野：医療薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：プレセナリン複合体 ニカストリン シノビオリン Rer1 アルツハイマー アミロイドベータ

### 1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患は中枢神経系の特定の部位のニューロンが主として中年以降に進行性に障害・脱落していく疾患の総称であり、代表的なものとしてはアルツハイマー病、パーキンソン病、プリオン病などがあげられる。障害されるニューロンの種類により疾患ごとの臨床症状はことなるが、いずれもニューロンが選択的に変性脱落することは共通している。孤発性、家族性を問わずにこれら神経変性疾患に共通な病理所見として、病変部位における神経細胞、グリア細胞に認められる封入体があげられる。封入体を構成する不溶性のタンパク質が病態機序に強く関与すると推測され、折りたたみ異常があるタンパク質が細胞内で処理しきれずに毒性をもち、それが神経細胞の機能異常や細胞死の原因となることが神経変性疾患全般に共通なメカニズムであると考えられている。

アルツハイマー病では、アミロイドベーター (A $\beta$ ) の脳内蓄積が病因と考えられている。A $\beta$  はアミロイド前駆体タンパク (APP) から $\beta$ と $\gamma$ -セクレターゼと呼ばれるプロテアーゼによって切断され生成される。このうち、 $\gamma$ -セクレターゼ活性は、プレセニリンを含むタンパク質複合体が担っていることが明らかにされている。また、プレセニリンは家族性アルツハイマー病の原因遺伝子としても同定されており、 $\gamma$ -セクレターゼ活性異常がアルツハイマー病の原因の1つではないかと考えられている。プレセニリン複合体は、少なくとも4つの膜タンパク質(プレセニリン、ニカストリン、APH-1、PEN-2)からなるが、細胞内のプレセニリン複合体の量は厳密に制御され、複合体を形成しない因子は、すみやかにユビキチン-プロテアソーム系で分解されることが明らかにされている。しかしながら、どのような機構で、余分な構成タンパク質が不要と認識され分解されるのかその詳細は不明である。

ニカストリンは、アルツハイマー病脳に蓄積する A $\beta$  産生を行う膜結合型複合体であるプレセニリン複合体 ( $\gamma$ -セクレターゼ) の基本構成因子であり、A $\beta$  前駆体であるアミロイド前駆体タンパクなどの基質結合部位として機能することが報告されている。さらに、ニカストリンが $\gamma$ -セクレターゼの安定性および活性に重要な役割を果たしていることも報告されている。この $\gamma$ -セクレターゼ複合体の形成には小胞体とゴルジ体間のリサイクリング経路が重要な役割を担っていると考えられている。最近、ニカストリンと相互作用する因子としてゴルジ体から小胞体への送り返しに関わっている Retention in endoplasmic reticulum 1 (Rer1) が同定され、Rer1 の発現をノックダウンすると $\gamma$ -セクレターゼ活性が上昇し、逆に過剰発現すると低下することが報告されている (Kaether C et al., EMBO reports 8: 743, 2007; Spasic D et al., J. Cell Biol. 176: 629, 2007)。また、複合

体を形成しないニカストリンは、小胞体局在していることが明らかとなっている。そこで、我々は小胞体ストレス誘導性の小胞体局在ユビキチンリガーゼであるシノピオリンに着目し、シノピオリンがニカストリン分解に関与しているか否かを解析した。その結果、シノピオリン欠損細胞において、糖鎖修飾が不十分な未成熟ニカストリンの蓄積量の増加が観察された。また、シノピオリンを過剰発現させると、A $\beta$  の顕著な増加が認められ、未成熟ニカストリンの蓄積量は減少した (Maeda T et al., FEBS J 276: 5832, 2009)。以上の結果より、プレセニリン複合体を形成していない未成熟ニカストリンの選択的分解にシノピオリンが関与していることが明らかとなった。また、未成熟ニカストリンと成熟ニカストリンの量比が A $\beta$  産生量に大きく影響する可能性が考えられた。したがって、小胞体およびゴルジ体でのニカストリンの成熟・分解機構を解明することは、アルツハイマー病の原因因子と考えられている A $\beta$  産生を制御する方法の開発につながることで期待できる。

### 2. 研究の目的

我々は、A $\beta$  産生制御をプレセニリン複合体の構成因子の成熟・分解機構に焦点をあて、新規アルツハイマー病の治療薬の開発を目指した研究を行っている。これまでに、小胞体局在ユビキチンリガーゼであるシノピオリンがプレセニリン複合体の基本構成因子の1つであるニカストリンの分解および A $\beta$  産生促進に関与していることを明らかにした。したがって、小胞体およびゴルジ体でのニカストリンの成熟・分解機構を解明することは、アルツハイマー病の原因因子と考えられている A $\beta$  産生を制御する方法の開発につながることで期待できる。

### 3. 研究の方法

**ニカストリンの成熟機構の解明:** リボソームで翻訳されたニカストリンは小胞体へ送られ、糖鎖修飾後、小胞体シャペロンであるカルネキシンにより折りたたみ異常の有無を検査され、正常なニカストリンはゴルジ体へ送られ、折りたたみ異常なニカストリンはユビキチン-プロテアソーム系により分解される。ニカストリンは細胞内では糖鎖付加なし(分子量: 80 kDa)、糖鎖修飾が不完全な未成熟ニカストリン、糖鎖修飾が完全な成熟型ニカストリンの3種で存在しており、成熟型と未成熟型ニカストリンが主にウェスタンブロットで検出される。

**(1) ニカストリンの糖鎖修飾:** 小胞体局在ユビキチンリガーゼであるシノピオリンを欠損した細胞では、未成熟型ニカストリン量が増加するので、シノピオリンがニカストリンの成熟化に関与しているか検討を行う。具体的には、シノピオリン欠損細胞からニカストリンを免疫沈降し、ピオチン標識したレク

チンを用いて糖鎖修飾パターンを野生株と比較する。小胞体で正常に糖鎖修飾されたニカストリンはカルネキシンと相互作用することが報告されている。そこで、シノビオリン欠損細胞においてニカストリンの正常な糖鎖修飾が行われているかカルネキシンとの相互作用の検討を行う。ツニカマイシンなどの糖鎖プロセッシング阻害剤を用いて、糖鎖修飾パターンをシノビオリン欠損細胞と野生型で比較する。さらに、糖鎖プロセッシング阻害した場合の A $\beta$  産生量を調べる。シノビオリン欠損細胞と野生型での網羅的な糖鎖修飾パターンの解析を行う。

**(2) ニカストリンの品質管理機構の解明:** 上述したように小胞体内で行われる糖鎖修飾は、N 型糖鎖の付加であり、細胞内での糖タンパク質の品質管理を行っている。N 型糖鎖の付加を受けるニカストリンも小胞体で品質管理を受けてファールディング不全や過剰なニカストリンは分解を受けることが予想される。しかしながら、シノビオリン欠損細胞においては、糖鎖修飾が不完全な未成熟ニカストリンおよび未成熟ニカストリンよりも分子量がわずかに小さいニカストリン(ニカストリン S)の蓄積がウエスタンブロットにより検出される。これら蓄積した未成熟ニカストリンおよびニカストリン S の蓄積は品質管理が正常に機能していないと考えられるので、未成熟ニカストリンおよびニカストリン S の糖鎖状態を(1)同様に調べる。これらの結果は小胞体での品質管理機構におけるシノビオリンの役割の解明に繋がると考えられる。

**(3) ニカストリンの局在:** 小胞体において合成された新生タンパク質は糖鎖修飾や正しい折りたたみを受け、ゴルジ体へと送られる。一方、ゴルジ体からは複合体などに用いられなかったタンパク質や膜成分などが小胞体に送り返されてくる。そこで、蛍光標識したニカストリンを作成し、ニカストリンのトラフィックの可視化できる系を確立し、小胞体からゴルジ体、ゴルジ体から小胞体へのニカストリン輸送を検出する。さらに、ツニカマイシンなどの糖鎖プロセッシング阻害剤を用いて、糖鎖修飾を阻害した場合のニカストリンの局在がどのように変化するか調べる。

**成熟型ニカストリンの分解機構の解明:** 未成熟なニカストリンの細胞内量はシノビオリン欠損細胞で増加するが、成熟型ニカストリン量はそれほど増加が認められない。さらに、糖鎖修飾を受けていないニカストリン(分子量: 80 kDa)についても蓄積量に変化が観察されなかった。したがって、成熟型ニカストリンの分解には、シノビオリン以外にユビキチンリガーゼが存在するか、ユビキチン-プロテアソーム系以外の分解機構の存在が考えられる。

**(1) ユビキチン-プロテアソーム系を介した成熟ニカストリンの分解機構:** 上述したよ

うにシノビオリン以外にニカストリンの分解に関与しているユビキチンリガーゼが存在している可能性がある。そこで、糖タンパク質の分解に関与しているユビキチンリガーゼを中心にシノビオリン以外のユビキチンリガーゼの同定を行う。さらに、成熟型ニカストリン分解に関与するユビキチンリガーゼが A $\beta$  産生を促進するか検討を行う。また、なぜ数種類のユビキチンリガーゼがニカストリンの分解に関与しているのか、さらには、どのような使い分けがされているのか解析を行う。

**(2) ユビキチン-プロテアソーム系以外のニカストリンの分解機構:** ニカストリンはプロテアソームとリソソームで分解されることが報告されている (He G et al., J. Neurochem. 101: 982, 2007)。半減期が長いタンパク質の分解にはリソソームが関与している報告があり、成熟型ニカストリンの半減期も長いので、リソソームを中心に成熟型ニカストリンの分解機構の解析を行う。具体的には、リソソーム阻害であるクロロキンで処理し、成熟型ニカストリンの安定性の評価を行う。

**シノビオリンによる Rer1 分解機構:** 予備的な実験から、ゴルジ体から小胞体への送り返しに関与している Rer1 の分解にシノビオリンが関与している可能性が強く示唆された。そこで、Rer1 の分解にシノビオリンが関与しているか A $\beta$  産生制御の解析も含め詳細な解析を行う。研究に用いる Rer1 抗体および Rer1 発現プラスミドは共同研究者の Kaether 博士から分与していただいている。さらに、Rer1 以外に小胞体からゴルジ体へのタンパク輸送に関与している小胞体-ゴルジ体中間区画(ERGIC-53)もニカストリンと相互作用することも報告されていることから、ERGIC-53 の分解にもシノビオリンが関与しているか解析を行う。

**プレセニン複合体 ( $\gamma$ -セクレターゼ) の分解機構:** プレセニン複合体のうち、我々が明らかにしたニカストリンの分解機構と他のグループによりプレセニンが細胞質に存在するユビキチンリガーゼである Sel10 によって分解されることが報告されている (Li J et al., J. Neurochem. 82: 1540, 2002)。一方、APH-1 および PEN-2 の分解機構についてほとんど情報はないので、APH-1 および PEN-2 の分解機構に関わるユビキチンリガーゼの同定を行い、さらに、これらの分解に関わるユビキチンリガーゼも A $\beta$  産生を促進するか検討を行う。

#### 4. 研究成果

##### ニカストリンの成熟機構の解明:

**(1) ニカストリンの糖鎖修飾:** 糖鎖プロセッシング阻害剤であるツニカマイシンを用いて、ニカストリンの糖鎖修飾パターンをシノビオリン欠損細胞と野生型で比較を行った。その結果、野生型では成熟型のニカストリン

は検出されたが、未成熟型ニカストリンは検出されなかった。一方、欠損細胞では成熟型および未成熟型ニカストリンよりわずかに分子量が小さいと予想されるバンドが検出された。この検出されたバンドは、小胞体で折りたたみが正常に行われず、分解されるべき、マンノースが付加されたニカストリンであると予想された。

### (2) ニカストリンの品質管理機構の解明

(1)の結果をもとに、小胞体の品質管理機構に関するカルネキシンとニカストリンの相互作用の検討を行った。その結果、カルネキシンとニカストリンとの相互作用は検出されなかった。さらに、小胞体関連を制御するレクチンである OS-9 との相互作用を検討した結果、ニカストリンとの相互作用が検出されたが、(1)で予想されたマンノースが付加されたニカストリンであるかどうかの同定には至っていない。今後、ツニカマイシン処理し、OS-9 と相互作用しているニカストリンについて詳細な検討を行っていく。

### (3) ニカストリンの局在

SNAP-tag をニカストリンの C 末端に組み込んだプラスミドを作成しているが、細胞内でのニカストリンの発現が確認できず、現在 SNAP-tag 以外のプラスミドベクターも含めて検討中である。

### 成熟型ニカストリンの分解機構の解明：

#### (1) ユビキチン-プロテアソーム系を介した成熟ニカストリンの分解機構

#### (2) ユビキチン-プロテアソーム系以外のニカストリンの分解機構

成熟型ニカストリンの分解機構に関しては、オートファージやリリソームの関与の有無について検討を行っており、研究を継続中である。

### シノビオリンによる Rer1 分解機構

以前に我々は、シノビオリンを過剰発現させると、A $\beta$  の顕著な増加が認められ、未成熟ニカストリンの蓄積量は減少したこと報告した。この結果をさらに確実するために、シノビオリンの siRNA を用いたノックダウンおよびシノビオリンのドミナントネガティブである変異を用いて A $\beta$  産生に対する影響を検討した。その結果、シノビオリンの発現および機能阻害により、A $\beta$  産生の減少が認められ、未成熟のニカストリンの増加も観察された。そこで、ニカストリンを介するシノビオリンの A $\beta$  産生に関わる機構の解明を行った。まずは小胞体からゴルジの輸送に、または、ゴルジ体から小胞体の輸送に関わる因子に着目した。その中で、ニカストリンの小胞体からゴルジ体への輸送およびゴルジ体から小胞体の輸送に関わる因子である、Retention in endoplasmic reticulum 1 (Rer1) の発現がシノビオリン欠損細胞で増加していることを明らかにした。この増加はシノビオリンの過剰発現により消失し、シノビオリンの過剰発現により Rer1 のユビキチン化も促進されていた。これらの結果より、

Rer1 の分解にシノビオリンが関与していることが示唆された。また、Rer1 とシノビオリンの相互作用を検討したところ、Rer1 とシノビオリンの相互作用が認められた。さらに、シノビオリン欠損細胞における細胞膜上に発現しているニカストリンの発現量およびプレセニン複合体量の定量を行った。その結果、シノビオリン欠損細胞において細胞膜上のニカストリンおよびプレセニン複合体の発現量の減少が観察された。これらの結果より、ゴルジ体から小胞体への送り返しに関わっている Rer1 の分解にシノビオリンが関与している可能性が強く示唆された。シノビオリン欠損細胞では Rer1 の発現量が増加したために、ニカストリンのゴルジ体から小胞体への送り返しが促進されたために、プレセニン複合体も減少している可能性が示唆された。さらに、シノビオリン過剰発現による A $\beta$  産生増加は逆に Rer1 の細胞量が減少したために、ニカストリンの細胞内量それに続くプレセニン複合体の増加によって引き起こされた可能性が考えられた。また、Rer1 以外に小胞体からゴルジ体へのタンパク輸送に関与している小胞体 ゴルジ体中間区画(ERGIC-53)もニカストリンと相互作用することも報告されていることから、ERGIC-53 の分解にもシノビオリンが関与しているか解析を行ったところ、ERGIC-53 の発現レベルは野生型とシノビオリン欠損細胞とで同レベルであった。

### プレセニン複合体 ( $\gamma$ -セクレターゼ) の分解機構：

小胞体関連に関与している Homocysteine-induced ER protein (Herp) の分解機構についても解析を進めている。Herp は、プレセニン複合体のプレセニンと相互作用し、Herp の過剰発現は A $\beta$  産生を増加させる。また、Herp はシノビオリンと相互作用することが報告されている。そこで、シノビオリンが Herp の分解に関与しているシノビオリン欠損細胞を用いて解析を行った。その結果、シノビオリン欠損細胞において野生型と比較して Herp タンパク質レベルの増加が観察された。さらに、タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドを用いて Herp の安定性の解析を行った。その結果、シノビオリン欠損細胞では、Herp の分解の遅延が観察され、プロテアソーム阻害剤でも Herp の分解が抑制された。これらの結果から、シノビオリン欠損細胞で観察される Herp タンパク質レベルの増加は、Herp の分解が抑制され Herp が細胞内に蓄積したために生じたと考えられた。次に、シノビオリン 依存の Herp の分解においてユビキチン化されるリジン残基の同定を行った。その結果、すべてのリジン残基がシノビオリン 依存の Herp 分解に関与していないことが示唆された。また、すべてのリジン残基をアルギニンに置換した変異体を用いてユビキチン化の検出およびプロテアソームでの分解について検討を行った

結果、すべてをアルギニン残基に置換した変異体においてもユビキチン化およびプロテアソームでの分解が観察された。以上の結果より、Herp の分解にシノビオリンが関与していることが明らかとなり、その際、Herp 上のリジン残基は関与していないことが示された。さらに、Herp の分解にはリジン残基以外のアミノ酸のユビキチン化の関与が示唆された。今後は、Herp 分解に関与するリジン残基以外のアミノ酸のユビキチン化の同定を進めていく予定である。さらに、NADH quinone oxidoreductase 1(NQO1)が関与するユビキチン非依存プロテアソーム分解系での Herp の分解および、NQO1 との相互作用が認められた。これらの成果をまとめ、論文に投稿予定である。

#### 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 1 件)

Tanabe, C\*, Maeda, T\*, Zou, K., Liu, J., Liu, S., Nakajima, T., & Komano, H. (2012) The ubiquitin ligase synoviolin up-regulates amyloid  $\beta$  production by targeting a negative regulator of  $\gamma$ -secretase, Rer1, for degradation. *J Biol Chem* **287**, 44203-44211 \*These authors made equal contributions to this work. Corresponding author 査読有り  
doi: 10.1074/jbc.M112.365296.

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 前田智司、田邊千晶、鄒鶴、鈴木ひとみ、稲垣学人、劉俊俊、劉しゅ余、駒野宏人: The stability of endoplasmic stress-inducible Herp is regulated by synoviolin-mediated and ubiquitin-independent proteasomal degradation, 第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 (横浜)

2. 鈴木ひとみ、稲垣学人、田邊千晶、鄒鶴、Junjun Liu、Shuyu Liu、小亀浩一、前田智司、駒野宏人: 小胞体ストレス誘導タンパク質 Herp の分解機構の解析、日本生化学会 東北支部 第 78 回 例会・シンポジウム、2012 年 5 月 (山形)

3. 前田智司、田邊千晶、鄒鶴、劉俊俊、劉しゅ余、小亀浩市、駒野宏人: Synoviolin facilitates the degradation of an ER-stress-inducible protein, Herp. 第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 (京都)

4. 田邊千晶、前田智司、鄒鶴、劉俊俊、劉しゅ余、駒野宏人: Synoviolin is involved in the degradation of Rer1, thereby modulating Amyloid beta. 第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 (京都)

〔その他〕

著書

田邊千晶、前田智司、駒野宏人 アルツハイマー病にかかわるプロテアーゼ活性調節機構の解明を目指して、臨床検査 57 号 110、医学書院 (2013)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 智司 (MAEDA, Tomoji)

岩手医科大学薬学部・准教授

研究者番号: 60303294

(3) 連携研究者

駒野 宏人 (KOMANO Chiaki)

岩手医科大学薬学部・教授

研究者番号: 40170378

(3) 連携研究者

田邊 千晶 (TANABE Chiaki)

岩手医科大学薬学部・助教

研究者番号: 00552902