

## 審査の結果の要旨

氏名 飯島浩一

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  $\beta$  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) の代謝過程で生成される。このため、 $A\beta$  生成量増加もしくは異常代謝による APP の生理機能不全が AD 発病の原因と考えられている。従って、AD を理解するためには、APP の代謝と生理機能を解明することが必要である。

本研究は、APP の生理的代謝と機能発現に必須である細胞質ドメインの機能解析を行ったものである。APP 細胞質ドメインの機能は、細胞質ドメインに結合する因子によって発現されると考えられている。APP 細胞質ドメインには、3つの機能モチーフが含まれている。細胞膜に近い N-末端側から 653-YTSI-656、667-VTPEER-672、682-YENTPY-687 (アミノ酸番号は APP695 アイソフォームに対するものを用いる) である。Fe65, X11L, mDab1 等はすべて 682-YENTPY-687 モチーフが結合認識サイトである。667-VTPEER-672 モチーフを認識するタンパクは、本研究室で見出された TBA だけであり、また 653-YTSI-656 に結合するタンパク質は PAT1 が報告されているが PAT1 が APP の代謝・生理機能にどのように関与しているのかは報告がない。本研究は、653-YTSI-656 に結合する新規タンパク質 hard1 を見だし、その生理機能を解明したものであり、653-YTSI-656 に結合するタンパク質が APP の代謝を制御する事を明らかにした初めての研究である。

Yeast-two hybrid 法を用いて、APP 細胞質ドメインと相互作用する新規遺伝子の探索を行った。その結果、酵母の Arrested deficiency 1 N-terminal acetyltransferase (ard1) とホモロジーを持つ新規タンパク質が APP と相互作用することを見だし、その全長 cDNA を単離した。このタンパク質を human ard1 N-terminal acetyltransferase (hard1) と名付けた。hard1 は酵母 ard1 の酵素活性ドメインと 60% のアミノ酸相同性を示したが、C-末端側の活性調節因子結合ドメインは 40% の相同性であった。hard1 の活性調節因子は見出されていないので、hard1 が ard1 同様に酵素活性を持つかどうかは未確認である。hard1 の部分欠失変異体を作成し、APP 結合ドメインを Yeast-two hybrid 法を用いて同定した。その結果、hard1 の c-末端側 50 アミノ酸が APP との相互作用に必要であることを明らかにした。また、APP 細胞質ドメインの欠失変異体を作成し、APP 側の結合領域が 653-YTSI-656 モチーフであることを同定した。特に 653-YTSI-656 の Tyr653 を Ala653 に置換すると hard1 の結合は完全に阻害された。HEK293 細胞に APP と hard1 を共発現させ、共役免疫沈降法を

行うことで、両タンパク質が細胞内でも相互作用を行うことを確認した。APP と hard1 は細胞の細胞膜近辺で共局在する事を免疫染色法で明らかにした。パルスチェイス法を用いて、hard1 が APP の代謝に及ぼす効果を解析した。その結果、hard1 は APP の成熟化（後期ゴルジ体以降の O-型糖鎖修飾を受けること）には関与しないが、成熟した APP の代謝を遅らせ安定化させることが明らかになった。さらに、生成されてくる培地中の A $\beta$  をサンドイッチ E LISA 法で測定したところ、A $\beta$  40 の生成を 20-30%抑制したが、A $\beta$  42 の生成には影響を及ぼさなかった。hard1 は、A $\beta$  40 の生成を抑制する初めての APP 結合タンパク質であることを明らかにした。これまで、A $\beta$  の生成を制御するタンパク質はすべて 682-YENTPY-687 を認識するタンパク質であったので、hard1 の作用メカニズムの解明は APP の代謝を理解する上で重要である。

さらに飯島は以下の研究を行った。APP は一回膜貫通型の受容体構造をとる膜タンパク質であるため、APP が細胞外情報を細胞内に伝える受容体の働きを行っている可能性が考えられた。飯島は、修士課程において APP の神経特異的リン酸化を見だし、リン酸化が神経特異的に活性化されるキナーゼ Cdk5 によって触媒されることを実証した。このリン酸化が細胞外からの刺激によって細胞内に情報を伝える可能性を考え、APP 細胞外ドメインがリン酸化制御に果たす役割の解明も行った。様々な APP 細胞外ドメイン欠失変異体を作成し、細胞に発現させて、細胞内ドメインのリン酸化レベルを定量した。リン酸化は細胞外ドメインの構造により影響を受けない事を証明した。APP 細胞内ドメインのリン酸化は外部からの情報伝達に関与していると言うよりはむしろ、APP の機能・代謝制御に細胞内側から制御されている可能性が高くなった。

本研究は、新規 APP 結合タンパク質を単離し、その機能の解析を中心としたもので、多くの新発見を含んでいる。従って、アルツハイマー病の原因因子である APP の生理機能と発病原因の 1 つとされている  $\beta$ -アミロイドの生成機構を解明する上で貢献するところ大であり、博士（薬学）の授与に値するものと認めた。