

## 審査の結果の要旨

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、 $\beta$ -amyloid ( $A\beta$ ) 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  $\beta$ -secretase、 $\gamma$ -secretase により切り出され生成される  $A\beta$  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 ( $\beta$ アミロイド仮説およびシナプス仮説)。

神経生物物理学教室では、APP 細胞内ドメインに結合するタンパク質が APP の代謝を調節しており、その異常により  $A\beta$  の産成量が増大し、アルツハイマー病の発症に至るとする仮説のもとに、APP 細胞内ドメイン結合タンパク質の同定と機能解析を行ってきた。最近、APP 細胞内ドメイン結合タンパク質分子の一つとして、hARD1 (human homologue of yeast ARD1 N-acetyltransferase) を単離し、hARD1 が APP の代謝安定化を起こすとともに、 $A\beta$ 40 産生を抑制することを見出したが、その分子機構は明らかではなかった。

そこで、浅海 真は、本研究において、hARD1 の機能と APP 代謝への関与について調べた。そして、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  $A\beta$ 40 産生に相関があることを見出した。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

hARD1 は yeast ARD1 N-acetyltransferase の活性ドメインと約 60% の相同性を持ち、また、acetyl-coenzyme A 結合配列も保存していた。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出した (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により検討した結果、HEK293 細胞内での結合を確認した。

### 2. hARD1 の N-acetyltransferase 活性測定

浅海は、hARD1 の N-acetyltransferase 活性測定系の確立を行った。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 の活性を抑制する変異体の同定

hARD1 はその N 末端側の N-acetyltransferase 活性ドメイン内に acetyl-coenzyme A 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。その結果、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 (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。また、hARD1 G85A は wt と R82A の中間の活性を示した。

#### **4. N-acetyltransferase 活性と A $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$ 40 産生量が N-acetyltransferase 活性と負の相関を示した。ただ、A $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$ 40 産生制御の律速であると考えている。この結果は、A $\beta$ 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。

#### **5. N-acetyltransferase 活性が APP の endocytosis に及ぼす影響**

神経生物物理学教室では、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を既に示していた。また、最近 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 $\beta$ 40 産生に関連があることが示唆されている。そこで、浅海は、hARD1/hNAT1 による A $\beta$ 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出した。A $\beta$ 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。

以上のように、本研究は、hARD1 の 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、hARD1 の acetyl-coenzyme A 結合配列に変異を入れて、N-acetyltransferase 活性を欠失した変異体を作成した。そして、それらの dominant negative form を用いて hARD1 の A $\beta$ 40 産生への影響を検討した結果、N-acetyltransferase 活性と A $\beta$ 40 産生量の間にも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した。これらの結果は APP から A $\beta$  が産生される機構に関して新たな知見を加えるのであり、博士 (薬学) の学位に値するものと判定した。