

論文内容の要旨

論文題目 ; アルツハイマーβアミロイド前駆体蛋白のγ切断機構に関する研究

氏名 ; 岩田 博司

[序論]

アルツハイマー病(Alzheimer's disease ; AD) は初老期、老年期に発症する進行性の神経変性疾患である。高齢化社会を迎えた現在、AD の頻度は急速に増加するものと予想され、その原因の解明、治療法の確立は急務である。AD 患者脳に出現する病理学的変化の一つである老人斑は βアミロイドペプチド (Aβ) から構成される。Aβはβアミロイド前駆体蛋白 (βAPP) からプロテアーゼにより切り出されて産生される。I 型の一回膜貫通型蛋白質であるβAPP から Aβが切り出される際、まず細胞外側でβセクレターゼによる切断を受け C 末端断片 (C100) が生じたのち、膜貫通領域内部で、γセクレターゼによる切断を受けることにより Aβが生じる。Aβにはγセクレターゼによる切断位置の違いにより、C 末端が第 40、42 残基まで伸びた Aβ40 と Aβ42 が存在する。このうち Aβ42 は凝集性が高く初期から蓄積すること、また、家族性 AD (FAD) の原因遺伝子である βAPP あるいはプレセニリン (PS) の変異により Aβ42 の産生が亢進することが明らかにされた。従って Aβ産生にかかわるγ切断機構、特に Aβ42 の産生機序の解明は AD の病態の理解に極めて重要である。本研究においては (1) γ切断により Aβが産生される細胞内コンパートメントの同定、(2) γ切断に必要なβAPP 分子内サブドメインの同定、特に細胞質ドメインと膜貫通領域の機能的意義の検討を行い、更にこれらと PS の FAD 変異による Aβ42 産生上昇機構との関連を明らかにすることを目的として研究を進めた。

[方法と結果]

1. γ セクレターゼ活性を有する細胞内コンパートメントの同定

β APP から $A\beta$ が産生される過程においては、第一段階として β セクレターゼによる切断を受け、その結果生じた 99 アミノ酸からなる C 末端フラグメント (C100)が γ セクレターゼの基質となり γ 切断が生じるものと考えられている。そこで私は β APP の γ 切断のみに注目した解析を可能とするために、N 末端にシグナルペプチドを付加した C100 を基本型として改変分子を構築し解析を進めた。 γ セクレターゼ活性を有する細胞内コンパートメントを同定するために、C100 の C 末端側に小胞体(ER)局在シグナルである -KKLN 配列、及びトランスゴルジネットワーク (TGN) へのリサイクルシグナルである -SDYQRL 配列を結合させたキメラ蛋白をマウス N2a 細胞に発現させた (図 1)。各キメラ蛋白の細胞内局在を免疫細胞化学的に観察すると、C100 は主に ER とゴルジ体、C100/ER は主に ER、C100/TGN は主にゴルジ体に局在することが確認された。ウエスタンブロット解析では、C100 キメラ蛋白に相当する約 12 kDa のバンドに加えて、カスパーゼ切断による産物であることが確認されている約 8 kDa のマイナーバンドが検出された。各キメラ蛋白を発現させた場合に分泌される $A\beta$ を ELISA 法で、細胞内 $A\beta$ を IP-Western 法により検出した。C100/ER を発現している場合には分泌型、細胞内 $A\beta$ ともに検出されなかったが、C100/TGN 発現により分泌型、細胞内 $A\beta$ がともに検出され、その量は C100/wt を発現させた場合とほぼ同等であった。FAD 変異を有する PS2 を共発現させた場合には、分泌型 $A\beta$ 、細胞内 $A\beta$ ともに C100/ER では $A\beta$ 42 産生亢進は生じなかったが、C100/wt、C100/TGN では $A\beta$ 40 の減少と、 $A\beta$ 42 産生の上昇がみられた (図 1)。 β APP 全長についても同様のキメラ蛋白を作製し解析を試みたところ、C100 キメラ蛋白を発現させた場合と同様の結果を得た。これらの結果から、細胞内及び分泌型 $A\beta$ の大部分はともに TGN 以降の late compartment で産生されること、変異型 PS2 の $A\beta$ 42 産生亢進作用もこれらのコンパートメントで生じることが示唆された。

2. γ 切断に必要な β APP サブドメインの検討

β APP には様々な機能配列や修飾部位が存在することが明らかにされている。また細胞質領域には複数の結合蛋白の存在が明らかにされており、 $A\beta$ 産生にも影響を及ぼすことが示されている。 $A\beta$ は β 切断後 C100 が γ 切断を受けて生じるが、このうち γ 切断に必要な β APP の分子内サブドメイン、特に細胞質領域の役割は不明であった。そこで C100 の細胞質領域を段階的に欠失させた変異体を作製し解析を行った。caspase-3 切断部位から C 末端側を欠失した C100/stop68、膜アンカリングに必要とされる KKK 配列以降を欠失した C100/stop56、及び KKK 配列を含む細胞質領域全体を欠失した C100/stop52 を作製した (図 2)。各 C 末端欠失型変異体は ER、ゴルジ体を含む細胞

内膜系に広く分布し、その局在は全長 C100/wt と変わらなかった。また全ての変異体は 0.5M Na₂CO₃(pH11.0)不溶、1% TritonX-100 可溶であり、膜に挿入されていることが示された。Aβ分泌を ELISA 法で解析すると、C100/stop68、C100/stop56 発現時には Aβに変化は見られず、C100/stop52 発現により Aβ1-40 分泌は変化しなかったが Aβ1-42 分泌が特異的に減少した。次に変異型 PS2 と C 末端欠損型 C100 を共発現すると Aβ1-42 分泌の上昇が観察され、この場合細胞質領域を完全に欠失させた C100/stop52 でも Aβ42 の産生亢進は全長 C100/wt と同程度に生じた (図 2)。βAPP 全長についても同様の細胞質領域欠失型変異体を作製し解析を試みたところ、C100 キメラ蛋白を発現させた場合とほぼ同様の Aβ42 上昇を確認した。これらの結果からγセクレターゼによる βAPP の切断及び変異型 PS による Aβ42 産生上昇効果には膜貫通部分を含む C100 の N 末端半のみが存在すれば十分であり、細胞質領域は必要ではないことが示唆された。

3. Aβ1-40、1-42 部分のみの細胞発現による効果

C100 の細胞質領域を段階的に欠失させた結果、KKK 配列以降の細胞質領域を完全に欠失させてもγセクレターゼの基質となり Aβ産生が生じた。そこで更に欠失を膜貫通領域まで拡大し、C100/stop52 より更に 10 アミノ酸欠失させた Aβ1-42、Aβ1-40 を細胞に発現させ、Aβの挙動を検討した。N 末端側にシグナルペプチドを付加した sAβ1-40 と sAβ1-42 そのものを COS-1 細胞に一過性に発現させ細胞内局在を解析したところ、sAβ1-40 は細胞内膜系に局在し、特に ER に強い局在を示した。一方 sAβ1-42 は sAβ1-40 と同様に ER に局在するとともに、細胞内でしばしば凝集体様の構造を形成することが明らかとなった。この構造には ER マーカーの BiP 及び TGN マーカーの Adaptin-γも共存していた。次に sAβ1-40、sAβ1-42 発現により分泌される Aβを ELISA 法で測定した。その結果、Aβ1-40、Aβ1-42 は同等に細胞内に発現されたが、相当量の Aβ1-40 が分泌されるのに対し、Aβ1-42 はほとんど分泌されなかった。また sAβ1-42 から Aβ1-40 が産生されることはなかった。これらの結果から、γ切断が生じるには膜貫通部分の保存された状態が必要であること、また Aβ1-42 は Aβ1-40 とは異なり、細胞内で膜と高い親和性を示し、細胞内に留まりやすい性質を有することが明らかとなった。

[まとめと考察]

本研究においてβAPP のγ切断及び変異型 PS2 による Aβ42 産生亢進効果は ER ではなく TGN 以降で主に生じており、βAPP の細胞質領域を欠失させても影響を受けないこと、さらに Aβ42 は分泌されずに細胞内に留まりやすい性質をもつことが明らかとなった。これらの結果からβAPP は主に TGN においてその膜内部分で PS の作用を受け、γ切断が生じるものと考えられる。また FAD 変異 PS による Aβ42 産生上昇効果も主に TGN

で β APPの膜内部分を介して生じるものと考えられる。 $A\beta_{42}$ は $A\beta_{40}$ とともに分泌され老人斑の形成を促しAD発症に至るが、 $A\beta_{42}$ の一部は分泌されずに細胞内に留り、細胞障害性を示す可能性も残される。今後 γ 切断による $A\beta_{40}$ と $A\beta_{42}$ の切り分け機構を更に追求すること、細胞内 $A\beta_{42}$ の効果を明らかにすることがAD発症機構の解明と治療法の開発に重要と考えられる。

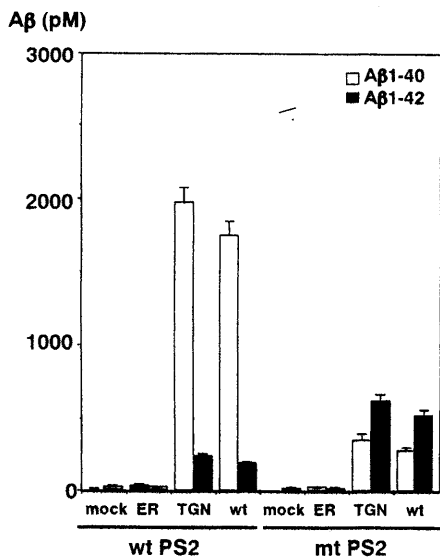
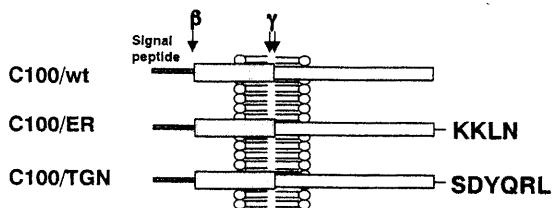


図1. 細胞内輸送シグナルを結合させた β APP C末端断片(C100)キメラ蛋白とPS2を共発現させた場合の $A\beta$ 分泌

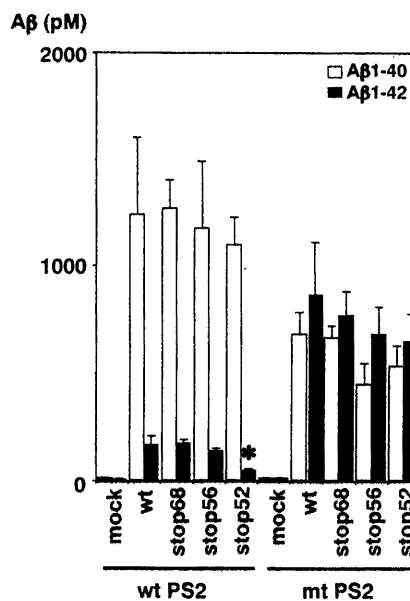
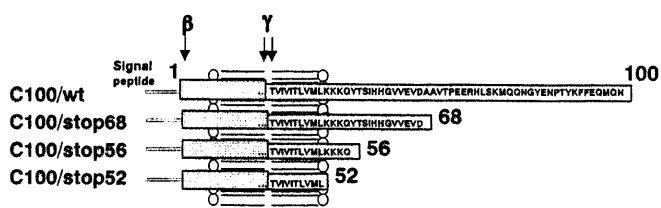


図2. 細胞質領域欠失型C100変異体とPS2を共発現させた場合の $A\beta$ 分泌