

## 審査の結果の要旨

氏名 高 杉 展 正

$\gamma$ -セクレターゼは $\beta$ -amyloid precursor protein ( $\beta$ APP) の膜内配列を切断し、アミロイド $\beta$ ペプチド( $A\beta$ )の産生を担う膜内プロテアーゼである。 $A\beta$ はアルツハイマー病 (AD) 脳に蓄積する老人斑アミロイドの主要構成成分であり、 $\gamma$ -セクレターゼの作動機構解析は AD 発症機序の解明に重要である。これまでに家族性 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、そして PS 複合体が $\gamma$ -セクレターゼの本体であることが示されてきた。現在 PS は $\gamma$ -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おり、PS と結合し、 $\gamma$ -セクレターゼ活性化に必要とされる他の構成因子 (cofactor) として nicastrin (NCT)、APH-1、PEN-2 が報告されている。しかし各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。本研究において申請者はショウジョウバエ細胞 (S2 細胞) を用いて、ショウジョウバエ PS (Psn)、nicastrin (dNCT)、dAPH-1、dPEN-2 が $\gamma$ -セクレターゼの形成と機能に与える影響を、RNA interference (RNAi) 法による機能喪失実験、及び過剰発現による機能獲得実験により解析した。

### (1) dNCT、dAPH-1、dPEN-2 は $\gamma$ -セクレターゼ活性に必須である

$\gamma$ -セクレターゼ複合体の各構成因子が Psn の代謝及び $\gamma$ -セクレターゼ活性に与える影響を検討するため、 $\beta$ 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 蛋白質を恒常発現する S2 細胞に対し、 $\gamma$ -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 ( $\gamma$ -セクレターゼ活性) への影響を検討した。正常な S2 細胞に多量に存在する断片型 Psn 及び微量の全長型 Psn はコントロールとして用いた GFP の RNAi では変化しなかったが、Psn、dNCT、dAPH-1、dPEN-2 の RNAi により断片型 Psn が消失し、基質となる C100、 $\alpha$ 切断を受け、 $\gamma$ 切断を免れた代謝産物と考えられる $\alpha$ -stub の蓄積が観察された。また dPEN-2 RNAi では全長型 Psn が蓄積していた。同時に分泌される  $A\beta$ を測定すると、Psn、dNCT、dAPH-1、dPEN-2 に対する RNAi により  $A\beta$ 分泌が抑制され、 $\gamma$ -セクレターゼ活性がほぼ消失した。これらの結果から dNCT、dAPH-1、dPEN-2 は $\gamma$ -セクレターゼ活性、ならびに活性型 $\gamma$ -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になった。

### (2) dPEN-2 RNAi により蓄積する全長型 Psn は、高分子量複合体を形成している

次に RNAi を 2 種類ずつ組み合わせ、dPEN-2 RNAi による全長型 Psn の蓄積に対する dNCT、dAPH-1 の影響を遺伝学的に解析した。全長型 Psn の蓄積は、dNCT (dNCT+dPEN-2) または dAPH-1 (dAPH-1+dPEN-2) との RNAi の併用により消失した。さらに dPEN-2 RNAi 後の膜面分を CHAPSO で溶解し、グリセロール速度勾配遠心法により分子量別に分画すると、コントロールの S2 細胞では、全長型 Psn (Psn FL) は 200 kDa 以下の低分子量領域 (LMW) に存在するのに対し、dPEN-2 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 200 kDa 以上の高分子量領域 (HMW) に存在し、高分子量複合体を

形成していた。これらの結果から、最初に全長型 Psn、dNCT、dAPH-1 の3者からなる安定な高分子量複合体が形成されるが、 $\gamma$ -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 $\gamma$ -セクレターゼとして成熟する過程に dPEN-2 が必要とされることが予想された。

(3) dAPH-1 単独、あるいは dAPH-1/dNCT の過剰発現により安定な全長型 Psn が蓄積する

$\gamma$ -セクレターゼ構成因子の機能を過剰発現により解析するため、dNCT または dAPH-1 単独、あるいは 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、dNCT 発現細胞に比して全長型 Psn が増加し、dNCT/dAPH-1 共発現細胞ではさらに増加したが、断片型 Psn の量に変化は見られなかった。

(4) Psn、dNCT、dAPH-1 は相互作用し、全長型 Psn を含む高分子量複合体を構成する

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。Psn、dNCT、dAPH-1 のうち、任意の2者同士が共沈降されることから、これらが複合体を形成することが示唆された。この膜画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た。これらの結果から、Psn、dNCT、dAPH-1 は相互作用し、dPEN-2 RNAi によって蓄積した全長型 Psn と同様に高分子量複合体を形成するものと考えられた。

(5) dNCT、dAPH-1、dPEN-2 の共発現により断片型 Psn が増大し、 $\gamma$ -セクレターゼ活性が増加する

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。dNCT/dAPH-1 共発現細胞にさらに dPEN-2 を発現させることにより、断片型 Psn が増加した。また dNCT/dAPH-1 の共発現は A $\beta$ 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 $\beta$ 分泌量が有意に上昇した。

これらの結果から、Psn、dAPH-1、dNCT から構成される高分子量複合体に dPEN-2 が加わることにより、活性型 $\gamma$ -セクレターゼが形成されるものと考えられた。

以上のごとく本研究において申請者は、ショウジョウバエ $\gamma$ -セクレターゼの活性化には dNCT、dAPH-1、dPEN-2 が必要とされることが、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示した。一方 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、 $\gamma$ -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。dNCT、dAPH-1、dPEN-2 の共発現により $\gamma$ -セクレターゼ活性が上昇したことから、これら3種の cofactor と Psn が、 $\gamma$ -セクレターゼの基本的な構成因子と考えられる。これらの知見は膜内蛋白質分解を担う $\gamma$ -セクレターゼの形成と作用に関する分子機構を解明するとともに、アルツハイマー病新規治療法の開発にも貢献するところが大きく、博士(薬学)の学位に値するものと判定した。