

審査の結果の要旨

氏名 多留偉功

アミロイド前駆体タンパク質 (APP) はその代謝過程において β アミロイド ($A\beta$) を生成することから、アルツハイマー病 (AD) の発症・進行に深く関与していると考えられている。一回膜貫通型タンパク質である APP の細胞内での代謝調節や生理機能の発現には細胞内ドメインにおける他のタンパク質との相互作用が不可欠であり、その解明は AD の分子機構および APP の生理機能を理解する上で重要であると考えられる。多留偉功は、修士課程において APP のショウジョウバエホモログである APPL に結合するタンパク質として APLIP1 および dX11L を単離した。本研究において、まず、ショウジョウバエ APPL 結合タンパク質 APLIP1 の cDNA をプローブとしてマウス脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングし、APLIP1 と高い相同性を示す二つの遺伝子を単離した。一つは近年 c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK) の結合タンパク質として同定された JNK interaction protein 1 (JIP1) と一致した。もう一つの未知遺伝子については 5' RACE 法で全長配列を決定した。この遺伝子はのちに JIP1 のファミリー分子 JIP2 として報告された。これらは脳において主に発現しており、C 末端領域には APLIP1 と同様に PI ドメインおよび SH3 ドメインを、N 末端側には JNK との結合ドメイン (JBD) を有する。

更に、JIP1 および JIP2 に関して、次の3点を解明した。

(1) 哺乳類における APLIP1 相同分子である JIP1 および JIP2 と APP 細胞質ドメインとの相互作用。(2) JIP1 および JIP2 の APP 細胞内代謝への関与。(3) APP の細胞質ドメインがストレスに応答してリン酸化修飾を受けることを発見したが、このリン酸化に対する APP 結合タンパク質の影響。

1. 哺乳類 APLIP1 相同分子 JIP1 および JIP2 の同定ならびに APP 細胞質ドメインとの相互作用の解析

GST 融合タンパク質として精製した APP 細胞質ドメインと *in vitro* で生合成した JIP1 および JIP2 タンパク質とを混合すると、両者の結合が観察された。さらに JIP1 および JIP2 を APP と共に過発現させた COS7 細胞から免疫沈降すると APP が共に回収されたことから細胞内において両者が相互作用しうることが明らかになった。興味深いことに、これらの実験の結果、JIP1 と JIP2 は共通の機能が報告されたファミリー分子であるにもかかわらず、APP との相互作用の強さに関しては大きく異なっていることが明らかになった。各種変異体を用いた解析からこの JIP1 と APP 細胞質ドメインとの相互作用には JIP1 の PI ドメインと APP の YENPTY モチーフが関与することが示された。

2. APP 細胞質ドメイン結合タンパク質 JIP1 の APP 細胞内代謝への関与

JIP1 の結合に重要な YENPTY モチーフは APP の細胞内の代謝に関与することが

知られている。そこで次に、JIP1 が APP の代謝過程においてはたす役割について検討した。Neuro2a 細胞において JIP1 を過剰発現させた結果、細胞内の全長 APP の蓄積が観察され、APP の切断によって生成する CTF および分泌型 APP (sAPP) が減少し、同時に、細胞外に分泌される A β の量も減少した。各種変異体を用いた解析によって、この作用には JIP1 と APP との相互作用が重要であることが示された。JIP1 とは異なり、APP との相互作用が弱い JIP2 については、過剰発現による APP の代謝への影響はみられなかった。これらの結果から、JIP1 が生体内において APP の代謝調節の役割を担っている可能性が示唆された。

3. ストレスに応答した APP 細胞質ドメインのリン酸化の同定とリン酸化における APP 結合タンパク質の機能

JIP1 および JIP2 は、APP 細胞質ドメインと相互作用する一方で、JNK キナーゼカスケードに関わるスキャフォールド分子としての働きが報告されている。JNK 系はストレス応答と密接に関わる細胞内情報伝達系の一つであり、アポトーシス誘導または生存シグナルとしての役割が指摘されている。APP は生体内において細胞質ドメインの Thr668 サイトにリン酸化修飾を受けうることが知られている。そのリン酸化は APP 細胞内ドメインの立体構造変化を引き起こすことでタンパク質間相互作用に影響を与えることが示されており、APP の代謝もしくは生理機能の調節において重要であると考えられる。

多留偉功は JNK 系の活性化にともなって APP Thr668 のリン酸化が誘導されることを見出した。JNK を活性化させることが知られている高浸透圧刺激、タンパク質合成阻害剤添加、UV 照射等の各種ストレスを細胞に与え、APP Thr668 リン酸化フォームを特異的に認識する抗体を用いて解析をおこなうと、これらの細胞において APP Thr668 サイトのリン酸化誘導されていた。JNK 系の上流キナーゼである zipper protein kinase (ZPK)/dual leucine zipper kinase の過剰発現によって JNK 系を活性化させた際にも、同様のリン酸化が検出された。これらの刺激にともなう APP リン酸化は、JNK を過剰発現させると顕著に増強され、逆に JNK を阻害することが報告されている JBD を過剰発現させた細胞においては抑制された。さらに、刺激後の細胞から免疫沈降によって回収した JNK は、*in vitro* で GST-APP タンパク質および APP 細胞内ドメイン部分の合成ペプチドをリン酸化したことから JNK が APP Thr668 リン酸化能を有することが示された。以上の結果より、培養細胞においてストレス等に応答して活性化した内在性 JNK が APP の細胞質ドメイン Thr668 サイトのリン酸化を引き起こすことが示唆された。

JNK 系活性化にともなう APP Thr668 サイトのリン酸化は、APP 結合タンパク質による制御を受ける可能性が考えられる。そこで JIP1 および JIP2 を過剰発現した細胞における JNK 活性化刺激にともなう APP リン酸化レベルを、リン酸化特異的抗体を用いたイムノブロットによって定量した。その結果、JIP2 を発現すると APP のリン酸化の抑制がみられた。それに対し JIP1 を共発現した際にはリン酸化が増加する傾向が観察されたが顕著なものではなかった。

そこでさらに JIP 以外の APP 結合タンパク質についても同様に検討したところ、

興味深いことに、X11L を発現させた場合に APP のリン酸化が顕著に増強された。X11L は、APLIP1 とともにショウジョウバエ APPL 結合分子として同定した dX11L の相同分子でもあり、過剰発現時には JIP1 と同様に細胞内 APP を安定化する効果を示す。しかし X11L によるこのリン酸化促進作用は、APP 代謝安定化に重要な C 末領域よりもむしろ N 末端側の領域を必要とすることから、APP との相互作用の新たな機能であると考えられる。

現在、 $A\beta$ の異常な産生、蓄積が AD 発病の重要な要因であることが示されつつあるが、患者の大部分を占める孤発性 AD において、いかにしてその $A\beta$ 異常が生じているのかという点が大きな疑問として残されている。その機構を解明する上で、APP の代謝に関わる分子群を同定しその複雑な制御機構を明らかにしていくことは重要であり、本研究で APP 代謝に作用する JIP1 との相互作用を新たに見出したことは意義がある。さらに AD 発病過程においては様々なストレス、炎症反応の関与が指摘されており、また患者脳における所見として JNK の活性化が認められている。したがって本研究で得られた、ストレス等に応答した JNK による APP のリン酸化とその制御に関する知見は、AD の分子機構を考える上での新たな観点を示したものである。以上により、本研究は博士（薬学）の学位を授与するに値するものと認めた。