

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700383

研究課題名(和文) アミロイド 蛋白(A) 43 変換酵素の同定と A 蓄積における役割の解明

研究課題名(英文) Abeta43-converting enzyme and its role in amyloid deposition

研究代表者

鄒 鞏(ZOU, KUN)

岩手医科大学・薬学部・講師

研究者番号：40450837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000 円、(間接経費) 1,020,000 円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病(AD)では、アミロイド 蛋白(A)蓄積機構の解明が重要な課題となっている。近年、毒性のA 42に加え、A 43の毒性もAD発症の要因になっていることが示されてきている。我々は、A 43が脳内にもっとも早期に沈着することを明らかにした。次に、マウス脳内にA 43をA 42へ変換する酵素として、ACE2を同定した。ACEとACE2がA 43を連続的に切断し、A 40へ変換することが明らかとなった。A 40は抗アミロイド沈着および抗酸化作用を持つことから、これらの結果は、ACEやACE2による脳内のA 変換活性の維持がADの予防や治療に重要であることを示した。

研究成果の概要(英文)：The longer and neurotoxic species of amyloid beta-protein (Abeta), Abeta42 and Abeta43, contribute to Abeta accumulation in Alzheimer's disease (AD) pathogenesis and are considered to be the primary cause of the disease. In contrast, Abeta40, inhibits amyloid deposition and may have neuroprotective effects. Herein, we provide evidence that Abeta43 deposition appears earlier than Abeta42 and Abeta40 deposition in the brain of mutant amyloid precursor protein transgenic (APPtg) mice, suggesting that Abeta43 is the earliest depositing Abeta species. In addition, we found increased Abeta43 levels and Abeta43/Abeta42 ratio in the serum of AD patients, which may be used as diagnostic blood biomarkers for AD. We further identified the brain Abeta43-to-Abeta42-converting enzyme as ACE2. Notably, the combination of ACE2 and ACE could convert Abeta43 to Abeta40. Thus, maintaining brain ACE2 and ACE activities may be important for preventing brain amyloid neurotoxicity and deposition in AD.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学 神経化学・神経薬理学

キーワード：アルツハイマー病 アミロイドベータ蛋白 アンジオテンシン変換酵素

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病(AD)では、アミロイド β 蛋白($A\beta$)蓄積機構の解明が重要な課題となっている。我々は、血圧調節に重要なアンギオテンシン変換酵素(ACE)が、毒性の強い $A\beta_{42}$ を神経保護作用をもつ $A\beta_{40}$ に変換する活性を有することを明らかにしてきた。近年、 $A\beta_{42}$ に加え、 $A\beta_{43}$ の毒性も AD 発症の要因になっていることが示されてきている。我々は、 $A\beta_{43}$ が脳内神経細胞周辺に沈着しすいこと及び $A\beta_{43}$ を $A\beta_{40}$ へ変換する活性($A\beta_{43}$ 変換活性)が脳内に存在することを明らかにしている。

2. 研究の目的

本研究では、AD の予防・治療の介入点として $A\beta_{43}$ 変換活性の促進を考え、 $A\beta_{43}$ 変換酵素同定し、 $A\beta$ 蓄積における $A\beta_{43}$ 変換酵素の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

1. $A\beta_{43}$ 変換活性における ACE の作用を明らかにする。

(1) 脳内の $A\beta_{43}$ 変換活性に ACE が関与しているか否かを明らかにする。脳 lysate に ACE 阻害剤、captopril や enalapril を添加し、 $A\beta_{43}$ とインキュベーションする。 $A\beta_{40}$ の特異抗体で Western blot を行い、 $A\beta_{43}$ から $A\beta_{40}$ への変換が ACE 阻害剤に阻害されるかを検討する。脳内の $A\beta_{43}$ 変換活性に ACE が関与している場合は、二つのルートが考えられる。一つは、ACE による $A\beta_{43}$ から $A\beta_{41}$ へ変換後、別の carboxypeptidase が $A\beta_{41}$ を $A\beta_{40}$ へ変換する。もう一つのルートは、carboxypeptidase が $A\beta_{43}$ を $A\beta_{42}$ へ変換し、その後、ACE が $A\beta_{42}$ を $A\beta_{40}$ へ変換するという二段階の変換が考えられる(図 1、ルート 2 と 3)。

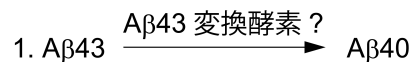


図 1 $A\beta_{43}$ を $A\beta_{40}$ に変換する三つのルート。我々は、ACE が $A\beta_{42}$ を $A\beta_{40}$ へ変換する活性と $A\beta_{43}$ を $A\beta_{41}$ へ変換する活性を持つことを明らかにしている。本研究は、 $A\beta_{43}$ 変換活性に必要な各ルートの変換酵素を同定する。

(2) ACE の $A\beta_{43}$ を $A\beta_{41}$ 変換に必要な活性ドメインを明らかにするために、ACE 組み換え蛋白を作成し解析する。すでに、ヒト全長 ACE cDNA、N 端ドメイン cDNA および C 端ドメイン cDNA 発現ベクターを準備し、COS7 細胞に ACE 発現ベクターの安定導入した系を確立した。平成 24 年度は、さらに全長 ACE cDNA の N 端活性ドメインならびに C 端活性ドメインに変異を導入し、N 端ドメイン活性あるいは C 端ドメイン活性を不活性化する。これらの発現ベクターを COS7 細胞に安定導入する系を確立する。これらの細胞株から各種 ACE を精製する。 $A\beta_{43}$ から $A\beta_{41}$ への変換作用に対する各 ACE ドメインの活性を Mass 解析で決定する。

2. $A\beta_{43}$ 変換酵素を同定し、脳内 $A\beta$ 蓄積における $A\beta_{43}$ 変換酵素の役割を明らかにする。

i. ACE が $A\beta_{43}$ 変換活性に関与しない、あるいは部分的に関与する場合には、種々の protease inhibitors を用いて脳内の $A\beta_{43}$ 変換酵素を同定する(図 1、ルート 1)。

(1) $A\beta_{43}$ 変換活性の検出方法として、 $A\beta_{43}$ とマウス脳 lysate をインキュベーションし、 $A\beta_{40}$ の特異抗体で $A\beta_{43}$ から

Aβ40 への変換を検出する。protease inhibitors cocktail の添加によって、Aβ40 への変換が阻害されたため、各 protease inhibitor をそれぞれ添加し、Aβ43 変換酵素を決定する。protease inhibitor で明確に同定できない場合は、該当 protease 種類の中で carboxypeptidase 活性のある protease を選別し、Aβ43 変換酵素の候補としてを同定する。

(2) Aβ43 変換酵素候補の flag tag 付き組み換え cDNA を作成し、細胞に発現ベクターへ安定導入した系を確立する。細胞培地から組み換え蛋白を精製し、Aβ43 変換活性があるか否かを Western blot ならびに Mass 解析で確認する。また、Aβ43 変換酵素候補の精製蛋白が市販されていれば、購入して Aβ43 変換活性を確認する。

4. 研究成果

我々は、Aβ42 よりさらに毒性の強い Aβ43 に着目し、AD 患者血清における Aβ43 量的変化や Aβ43 変換活性があるか否かを解析した。その結果、まず、AD 患者の血清 Aβ43 が上昇し、Aβ42 が低下していることを明らかにした (Zou, et al., *Translational Medic.*, 1:103, 2011)。このことから、Aβ43/Aβ42 の比の上昇が AD の血液診断マーカーになる可能性が考えられる。次に、ACE の Aβ43 変換活性を解析したところ、ACE は Aβ43 を Aβ41 に変換することを見出し、アルツハイマー病モデルマウスにおいて Aβ43 がアミロイド初期の沈着に関与していることを明らかにした (Zou et al., *Am J Pathol.*, 182:2322-2331, 2013)。また、AD 患者血清中の ACE 活性は変化がなかったが、Aβ 変換活性は健常者よりも低下していることが明らかとなった (論文作成中)。さらに、我々は、マウス脳に Aβ43 から Aβ40 へ変換する活性が存在することを明らか

にした。Aβ43 から Aβ40 への変換は、まず、Aβ43 が Aβ42 へ変換され、次に ACE により Aβ42 が Aβ40 に変換されるルートが考えられる。我々は、マウス脳内に Aβ43 を Aβ42 へ変換する酵素として、ACE2 を同定した。さらに、精製した ACE2 および ACE により、Aβ43 が Aβ40 に変換された (Liu et al., *J Neurosci Res*, in press)。Aβ40 は抗アミロイド沈着および抗酸化作用を持つことから、これらの結果は、ACE や ACE2 による脳内の Aβ 変換活性の維持が AD の予防や治療に重要であることを示し、血中 Aβ43/Aβ42 の比および Aβ 変換活性が AD の早期診断に応用できると期待される。

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 4 件)

1. Tanabe, C., Maeda, T., Zou, K., Liu, J., Liu, S., Nakajima, T., Komano, H. The ubiquitin ligase synoviolin up-regulates amyloid β production by targeting a negative regulator of γ-secretase, Rer 1, for degradation. (2012) *J. Biol. Chem.* 28: 44203-44211.

2. Zou, K., Liu, J., Watanabe, A., Hiraga, S., Liu, S., Tanabe, C., Maeda, T., Terayama, Y., Takahashi, S., Michikawa, M., Komano, H. Aβ43 is the earliest depositing Aβ species in APP transgenic mouse brain and is converted to Aβ41 by two active domains of ACE. (2013) *Am J Pathol.* 182:2311-2331.

3. Liu, J., Liu, S., Tanabe, C., Maeda, T., Zou, K., Komano, H. Differential effects of angiotensin II receptor blockers on Aβ generation. (2014) *Neurosci Lett.* 567:51-56.

4. Liu, S., Liu, J., Miura, Y., Tanabe, C., Maeda, T., Terayama, Y., Turner, A.J., Zou, K., Komano, H. Conversion of Aβ43 to Aβ40 by the successive action of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-converting enzyme. (2014) *J Neurosci Res*, in press.

[学会発表](計 4 件)

1. 劉姝余, 劉俊俊, 平賀彩江子, 松本

幸乃, 三浦友希恵, 田邊千晶, 前田智司, 鄒鶴, 駒野宏人. アルツハイマー病モデルマウスにおける Aβ43 の脳内蓄積の解析. 日本生化学会東北支部 第78回例会・シンポジウム、2012年5月(山形)

2. Liu, S., Liu, J., Tanabe, C., Maeda, T., Terayama, Y., Takahashi, S., Zou, K., Komano, H. Analysis of Aβ42-to-Aβ40-converting activity and Aβ43 level in AD patient serum. 第11回アジア太平洋神経化学会・第55回日本神経化学会合同大会、2012年9月(神戸)

3. Zou, K., Liu, J., Watanabe, A., Liu, S., Tanabe, C., Maeda, T., Terayama, Y., Takahashi, S., Michikawa, M., Komano, H. Aβ43 is the earliest depositing Aβ species in APP transgenic mouse brain and is converted to Aβ41 by two active domains of ACE. 第11回アジア太平洋神経化学会・第55回日本神経化学会合同大会、2012年9月(神戸)

4. 鄒鶴, 劉俊俊, 渡邊淳, 劉姝余, 田邊千晶, 前田智司, 寺山靖夫, 高橋智, 道川誠, 駒野宏人. Early deposition of Aβ43 in APP transgenic mouse brain. 第31回日本認知症学会学術集会、2012年10月(筑波)

〔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：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鄒鶴 (ZOU KUN)

岩手医科大学・薬学部・特任講師

研究者番号：40450837

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者

駒野 宏人 (KOMANO HIROTO)

岩手医科大学・薬学部・教授

研究者番号：40170378