

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591703

研究課題名(和文) プレセニリン セクレターゼによるNICD、アミロイドなどの産生機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of presenilin gamma-secretase function on Abeta and NICD generation

研究代表者

田上 真次 (Tagami, Shinji)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40362735

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)：アミロイドベータ蛋白はアルツハイマー病の原因物質であり、ガンマセクレターゼという酵素によって産生されることがわかっているが、その詳細なメカニズムは不明である。本研究では細胞から精製したガンマセクレターゼとアミロイドベータ蛋白やその他の基質を試験管内で混合して、ガンマセクレターゼによる切断がどのように起こるのかを詳細に検討した。またガンマセクレターゼの他の基質の中で最も重要な分子であるNotch-1の切断機構についても解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Amyloid beta42 is a highly aggregatable and pathogenic molecule which triggers Alzheimer disease. Amyloid beta42 is generated by gamma-secretase. In this study, we performed in vitro study in which purified gamma secretase and substrates including amyloid beta42 are mixed. We performed enzyme kinetics study and elucidated how amyloid beta is generated. We also analyzed how amyloid beta42 inhibiting compounds (gamma secretase modulators) function. We also investigated NICD generating process by gamma secretase.

研究分野：医歯薬学

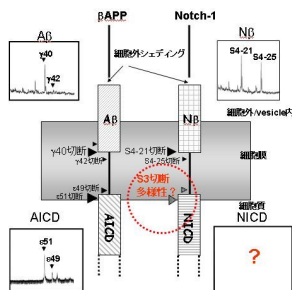
科研費の分科・細目：内科系臨床医学 精神神経科学

キーワード：アルツハイマー病 アミロイド セクレターゼ Notchシグナル プレセニリン

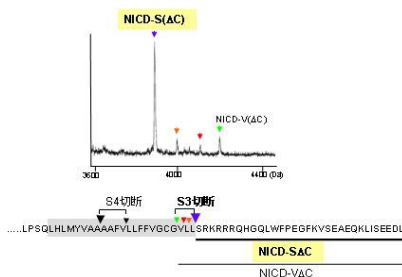
1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病(AD)脳に特異的に認められる老人斑の主たる構成成分は 42 アミノ酸からなる Amyloid beta42(Abeta42)であり、AD病理の本体はこの Abeta42 の凝集過程にあるのではないかと考えられている。Abeta は前駆体である betaAPP が BACE と セクレターゼによる段階的蛋白分解を受けて産生される。重要なことに近年、セクレターゼによる切断の正確さがプレセニリン(PS)や betaAPP の病原性突然変異だけではなく、NSAID などの薬剤により変化することがわかった。しかしながらこれらの薬剤の作用機序は不明であり、さらには Abeta 産生機構自体也未解明である。

セクレターゼには betaAPP 以外にも数十の基質がある。その中でも生物学的に最も重要な活性を持つのは Notch-1 受容体である。セクレターゼは Notch-1 の細胞膜ドメインを切断し(S3 切断) 幹細胞維持などに重要な役割を担う Notch シグナルに必須の分子、NICD を産生する。Abeta 産生を抑制したり(セクレターゼ阻害薬; GSI) 修飾したりする薬剤は(セクレターゼ修飾薬; GSM) 抗 AD 薬の最有力候補の一つであるが、これらの薬剤開発において、Notch シグナルを担う NICD 分子の産生に対する影響は副作用回避のために常に意識されている。しかしながら NICD を産生する S3 切断に関する知見は非常に乏しく他の切断と同じように多様性があるのかどうかさえ不明であった(左図) によって NICD 産生におけるこれらの薬剤の影響を詳細に調べることは困難であった。



我々は Abeta 産生機構の謎に迫るために、従来より betaAPP を含めた セクレターゼの複数の基質の分解機構を調べてきた。その過程で NICD を産生する S3 切断に多様性があることを世界に先駆けて発見した(左図)。



この多様性により、今まで細胞内には単一の NICD 分子しか想定されていなかったが、シグナル伝達活性の強い NICD 分子(NICD-V)と弱い分子(NICD-S)が生体内に産生されることを発見した。これらの特異的断端抗体を作ること

に成功し、さらに Notch シグナルを高感度で測定できるアッセイ系を確立した。この系を用いれば Notch 受容体を過剰発現しないより生理的な条件でシグナル強度を測定することが可能である。

本研究ではこれらの発見をもとにして Abeta 産生をターゲットとした GSI や GSM などの薬剤が Notch シグナルに及ぼす影響ならびにそれらの作用機序の解明を目指す。さらに複数の基質をセクレターゼがどのように切断しているのかを詳細に検討し、アルツハイマー病発症の key molecule である Abeta42 産生機構の解明に役立てる。

2. 研究の目的

認知症の約半数以上を占めるアルツハイマー病の根本治療において、最終的に Abeta を産生するセクレターゼを標的とした薬剤開発が精力的になされている。しかしながらセクレターゼは幹細胞維持などに重要な役割を担う Notch シグナルに必須の分子である NICD も産生する。よってセクレターゼを標的とした薬剤は重篤な副作用を惹起する危険性がある。本研究はセクレターゼによる NICD 産生機構を詳細に解析し、得られた知見をより副作用の少ないアルツハイマー病根本治療薬開発に役立てること、NICD と Abeta 産生機構の相違点を詳細に検討することで Abeta 産生メカニズムに関する基本的な知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

S3 切断の多様性が Abeta42 産生を特異的に阻害する薬剤により変化するかどうかの検討。今回、我々が発見したセクレターゼによる S3 切断の正確さが、Abeta42 の比較的産生量を増減させる効果を持つ薬剤により変化するかどうかを検討した。具体的には Notch-1 由来タンパク質と betaAPP を共発現する細胞を Abeta42 比較的産生量を下げ活性を持つ GSM 数種および Abeta42 比較的産生量を上げる活性を持つ inverse GSM 数種で処理をした。これらの濃度で分泌される Abeta42 量は変化することを確認し NICD-V の量と NICD-S の量が変化するかどうかを調べた。

セクレターゼによる S3 切断メカニズムの検討により得られた基礎的知識をもとにして、Abeta42 を産生する切断との比較検討を行った。さらに異なるいくつかのセクレターゼ基質を用いて検討を重ねた。これらの知見を総合的に把握して、病原性の高い Abeta42 がどのように産生されるのかを解析した。

4. 研究成果

S3 切断の多様性は、検討した GSM 数種および inverse GSM 数種により、いずれも変化

しなかった。また Notch シグナル強度にも影響を及ぼさなかった。以上の結果より、GSM は病原性の高い Abeta42 の産生をより選択的に阻害することが示唆された。

GSM がどのようなメカニズムで Abeta42 の比較的産生量を増減させているのかを詳細に検討した。具体的には細胞から精製したセクレターゼを様々な種類の基質と in vitro で混合し、切断の様式を MALDI-TOF MS で調べた。その結果驚くべきことに今まで product であると思われていた Abeta42 がセクレターゼによる切断を受けて、病原性のはるかに低い Abeta38 に代謝されることがわかった。そこで セクレターゼによる Abeta42 から Abeta38 への切断に、GSM が影響を及ぼしているのかどうかを詳細に検討した。その結果、重要なことに i) GSM は Abeta42 から Abeta38 への切断を促進している ii) GSM は Abeta42 が セクレターゼから解離するのを遅延させていることを発見した。これらの知見をまとめ、論文発表した。

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 7 件)

1. Okochi M, Tagami S, Yanagida K, Takami M, Kodama TS, Mori K, Nakayama T, Ihara Y, Takeda M. -Secretase Modulators and Presenilin 1 Mutants Act Differently on Presenilin/ -Secretase Function to Cleave A 42 and A 43. *Cell Reports* Vol.3 2013 pp42-51

2. Morihara T, Hayashi N, Yokokoji M, Akatsu H, Silverman MA, Kimura N, Sato M, Saito Y, Suzuki T, Yanagida K, Kodama TS, Tanaka T, Okochi M, Tagami S, Kazui H, Kudo T, Hashimoto R, Itoh N, Nishitomi K, Yamaguchi-Kabata Y, Tsunoda T, Takamura H, Katayama T, Kimura R, Kamino K, Hashizume Y, Takeda M. Transcriptome analysis of distinct mouse strains reveals kinesin light chain-1 splicing as an amyloid-accumulation modifier. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Vol.111 2014 pp2638-2643

3. Matsumura N, Takami M, Okochi M, Wada-Kakuda S, Fujiwara H, Tagami S, Funamoto S, Ihara Y, Morishima-Kawashima M. -Secretase associated with lipid rafts: multiple interactive pathways in the stepwise processing of -carboxyl-terminal fragment. *J Biol Chem*. Vol.289 2014 pp5109-5121

4. Sano S, Tagami S, Hashimoto Y, Yoshizawa-Kumagaye K, Tsunemi M, Okochi M, Tomonaga T. Absolute Quantitation of Low Abundance Plasma APL1 peptides at Sub-fmol/mL Level by SRM/MRM without

Immunoaffinity Enrichment. *J Proteome Res*. Vol.13 2014 pp1012-1020

5. Mitsuda T, Omi T, Tanimukai H, Sakagami Y, Tagami S, Okochi M, Kudo T, Takeda M. Sigma-1Rs are upregulated via PERK/eIF2 /ATF4 pathway and execute protective function in ER stress. *Biochem Biophys Res Commun*. Vol.415 2011 pp519-525

6. Kato K, Tanaka T, Sadik G, Baba M, Maruyama D, Yanagida K, Kodama T, Morihara T, Tagami S, Okochi M, Kudo T, Takeda M. Protein kinase C stabilizes X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) through phosphorylation at Ser(87) to suppress apoptotic cell death. *Psychogeriatrics*. Vol.11 2011 pp90-97

7. Kazui H, Yoshida T, Takaya M, Sugiyama H, Yamamoto D, Kito Y, Wada T, Nomura K, Yasuda Y, Yamamori H, Ohi K, Fukumoto M, Iike N, Iwase M, Morihara T, Tagami S, Shimosegawa E, Hatazawa J, Ikeda Y, Uchida E, Tanaka T, Kudo T, Hashimoto R, Takeda M. Different characteristics of cognitive impairment in elderly schizophrenia and Alzheimer's disease in the mild cognitive impairment stage. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra*. Vol.1 2011 pp20-30

[学会発表](計 21 件)

1. Tagami S, Okochi M, Takeda M. Symposium: "Regulation of presenilin/gamma-secretase function; towards intervention of Alzheimer disease in future". 11th World Congress of Biological Psychiatry Kyoto, Japan, June 26, 2013

2. Tagami S, Okochi M, Takeda M. Elucidation of the mechanism underlying the alteration of A 42 ratio by g-secretase modulators. Neuroscience 2013 Nanosymposium San Diego, California, November 11, 2013

3. Naoki Mizuta, Masayasu Okochi, Shinji Tagami, Kanta Yanagida, Takashi Kodama, Toshihisa Tanaka, Takashi Morihara, Takashi Kudo, Masatoshi Takeda. CSF APL1 28 is a possible surrogate marker for A 42 production in human brains Neuro2013 Kyoto, 2013.6.21

4. Naoki Mizuta, Masayasu Okochi, Shinji Tagami, Kanta Yanagida, Takashi Kodama, Toshihisa Tanaka, Takashi Morihara, Takashi Kudo, Masatoshi Takeda. APL1 28, a new candidate biomarker for Alzheimer disease. 11th World Congress of Biological Psychiatry Kyoto, Japan, June 24, 2013

5. Naoki Mizuta, Masayasu Okochi, Shinji Tagami, Kanta Yanagida, Takashi Kodama, Mako Takami, Yasuo Ihara, Daisuke Kanayama, Takashi Morihara, Takashi Kudo, Toshihisa

Tanaka, Masatoshi Takeda Degradation of extracellular A_{42/43} in human brain and cultured cells CTAD2013 San Diego, 2013.11.14

6. 柳田寛太,大河内正康、田上真次、児玉高志、武田雅俊 . Identification of APLP2-derived Ab-like peptides from human Cerebrospinal fluid. 11th World Congress of Biological Psychiatry Kyoto, Japan, June 27, 2013

7. Takashi. S. Kodama, Masayasu Okochi, Sinji Tagami, Kanta Yanagida, Naoki Mizuta, Toshihisa Tanaka, Takashi Morihara, Takashi Kudo, Masatoshi Takeda. Determination of APL1 β Peptide Concentration in Cerebrospinal Fluid (CSF) by ELISA. Neuro2013, 21 June 2013, Kyoto, International Conference Center.

8. Takashi. S. Kodama, Masayasu Okochi, Sinji Tagami, Kanta Yanagida, Naoki Mizuta, Toshihisa Tanaka, Takashi Morihara, Takashi Kudo, Masatoshi Takeda. Identification and quantitative analysis of APL1 β peptides in human cerebrospinal fluid (CSF). 11th World Congress of Biological Psychiatry Kyoto, Japan, June 27, 2013.

9. Kodama T.S., Okochi M., Tagami S., Yanagida K., Mizuta N., Tanaka T., Morihara T., Kudo T., Takami M., Ihara Y., Takeda M. Identification and quantitative analysis of short peptides derived from amyloid-beta peptides in living cell. IPA's 16th International Congress, 2 October 2013, Seoul Korea, COEX.

10. 大河内 正康 田上 真次 柳田 寛太 児玉 高志 武田 雅俊 セクレターゼ修飾薬のアルツハイマー病予防薬としての理論と実際 第31回日本認知症学会学術集会 2012.10.28 つくば国際会議場

11. 児玉 高志 大河内 正康 田上 真次 柳田 寛太 森原 剛史 田中 稔久 工藤 喬 朝長 毅 武田 雅俊 ヒト脳脊髄液中 APL1 ペプチドの高感度定量第31回日本認知症学会学術集会 2012.10.26 つくば国際会議場

12. 柳田 寛太 大河内 正康 田上 真次 児玉 高志 森原 剛史 田中 稔久 工藤 喬 武田 雅俊 APL2 の産生メカニズムの解析(1) APLP2 はプレセニン1と2で異なる切断を受ける 第31回日本認知症学会学術集会 2012.10.27 つくば国際会議場

13. 柳田 寛太 大河内 正康 田上 真次 児玉 高志 森原 剛史 田中 稔久 工藤 喬 武田 雅俊 APL2 の産生メカニズムの解析(2) APLP2 はプレセニン1と2で異なる切断を受ける 第31回日本認知症学会学術集会 2012.10.27 つくば国際会議場

14. 松村 展敬 高見 真子 田上 真次 大河内 正康 井原 康夫 森島 真帆 ラフトの セクレターゼによる APP 膜内段階的切断機構 第31回日本認知症学会学術集会 2012.10.26 つくば国際会議場

15. Masayasu Okochi, Kanta Yanagida, Shinji Tagami, Takashi Kodama, Shozo Sano, Takeshi Tomonaga, Takaomi C. Saido, Masatoshi Takeda. Characterization of brain APL2, an A β -like peptide produced from APLP2. Alzheimer's Association International Conference 2012. 2012.6.20. Vancouver Convention & Exhibition Centre

16. Shinji Tagami, Masayasu Okochi, Kanta Yanagida, Takashi Kodama, Takeshi Ikeuchi Takashi Morihara, Hitoshi Tanimukai, Hiroaki Kazui, Toshihisa Tanaka, Takashi Kudo, Masatoshi Takeda. Decrease in major amyloid beta species may trigger amyloidogenesis in vivo. 10th World Congress of Biological Psychiatry, Prague, Czech Republic, 2011.5.30

17. Shio Watanabe, Shinji Tagami, Shozo Sano, Kumiko Yoshizawa-Kumagaye, Masahiko Tsunemi, Masayasu Okochi and Takeshi Tomonaga. Absolute quantitation of plasma biomarker peptides for Alzheimer disease at pM level using SRM coupled with stable isotope standards and capture by anti-peptide antibodies. 日本ヒトプロテオーム機構第9回大会 新潟市朱鷺メッセ 2011.7.28-29

18. Shozo Sano, Shinji Tagami, Masayasu Okochi, Kumiko Yoshizawa-Kumagaye, Masahiko Tsunemi, Yoshio Kodera and Takeshi Tomonaga. Comparison of pretreatment methods for SISCAPA-SRM quantitation of Alzheimer disease biomarker peptide APL1 β in plasma. 日本ヒトプロテオーム機構第9回大会 新潟市朱鷺メッセ 2011.7.28-29

19. 田上 真次 大河内 正康 柳田 寛太 児玉 高志 池内 健 佐野聖三 渡邊 史生 数井 裕光 森原 剛史 谷向 仁 田中 稔久 工藤 喬 朝長 毅 武田 雅俊 BACE と セクレターゼによって産生される脳内 A β 様ペプチドを末梢血中で検出・同定する. 第30回日本認知症学会学術集会 タワーホール船堀 2011.11.11-13

20. 柳田 寛太 大河内 正康 田上 真次 児玉 高志 森原 剛史 田中 稔久 工藤 喬 武田 雅俊 APP ファミリー蛋白は脳内では主に BACE によって shedding を受けるが培養細胞に過剰発現させると - セクレターゼによる切断が増加する 第30回日本認知症学会学術集会 タワーホール船堀 2011.11.11-13

21. 渡邊 史生 田上 真次 佐野聖三 熊谷 久美子 常見 雅彦 大河内 正康 朝長 毅 Immuno-SRM/MRM を用いた新規アル

ツハイマー病血漿マーカーペプチド APL1
の絶対定量法の確立と臨床応用 第34回日本
分子生物学会 パシフィコ横浜
2011.12.13-16

〔図書〕(計 0件)

〔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：

ホームページ等

http://www.osaka-u.ac.jp/en/research/annual-report/volume-9/100_select_paper/biology02.html

http://www.osaka-u.ac.jp/en/research/annual-report/volume-11/100_select_paper/copy6_of_science02.html

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/psy/www/jp/labo/kagaku.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田上 真次 (TAGAMI SHINJI)
大阪大学大学院医学系研究科・助教
研究者番号：40362735

(2) 研究分担者

大河内 正康 (OKOCHI MASAYASU)
大阪大学大学院医学系研究科・講師
研究者番号：90335357

(3) 連携研究者

武田 雅俊 (TAKEDA MASATOSHI)
大阪大学大学院医学系研究科・教授
研究者番号：00179649