

審査の結果の要旨

氏名 齊悦

本研究では、アルツハイマー病の病因に密接に関連するアミロイド蛋白質 ( $A\beta$ )を産生する酵素であるプレセニリン(PS)1 及び PS 2 依存性 $\gamma$ セクレターゼの特徴を明らかにするために、アミロイド前駆体(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検討したものであり、下記の結果を得ている。

1. 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。
2. これらの細胞を用い、分泌された  $A\beta$ と細胞内の  $A\beta$ を検討した所、同様の  $A\beta$ 変化が見られた。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、予想外に  $A\beta_{40}$ の量が減少していることがわかった。さらに、 $A\beta_{42}$ の増加の程度は内在性 PS の displacement の程度に依存していることから、これらの変化は過剰発現する変異型 PS によるものであると考えられた。
3. また、野生型または他の種々の FAD 変異 PS 2 及び PS 1 遺伝子を 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。その結果では、全ての変異型 PS 細胞において細胞内  $A\beta_{42}$ の量が増加することが示された。
4. 細胞内  $A\beta$ を定量したところ、FAD 変異である M239V、T122P 変異をもつ PS2 と、野生型 PS 1、PS2 の N141I、M239V 変異に相同な部位に変異をもつ N135D、M233T 変異型 PS1 を発

現する細胞では、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示された。無細胞系を用いて A $\beta$ の産生を検討した所、これらの変異型 PS 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ことが分かった。

5. 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。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。一方、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。

以上、本論文は CHO 細胞において、PS1 及び PS2 の変異が A $\beta$ 産生に及ぼす影響を検討した結果から、変異型 PS1 及び PS2 はいくつかの機序により A $\beta$ 42 を増加させることを明らかにした。本研究はアルツハイマー病の病因に密接に関連するアミロイド蛋白質 (A $\beta$ )を産生する機序の解明に貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。