

論文内容の要旨

論文題目 ショウジョウバエ細胞を用いた γ -セクレターゼ複合体形成機構の解析

氏名 高杉 展正

アルツハイマー病 (AD) は老年期痴呆の中でも最も頻度の高い疾患の一つである。AD の主要な病理学的特徴としては、大脳皮質、海馬における顕著な神経細胞の脱落に加えて、神経原線維変化、老人斑と呼ばれる異常構造物の蓄積が見られることが挙げられる。中でもアミロイド β 蛋白 ($A\beta$) を主要な構成成分とする老人斑は、AD 患者脳で最も初期にあらわれる病理学的変化であることから、 $A\beta$ が脳内において蓄積することが AD 発症に大きな役割を果たすとする「アミロイド仮説」が考えられている。

γ -セクレターゼは β -amyloid precursor protein (β APP) の膜内配列を切断し、 $A\beta$ の産生を担う膜結合型プロテアーゼである (Fig-1)。我々は家族性 AD 病因遺伝子産物である presenilin (PS) が分子内切断を受けること、断片化を受けた PS 蛋白は安定化され、高分子量複合体を形成し、この安定化された PS 複合体こそが γ -セクレターゼの本態であることを明らかにしてきた。現在では PS は γ -セクレターゼの活性中心サブユニットとして働くものと考えられている。一方、PS と結合し、 γ -セクレターゼ活性化に必要とされる他の構成因子として nicastrin (NCT)、APH-1、PEN-2 が報告されている。しかしこれらの因子の個別の機能や、PS 複合体形成における役割については未解明な点が多い。本研究において、私はショウジョウバエ S2 細胞を用い、ショウジョウバエ PS (Psn)、nicastrin (dNCT)、dAPH-1、dPEN-2 が、 γ -セクレターゼの形成と機能に与える影響を RNA interference (RNAi) 法による蛋白発現ノックダウン及び過剰発現系を用いて解析した。

まずショウジョウバエにおいても PS の代謝機構が保存されているかを検討するため、S2 細胞、マウス神経芽細胞腫由来の N2a 細胞に Psn を発現させてその代謝について解析した。S2 細胞における内因性 Psn 及び N2a 細胞に発現させた外因性 Psn は、ともに分子内切断を受けて断片化して安定化され、高分子量複合体を形成していたことから、PS の代謝機構はショウジョウバエにおいても保存されていると考えられた (Fig-2)。

次に γ -セクレターゼ複合体の各構成因子が Psn の代謝及び γ -セクレターゼ活性に与える影響を検討するため、 β APP の C 末端 99 アミノ酸の配列にシグナル配列を付加した C100 蛋白を恒常発現する S2 細胞に対し、 γ -セクレターゼ構成因子の RNAi を行い、Psn 及び C100 の代謝、 $A\beta$ 分泌量への影響を検討した。S2 細胞に多量に存在する断片型 Psn (Fig-3A、*CTF) 及び微量の全長型 Psn (FL) は、Psn の RNAi によってともに消失した。一方 dNCT および dAPH-1 の RNAi では、断片型 Psn のみが選択的に消失した。dPEN-2 の RNAi では、断片型 Psn の消失に加え、さらに全長型 Psn の蓄積が観察された。いずれの RNAi によっても γ -セクレターゼの基質となる C100、その代謝産物と考えられる α -stub の蓄積が観察された (Fig-3A)。同時に培地中に分泌される $A\beta$ を測定すると、いずれの RNAi によっても $A\beta$ 分泌が抑制され、 γ -セクレターゼ活性が消失しているものと考えられた (Fig-3B)。これらの結果から dNCT、dAPH-1、dPEN-2 は γ -セクレターゼ活性および、断片型 PS を含む活性型 γ -セクレターゼ複合体の形成に必須な因子であることが明らかとなった。

次に PEN-2 の RNAi により蓄積した全長型 Psn についてグリセロール速度勾配遠心法により解析した。コントロールの S2 細胞では、全長型 Psn が 200kDa 以下の低分子量領域 (LMW) に分画されるのに対し、dPEN-2 の RNAi により蓄積した全長型 Psn は、コントロール細胞における断片型 Psn と同様に 200kDa 以上の高分子量領域 (HMW) に存在していた (Fig-4A)。次に RNAi を 2 種類ずつ組み合わせ、dPEN-2 の RNAi による全長型 Psn の蓄積機構における dNCT、dAPH-1 の機能について分子遺伝学的に解析した。その結果全長型 Psn の蓄積は、dPEN-2 に dNCT または dAPH-1 いずれの RNAi を組み合わせることによって消失した (Fig-4B)。これらの結果から、まず全長型 Psn、dNCT、dAPH-1 によって安定な高分子量複合体が形成されるが、 γ -セクレターゼとしては不活性型であること、そしてこの未成熟な複合体が断片型 Psn を含む活性型 γ -セクレターゼとなる過程に dPEN-2 が必要とされることが予想された。

γ -セクレターゼ構成因子の機能をさらに解析するため、dNCT または dAPH-1 単独、及び dNCT と dAPH-1 を共発現する S2 細胞系を樹立し、Psn の代謝について検討した。dAPH-1 発現細胞ではコントロールまたは dNCT 発現細胞に比して、全長型 Psn の増加が見られた。dNCT/dAPH-1 共発現細胞ではさらに多くの全長型 Psn の蓄積が観察されたが、いずれの細胞においても断片型 Psn の量に変化は見られなかった (Fig-5A)。次に dNCT/dAPH-1 共発現細胞の膜画分を CHAPSO で可溶化し、免疫共沈降実験を行った。S2 細胞に内因性に存在している 7 回膜蛋白質 Smoothed (Smo) はどの因子とも共沈しなかったが、Psn、dNCT、dAPH-1 は各々を認識する抗体により共沈され、これらの因子は複合体を形成していると考

えられた (Fig-5B)。この膜面分をグリセロール速度勾配遠心法により分画すると、蓄積した全長型 Psn、dNCT、dAPH-1 は高分子量領域に存在していた。以上の結果より、過剰発現した dNCT、dAPH-1 と内因性全長型 Psn は相互作用し、高分子量複合体を形成するが、最終的な活性化には至っておらず、さらになんらかの活性化因子が必要であると考えられた。(Fig-5C)。そこで次に dNCT/dAPH-1 の共発現により蓄積した全長型 Psn に対して dPEN-2 が及ぼす効果について検討するため、コントロールの S2 細胞 (mock)、及び dNCT/dAPH-1 共発現細胞に、CAT (コントロール) または dPEN-2 を C100 と一過性に共発現させた。その結果、dNCT/dAPH-1 共発現細胞にさらに dPEN-2 を発現させたときのみ、断片型 Psn が増加した (Fig-6A)。また dNCT/dAPH-1 の共発現は A β 分泌を増加させなかったが、さらに dPEN-2 を遺伝子導入すると、A β 分泌量が有意に上昇した (Fig-6B、*
p<0.01)。これらの結果から、Psn、dAPH-1、dNCT で構成される高分子量複合体に対し、dPEN-2 が加わることにより活性化型 γ -セクレターゼが形成されるものと考えられた。

本研究では、ショウジョウバエ γ -セクレターゼの活性は dNCT、dAPH-1、dPEN-2 を必要とすること、dNCT、dAPH-1 は Psn と相互作用し、Psn の高分子量複合体形成過程に関与することを明らかにした。さらに dPEN-2 は Psn、dNCT、dAPH-1 から構成される高分子量複合体に作用し、 γ -セクレターゼの最終的な成熟過程を制御する可能性が考えられた (Fig-7)。また dNCT、dAPH-1、dPEN-2 の共発現により γ -セクレターゼ活性が上昇したことから、これらの三種の cofactor と Psn が γ -セクレターゼ活性の基本的な構成因子と考えられる。今後さらに個々の γ -セクレターゼ構成因子の機能解析を行うことにより、その性質を明らかにし、新たな AD 治療法開発につながることを期待できる。

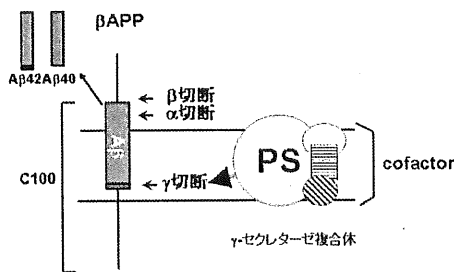


Fig-1 γ -セクレターゼによる β APPの切断

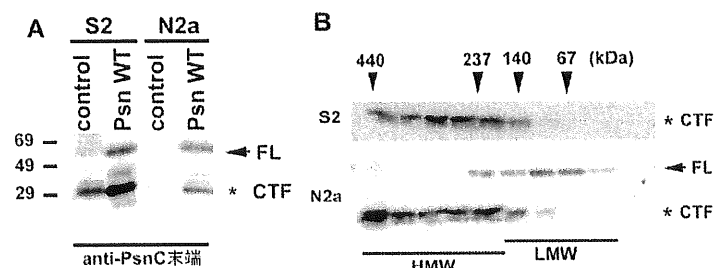


Fig-2 Psnの代謝

A: S2、N2a細胞でのPsnの発現

B: グリセロール速度勾配遠心法による分画

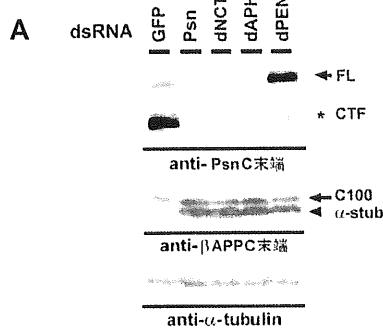
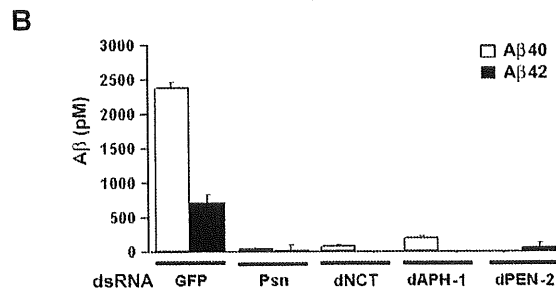


Fig-3 RNAiによる γ -セクレターゼ構成因子の機能解析

A: Psn、C100のウェスタンブロット解析 B: サンドイッチELISA法によるA β 分泌量の測定



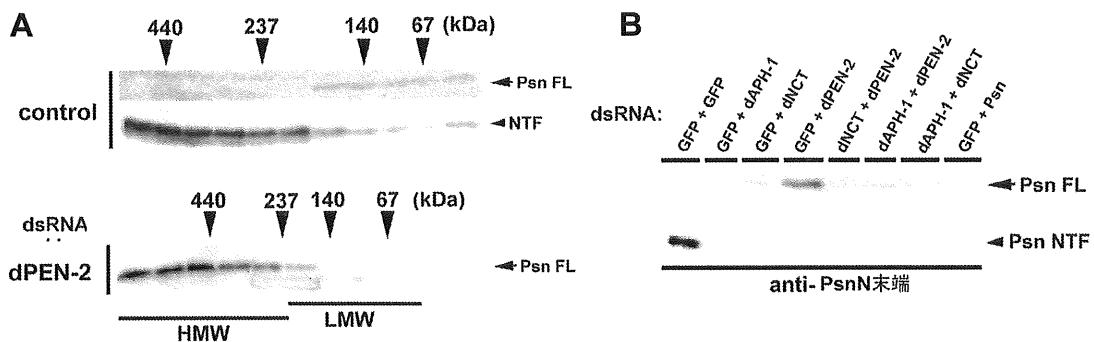


Fig-4 dPEN-2 RNAiにより蓄積する全長型 Psn の生化学的解析
 A: グリセロール速度勾配遠心法による CHAPSO 可溶膜画分の分子量別分画 (上段: コントロール, 下段: dPEN-2 RNAi 処理)
 B: 二重 RNAi 処理後の Psn のウェスタンブロット解析

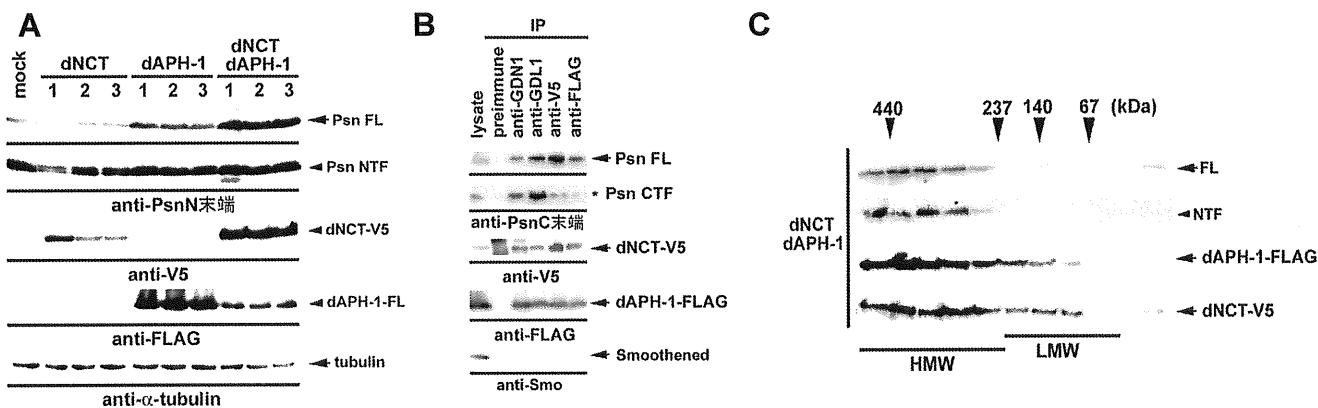


Fig-5 dNCT、dAPH-1 発現細胞の生化学的解析
 A: dNCT、dAPH-1 及び両者を共発現細胞のウェスタンブロット解析
 B: Psn、dNCT、dAPH-1 の免疫共沈降実験
 免疫沈降、ウェスタンブロットに用いた抗体をそれぞれ上・下段に示した。
 C: dNCT、dAPH-1 共発現細胞の CHAPSO 可溶膜画分のグリセロール速度勾配遠心による分画

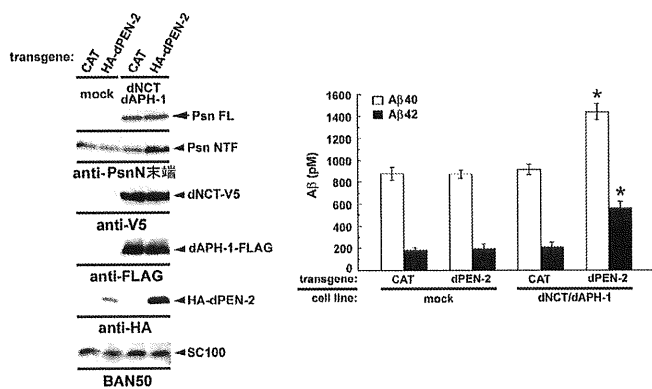


Fig-6 dPEN-2 の発現が γ -セクレターゼ活性に与える影響
 A: dNCT、dAPH-1、dPEN-2 共発現細胞のウェスタンブロット解析
 B: サンドイッチ ELISA 法による A β 分泌量の測定

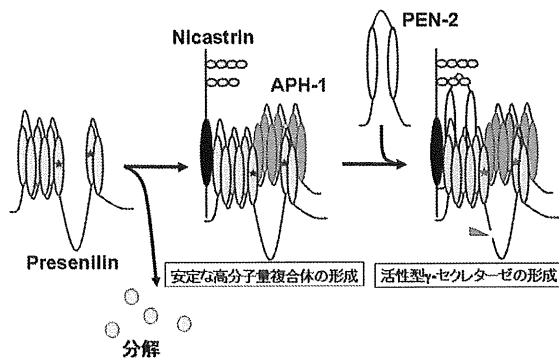


Fig-7 γ -セクレターゼ形成機構モデル