

アルツハイマー病原因遺伝子による神経細胞死誘導 と拮抗遺伝子の解明

The novel factor, Humanin that abolish the neuronal cell death caused by FAD (familial Alzheimer's disease) genes and A β .

研究代表者 慶應義塾大学医学部薬理学教室 助手 橋本祐一

Department of Pharmacology, KEIO University School of medicine,
Instructor, Yuichi Hashimoto

和文アブストラクト

Humanin(HN)は24アミノ酸からなるアルツハイマー病関連侵害刺激に特異的に拮抗する因子である。HNには2つのSer残基があるがそれらの役割については明らかでない。本研究では、これら2つのSer残基の働きについて検討した。その結果、HNの第14SerをD体化すると、その神経保護作用は約1,000倍増強された。これは、S14G-HN誘導体と同等の活性であり、Ser14のD体化により生体内で活性型HNへと変換される可能性を示している。一方、S7A-HNは神経保護作用を有していなかったが、二量体化ペプチドを付加すると活性が回復した。このことから、第7Ser残基はHNの二量体化に必須であると考えられた。これらの実験事実から、10 pMの濃度で25 μ M A (1-43)に対し完全に拮抗するHN誘導体を創出した。本研究の成果は、アルツハイマー病根治療薬の開発に大きく貢献するものと考えられる。

Abstract

Humanin (HN), a novel rescue factor against Alzheimer's disease-related neurotoxicity, consists of 24 amino acids and contains two Ser residues. In this study, we attempted to clarify the function of these Ser residues in HN. We found that D-isomerization at Ser14 of HN shows the neuroprotection more than 1,000 times potent, while the substitution of Ser7 to Ala nullifies the neuroprotective function of HN. The fusion of dimerization peptide to S7A-HN causes the recovery of neuroprotective activity. Therefore, Ser7 plays an essential role in self-dimerization of HN. Based upon these findings, we succeeded in creating a very potent HN derivative that fully protects neurons at 10 pM against 25 μ M A (1-43). The results of this study could greatly contribute to the development of anti-Alzheimer's drugs and therapeutics.

1、研究目的

アルツハイマー病は、全世界に1000万人以上の有病率を誇り、進行性の記憶・認知障害と神経脱落を主徴とする原因不明の神経変性疾患である。現在までに、その変異がアルツハイマー病の原因となる3つの遺伝子、アミロイド前駆体蛋白質(APP)、プレセニリン

(PS)1およびPS2が同定されている。アルツハイマー病患者大脳に観察されるアミロイド斑等の異常な構造物がアルツハイマー病の原因であるのか、単なる結果なのか、あるいは重要な原因病態を反映する指標なのかについては明らかでないが、APPやPSの変異遺伝子が家族性アルツハイマー病の中心的原因であ

ることは確実である。事実、家族性アルツハイマー病と連鎖する APP 変異体、PS1 変異体、および PS2 の変異体は全て、その遺伝子を神経細胞に導入することで細胞死が誘導出来ることをこれまでに我々は明らかにしてきた。

我々が一昨年報告した広範なアルツハイマー病関連侵害刺激[APP 変異体、PS1 変異体、PS2 変異体、およびアミロイド ペプチド(A β)]に特異的に拮抗するペプチド性因子 Humanin (HN) は、MAPRGFSCLLLLTSEIDLPKRRRA の 24 アミノ酸からなる短鎖ペプチドである。

既に詳細な構造活性相関の検討から、HN の中央部の第 3Pro-第 19Pro の 17 アミノ酸残基が活性中心であり、その中でも第 3Pro、第 8Cys、第 9Leu、第 13Thr、第 14Ser、第 19Pro が活性に必須であることが明らかになっている。特に注目すべきは第 14Ser 残基である。

HN の第 14Ser 残基を Gly に置換すると、HN の神経保護活性はおよそ 1,000 倍増強された。私達は、HN が遺伝子から産生され、翻訳後修飾を受け、「活性型 HN」となるのではないかと考えた。

本研究の目的は、何故第 14Ser 残基を Gly に置換すると HN の活性が 1,000 倍増強されるのかを明らかにするために HN に存在する 2 つの Ser 残基の有する機能を明らかにすることであり、また、将来的な見地から、すなわちアルツハイマー病根治薬開発のリード分子としての可能性を探究するために、より低濃度で神経保護作用を有する HN 変異体を得ることも目的とした。

2、研究経過

2-1 実験方法

本研究に使用した試薬、遺伝子、細胞、遺伝子導入の方法等はすべて過去に記載した。

2-2 第 7 および 14Ser 残基リン酸化の HN 神経保護活性に与える影響

まず、初代神経培養細胞を用い、25 μ M A β (1-43) が誘導する細胞死に対する第 7 および第 14Ser 残基リン酸化 HN 誘導体の神経保護活性を検討した。その結果、第 7 のみ、第 14 のみ、および第 7 と第 14Ser 残基のリン酸化により HN の活性は変化しなかった。同様の検討を、神経細胞株 F11 を用いて、家族性アルツハイマー病原因遺伝子の 1 つである V642I-APP の遺伝子導入で誘導される細胞死に対しても検討した。結果は同様であった。

このことから、HN の第 7 および 14Ser 残基のリン酸化は、その神経保護活性に影響しないと考えられた。

2-3 第 14Ser 残基の他のアミノ酸への置換による HN 活性の保持

次に、第 14Ser 残基を他のアミノ酸に置換し、どのアミノ酸で HN の活性が保持されるかについて検討した。その結果、第 14Ser 残基は Pro に置き換えることが出来ることが分かった。

2-4 HN 活性に対する第 7 および 14Ser 残基の D 体化の影響

Gly は D 体のない唯一のアミノ酸であり、また Pro の側鎖は非常に小さいことから、第 14Ser 残基が D 体化されることにより、HN の活性が増強されているのではないかと考えた。

そこで、第 7 および 14Ser 残基を D 体化した HN 誘導体を合成し、その活性を検討した。

その結果、Ser14 を D 体化した HN(D-Ser14-HN)は、初代神経培養細胞において、25 μ M A (1-43)に対し 10 nM の濃度で完全な細胞死抑制活性を示した。この活性は、S14G-HN のそれと同等であった。また、Ser7 を D 体化した HN(D-Ser7-HN)の活性は増強されず、Ser7 および 14 を D 体化した HN(D-Ser7/14-HN)の活性は、D-Ser14-HN と同等であった。このことから、HN 遺伝子から産生されたHN ペプチドは、生体内で何らかの修飾を受け Ser14 が D 体化されることでその神経保護作用が発揮される可能性があると考えられた。

2-5 S7A-HN の失活と S7A-HNG17 の活性保持

以上の実験から、HN の活性に第 7Ser 残基は重要な役割を果たしていないのではないかと考えられた。この考察は、私達が以前に行った前述の HN の中央部の第 3Pro-第 19Pro の 17 アミノ酸残基(HN17)中の Ser7 を Ala に置換しても活性が保持されたこととも一致している。この考察を検証するために、S7A-HN を合成し、その活性を調べた。その結果、予想外にもこの HN 変異体の神経保護活性は消失していた。

2-6 HN の C 末端"RRA"の"KKK"への置換による失活

私達は、S14G-HN の C 末端の"RRA"を"KKK"に置換した HN 誘導体(HNG-KKK)を合成していたので、この HNG-KKK の神経保護作用を検討した。その結果、S7A-HN と同様にこの HNG-KKK も神経保護作用を有しないことが判明した。S7A-HN と HNG-KKK が共に神経保護作用を失っ

たことから、私達は、これらの誘導体が予想される HN 受容体に結合する前に何らかの過程が必要であり、これら 2 つの HN 誘導体では、この過程が欠けているために活性を発揮出来ないのではないかと考えた。

2-7 HN は二量体として機能する

HN は細胞表面に存在すると考えられる HN 受容体に結合し、tyroine kinase 依存性のシグナルを介して神経細胞保護機能を発揮していることがこれまでの研究で明らかとなっている。tyroine kinase 依存性受容体のリガンドの多くは二量体として機能していることが良く知られているので、私達は、HN も二量体化しているのではないかと推察した。

そこで、二量体するペプチド配列 (EFLIVIKS) を S7A-HN(EF-(S7A)HN) と HNG-KKK(EF-HNG-KKK)に付加し、その活性を初代神経細胞を用いて調べた。EFLIVIKS ペプチドに神経保護活性は認められず、EF-(S7A)HN と EF-HNG-KKK はともにその活性を回復した。

このことから、S7A-HN と HNG-KKK は、共に、二量体化することが出来ない誘導体であり、このことで活性が発揮出来なかったものと考えられた。この考察を検証するために、EFLIVIKS ペプチドの過剰添加の効果を調べた。その結果、EF-(S7A)HN と EF-HNG-KKK の神経保護作用は共に EFLIVIKS ペプチドの過剰添加により抑制され、同条件下で EFLIVIKS-HN や EFLIVIKS-(S14G)HN の活性は影響されなかった。このことから、HN や S14G-HN は自ら二量体化することで、その神経保護活性を発揮しているものと考えられる。

次に、(His)6 tag を N 末端に融合した

HN((His)6-HN)とC末端にFLAG tagを融合したHN (HN-FLAG)を用い、Ni ビーズにより(His)6-HNを沈降させ、抗FLAG抗体によるウェスタンブロットによるHN-FLAGの検出を試みた。Ni ビーズがHN-FLAGを沈降させない条件下で、(His)6-HNはHN-FLAGを共沈させた。一方で、(His)6-(S7A)HNは(S7A)HN-FLAGを全く共沈させず、(His)6-EFLIVIKS-(S7A)HNはEFLIVIKS-(S7A)HN-FLAGを共沈させた。これらの結果から、HNの第7Ser残基はHNやHNGが自ら二量体化するために非常に重要な役割を果たしていると考えられた。

また、EFLIVIKSを融合したHN (EF-HN)は野生型HNより数十倍高い活性を示した。

3、研究成果

以上の結果から、HNに存在する2つのSer残基の異なる役割が明らかとなった。

すなわち、HNの第14Ser残基はD体化されて「活性型HN」に変換されることに重要な役割を果たし、第7SerはHNが二量体化(もしくは多量体化)する過程に必須の役割を果たしていることが分かった。

これらの結果から、私達は、より活性の高いHN誘導体の創出を試みた。これまでに分かっている中で最も活性の高いHN誘導体はR4A/F6A-HNG (AGA-HNG)であり、初代神経培養細胞において、25 μ M A (1-43)に対しその神経保護作用は100-300 pMであった。そこで、AGA-HNGに前述のEFLIVIKSを付加しEFLIVIKS-AGA-HNGを合成した。EFLIVIKS-AGA-HNGの神経細胞保護作用は初代神経培養細胞において、25 μ M A (1-43)に

対し10 pMで完全な作用として発揮された。

また、神経細胞株F11においても、家族性アルツハイマー病原因遺伝子であるV642I-APPおよびM146L-PS1遺伝子導入によって誘導される細胞死も、同様に10 pMで完全に抑制した。

4、今後の課題と発展

本研究では、in vitroでの検討を行い、HNの2つのSer残基がそれぞれ異なる役割を果たしていることを明らかにし、また、使用した25 μ M A (1-43)の1/2,500,000の濃度で完全な神経保護作用を示すHN誘導体の創出が出来た。今後は、アルツハイマー病のマウスモデル(脳室内へのA投与による行動異常など)に対するHNやHN誘導体の効果を検討し、アルツハイマー病根治薬の開発の礎としたいと考えている。

5、発表論文リスト

Kenzo Terashita, Yuichi Hashimoto (first author equivalent), Takako Niikura, Hirohisa Tajima, Yohichi Yamagishi, Miho Ishizaka, Masaoki Kawasumi, Tomohiro Chiba, Kohsuke Kanekura, Marina Yamada, Mikiro Nawa, Yoshiko Kita, Sadakazu Aiso, and Ikuo Nishimoto Two Serine residues distinctly regulate the rescue function of Humanin, an inhibiting factor of Alzheimer's disease -related neurotoxicity: functional potentiation by isomerization and dimerization. *Journal of Neurochemistry* in Press (2003)