

<研究課題> γ -セクレターゼ特異的に作用するユビキチンリガーゼを標的としたアミロイド β 抑制薬の基盤研究

代表研究者 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 准教授 金子 雅幸
共同研究者 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 教授 今泉 和則

【まとめ】

我々は、アルツハイマー病の原因タンパク質アミロイド β の前駆体タンパク質 (APP) のプロセッシングに関与する膜貫通型のユビキチンリガーゼ RNF19A と RNF19B を同定した。これらのユビキチンリガーゼは、APP の局在を調節することで、 γ -セクレターゼによる APP のプロセッシングに影響する可能性が示唆された。また、これらのユビキチンリガーゼの基質の候補として、APP の局在制御に関連することが報告されている 14-3-3 ϵ を同定した。

1. 研究の目的

我々は、アルツハイマー病 (AD) の原因タンパク質アミロイド β ($A\beta$) の前駆体タンパク質 (APP) の分解に関与する膜貫通型のユビキチンリガーゼ (タンパク質の分解・輸送・情報伝達に関わるユビキチン化を行う酵素) HRD1 が、AD 患者の脳皮質で減少することを発見した (Kaneko, et al., J Neurosci, 2010)。さらに、HRD1 と類似した膜貫通型ユビキチンリガーゼを新規に 44 種同定した。その中で、発現抑制により $A\beta$ の産生量が特異的に低下するユビキチンリガーゼとして RNF19A と RNF19B を見出した。さらに、RNF19A を欠損したノックアウトマウスにおいても $A\beta$ の産生量が減少することを証明した。このことから、RNF19A・19B を直接抑制、もしくはその関連分子を制御できれば、特異的な $A\beta$ 抑制薬の開発が可能となり、これまで根本的治療薬が存在せず、治療薬の開発が急務である AD に対する画期的な治療薬となることが期待される。本研究は、膜貫通型ユビキチンリガーゼ RNF19A および RNF19B による $A\beta$ 産生調節機構を明らかにすることで、AD の創薬ターゲットを提案することを目的とした。

2. 研究方法と経過

2-1 RNF19A・19B 発現抑制による APP プロセッシングへの影響

APP は α -および β -セクレターゼによってプロセッシングを受け、それぞれ C 末端断片である CTF α と CTF β を生じる。さらに、 γ -セクレ

ターゼによって、それぞれ P3 と $A\beta$ を生じる。したがって、RNF19A・19B の発現抑制による CTF 量の変化を解析することで、どのセクレターゼのプロセッシングに RNF19A・19B が関与するかが明らかとなる。そこで、APP プロセッシングの過程で生じる分泌型 sAPP α ・sAPP β および P3・ $A\beta$ 量を解析することで、 γ -セクレターゼへの関与の詳細を明らかにした。

2-2 RNF19A・19B と APP・ γ -セクレターゼの局在および結合

RNF19A・19B が APP および γ -セクレターゼと共局在するか、脳組織および神経細胞内の局在を免疫染色によって確認した。また、RNF19A・19B と APP および γ -セクレターゼとの結合について、免疫沈降により確認した。

2-3 RNF19A・19B 発現抑制による APP の局在変化

予備的実験で、RNF19A・19B の発現抑制によって、APP の神経細胞内局在が変化することが判明している。そこで、その局在変化についてさらに詳細に検討するため、各オルガネラにおける APP の変化について、免疫染色法により解析した。

2-4 RNF19A・19B に結合するタンパク質の同定

RNF19A・19B と結合するタンパク質 (基質を含む) を同定するため、RNF19A・19B の免疫沈降によって沈降したタンパク質を質量分析により同定した。

3. 研究の成果

3-1 RNF19A・19B 発現抑制による APP プロセッシングへの影響

RNF19A・19B の発現抑制による $A\beta$ 産生抑制機構を明らかにするため、APP プロセッシングの過程で生じる分泌型 sAPP α ・sAPP β を解析した結果、いずれも産生量に有意な変化は認められなかった。この結果から、RNF19A・19B の発現抑制による $A\beta$ 産生低下は、 γ -セクレターゼの関与が示唆された。

3-2 RNF19A・19B と APP・ γ -セクレターゼの局在および結合

両ユビキチンリガーゼにおいて、一方のユビキチンリガーゼの発現を低下させると代償機構が働くことなく、APP の分解能が低下することが判明した。これらのことから、RNF19B および RNF19A の両ユビキチンリガーゼが複合体を形成する可能性が考えられた。そこで、免疫染色法を用いて、マウス脳組織における RNF19B と RNF19A の局在を確認したところ、両ユビキチンリガーゼは海馬および大脳皮質などの神経細胞に選択的に発現し、共局在していた。また、SH-SY5Y 細胞における RNF19B と RNF19A の局在を確認したところ、両ユビキチンリガーゼは小胞体に発現し、共局在していた。さらに、免疫沈降を行ったところ、RNF19B と RNF19A が共沈したことから、両ユビキチンリガーゼは複合体を形成していることが判明した。以上の結果より、RNF19B と RNF19A は中枢の神経細胞において複合体を形成することで機能している可能性が示唆された。一方、RNF19B と RNF19A と APP、presenilin が共局在するか検討したところ、いずれも APP や presenilin と共局在することが示された。

3-3 RNF19A・19B 発現抑制による APP の局在変化

RNF19A 発現抑制に伴う CTF β の局在変化について解析した結果、RNF19A の発現抑制によって、CTF β の後期エンドソームとリソソームへの局在が増加した。このことから、RNF19A は CTF β のリソソームへの輸送を調節することで、 γ -セクレターゼへの CTF β の輸送と A β 産生量を制御している可能性が示唆された。さらに、RNF19B を安定的に発現する細胞を樹立し、RNF19B の局在と機能について解析を行った。その結果、RNF19B を発現する細胞では、RNF19B は小胞体に加え、後期エンドソームに多く局在することが判明した。この結果は、RNF19B が初期エンドソームからライソソームへの CTF β の輸送へ関わる結果と一致するものであった。

3-4 RNF19A・19B に結合するタンパク質の同定：RNF19A・19B による A β 産生機構を明らかにするため、RNF19A に結合するタンパク質を質量分析により同定した。その結果、14-3-3 ϵ が RNF19A と結合することが判明した。

14-3-3 ファミリーは、APP の輸送に関与することが既に報告されていることから、その関与が示唆された。

4. 今後の課題

RNF19A・19B の基質のユビキチン化による APP の輸送と A β 産生機構がまだ未解明である。RNF19A・19B の結合タンパク質として、14-3-3 ϵ を同定したが、RNF19A・19B によるユビキチン化様式を明らかにする必要がある。さらに、14-3-3 ϵ のユビキチン化と APP の関係について、両者の結合や局在変化についても検討する必要がある。

RNF19A ノックアウトマウスにおける APP プロセッシングへの影響についてまだ検討していない。RNF19A ノックアウトマウスにおいても、 γ -セクレターゼによる APP 切断が抑制されているかについても確認する必要がある。

5. 研究成果の公表方法

関連する論文を以下に報告した。さらに、今後の課題に取り組み、本研究の中心となる成果を原著論文に発表し、学会等でも報告していく予定である。

1. Kaneko M, Iwase I, Yamasaki Y, Takai T, Wu Y, Kanemoto S, Matsuhisa K, Asada R, Okuma Y, Watanabe T, Imaizumi K, Nomura Y. Genome-wide identification and gene expression profiling of ubiquitin ligases for endoplasmic reticulum protein degradation. **Sci Rep** 2016; 6: 30955.
2. Kaneko M. Physiological Roles of Ubiquitin Ligases Related to the Endoplasmic Reticulum. **Yakugaku Zasshi-Journal of the Pharmaceutical Society of Japan** 2016; 136: 805-809.
3. Nomura J, Hosoi T, Kaneko M, Ozawa K, Nishi A, Nomura Y. Neuroprotection by Endoplasmic Reticulum Stress-Induced HRD1 and Chaperones: Possible Therapeutic Targets for Alzheimer's and Parkinson's Disease. **Medical Sciences** 2016; 4: 14.

以上