

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500433

研究課題名(和文) 脳セクレターゼ活性の解析とその活性変化がアルツハイマー病発症に及ぼす意義

研究課題名(英文) Characterization of gamma-secretase activity in the brain and its significance in the development of Alzheimer's disease

研究代表者

森島 真帆 (Morishima, Maho)

北海道大学・薬学研究科(研究院)・客員准教授

研究者番号：50204722

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：アミロイドタンパク質(A $\beta$ )の脳内蓄積はアルツハイマー病の発症を引き起こすが、孤発性アルツハイマー病ではA $\beta$ が蓄積する原因は不明である。本研究では、その原因として脳セクレターゼの活性変化を想定し、検証した。脳のセクレターゼ活性の領域特異的、発達段階および加齢依存的な変化を調べ、活性量とA $\beta$ の沈着、年齢、アルツハイマー病危険因子などとの関連性を検討した。その結果、脳セクレターゼ活性の量的変化がA $\beta$ の蓄積を生じるのではないらしいということが明らかになった。活性の質的变化については現在も解析中である。

研究成果の概要(英文)：To learn whether altered brain  $\gamma$ -secretase activity contributes to the deposition of amyloid  $\beta$ -protein (A $\beta$ ) in the sporadic Alzheimer's disease patients,  $\gamma$ -secretase activity in the brain was assessed using in vitro reconstituted A $\beta$  generation system in the presence of CHAPSO.  $\gamma$ -Secretase activity in the brain was regulated in the developmental stage-dependent manner. The regional distribution and age-dependent alteration of the  $\gamma$ -secretase activity were little correlated with various indexes of A $\beta$  deposition as well as risk factors for AD. Thus, the quantitative alteration of  $\gamma$ -secretase activity during aging may not be involved in the pathological A $\beta$  deposition in the brain. Further analysis regarding the modulation of  $\gamma$ -secretase activity (variability of cleavage sites) in the brain is ongoing.

研究分野：神経化学

キーワード：アミロイド タンパク質 アルツハイマー病 セクレターゼ

### 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病は老年期の代表的な認知症疾患で、脳内にアミロイドβタンパク質(Aβ)が蓄積することにより発症すると考えられている。Aβ沈着を引き起こす原因は、遺伝性アルツハイマー病患者では、原因遺伝子であるアミロイド前駆体タンパク質(APP)やプレセニリンの変異が、Aβ分子あるいはその産生状況を変化させることによってAβの脳内沈着を促進することが示されている。しかしながら、アルツハイマー病の90%以上を占める孤発性アルツハイマー病患者の場合は、Aβ沈着を増加させる要因がまだ明らかになっていない。

γセクレターゼは、AβのC末端側の位置でAPPを切断しAβを産生するプロテアーゼであり、産生するAβの長さ、即ち分子種を決定する。従って、その活性の性質は、Aβの凝集性、ひいては沈着の程度に大きく影響する。γセクレターゼは、アルツハイマー病治療薬の標的として盛んに研究されているが、その性質にはまだ不明の点が多い。特に、脳のγセクレターゼに関する情報は少ない。γセクレターゼの基質はAPP以外にも存在するが、近年、ヒト髄液中のそれらの切断産物の解析により、孤発性アルツハイマー病患者と正常人では、γセクレターゼの切断活性が少し異なっていることが報告されている(Yanagida K, *et al.*, 2009; Hata S, *et al.*, 2011)。このことは、孤発性アルツハイマー病においても、γセクレターゼの切断活性が変化し、それが産生されるAβに変化を生じて沈着を促進している可能性を示唆する。

### 2. 研究の目的

本研究では、脳のγセクレターゼ活性の特徴を調べ、その活性の性質の変化がアルツハイマー病発症に関わるAβ沈着を引き起こす要因となり得るかどうかについて検討を行う。脳のγセクレターゼ活性の基本的性質として、領域特異性と各発達段階における活性の変化を調べ、Aβ沈着との関係を探る。また、ヒト脳でγセクレターゼの活性の加齢(老化)に伴う変化を調べ、Aβ沈着量などアルツハイマー病発症に関わる他の様々な要因と比較検討する。これにより、γセクレターゼの活性の変化が、孤発性アルツハイマー病でも遺伝性アルツハイマー病と同様に、発症を引き起こす要因と成り得るかどうかを明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) セクレターゼ活性の測定

γセクレターゼ活性は、CHAPSO存在下での*in vitro*再構成Aβ産生系を用いて測定した。脳からミクロソーム画分を調製して1%CHAPSOで可溶化した。遠心後の上清あるいは懸濁液に基質を加えて、37℃でインキュベートした。基質には、バキュロウイルスを用いてSf9細胞に発現させFLAG抗体で精製

したC99-FLAGを使用した。産生されたAβは特異抗体を用いてwestern blot法により検出・定量した。

#### (2) 脳内Aβ沈着量の定量

脳に沈着するAβは、可溶性Aβ除去後に不溶性Aβをグアニジン塩酸で抽出し、サンドイッチELISA法を用いて定量した。

### 4. 研究成果

#### (1) 脳γセクレターゼ活性の領域特異性

2ヶ月齢マウスの脳を、大脳皮質、海馬、間脳、脳幹、小脳に分けてミクロソーム画分を調製し、各領域に含まれるγセクレターゼ活性を*in vitro*再構成Aβ産生系を用いて測定した。脳のγセクレターゼ活性は大脳皮質で高い傾向を示した。しかしながら領域間での活性の相違は小さく、有意な差は見られなかった。この結果から、γセクレターゼの活性の強弱が、その脳領域におけるAβの沈着し易さ、沈着量を決定する可能性は低いと考えられる。

#### (2) 脳発達段階におけるγセクレターゼ活性の変化

胎生期以降の種々の発達段階のマウスの大脳皮質を用いて、ミクロソーム画分を調製しγセクレターゼ活性を測定した。その結果、胎生期の脳では、γセクレターゼ活性が著しく高いことが明らかになった(図1)。γセク

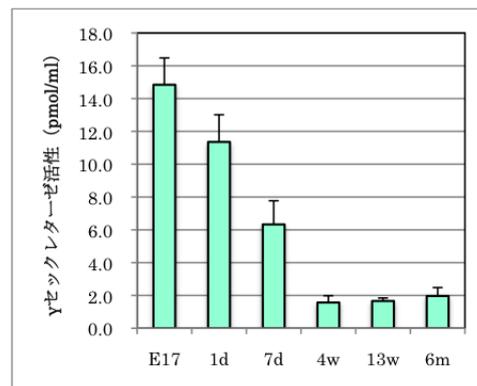


図1. 脳発達段階におけるγセクレターゼ活性の変化

レーターゼ活性は、生後、徐々に低下し、4週齢以降はほぼ定常状態になった(図1)。γセクレターゼ複合体酵素を構成する4つの分子の各発達段階における発現量をwestern blot法で調べたところ、活性の変化のパターンはγセクレターゼ構成分子の発現量の変化とよく一致していることが分かった。従って、脳発達段階においては、γセクレターゼ構成分子の量的変化によりγセクレターゼの活性量が制御されている可能性が示唆された。

胎児期の脳は高いγセクレターゼ活性を示したが、Aβの沈着はほとんど検出されない。従って、この結果もまた、γセクレターゼの活性の高さとAβの沈着には直接的な関係が

見られないということを示唆した。発達期ではなく老齢期になると別の要因が加わって関係するようになるのかもしれない。また、この結果は、 $\gamma$  セクレターゼが胎児期に重要な働きをする胎児型酵素であることを示唆している。 $\gamma$  セクレターゼによる Notch の切断は、この時期の神経細胞の分化・発達に必須であることが知られているが、生理的機能が未だに不明の  $A\beta$  も、胎児期において生理学的に重要な機能を持つ可能性が考えられる。

次に、産生される  $A\beta$  の分子種について調べた。その結果、6 ヶ月齢まではほとんど変化が見られなかったが、加齢が進行して 24 ヶ月齢になると、 $\gamma$  セクレターゼ活性の緩やかな低下とともに、 $A\beta_{40}$  に対する  $A\beta_{42}$  の割合が増加する傾向が見られた。この結果は、加齢に伴って  $\gamma$  セクレターゼ活性が修飾され、切断部位の変化により産生される分子種が変化する可能性を示唆する。

### (3) ヒト脳 $\gamma$ セクレターゼ活性とアルツハイマー病病理形成との関係

$A\beta$  の脳内沈着はアルツハイマー病の発症より 10 年から 20 年先行して起こると考えられている。そこで  $A\beta$  沈着の初期変化との関連性を調べるために、40 歳代から 80 歳代の認知機能が正常な人、約 60 例の脳の  $\gamma$  セクレターゼ活性を測定した。脳は前頭葉皮質の一定領域を用いた。また、脳内の  $A\beta$  蓄積量を ELISA 法で定量した。

ヒト脳の  $\gamma$  セクレターゼ活性は、各個人の間で約 10 倍の範囲でヴァリエーションがあった。まず、アルツハイマー病である脳内  $A\beta$  蓄積量と  $\gamma$  セクレターゼ活性との関係について検討した。その結果、 $\gamma$  セクレターゼ活性は、蓄積する全  $A\beta$  の量とは全く相関しないことが分かった(図 2)。また  $\gamma$  セクレターゼ活性は、脳に蓄積する  $A\beta_{42}$  あるいは  $A\beta_{40}$  の量、 $A\beta_{42}$  の全  $A\beta$  に対する割合ともほとんど相関が見られなかった。従って、脳内に蓄積する全  $A\beta$  および  $A\beta$  各分子種の量

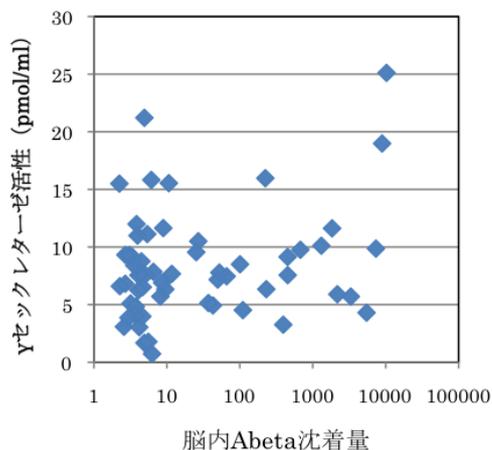


図 2.  $\gamma$  セクレターゼ活性と  $A\beta$  沈着量

は、その脳部位の  $\gamma$  セクレターゼの活性強度には依存しないことが明らかになった。

アルツハイマー病では加齢が重要な危険因子であるので、次に、加齢に伴う脳  $\gamma$  セクレターゼ活性の変化を調べた。その結果、 $\gamma$  セクレターゼ活性と年齢との間には相関関係が見られないことが分かった。また、中年期から老年期の間では活性量が年齢依存的に変化しないことが明らかになった(図 3)。また、アルツハイマー病の最大の危険因子であるアポリタンパク質 E の遺伝子多型との関連についても調べた。しかし、アポリタンパク質 E 遺伝子型による活性の相違は観察されなかった。

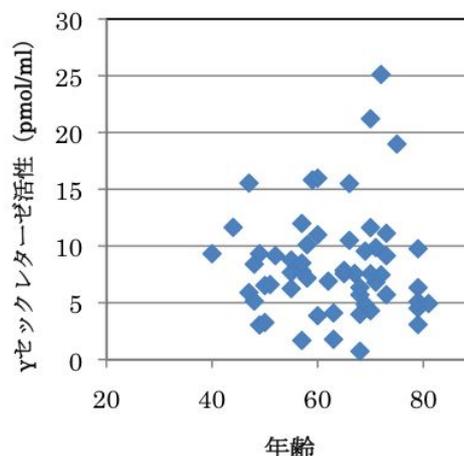


図 3. 加齢における  $\gamma$  セクレターゼ活性の変化

以上の結果から、アルツハイマー病の発症や  $A\beta$  病理形成には、脳  $\gamma$  セクレターゼ活性の量的変化が関与していないらしいということが明らかになった。一方、 $\gamma$  セクレターゼ活性の質的变化、即ち切断活性の修飾については、マウス脳でその傾向が観察されたこともあり、さらに検討が必要である。本研究では質的变化を検出するために精力的に研究を進めてきた。しかし、*in vitro* 再構成  $A\beta$  産生系で産生された  $A\beta$  を各分子種毎に解析する際に、最も重要な分子種である  $A\beta_{42}$  の検出感度が低く、安定的に定量することは困難であった。現在もさまざまな方法で改善を試みており、今後も解析を継続して、 $\gamma$  セクレターゼ活性の質的变化、すなわち切断部位の変化と疾患発症の関係を明らかにしていきたい。

### 引用文献

Yanagida K, Okochi M, Tagami S, *et al.* (2009) The 28-amino acid form of an APLP1-derived  $A\beta$ -like peptide is a surrogate marker for  $A\beta_{42}$  production in the central nervous system. *EMBO Mol Med.* 1, 223-235

Hata S, Fujishige S, Araki Y, *et al.* (2011) Alternative processing of  $\gamma$ -secretase substrates in common forms of mild cognitive

impairment and Alzheimer's disease: evidence for  $\gamma$ -secretase dysfunction. *Ann Neurol.* 69, 1026-1031

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 3 件)

Matsumura N, Takami M, Okochi M, Wada-Kakuda S, Fujiwara H, Tagami S, Funamoto S, Ihara Y, Morishima-Kawashima M. (2014)  $\gamma$ -Secretase associated with lipid rafts: Multiple interactive pathways in the stepwise processing of  $\beta$ -carboxyl terminal fragment. *J Biol Chem*, 289, 5109-5121, 査読有  
DOI: 10.1074/jbc.M113.510131

Omori C, Kaneko M, Nakajima E, Akatsu H, Waragai M, Maeda M, Morishima-Kawashima M. Saito Y, Nakaya T, Taru H, Yamamoto T, Asada T, Hata S, Suzuki T; Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. (2014) Increased levels of plasma p3-Alc $\alpha$ 35, a major fragment of Alcadeina by  $\gamma$ -secretase cleavage, in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 39, 861-870, 査読有  
DOI: 10.3233/JAD-131610

Kang MS, Baek SH, Chun YS, Moore AZ, Landman N, Berman D, Yang HO, Morishima-Kawashima M. Osawa S, Funamoto S, Ihara Y, Di Paolo G, Park JH, Chung S, Kim TW. (2013) Modulation of lipid kinase PI4KII $\alpha$  activity and lipid raft association of presenilin 1 underlies  $\gamma$ -secretase inhibition by ginsenoside (20S)-Rg3. *J Biol Chem*, 288, 20868-20882, 査読有  
DOI: 10.1074/jbc.M112.445734

### 〔学会発表〕(計 6 件)

白木柚葉, 河野高德, 千葉杏子, 森島真帆, 山本融, 鈴木利治. Alcadeinによるkinesin-1活性と膜小胞輸送制御機構. 第85回日本生化学会大会, 2012.12.16, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡県・福岡市)

本館利佳, 齋藤優実, 森島真帆, 齋藤有紀, 鈴木利治. X11Lの構造変換によるAPPの輸送・代謝制御機構. 第85回日本生化学会大会, 2012.12.15, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡県・福岡市)

江波綾佳, 朴懿, 森島真帆, 羽田沙緒里, 鈴木利治. Alcadein代謝産物による機能発現. 第85回日本生化学会大会, 2012.12.15, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡県・福岡市)

木村尚紀, 齋藤有紀, 井上剛, 森島真帆, 鈴木利治. てんかん発作、アルツハイマー病発症におけるX11/X11Lの関与. 第85回日本生化学会大会, 2012.12.15, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡県・福岡市)

蘇武佑里子, 古郡慶子, 森島真帆, 羽田沙緒里, 鈴木利治. Alcadeinのリン酸化. 第85回日本生化学会大会, 2012.12.15, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡県・福岡市)

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, 2012.10.26, つくば国際会議場(茨城県・つくば市)

### 〔図書〕(計 2 件)

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, Cold Spring Harbor, New York, 全 511 ページ (359-385)

森島真帆. (2012) 代謝相互関係, 有機化学概説. デブリン生化学 臨床の理解のために 原書 7 版, 丸善出版, 全 1485 ページ (1073-1125, 1425-1436)

## 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・客員准教授  
研究者番号: 50204722

### (2) 研究分担者

なし