

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860251

研究課題名(和文) ライフサイクルからのネプリライシン制御によるアルツハイマー病新規創薬標的の探索

研究課題名(英文) Screening of Alzheimer's disease therapeutic targets based on neprilysin life cycle

研究代表者

垣矢 直雅 (KAKIYA, NAOMASA)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：20383903

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、ネプリライシン活性の制御機構として、局在が細胞内ドメインのリン酸化により制御されることを明らかにしており、その過程で、細胞内ドメインがネプリライシン自身の代謝・アロステリックな活性変化にも関与する可能性を見出している。本研究では前述の可能性を検討し、ネプリライシンのライフサイクルの全容を明らかにすることで、ネプリライシン活性制御を基盤としたアルツハイマー病 予防・治療のための創薬標的を多角的に提起することに成功した。

研究成果の概要(英文)：I have already shown a regulatory mechanism in neprilysin localization dependent on phosphorylation and dephosphorylation. While, I also found out the possibility that phosphorylation of neprilysin may be involved in the metabolism and allosteric activation. In this study, I succeed to reveal the relationship between neprilysin phosphorylation and metabolism.

研究分野：生化学

キーワード：アルツハイマー病 ネプリライシン

1. 研究開始当初の背景

(1)アルツハイマー病 (AD) は、脳内におけるアミロイドβペプチド (Aβ) の代謝異常に起因する代謝異常疾患であるとも考えられており、Aβの過剰な蓄積がAD病理像の特徴の一つとして観察される。Aβは正常時には速やかに代謝分解されているが、加齢に伴うAβ分解能の低下に伴い脳内でその蓄積が始まると考えられている。故に、Aβの分解を司る酵素の発見が待たれた。2000年、Aβの主要分解酵素としてネプリライシンが脳内で機能していることが申請者らの研究室で同定されたのを皮切りに、ADにおけるネプリライシンの占める役割の重要性がこれまでに強く示唆されてきた (Nature medicine 6, 143-151, 2000)。さらに申請者らの研究室から神経ペプチドであるソマトスタチンが、ネプリライシンの活性増強因子として作用することを報告した (Nature medicine 11, 434-439, 2005)。これは、ネプリライシン活性増強によるAβ分解促進法として、現在も製薬企業と共同研究が行われている。

(2)一方、ネプリライシンが加齢依存的に、発現・活性が減少する事も明らかとなり (Nature 429, 883-891, 2004)。「ネプリライシンの活性低下を如何に食い止めるか」は、ADの予防の観点からも、非常に重要な意義を持つ。そのためには、ネプリライシンの活性制御機構を網羅的に明らかにする必要がある。申請者は、神経栄養因子であるBDNF, NGF, NT-3, NT-4がネプリライシンの細胞質ドメインのリン酸化制御を介して神経細胞膜上の局在を減少させること、反対に脱リン酸化酵素 protein phosphatase 1 (PP1) がネプリライシンの細胞膜上への局在を増加させること、そして、ネプリライシンの活性・局在制御ドメインを同定し、ネプリライシンの局在とそのドメインのリン酸化変化の間に深い関係性があることを明

らかにしてきた (J. Biol. Chem. 287, 29362-72, 2012)。

(3)この研究を進めて行く中で、申請者は、ネプリライシン細胞質ドメインのリン酸化サイトの変異に依存して、ネプリライシン自身の代謝が促進される可能性や、ネプリライシンのアロステリックな変化を引き起こしている可能性を見出すことができた。しかし、多くのタンパク質では、リン酸化だけではなく、他の修飾機構 (メチル化、アセチル化、ニトロ化など) と協調的に作用して、タンパク質のライフサイクルが制御されていることが、これまでに数多く報告されている。そこで本研究では、ネプリライシンのリン酸化に主眼を置きつつ、ネプリライシン細胞質ドメインの修飾が、ネプリライシンの多様な機能制御に作用する可能性を検討し、ネプリライシンのライフサイクルの全容を明らかにすることを目指す。最終的には、ネプリライシンを中軸とした、ADに対する根本治療・予防を見据えた新規創薬標的を多角的に提起することを目的とする。

2. 研究の目的

(1)アルツハイマー病 (AD) は、脳内でのアミロイドβペプチド (Aβ) の代謝異常に起因した、病理症状を主因とする。Aβの主要分解酵素:ネプリライシンが同定されてから、ネプリライシン活性を制御することが、AD治療戦略の有力な選択肢の一つと考えられている。

(2)申請者は、ネプリライシン活性の制御機構として、局在が細胞内ドメインのリン酸化により制御されることを明らかにしており、その過程で、細胞内ドメインがネプリライシン自身の代謝・アロステリックな活性変化にも関与する可能性を見出している。本研究では前述の可能性を検討し、ネプリライシンのライフサイクルの全容を明らかにすること

で、ネプリライシン活性制御を基盤とした AD 予防・治療のための創薬標的を多角的に提起することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) これまでに、ネプリライシンの細胞内ドメインに位置する N 末端に 5 ヶ所のリン酸化サイトが存在することを、それぞれに特異的なリン酸化抗体を作製して確認している。しかし、ネプリライシンの細胞内ドメインがどのような修飾状態にあるか、完全には明らかにされていない。タンパク質の細胞内ドメイン修飾の役割として、タンパク質の代謝（安定性）、アロステリック変化などに関与することがこれまでに示されている。そこで、LC/MS/MS によりネプリライシンの細胞内ドメインの修飾状態を明らかにする。

(2) ネプリライシンの代謝経路としては、細胞質ドメインの修飾をきっかけに細胞内に取り込まれて分解されるか、細胞外に分泌されることが想定された。しかし、培養上清中に分泌型ネプリライシンの存在が確認されなかったことから、ネプリライシンは細胞内で分解されていると想定している。

そこで、ネプリライシンを発現する細胞に、主要な分解経路の阻害剤を処理し、ネプリライシンの発現量を比較することで関与する分解系の同定を行う。もしくは、ネプリライシンの N 末端もしくは C 末端に Flag タグを加えた発現ベクターを構築し、細胞に発現させる。そして、この発現細胞から Flag に対する免疫沈降法とイムノプロット法によりネプリライシンの分解パターンを検出する。そして、ネプリライシンの分解パターンから、ネプリライシンの分解に関与する分解経路を絞り込み、最終的には、RNAi 等によりネプリライシン分解因子を同定していくことも視野に入れる。

また、計画 1. で確認された修飾サイトに変

異を導入したネプリライシン変異体を用いて、ネプリライシンの発現量、活性比を比較することで、代謝（安定性）、アロステリック変化に関するネプリライシンの細胞内ドメイン修飾サイトを同定する。

(3) ネプリライシンの細胞内ドメインの修飾状況に依存した代謝・酵素活性調節が、多様な修飾機構を介して、協調的に行われている可能性が想定される。そのため、ネプリライシンが細胞内ドメインの修飾状態に応じて、代謝機構・アロステリック変化へと移行する際に要求される正確な修飾状況を明らかにする必要があり、下記の実験を計画している。

計画 2. で確認された代謝（安定化）に関与するサイトの機能を抑制する事により、ネプリライシンの発現量の低下が見込まれる。この発現量の低下を、計画 2. で同定された分解経路を抑制することで阻害し、分解を免れたネプリライシンを LC/MS/MS により解析を行う。計画 1. の結果と比較することで、分解されるシグナルを有するネプリライシンの細胞内ドメインの修飾状態を明らかにする。

また、アロステリックな酵素活性制御メカニズムに関しては、ネプリライシンの酵素活性部位が細胞外領域にあり、細胞内ドメインの修飾変化が酵素活性部位の構造変化を直接誘起している可能性は考えづらく、細胞内ドメインの修飾変化を契機とした介在機構の存在が推察される。そこで、このメカニズムを明らかにしつつ、更には、計画 2. で確認されたネプリライシンの細胞内ドメイン修飾サイトに変異を導入したネプリライシン体の LC/MS/MS による解析、詳細な Km 値の測定、更には酵素活性部位の X 線構造解析を計画している。

(4) 本研究ではネプリライシンを中軸とした、AD に対する根本治療・予防を見据えている。

したがって、計画2.3.において薬剤標的となるネプリライシンの細胞内ドメインサイト、修飾状態、及びその修飾制御因子を明らかにしておく必要がある。最終的に、ADモデルマウスでネプリライシン細胞内ドメインの修飾制御因子のAD関連症状に対する効果を、Morris water maze, Y mazeなどの行動解析などから評価を行い、また、その際に、脳内Aβの定量と組織化学的な解析も行う。以上の結果から、実際に生体内でもこの同定された因子が、ネプリライシンの代謝・酵素活性メカニズムに関与しているかを評価することが出来る。

4. 研究成果

(1)申請者は、ネプリライシン活性の制御機構として、局在が細胞内ドメインのリン酸化により制御されることを明らかにしており、その過程で、細胞内ドメインがネプリライシン自身の代謝・アロステリックな活性変化にも関与する可能性を見出している。本研究では前述の可能性を検討し、ネプリライシンのライフサイクルの全容を明らかにすることで、ネプリライシン活性制御を基盤としたアルツハイマー病 予防・治療のための創薬標的を多角的に提起することを目標としている。

(2)これまでに、LC/MS/MSによりネプリライシンの修飾状態についての解析を行っている。そして、ネプリライシンの修飾状態に応じた代謝システムの存在を確認している。

現在、この修飾状態を変化させることでネプリライシン代謝システムを制御することを試みている。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

発表者：垣矢直雅、発表演題：phosphorylation controls neprilysin cell surface localization and extracellular Aβ level、学会名：第58回 日本神経化学会大会、発表年月日：2015年9月12日、発表場所：「大宮ソニックシティー（埼玉県・さいたま市）」

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

垣矢 直雅 (KAKIYA Naomasa)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：20383903