ムーンライト解糖系酵素に焦点をあてた脳アミロイドアンギオパチーの病態解析と治療開発への挑戦

熊本大学大学院生命科学研究部 脳神経内科学講座
特任助教　井上 泰輝

（共同研究者）

長崎国際大学薬学部 アミロイドーシス病態解析学講座	教授	安東 由喜雄
熊本大学病院脳神経内科学講座	特任教授	山下 太郎
熊本大学病院脳神経内科学講座	講師	植田 光晴
熊本大学病院脳神経内科学講座	診療講師	三隅 洋平
熊本大学病院脳神経内科学講座	診療講師	増田 曜章

はじめに

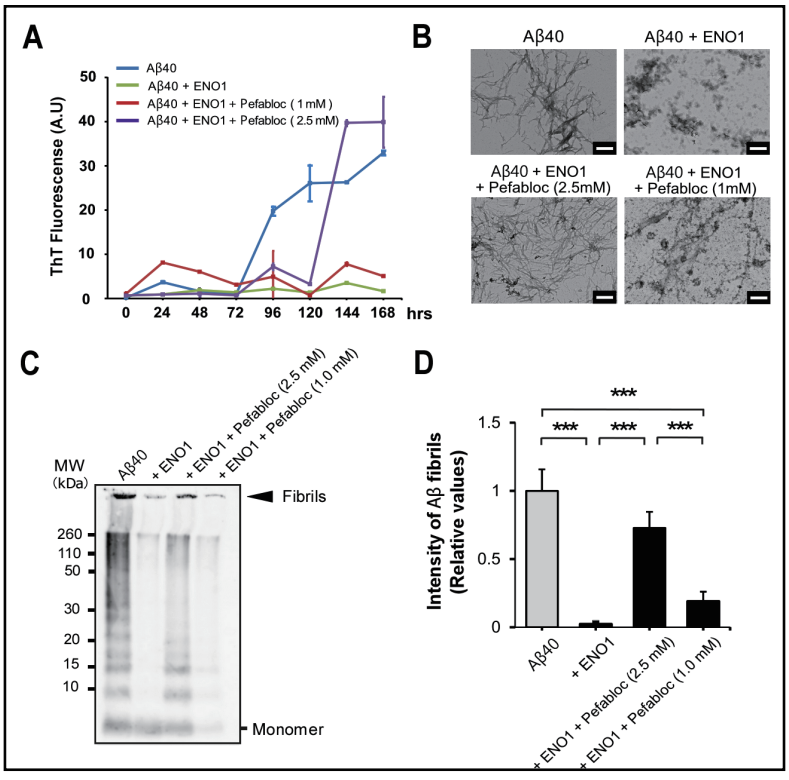
脳アミロイドアンギオパチー（CAA）は、アルツハイマー病（AD）患者の90%に随伴し、Aβが脳血管に沈着、脆弱化し脳出血を発症する[1]。高齢化社会が社会問題となる中、CAA患者が増加する一方で、CAAの予防や治療法は未確立であり、その開発は急務である。CAAやADは病原タンパク質であるAβが脳に沈着するアミロイドーシスという疾患概念に含まれる。アミロイドーシスは、難溶性のタンパク質であるアミロイド線維が全身諸臓器の細胞外に沈着し、様々な機能障害を起こす疾患群の総称でありADとCAAを総じて脳アミロイドーシスと呼ぶ。近年、アミロイドーシスの研究領域では、病原タンパク質と共存するタンパク質が分子基盤の解明と治療薬開発の鍵として認識されるようになった。しかし、CAAの共存タンパク質の研究は、これまで日本、および諸外国を含め報告がなかった。申請者はこの問題を解明すべく、世界に先駆けてCAAにおける共存タンパク質を同定した。具体的には、CAA罹患血管から、レーザーマイクロダイセクションを用い精密に切り出した脳血管に含まれるタンパク質のプロテオミクス解析を行い、CAA罹患血管に特異的に発現する分子を同定した[2]。その中で、Aβに次いで2番目に多く発現するα-エノラーゼに着目し検討を行い、α-エノラーゼが　① Aβの線維形成を抑制　② Aβ線維を分解、さらに　③ Aβの細胞毒性を抑制するというこれまでに報告のない全く新しい作用機序を見出し、治療応用への可能性を示した。そこで、α-エノラーゼのCAA病態制御機構の解明、α-エノラーゼを用いた新しいCAAの治療法開発など臨床応用へ発展させることを目的とした発展的研究を行うこととした。

結　果

1. α-エノラーゼによるAβ線維形成抑制メカニズムの解明

α-エノラーゼのAβ毒性制御機構の解明に向けて、プロテアーゼ活性に着目し検討を行った。申請者はα-エノラーゼがプロテアーゼ作用を介して、Aβタンパクを切断するとの仮説を立てた。そこで、複数のプロテアーゼ阻害剤を用いて、αエノラーゼによるAβ線維形成抑制効果が減弱するか否かを検討した。セリンプロテアーゼ阻害剤としてPefabloc、アスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤としてPepstatinA、システインプロテアーゼ阻害剤としてE-64、金属プロテアーゼとしてPhosphoramidonとEDTAを用いた。この中で、セリンプロアーゼ阻害剤であるPefabloc SCを用いた検討で、αエノラーゼの線維形成抑制効果が阻害されることが判明した。まず、チオフラビンT吸光度を用いた解析を行った。チオフラビンTはアミロイドのβシート構造を認識し、それに応じて吸光度が上昇し線維形成を間接的にモニタリンする測定手段である。これまでの研究で、αエノラーゼの添加により抑制されていた吸光度の上昇（図1 A、緑）が、セリンプロテアーゼ阻害剤（Pefabloc SC、2.5mM）の添加により、一転して吸光度の上昇がみられるようになった（図1 A、紫）。このことは透過型電子顕微鏡を用いた検討でも示され、α-エノラーゼによって抑制されていたAβ線維形成（図1B、右上）がPefabloc SC、2.5mMの添加によって線維形成がみられるようになった(図1B､左下)。さらに申請者はウェスタンブロット法を用いた検討において、

図1　セリンプロテアーゼ阻害剤の影響



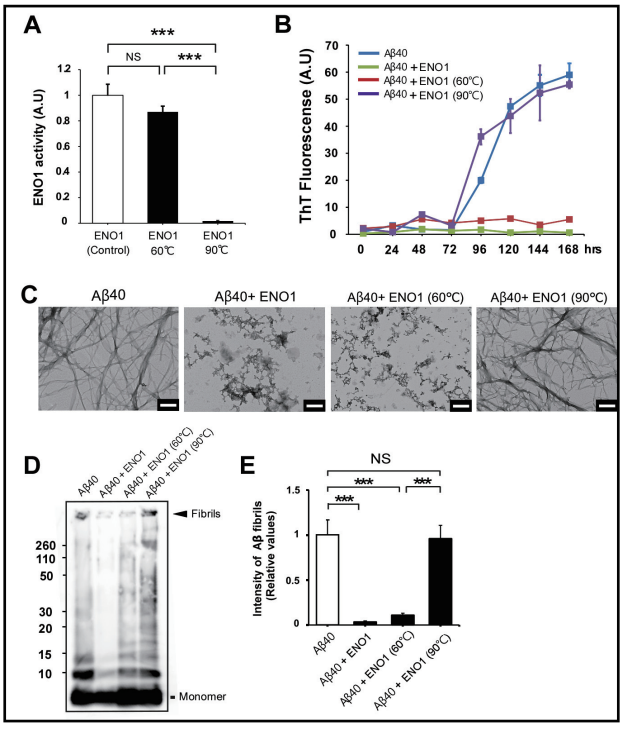
略語　ENO1：α-エノラーゼ

α-エノラーゼの添加によりAβ線維に該当するバンドが消失するが（図1C、矢頭、2レーン目）（図1D、右から2つ目の棒グラフ）、Pefabloc SC, 2.5mMの添加によってAβ線維に該当するバンドが出現することを確認した（図1C、矢頭、3レーン目）（図1D, 右から3つ目の棒グラフ）。

2. α-エノラーゼの酵素活性がAβ線維形成メカニズムに与える影響の解明

次に申請者は、α-エノラーゼによるAβ線維形成抑制能は、その酵素活性に依存するとの仮説を立てた。そこで、α-エノラーゼに対して90℃、5分間の熱処理を加えたところ、その酵素活性が完全に消失した（図2A）。また、図1と同様にチオフラビンTによる吸光度測定、および透過型電子顕微鏡を用いた検討を行い、90℃の熱処理で失活させたα-エノラーゼは、そのAβ線維形成抑制効果が失われ、線維形成に至ることを示した（図2B、紫）（図2C、右端）。さらに、ウェスタンブロット法においても、90℃の熱処理で失活させたα-エノラーゼを添加した群において、Aβ線維が確認された（図2D、Eの右端）。

図2　α-エノラーゼの酵素活性の影響



考　察

本研究において、申請者は　①α-エノラーゼのAβ線維形成抑制にセリンプロテアーゼ作用が関与していること、②α-エノラーゼのAβ線維形成抑制に、その酵素活性も関与するという、これまでに報告のない全く新しい作用機序を見出した（論文投稿中）。

先行研究において申請者は、α-エノラーゼがAβによる細胞毒性を抑制することを既に

示していたがその詳細なメカニズムは不明であった。本研究では、その発展的研究を行い、αエノラーゼがセリンプロテアーゼ活性を介して、Aβタンパクを切断、断片化させた結果、Aβ線維形成能が顕著に減弱、あるいは消失し、Aβ線維が減少する可能性を示した。Aβは、はじめ単量体として存在するがその毒性は低く、凝集する過程で形成されるAβ線維が強力な細胞毒性を示す。申請者の検討によりα-エノラーゼがAβ線維形成を抑制し、Aβの細胞毒性を軽減させる可能性を示した。また、α-エノラーゼ酵素活性低下とAβ線維形成との関連については、ヒト検体を用いた検討で、AD患者におけるα-エノラーゼ活性が健常人と比較して減少していることが既に示されているがその意義は不明であった[3、4]。本検討において、α-エノラーゼの酵素活性減弱がADやCAAの病態進行の可能性に影響している可能性を示した。

要　約

α-エノラーゼによるAβ線維形成抑制にはセリンプロテアーゼ作用が関与する。また、α-エノラーゼのAβ線維形成抑制には、その酵素活性も関与している。

文　献

1. Viswanathan A, Greenberg SM. Cerebral amyloid angiopathy in the elderly. Ann Neurol ; 70:871–880, 2011.
2. Inoue Y, Ueda M, Tasaki M, Takeshima A, Nagatoshi A, Masuda T, Misumi Y, Kosaka T, Nomura T, Mizukami M, Matsumoto S, Yamashita T, Takahashi H, Kakita A, Ando Y. Sushi repeat-containing protein 1: a novel disease-associated molecule in cerebral amyloid angiopathy. Acta Neuropathol; 134: 605-617, 2017.
3. Sultana R., Boyd-Kimball D., Poon H. F., Cai J., Pierce W. M., Klein J. B., Merchant M., Markesbery W. R., and Butterfield D. A. Redox proteomics identification of oxidized proteins in Alzheimer's disease hippocampus and cerebellum: an approach to understand pathological and biochemical alterations in AD. Neurobiol Aging; 27: 1564–1576, 2006.
4. Butterfield DA, Poon HF, St Clair D, Keller JN, Pierce WM, Klein JB, Markesbery WR. Redox proteomics identification of oxidatively modified hippocampal proteins in mild cognitive impairment: insights into the development of Alzheimer's disease. Neurobiol Dis; 22: 223-232, 2006.