

## アルツハイマー病創薬への応用が期待される新たな酵素複合体を発見

### 【ポイント】

- ・基質認識タンパク質 NRBP1 が二量体化して Cul2 及び Cul4A と結合し、ヘテロ二量体\*1 構造の NRBP1-ユビキチンリガーゼ\*2 を形成することを明らかにしました。
- ・NRBP1-ユビキチンリガーゼが抗アルツハイマー病\*3 因子 BRI2、BRI3 を標的として分解を促進することを明らかにしました。
- ・神経細胞において NRBP1 の機能を阻害すると、細胞内 BRI2、BRI3 の量が増え、アミロイドβ (Aβ)\*4 の産生が抑えられることを確認しました。
- ・本研究の成果が、NRBP1 と BRI2、BRI3 間の相互作用を標的とするアルツハイマー病根本治療薬の開発へと結びつくことが期待されます。

### 【概要】

高知大学医学部遺伝子機能解析学講座の麻生悌二郎教授、安川孝史助教らの研究チームは、米国ストロワーズ医学研究所の Joan Conaway 博士ら、東京大学大学院情報学環の寺田透教授らとの共同研究により、アルツハイマー病病因物質であるアミロイドβ (Aβ) の産生、凝集の抑制と分解促進の三つの作用を示す抗アルツハイマー病因子 BRI2、BRI3 の分解を制御する NRBP1-ユビキチンリガーゼを発見しました。また、同ユビキチンリガーゼが、二量体化した基質認識タンパク質 NRBP1 に Cul2 及び Cul4A が結合したヘテロ二量体構造をとることも明らかにしました。さらに、神経細胞において NRBP1 の機能を阻害すると、細胞内 BRI2、BRI3 の量が増え、Aβ の産生が抑えられることを確認しました。以上より、NRBP1 と BRI2/BRI3 間の相互作用はアルツハイマー病の根本治療薬開発のための新規の標的となることが期待されます。

本研究成果は、2020年3月11日午前1時(日本時間)に米国科学誌『Cell Reports』(Cellの姉妹誌)に掲載されます。

### 【研究の背景】

アルツハイマー病(AD)は、認知症の中で最も多い疾患であり、アミロイドβ (Aβ) を主要構成成分とする老人斑が脳内に多数出現することを特徴とします。Aβは、アミロイド前駆タンパク質(APP)がβ-セクレターゼとγ-セクレターゼによる二段階の切断を受けて産生されますが、このAβの産生亢進と分解の遅延によるAβの脳内濃度上昇と、

これに続く凝集の促進による A $\beta$ オリゴマー\*5 を始めとする A $\beta$ 凝集体の過剰な形成が AD の発症に深く関与していると考えられています。

一方、A $\beta$ の APP からの切り出しの過程は APP 結合タンパク質である BRI2 とその相同因子 BRI3 が $\beta/\gamma$ -両セクレターゼの APP へのアクセスを阻害することにより抑制されることが知られています(図 1)。加えて、これら BRI2、BRI3 は A $\beta$ とも結合してその凝集を抑制する機能も有しています(図 1)。BRI2 はさらに、A $\beta$ 分解酵素である Insulin degrading enzyme (IDE)\*6 の細胞からの分泌を促進して A $\beta$ の分解をも誘導します(図 1)。また、*BRI2* 遺伝子の片方のアレル\*7 の変異は、正常な BRI2 の量の減少を招き、アルツハイマー病と類似の臨床症状と病理所見を示す遺伝性の家族性英国型認知症 (FBD) 並びに家族性デンマーク型認知症 (FDD) の原因となることが知られています。

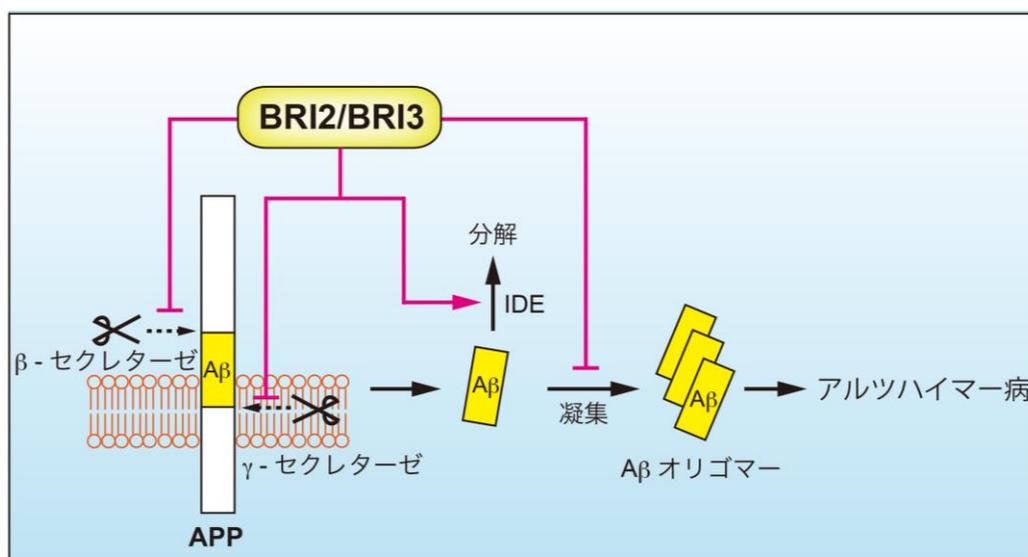


図 1. BRI2 と BRI3 は、(1) A $\beta$ 産生抑制、(2) A $\beta$ 凝集抑制、(3) A $\beta$ 分解促進により抗アルツハイマー病因子として機能する。

これまで、A $\beta$ 産生の抑制を目的に $\beta$ -並びに $\gamma$ -セクレターゼの阻害剤が多数開発され臨床試験が行われてきましたが、両セクレターゼが APP 以外にも多数の生理的に重要な基質の切断に関与するため皮膚癌、肝障害等の副作用が出現し、大部分が中止となっています。

NRBP1 は、その配列中に Cullin-RING 型ユビキチンリガーゼ (CRL)\*8 の足場タンパク質 Cul2 或いは Cul5 が基質認識サブユニットに結合する際にアダプター役を果たす Elongin BC の結合配列 BC-box を有することから、基質は未同定ではあるものの CRL2 或いは CRL5 において基質認識に関わる可能性が指摘されていました。また、NRBP1 は TSC22DF\*9 メンバーのタンパク質とも相互作用することが報告されていま

すが、その意義については明らかにされていませんでした。

### 【本研究成果】

本研究グループは、今回新たに NRBP1 内にタンパク質の二量体形成に関わる LisH 配列と、BC-box 配列にオーバーラップする形で CRL4 の足場タンパク質である Cul4A 或いは Cul4B との結合の際にアダプター役をする DDB1 の結合配列 H-box が存在することを見出しました。さらに、TSC22DF メンバーの内 TSC22D3 と TSC22D4 の結合によって NRBP1 の安定性並びに二量体化が促進され、片方の NRBP1 に Elongin BC と共に Cul2 が結合、もう片方の NRBP1 には DDB1 を介して Cul4A が結合して、CRL2/CRL4A-ヘテロ二量体型の NRBP1-ユビキチンリガーゼが形成されることを明らかにしました (図 2)。

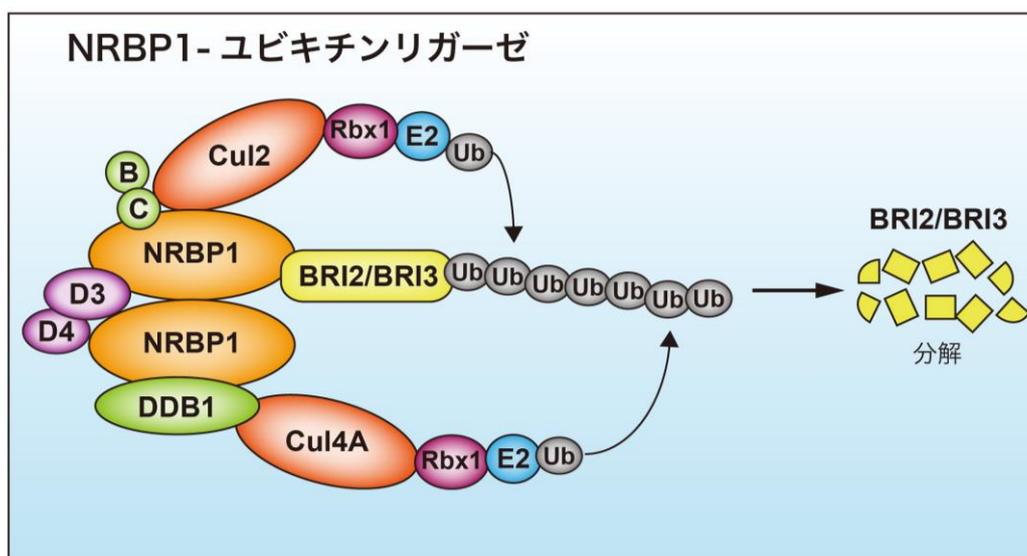


図 2. NRBP1-ユビキチンリガーゼは、BRI2 と BRI3 をユビキチン化してプロテアソームによる分解へと導く。

次に、同ユビキチンリガーゼの標的となる基質を明らかにするために、TR-TUBE<sup>10</sup> というユビキチン鎖結合プローブとプロテオーム解析<sup>11</sup> とを組み合わせた方法により網羅的な探索を行った結果、抗アルツハイマー病因子である BRI2 の相同因子 BRI3 を含む複数の基質の候補分子がとれてきました。その後、それぞれの候補分子毎に NRBP1 との結合性や同酵素によって実際にユビキチン化<sup>12</sup> されるかどうかについて確認した結果、BRI3 に加えて BRI2 も同酵素の基質となり、強くユビキチン化されて分解へと導かれることが明らかになりました。さらに、NRBP1 の LisH 或いは BC/H-box 配列に変異を入れた各種変異型 NRBP1 を作製して同酵素の活性について比較検討した結果、NRBP1 の二量体化、NRBP1 と Cul2 の結合、NRBP1 と Cul4A の結合の

三つの条件全てが揃った場合（これは CRL2/CRL4A が形成されることを意味します）にのみ BRI2/BRI3 が強くユビキチン化されることが明らかとなり、基質や伸長していくユビキチン鎖への効率的なユビキチン\*<sup>13</sup>の転移に CRL2/CRL4A-ヘテロ二量体もつ非対称な構造が有利に働く可能性が示唆されました（図 2）。

NRBP1-ユビキチンリガーゼ複合体の各構成因子並びに BRI2/BRI3 は神経細胞においても発現が認められます。そこで、神経細胞で NRBP1 の機能を阻害してみたところ、細胞内 BRI2/BRI3 量の増加と共に APP のセクレターゼによる切断の抑制が認められ、A $\beta$ の産生が有意に抑えられることが明らかになりました。

以上の結果から、NRBP1 と BRI2/BRI3 間の相互作用の阻害は、BRI2/BRI3 の分解を抑制し、結果的に A $\beta$ の産生と凝集の抑制及び A $\beta$ 分解の促進の増強につながると考えられるため、アルツハイマー病の根本治療薬開発のための新たなメカニズムとして期待されます（図 3）。

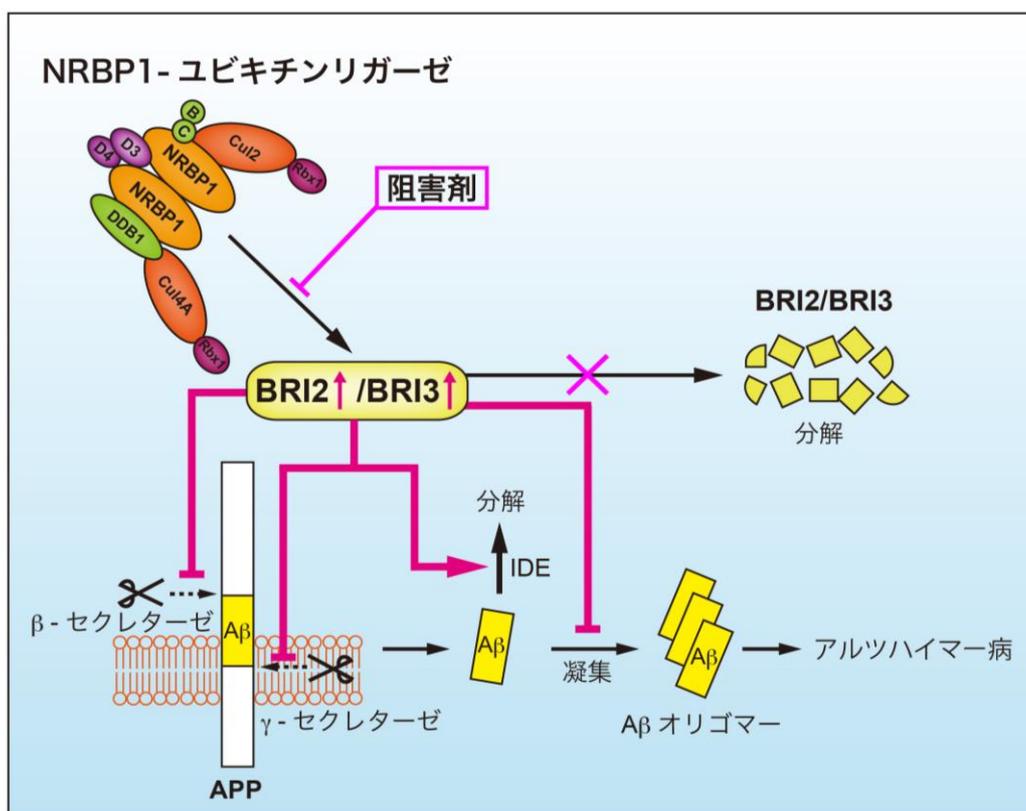


図 3. NRBP1 と BRI2/BRI3 間の相互作用の阻害は、BRI2 と BRI3 の分解を抑制し、  
(1) A $\beta$ 産生抑制、(2) A $\beta$ 凝集抑制、(3) A $\beta$ 分解促進の増強につながると期待される。

### 【波及効果、今後の展開】

本研究によって、NRBP1 と BRI2/BRI3 間の相互作用がアルツハイマー病の根本治療薬開発のための新たな標的となり得る可能性を示しました。本標的に対する阻害剤は、

APP 以外のセクレターゼの基質切断には影響を及ぼさずに、(1) A $\beta$ 産生抑制、(2) A $\beta$ 凝集抑制、(3) A $\beta$ 分解促進の三つの異なるメカニズムにより抗 A $\beta$ 作用を発揮すると想定されるため、従来のセクレターゼ阻害剤に比べて優位性があると考えられます。重大な副作用の発現を伴うことなく、AD の発症予防並びに進展阻止に有用となることが期待されます。この成果を踏まえ、本研究チームは理化学研究所の創薬・医療技術基盤プログラムの支援の下、NRBP1 と BRI2/BRI3 間の相互作用を阻害する化合物の探索を開始しています。

【掲載誌名】

*Cell Reports*

【論文タイトル】

NRBP1-containing CRL2/CRL4A regulates amyloid  $\beta$  production by targeting BRI2 and BRI3 for degradation

【著者】

Takashi Yasukawa<sup>1</sup>, Aya Tsutsui<sup>1</sup>, Chieri Tomomori-Sato<sup>2</sup>, Shigeo Sato,<sup>2</sup> Anita Saraf<sup>2</sup>, Michael P. Washburn<sup>2,3</sup>, Laurence Florens<sup>2</sup>, Tohru Terada<sup>4,5</sup>, Kentaro Shimizu<sup>5,6</sup>, Ronald C. Conaway<sup>2,7</sup>, Joan W. Conaway<sup>2,7</sup>, and Tejiro Aso<sup>1,\*</sup>

【所属名】

- 1) Department of Functional Genomics, Kochi Medical School, Kohasu, Oko-cho, Nankoku, Kochi 783-8505, Japan
- 2) Stowers Institute for Medical Research, Kansas City, Missouri 64110, USA
- 3) Department of Pathology and Laboratory Medicine, Kansas University Medical Center, Kansas City, Kansas 66160, USA
- 4) Interfaculty Initiative in Information Studies, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan
- 5) Agricultural Bioinformatics Research Unit, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan
- 6) Department of Biotechnology, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

7) Department of Biochemistry and Molecular Biology, Kansas University Medical Center, Kansas City, Kansas 66160, USA

\*) Corresponding author

【DOI】 10.1016/j.celrep.2020.02.059

【本研究への支援】

本研究は、文部科学省科学研究費補助金、高知大学医学部附属病院長裁量経費による研究助成、公益財団法人ライフサイエンス振興財団、公益財団法人三井住友海上福祉財団、ストワーズ医学研究所研究基金、国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED)の創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業(BINDS)などの支援を受けて行われました。

【本件に関する問い合わせ先】

○研究内容

高知大学医学部 遺伝子機能解析学講座

教授 麻生 悌二郎

TEL 088-880-2279 FAX 088-880-2281

e-mail [asot@kochi-u.ac.jp](mailto:asot@kochi-u.ac.jp)

○報道対応

高知大学医学部・病院事務部 総務企画課広報係

TEL 088-880-2723 FAX 088-880-2227

e-mail [is09@kochi-u.ac.jp](mailto:is09@kochi-u.ac.jp)

## 【用語解説】

### \*1 ヘテロ二量体

異なる分子1個ずつが結合してできた複合体。NRBP1の二量体のように同一の分子2個が結合してできた複合体の場合は、ホモ二量体という。

### \*2 ユビキチンリガーゼ

基質となるタンパク質をユビキチン化するための三つの酵素の一つ。ユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチン転移酵素 (ユビキチンリガーゼ) (E3) の働きにより、基質タンパク質がユビキチン化される。中でもユビキチンリガーゼは、特異的に基質を認識し分解に導くという重要な役割を担っている。

### \*3 アルツハイマー病

ドイツの精神科医アロイス・アルツハイマー博士が、1906年に記憶障害と妄想を主徴とする第一例を学会で報告したことで広く認知されるようになった。多くは中高年で発病する緩徐進行性の認知症。AD患者の脳ではA $\beta$ を主成分とする老人斑の多発が認められるため、A $\beta$ の過剰な蓄積がADの発症に深く関与していると考えられてきた。

### \*4 アミロイド $\beta$ (A $\beta$ )

膜タンパク質であるAPPが $\beta$ -セクレターゼと $\gamma$ -セクレターゼによる二段階の切断を受けて産生される40~43個のアミノ酸からなるペプチド (タンパク質断片) で、ADの病態において中心的な役割を持つと考えられている。近年の大規模ヒト遺伝学的研究から、A $\beta$ 産生が低下するとADの発症が抑制されることが示されている。

### \*5 A $\beta$ オリゴマー

A $\beta$ が二個~十数個集合した凝集中間体のことで、神経毒性を有しシナプスの機能障害や神経細胞死を引き起こすとされている。

### \*6 Insulin degrading enzyme (IDE)

Nepilysin (NEP) と共に代表的なA $\beta$ 分解酵素である。IDE、NEP共にAD患者の脳において量が減少していたり、A $\beta$ 分解活性が低下しているなどの報告が認められる。

### \*7 アレル

父方と母方からの対をなす遺伝子 (対立遺伝子) のこと。

### \*8 Cullin-RING型ユビキチンリガーゼ (CRL)

ユビキチンリガーゼは大きく分けて、HECT型、U-box型、RING-finger型に分類されるが、CRLはRING-finger型に属する。CRLは、足場タンパク質であるCullin (Cul1,

Cul2、Cul3、Cul4A、Cul4B、Cul5、Cul7 の少なくとも 7 種類が存在)、RING-finger タンパク質 (Rbx1 と Rbx2 の 2 種類が存在)、アダプタータンパク質 (Skp1、Elongin BC、DDB1 の 3 種類が存在) 及び基質特異性を決定する基質認識タンパク質からなる複合体を形成している。

#### \*9 TSC22DF

TSC22 ドメインファミリーの略称で、TSC22D1、TSC22D2、TSC22D3、TSC22D4 などからなる。本ファミリーのメンバーは共通して、C 末端領域に二量体形成に関わるロイシンジッパー配列と TSC-box 配列を有している。

#### \*10 TR-TUBE

トリプシン抵抗性ユビキチン鎖結合タンパク質。質量分析の際に用いられるトリプシンという加水分解酵素によって分解されないようにアミノ酸配列を部分的に置き換えたユビキチン鎖結合タンパク質を四つ直列に繋いだ人工プローブのこと。

#### \*11 プロテオーム解析

細胞内のタンパク質を網羅的に解析する方法。本研究では、質量分析装置を用いて NRBP1-ユビキチンリガーゼによりユビキチン化されたタンパク質を同定した。

#### \*12 ユビキチン化

タンパク質修飾の一種で、ユビキチンリガーゼなどの働きによりユビキチンが基質タンパク質に付加されること。通常、ユビキチンが複数連なったポリユビキチン鎖の修飾を受けたタンパク質は選択的にプロテアソームで分解される。

#### \*13 ユビキチン

76 残基のアミノ酸からなる小さなタンパク質である。名前は細胞内に普遍的 (ユビキタス) に存在することに由来する。

#### 図内 プロテアソーム

タンパク質の分解を行う巨大な酵素複合体のこと。

図内の略称

**B:** Elongin B、**C:** Elongin C、**D3:** TSC22D3、**D4:** TSC22D4