

論文の内容の要旨

論文題目 **N-acetyltransferase 活性を介した
β-amyloid 産生制御に関する研究**

氏名 浅海 真

Amyloid Precursor Protein、APP はアルツハイマー病の病理学的特徴である老人斑の主要構成成分、β-amyloid (Aβ) の前駆体として単離された、長い細胞外ドメインと膜貫通ドメイン、短い細胞内ドメインからなる一回膜貫通型受容体に似た構造を持つタンパク質である。現在は APP の細胞内代謝過程でβ-secretase、γ-secretase により切り出され生成される Aβの持つ神経毒性が、シナプスの脱落や神経細胞死を引き起こし、アルツハイマー病を発症させると考えられている (βアミロイド仮説およびシナプス仮説)。実際、家族性アルツハイマー病では APP、presenillin の変異によって Aβ産生量が増加することが知られており、Aβの産生が神経細胞死の引き金となると広く考えられている。

当研究室ではこれまでに APP 細胞内ドメインに結合するタンパク質として hARD1 (human homologue of yeast ARD1 N-acetyltransferase) を単離した。yeast ARD1 はタンパク質の N 末端のアミノ酸 (特に Ser に対する特異性が高い) をアセチル化する N-terminal acetyltransferase である。これまでに我々は hARD1 が APP の代謝安定化を起こすとともに、Aβ40 産生を抑制することを見だしていたが、その分子機構は明らかではなかった。

本研究において私は、hARD1 に co-factor が存在し、両者の共存下でのみ N-acetyltransferase 活性を持つこと、その活性は hARD1 の acetyl-coenzyme A 結合配列に mutation を入れることで抑制されること、そして hARD1 の N-acetyltransferase 活性と Aβ40 産生に相関があることを見いだした。これらの結果は hARD1 による APP 代謝調節の分子機構に hARD1 の N-acetyltransferase 活性が関与していることを強く示唆するものである。

1. human NAT1 のクローニングと hARD1-hNAT1

の結合の検討

データベースを用いた相同性検索の結果、hARD1 は yeast ARD1 N-acetyltransferase の活性ドメインと約 60%もの相同性を持ち、また、acetyl-coenzyme A 結合配列も保存していることが明らかとなった。この知見を基に、私は hARD1 も yeast と同様に N-acetyltransferase 活性を保持し、その N-acetyltransferase 活性が APP 代謝調節機構に参与する可能性を考えた。この可能性を検討するため、まず human での N-acetyltransferase 活性測定系の確立を行った。

活性測定系を検討するにあたり、yeast では約 95kDa の分子量を持つ NAT1 というタンパク質が co-factor として働くという報告を基に、yeast NAT1 の human homologue をデータベースから検索した。その結果、yeast NAT1 と同様に N 末端側に TPR (tetratricopeptide repeat) motif を持ち (human では 5 つ、yeast では 3 つ)、yeast NAT1 と約 40%の相同性を持つ分子を見いだした (GenBank accession number AJ314788)。この分子を HEK293 細胞から RT-PCR 法で単離し、hARD1 との結合を共役免疫沈降法を用いて検討した。その結果、HEK293 細胞内での結合を確認した (Fig.1)。

2. N-acetyltransferase 活性測定系の確立

hNAT1 を単離し hARD1 との結合を確認したので、次に human での N-acetyltransferase 活性測定系の確立を行った。活性測定系の確立にあたり、yeast の活性測定系 (Lee et al., J.B.C. 263(29):14948- (1988))を参考にした。この系は、 ^3H ラベルされたアセチル基を持つ acetyl-coenzymeA を使い、ACTH peptide を基質として酵素反応をさせ、反応終了後に ACTH peptide をナイロン膜で回収し、転移したアセチル基を液体シンチレーションカウンターで計測するものである。反応条件やナイロン膜の洗浄液の溶液組成など、活性測定系の条件検討を行った結果、hARD1/hNAT1 を共発現させた HEK293 細胞の lysate で N-acetyltransferase 活性を検出した。また、この条件では hARD1, hNAT1 の単独

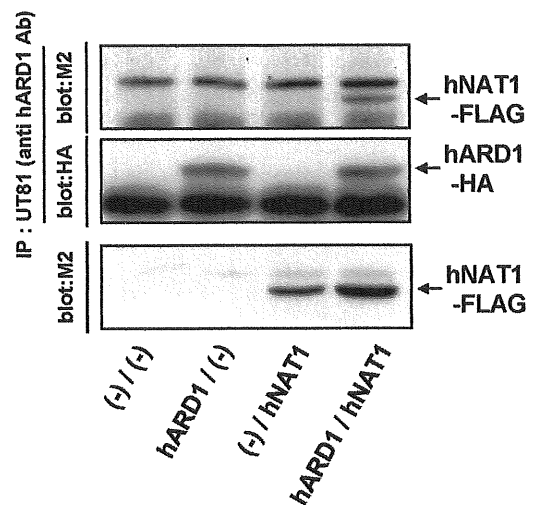


Fig.1 共役免疫沈降法による hNAT1-hARD1間の結合の確認

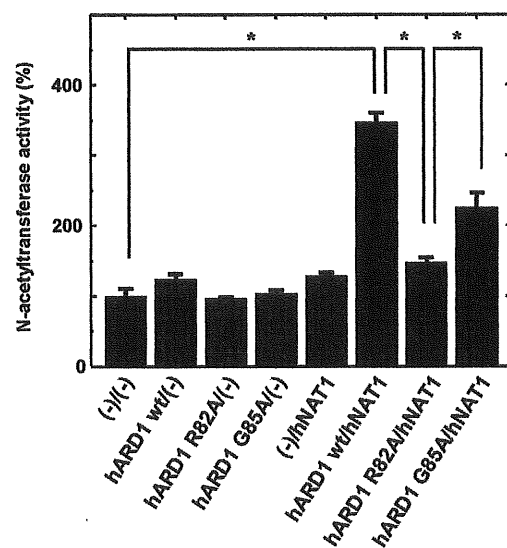


Fig.2 hARD1/hNAT1によるN-acetyltransferase 活性と hARD1 acetyl CoA結合配列の変異による活性の抑制 (ANOVA, $p < 0.05$)

発現下では活性の有意な上昇は観察されなかった。これは human での N-acetyltransferase 活性を初めて測定した結果である。

3. hARD1 dominant negative form の同定

hARD1 はその N 末端側の N-acetyltransferase 活性ドメイン内に acetyl-coenzymeA 結合ループを形成する配列を保存している (amino acid residues 82-87, RXXGXA)。この点を考慮し、その consensus sequence である Arg82 と Gly85 をそれぞれ Ala に変異させた hARD1 (hARD1 R82A, G85A) を作成し、N-acetyltransferase 活性への影響を検討した。HEK293 細胞にそれぞれの constructs (hARD1 wt, R82A, G85A, hNAT1) を発現させ、上記で確立した活性測定系を用いてその lysate の活性を測定した。この結果、hNAT1 と共に発現させた場合に活性の低下が観察され、変異による効果は R82A < G85A であった (Fig.2, ANOVA, significance at $p < 0.05$ or better)。hARD1/hNAT1 の共役免疫沈降物を用いた場合も同様の傾向を示した (data not shown) ことから、hARD1 R82A は hARD1 wt の dominant negative form として用いることができることが明らかとなった。また、hARD1 G85A は wt と R82A の中間の活性を示しており、この変異体も後の実験で用いることにした。

4. N-acetyltransferase 活性と A β 40 産生の相関関係の検討

これまでの結果から、hARD1 の acetyl-coenzyme A 結合配列に変異を入れる (R82A, G85A) ことで N-acetyltransferase 活性を欠失、もしくは一部を欠失することが明らかとなったことから、これらの変異体を用いて hARD1 の A β 40 産生抑制と N-acetyltransferase 活性の相関を検討した。実験は HEK293 細胞を用い、APP, hARD1 (wt, R82A, G85A), hNAT1 を一過的に発現させ、培地中に放出される A β 40 を sandwich ELISA 法を用いて測定した。その結果、特に hNAT1 と共発現させた場合に A β 40 産生量が N-acetyltransferase 活性と負の相関を示した (Fig.3, ANOVA, significance at $p < 0.01$ or better)。ただ、A β 40 産生量の変化は N-acetyltransferase 活性の変化量ほどではないことから、現在のところ、この酵素活性と A β 40 産生の間には何らかの因子が存在し、そのアセチル化が A β 40 産生制御の律速であると考えている。どちらにしろこの結果は、A β 40 産生、さらには APP の代謝の分子機構に N-acetyltransferase が関係していることを示唆した最初の報告である。

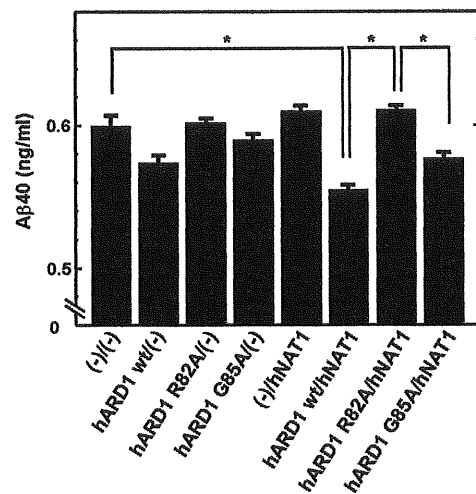


Fig.3 N-acetyltransferase活性と A β 40産生抑制との相関の検討 (ANOVA, $p < 0.01$)

示唆した最初の報告である。

4. N-acetyltransferase 活性が APP の endocytosis に及ぼす影響

前任者の pulse-chase 法による APP 代謝の解析から、hARD1 の強制発現によって Golgi 体で O 型糖鎖修飾を受けた後の mature APP の分解が抑制されることが明らかとなっている。また、ここ 10 年ほどの間に行われた細胞生物学的な実験から、APP の endocytosis と A β 40 産生に関連があることが示唆されている。これらの点から、hARD1/hNAT1 による A β 40 産生制御の作用点として APP の endocytosis を考え、hARD1 と hNAT1 を共に発現させた細胞での APP の endocytosis を経時的に測定し、コントロールと比較した。その結果、測定値のばらつきが大きく、どの時間でも有意さを検出することはできなかったが、hARD1 と hNAT1 を共に発現させた細胞での APP の endocytosis が抑制されるという傾向を見いだした (Fig.4, n=3, P>0.05, ANOVA)。A β 40 産生に APP の endocytosis が重要であるというこれまでの知見と考え併せると、この結果は非常に興味深いものである。今後、追試を行うと共に、hARD1 mutants の効果についても検討することを考えている。

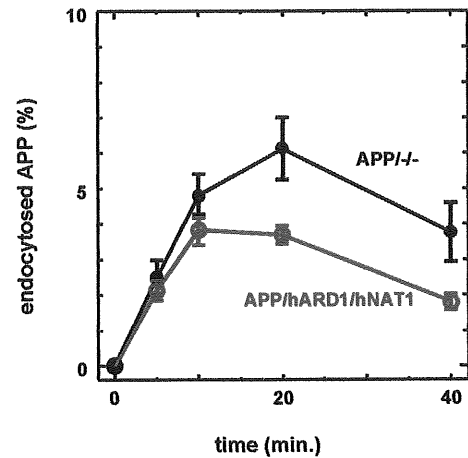


Fig.4 hARD1/hNAT1によるAPPのendocytosisの抑制 (ANOVA, p>0.05)

総括

本研究において私は、これまでその分子機構に関してほとんど解明されていなかった hARD1 による APP 代謝制御機構において、その N-acetyltransferase 活性が関与していることを示した。私は N-acetyltransferase 活性発現に必須のサブユニットである human NAT1 を単離し、その上で human での N-acetyltransferase 活性測定系を初めて確立した。次にその活性測定系を用いて、acetyl-coenzymeA 結合配列に変異を入れることで、hARD1 の N-acetyltransferase 活性が欠失、もしくは一部欠失することを明らかにした。さらにそれらの dominant negative form を用いて hARD1 の A β 40 産生への影響を検討した結果、N-acetyltransferase 活性と A β 40 産生量の間には負の相関関係があることを見いだした。また、その効果は APP の endocytosis を制御していることによるものである可能性を示唆するデータを得た。

また、アルツハイマー病と N-acetyltransferase 活性の関係を明らかにするために、患者脳での N-acetyltransferase 活性を測定し、健常人での活性と比較した。