

審査の結果の要旨

氏名 安藤 香奈絵

アルツハイマー病 (AD) は、神経細胞自身の変調が原因となる老人性痴呆症の代表的な病気である。AD 患者脳内に大量に観察される老人斑の主成分 β アミロイド ($A\beta$) は、レセプター様一回膜貫通型構造を持つアミロイド前駆体蛋白質 (APP) から生成されるが、その詳細な分子機構は未だ明らかではない。APP の代謝と $A\beta$ 生成機構を分子レベルで解明することが、AD 発病の理解につながると考えられる。APP は、神経細胞だけでなく全ての組織で発現している。従って、神経細胞に特徴的な APP の代謝機構を解明する必要がある。

本研究は、APP が神経細胞で特異的なリン酸化を受ける事に着目して、リン酸化が APP の代謝に果たす役割を解析したものである。リン酸化が APP の細胞質ドメインに結合するタンパク質の結合活性を制御し、結果として APP の代謝を調節する事を初めて示した。本研究は、APP 結合タンパク質が介する APP の代謝の分子機構に新たな知見を見出したものである。

APP の細胞質ドメインは、APP の機能・生理的代謝に重要な役割を担っている。APP 細胞質ドメインには、少なくとも 3 つの機能モチーフが存在し、複数の細胞内タンパク質が相互作用を行うことで、APP の機能・生理的代謝を制御している。安藤は修士課程において APP の神経特異的なリン酸化が、神経細胞の突起伸張に機能していることを明らかにした。博士課程においては、リン酸化が APP の代謝を制御する仕組みを解明した。リン酸化サイト Thr668 に変異を導入し、Yeast-two hybrid 法、Far western 法を用いて、野生型 APP に結合するが変異 APP (Thr668 を Ala もしくは Glu に置換した APP) には結合しない、もしくは結合が強まる分子の探索を行った。その結果、既知の APP 結合タンパク質 Fe65 と新規タンパク質 (TAB と命名) を同定した。両タンパク質の完全長 cDNA を単離して機能解析を行った。

Fe65 は神経組織に特異的に発現するタンパク質であり、当初転写因子 CP2/ LSF/ LBP1 と相互作用する因子として見いだされたが、APP 結合タンパク質として再同定された。Fe65 は APP 細胞質ドメインの 3 つの機能モチーフのうち、もっとも C-末端側に位置する 682-YENPTY-687 配列 (アミノ酸番号は APP695 アイソフォームのものを用いる) を認識し、リン酸化サイト Thr668 を含む 667- VTPEER-672 配列は認識サイトではないことが明らかになっていた。そこで、APP 結合サイトである Fe65 の 2 番目の Phosphotyrosine Interaction

Domain (Fe65PI2)とGSTの融合タンパク質を作成し、野生型 APP(APPwt), Thr668 を Ala (APP T668A) もしくは Glu (APP T668E)に置換した APP を発現させた細胞抽出液を用いて Pull-down アッセイを行った。その結果、Thr668 に変異を導入した APP は Fe65PI2 に対する結合活性が大きく減少した。全長の APP695 と Fe65 を細胞内に共発現させ共役免疫沈降を行い、APP と Fe65 の安定的な結合には Thr668 が必要であることを示した。

次に、APP と Fe65 の相互作用が APP の細胞質ドメインペプチドでは阻害されるが、リン酸化された APP 細胞質ドメインペプチドによる阻害効果は弱いことを見いだした。両ペプチド共に認識サイトである 682-YENPTY-687 配列は含んでいる。一方、リン酸化サイト Thr668 を含む 667- VTPEER-672 モチーフだけを含むペプチドはリン酸化、脱リン酸化を問わず、APP と Fe65 の相互作用を阻害しなかった。これは、Thr668 のリン酸化が、682-YENPTY-687 配列を含む C-末端側の構造を変化させることで、Fe65 の結合を制御している可能性を示唆するものである。そこで、全長のリン酸化、脱リン酸化 APP をラット脳より抽出し、GST-Fe65PI2 に対する結合能を Pull-down アッセイ法で検討した。その結果として、リン酸化 APP は GST-Fe65PI2 にほとんど結合しないことを明らかにした。他の PI ドメインを持つ APP 結合タンパク質、X11L や mDab1 の APP に対する結合は Thr668 サイトの変異およびリン酸化によって影響を受けなかった。

APP695 を安定的に発現させた HEK293 細胞に Fe65 を過発現させると、 β -アミロイド 40(A β 40) および 42(A β 42) の生成が有意に減少した。しかしながら、リン酸化サイトに変異を導入した APP を安定的に発現させた HEK293 細胞に Fe65 を過発現させた場合は、A β 40 および A β 42 の生成は減少しなかった。どちらの細胞も Fe65 を発現していない時は、A β の生成量は同じであった。これは、APP のリン酸化が結合タンパク質との相互作用を介して A β 生成を制御する事を示した初めての結果である。

さらに、Thr668 サイトに依存して APP に結合する新規タンパク質(TAB, Thr668-dependent APP binding protein)の一次構造を決定し、結合特性を解析した。これは、667- VTPEER-672 モチーフに直接結合することが明らかになった初めてのタンパク質である。TAB の発現を Northern blot で解析したところ、生体組織と共に胎児期に高い発現が認められた。細胞に TAB を発現させ、分布を解析したところ、APP とは細胞膜近辺で共局在していた。TAB の生理機能は十分に解明していないが、リン酸化サイトを認識し APP と相互作用を行う事が判明している唯一のタンパク質であるので、APP の生理機能を修飾している可能性が考えられた。

以上、本研究より、APP 細胞質ドメインのリン酸化が、結合タンパク質 Fe65 の結合を制御する事によって A β の生成を調節していることが明らかになった。さらに、リン酸化サイトを直接認識する新規タンパク質の単離にも成功した。これらの多くの新発見を含む研究成果は、アルツハイマー病の発病原因の 1つとされている β -アミロイドの生成機構を解明する上で、大きく貢献すると考えられるので、博士(薬学)の授与に値するものと認めた。