

〈研究課題〉 BRI2/BRI3 を標的とするユビキチンリガーゼの機能阻害による新規アルツハイマー病治療薬の開発

代表研究者 高知大学 教育研究部医療学系 基礎医学部門 教授 麻生 悌二郎

共同研究者 高知大学 教育研究部医療学系 基礎医学部門 助教 安川 孝史

【まとめ】

本研究では、BRI2/3-ユビキチンリガーゼの基質認識タンパク BRI2/3-BP と基質 BRI2/BRI3 間の結合に重要な領域を決定し、両者がゴルジ体において共局在すること、さらには、BRI2/3-BP の knockdown により BACE1 レベルの低下、IDE 分泌量の増加並びに A β 40、A β 42 産生量の低下が誘導されることを示した。また、BRI2/3-BP と BRI3 間の相互作用解析系の構築を行った。

1. 研究の目的

アルツハイマー病(AD)患者脳に蓄積する老人斑の主要構成成分であるアミロイド β (A β) は、APP が β / γ -両セクレターゼにより切断されて、神経細胞から細胞外に分泌される。この過程は、BRI2、BRI3 の2つの APP 結合タンパクが両セクレターゼの APP へのドッキングを阻害することにより抑制される(図 1) (Matsuda S. et al

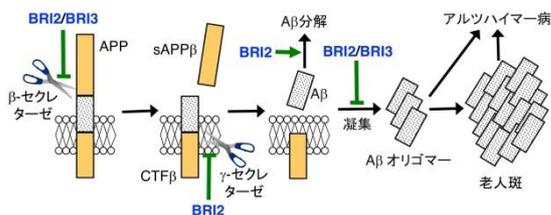


図1. BRI2とBRI3は、A β の産生と凝集を抑制し、A β 分解を促進する

JBC 280, 28912-28916, 2005, Fotinopoulou A. et al *JBC* 280, 30768-30772, 2005, Matsuda S. et al *JBC* 284, 15815-15825, 2009)。さらに、BRI2 は A β 凝集の抑制、A β 分解作用をもつ Insulin Degrading Enzyme (IDE) 分泌の促進並

びに細胞内 β -セクレターゼ (BACE1) の減少を誘導する作用も併せ持つ(図 1) (Del Campo M. et al *J. Alzheimers Dis.* 40, 481-494, 2014, Kim J. et al *J. Neurosci.* 28, 6030-6036, 2008, Willander H. et al *JBC* 287, 31608-31617, 2012, Kilger E. et al *JBC* 286, 37446-37457, 2011, Tsachaki M. et al *Curr Alzheimer Res.* 10, 532-541, 2013)。また、*BRI2* 遺伝子の片方のアレルの変異は正常 BRI2 タンパクの不足により AD 類似の病像を呈する常染色体優性遺伝性の家族性英国型認知症 (FBD) 及びデンマーク型認知症 (FDD) の原因となることが知られている (Vidal R. et al *Nature* 399, 776-781, 1999, Vidal R. et al *PNAS* 97, 4920-4925, 2000)。

一方、膵島アミロイドポリペプチド (IAPP; 別名 amylin) の膵 β 細胞内での凝集、沈着と続発する膵 β 細胞死が2型糖尿病 (T2DM) 発症の主な原因であることは以前より知られていたが、最近 IAPP 凝集の過程で形成される IAPP オリゴマーが脳内に移行して単独或いは A β と結合してアミロイド凝集体を形成、続いて起こる神経細胞死が T2DM に併発する AD の発症に深く関わっていることが明らかとなってきた (Zhang Y. et al *Prog Neurobiol.* 2017 Jun;153:100-120)。さらに最近、毒性の高いこの IAPP オリゴマーの形成も BRI2 により強く抑制されることが報告された (Oskarsson ME. et al *PNAS* 115, 2752-2761, 2018)。

申請者らは最近、BRI2/BRI3-Binding Protein (BRI2/3-BP; 未発表のため仮称を 사용합니다) が Cullin/Rbx と結合して BRI2/3-ユビ

キチンリガーゼ (BRI2/3-E3) 複合体を形成、これら BRI2、BRI3 を特異的に認識、ユビキチン化してプロテアソームによる分解へと導くことを発見した(図 2)。

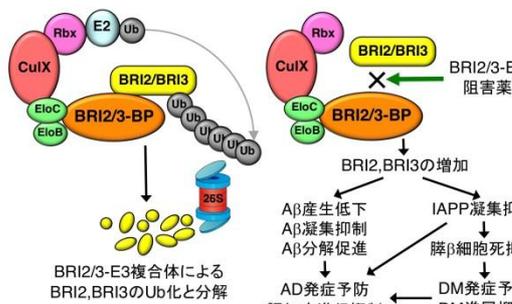


図2. BRI2/3-E3の働き(左)と同E3阻害薬の作用(右)の予想図

そこで本研究では、BRI2/3-BP と標的基質 BRI2、BRI3 間の相互作用に重要な配列を決定した後、これら分子間の結合を特異的に阻害する化合物を探索して、Aβの産生並びに凝集を効果的に抑制する新規の AD 治療薬の開発を目指す(図 2)。

2. 研究方法と経過

2-1 BRI2/3-BP と BRI2 および BRI3 間の相互作用部位の解析

BRI2/3-BP ならびに BRI2、BRI3 の欠失変異型タンパクを作製して昆虫細胞で発現させ、免疫沈降法を用いて BRI2/3-E3 の基質認識サブユニットと基質タンパク質間の相互作用に重要な配列を決定する。

2-2 BRI2/3-BP と BRI2 および BRI3 の細胞内での共局在性の解析

BRI2 と BRI3 は主として小胞体(ER)とゴルジ体に局在することが知られている。そこで、BRI2/3-BP が HeLa 細胞の ER とゴルジ体において BRI2/BRI3 と共局在性を示すかどうかを、各々に対する抗体を用いた蛍光免疫染色法により解析する。尚、ゴルジ体のマーカーとしては GM130 を用いた。

2-3 BRI2/3-E3 機能の抑制が APP のプロセッシング等に及ぼす影響の解析

神経系細胞株 F11 を用いて BRI2/3-BP の

knockdown が APP のプロセッシング、IDE 分泌量、細胞内 BACE1 レベル等に及ぼす影響を、培養上清中の sAPPα、sAPPβ並びに IDE 量及び細胞溶解液中の BACE1 量を Western blot 法で、培養上清中の Aβ40、Aβ42の量を ELISA 法により調べることににより明らかにする。

2-4 BRI2/3-BP と BRI2/BRI3 間の相互作用を阻害する化合物探索用のアッセイ系の構築

BRI2/3-BP と BRI2/BRI3 間の相互作用を阻害する化合物を探索するため、生細胞でタンパク-タンパク間の結合をリアルタイムで観察することが可能な NanoLuc Binary Technology (NanoBiT)を用いて、BRI2/3-BP と BRI2/BRI3 間の相互作用のモニタリングが可能なアッセイ系を構築する。

3. 研究の成果

3-1 BRI2/3-BP と BRI2、BRI3 間の相互作用に重要な部位の決定

BRI3 の多数の欠失変異型タンパクを作製して BRI2/3-BP との相互作用に必要な配列について解析した結果、BRI3 のアミノ酸配列(121-140)と(191-210)の2つの領域が重要であることが判明した(図 3)。さらに、BRI2/3-BP の欠失変異型タンパクを作製して BRI2、BRI3 との相互作用に必要な配列について解析した結果、BRI2/3-BP の N 末端の配列は不要であり、C 末端の領域が重要であることが明らかとなった。

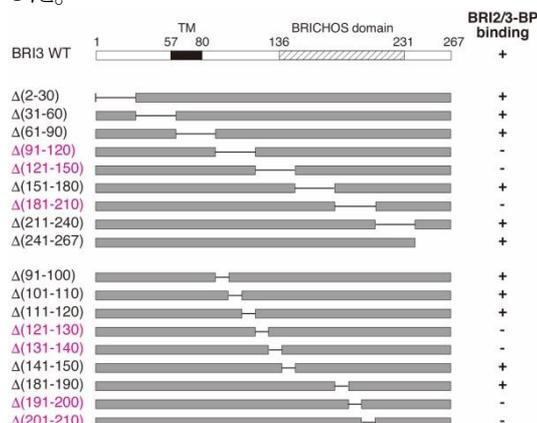


図3. BRI2/3-BPとの相互作用に重要なBRI3配列の決定

3-2 BRI2/3-BP と BRI2、BRI3 の細胞内での共局在性の解析

細胞免疫染色の結果、BRI2/3-BP 並びに BRI2、BRI3 は主に細胞質に局在することが判明した(図 4)。さらに、重ね合わせの結果、BRI2/3-BP と BRI2 及び BRI3 は部分的にゴルジ体において共局在性を示すことが明らかとなった(図 4)。

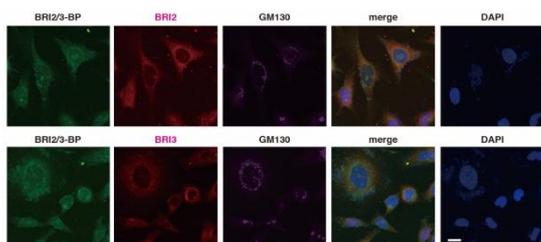


図4. BRI2/3-BPはゴルジ体においてBRI2、BRI3と部分的に共局在する

3-3 BRI2/3-BP 機能の抑制が APP 代謝等に及ぼす影響の解析

神経系細胞(F11 細胞)株において siRNA を用いて BRI2/3-BP を knockdown すると、細胞内 BACE1 レベルの顕著な低下と培養上清中への IDE 分泌量増加並びに Aβ40、Aβ42 産生量の有意な低下が誘導されることが判明した(図 5)。

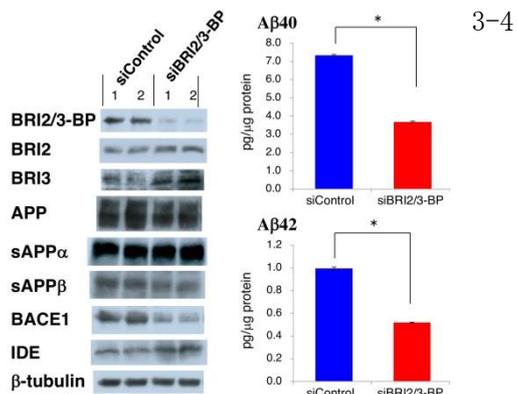


図5. BRI2/3-BPのknockdownによりBACE1減少、IDE分泌増加、Aβ産生低下が誘導される

BRI2/3-BP と BRI3 間の相互作用解析系の構築

LgBiT、SmBiT 各々の C 末側或いは N 末側に、BRI2/3-BP の全長或いは C 末端領域、並びに BRI3 を連結させた融合体を発現するプラスミド DNA を作製して、293T 細胞に導入、基質を加えた際に検出される発光を指標に両者

間の相互作用について解析した結果、LgBiT-BRI2/3-BP-C 末端と SmBiT-BRI3 とを共発現させた際に最強の発光強度が得られた(図 6)。

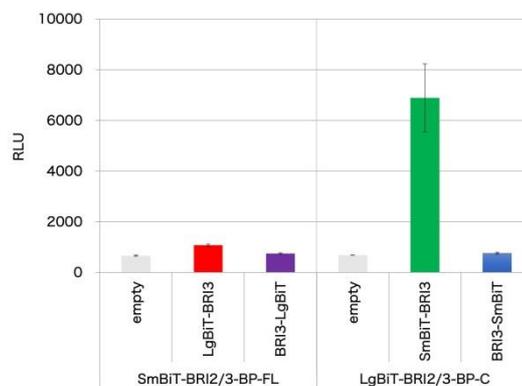


図6. NanoBiTを用いたBRI2/3-BPとBRI3間の相互作用解析系の構築

4. 今後の課題

構築した BRI2/3-BP と BRI3 間の相互作用解析のアッセイ系で得られる発光強度並びに S/B 比が、384 well プレートを用いて解析を行う High Throughput Screening (HTS) で使用するには十分な値とは言えず、今後改善を図っていく必要がある。

5. 研究成果の公表方法

学術誌に発表の予定(12/14 現在 *Molecular Cell* 誌に投稿中)