

[別紙 1]

## 論文の内容の要旨

論文題目 : Distinct mechanisms by presenilin 1 and 2 leading to increased

intracellular levels of amyloid  $\beta$ -protein 42 in Chinese hamster ovary cells

和訳 : 変異型プレセニリン 1 及び 2 が細胞内アミロイド  $\beta$  タンパク 42 を増加させる機序の検討

指導教官 : 井原 康夫 教授

東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻

平成 11 年 4 月入学

医学博士課程

神経病理学

氏名 : 齊 悦

アルツハイマー病(Alzheimer's disease, AD)は進行性の痴呆疾患であり、その神経病理学的特徴は、多数の老人斑、神経原線維変化の出現と神経細胞の脱落である。老人斑は、アミロイド $\beta$ 蛋白質(amyloid  $\beta$ -protein, A $\beta$ )とよばれる分子量約 4000 の凝集性の高い蛋白質が細胞間隙に蓄積したものであり、早期に見られる病理学的変化であると考えられている。

A $\beta$ は、アミロイド前駆体蛋白質( $\beta$ -amyloid precursor protein, APP)が $\beta$ および $\gamma$ セクレターゼと呼ばれる 2 種類のプロテアーゼにより切断されて産生される。APP は 695-770 アミノ酸残基からなる膜 1 回貫通型蛋白質である。 $\beta$ セクレターゼが、まず APP の細胞外領域にある A $\beta$ の N 末端側を切断し、99 アミノ酸からなる C 末端断片(C99)を生じる。この C99 がさらに $\gamma$ セクレターゼによって膜内で切断され、A $\beta$ が産

生、分泌される。 $\gamma$ セクレターゼの切断により生じる  $A\beta$  の C 末端には多様性がみられ、主要な  $A\beta$  分子種として、第 40 番目のバリン(Val40)で終わる  $A\beta$ 40 と第 42 番目のアラニン(Ala42)で終わる  $A\beta$ 42 が存在する。 $A\beta$ 42 は  $A\beta$ 40 よりはるかに強い凝集性を示し、老人斑に最初に蓄積することが知られている。さらに、これまでに明らかにされた家族性アルツハイマー病(familial Alzheimer's disease, FAD)の三つの原因遺伝子、APP とプレセニリン(presenilin, PS)1 及び PS 2 に見られる変異が、いずれも  $A\beta$ 42 の産生を増加させることが判明したことから、 $A\beta$ 42 は AD の病因と密接に関連すると考えられている。

1995 年に FAD の原因遺伝子として同定された PS1 及び PS2 遺伝子は、アミノ酸の相同性が高い 8 回膜貫通型蛋白質をコードしている。現在までに PS1 には分子全体に分布している 80 種類以上の点突然変異が、また PS2 には 6 種類の変異が報告されている。PS 変異は  $A\beta$  の C 末端を生じる  $\gamma$ 切断に影響を及ぼし、凝集性の高い  $A\beta$ 42 の産生を特異的に上昇させる。

PS1/2 のダブルノックアウトマウス由来の細胞では、 $A\beta$  が検出されなくなり、 $\gamma$ セクレターゼの基質である C99 が蓄積し、 $\gamma$ セクレターゼ活性がなくなっていることが示唆された。このことから、PS が  $\gamma$ セクレターゼ活性に必須の要素であると考えられるようになった。さらに、活性部位に対する遷移状態を模倣した  $\gamma$ セクレターゼ阻害剤にて、PS の N 末端断片と C 末端断片がアフィニティー標識されたことから、PS が  $\gamma$ セクレターゼそのものであると考えられるようになってきた。しかし、PS の変異によってなぜ  $A\beta$ 42 の産生が特異的に増加するのかについてははまだ分かっていない。

本研究では、PS1 及び PS2 依存性  $\gamma$ セクレターゼの特徴を明らかにするために、APP と野生型または FAD 変異をもつ PS1 あるいは PS2 を安定的に発現する Chinese hamster ovary (CHO) 細胞を作製し、PS1 及び PS2 の変異が  $A\beta$  産生に及ぼす影響を調べた。

本研究では、野生型または複数の変異型 PS1 あるいは PS2 cDNA を含む発現プラスミドを、ヒト APP751 を過剰発現する CHO 細胞 (7WD10) に導入し、薬剤処理により目的蛋白質を安定的に発現する細胞を選択して実験に用いた。

まず初めに、APP と野生型あるいは N141I 変異をもつ PS2 を安定的に共発現する複数の CHO 細胞株を作製した。得られた細胞株の PS2 の発現レベルをウェスタンブロット法により定量し、発現量の一致する野生型と変異型の 3 ペアを選んでその後の実験に用いた。外因性 PS を過剰発現させると、内在性の PS の発現が著しく抑制さ

れること(displacement)が知られている。これらの3ペアではいずれも内在性PSのdisplacementが観察され、その程度はPS2の過剰発現の程度に依存していた。次に、これらの細胞から培地中に分泌されたA $\beta$ の量をサンドウィッチELISA法を用いて定量した。その結果、N141I変異型PS2では、野生型PS2と比べてA $\beta$ 42の量が増加していると同時にA $\beta$ 40の量が減少していることがわかった。また、細胞内のA $\beta$ については、APPとのcrossreactivityを避けるためにウェスタンブロット法により調べた。回収した細胞をクロロフォルム：メタノール処理により脱脂し、残渣を70%ギ酸で抽出してウェスタンブロット法を行い、ルミノイメージアナライザーを用いてA $\beta$ を定量した。その結果、培地内のA $\beta$ と同様に、細胞内でもA $\beta$ 42の増加とA $\beta$ 40の減少が見られた。また、A $\beta$ 42の増加の程度は内在性PSのdisplacementの程度に依存しており、これらの変化は導入した変異型PS2によるものであると考えられた。以上の結果から、PS2のN141I変異はA $\beta$ 42のレベルを増加させるだけでなく、A $\beta$ 40のレベルを減少させることが分かった。

このようなA $\beta$ の変化がN141I変異型PS2に特異的なものであるかどうかを調べるために、他のFAD変異であるM239V、T122P変異をもつPS2と、野生型PS1、PS2のN141I、M239V変異に相同な部位に変異をもつN135D、M233T変異型PS1をAPPとともに安定的に発現する細胞株を作製し、細胞内のA $\beta$ レベルをウェスタンブロット法により定量した。その結果、これらの変異型PS細胞でも、野生型PS細胞と比べて細胞内A $\beta$ 42の量が増加し細胞内A $\beta$ 40の量が減少していることが分かった。

次に種々のFAD変異PSの細胞内A $\beta$ に対する影響を調べるために、M146L、H163R、G384A変異を持つPS1をAPPとともに安定的に発現する細胞株を作製して、同様の検討を行った。すると、これらの変異型PS1細胞では、野生型PS1細胞と比べてA $\beta$ 42のレベルが増加したが、A $\beta$ 40のレベルには変化が見られなかった。

細胞内のA $\beta$ レベルは定常状態のそれであり、産生、分解、分泌、取り込みなどの総合的な結果をあらわしている。そこで、変異PS依存性 $\gamma$ セクレターゼの性質をさらに調べるために、無細胞系を用いてA $\beta$ の産生に対するPS変異の影響を検討した。全ての細胞株から膜画分を調製し、37°Cでインキュベートした。A $\beta$ 産生のtime courseを調べたところ、A $\beta$ の産生は少なくとも10分までは直線的に増加し、30分以降になると産生速度が著しく低下した。

野生型PS細胞の膜画分では、A $\beta$ 40がA $\beta$ 42よりはるかに多く産生され、約70%を占めた。変異PS2あるいはこれに相同な変異をもつPS1を発現する細胞の膜画分では、A $\beta$ 42の産生が著しく増加しA $\beta$ 40の産生量が減少した。従ってこれらの変異

型 PS では、無細胞系による A $\beta$  の産生が細胞内 A $\beta$  レベルの変化と一致した。

一方、M146L、H163R、G384A 変異型 PS1 を発現する細胞は、細胞内 A $\beta$  レベルに共通の変化 (A $\beta$ 42 の増加) が見られたが、その膜画分では多様な A $\beta$  産生様式が見られた。M146L 変異型 PS1 細胞膜画分では、A $\beta$ 42 の産生が増加したが A $\beta$ 40 の産生は野生型と比べて変化がなく、A $\beta$  産生様式が細胞内の A $\beta$  レベルの変化と一致した。ところが G384A 変異型 PS1 細胞膜画分では、A $\beta$ 42 の産生が大きく増加すると同時に A $\beta$ 40 の産生の減少が見られた。また、H163R 変異型 PS1 細胞膜では、野生型 PS1 と比べて A $\beta$ 42 の産生の増加が見られず、A $\beta$ 40 の産生が全体の約 80% を占めた。従って、これら二つの細胞株では、細胞内 A $\beta$  レベルと無細胞系による A $\beta$  産生結果が一致しなかった。殊に、H163R 変異型 PS1 細胞では両者の結果が全く異なったことから、膜以外の細胞質画分に A $\beta$  の産生に影響を及ぼす因子が存在するのではないかと考えられた。

野生型または変異型 PS1 及び PS2 細胞の膜画分を用いて、 $\gamma$ セクレターゼの阻害剤である DFK-167 の A $\beta$  産生への影響を検討した。いずれの PS 膜画分でも、高濃度の DFK で処理することにより A $\beta$ 40 と A $\beta$ 42 の産生が抑制されたが、低濃度の DFK 存在下では、A $\beta$ 40 の産生は抑えられたが A $\beta$ 42 の産生は一時的に増加した。この結果から、低濃度の DFK-167 処理により A $\beta$ 40 を産生する  $\gamma$ セクレターゼの活性が抑えられ、基質が A $\beta$ 42 を産生するセクレターゼに運ばれて A $\beta$ 42 の産生が増加すると推測される。

以上の結果から、PS1 及び PS2 の変異は二つのサブタイプに分けられると考えられる。一つのサブタイプは、野生型 PS と比べて、細胞内の A $\beta$ 42 の量が増加していると同時に A $\beta$ 40 の量が減少していた。無細胞 A $\beta$  産生系では、細胞内の A $\beta$  レベルの変化と一致して、A $\beta$ 42 産生量の増加と A $\beta$ 40 産生量の減少が見られた。PS2 変異またはそれに相同の PS1 変異がこのタイプに相当する。もう一つのサブタイプはそれ以外の PS1 変異であり、細胞内の A $\beta$  は、A $\beta$ 40 の量は変化せずに A $\beta$ 42 の量のみが増加した。ところが無細胞 A $\beta$  産生系では、細胞内の A $\beta$  レベルと異なり多様な A $\beta$  産生様式が見られた。

従って、変異型 PS1 及び PS2 はいくつかの機序により A $\beta$ 42 を増加させると考えられる。今後は、H163R 変異型 PS1 細胞で見られた膜以外の画分に存在すると考えられる A $\beta$  産生に影響を及ぼす因子について研究を進めていきたい。