

## 論文内容の要旨

論文題目 Characterization of  $\gamma$ -secretase  
( $\gamma$ セクレターゼの解析)

氏名 佐藤 徹

アルツハイマー病(AD)は進行性の知能低下を呈する神経変性疾患で、その病理学的所見として老人斑と神経原線維変化がある。老人斑は主に大脳皮質に蓄積する球状の構造物であり(図 1A)、神経原線維変化は海馬、海馬傍回、及び新皮質Ⅲ、Ⅴ層の錐体細胞内に出現する。老人斑の主な構成成分は約40残基から成るアミロイド $\beta$ タンパク(AB)であり、神経原線維変化はタウタンパク質からなる。ABは、I型膜タンパク質であるアミロイド $\beta$ タンパク前駆体(APP)が $\beta$ セクレターゼにより内腔側で切断され、続いて $\gamma$ (または $\epsilon$ )セクレターゼによって膜の真ん中で切断されることによって産生し、分泌される(図 1B)。

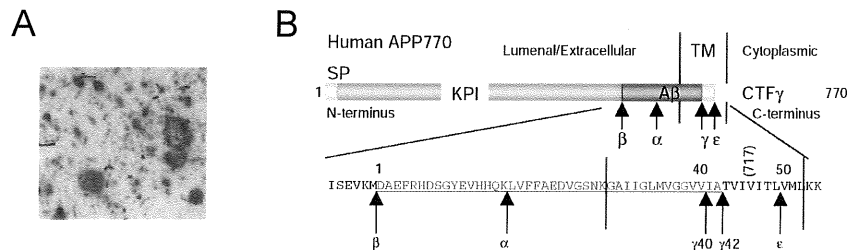


図 1 (A)老人斑。(B)APP の構造と AB のアミノ酸配列。AB は下線で示す。アミノ酸の番号は AB に従う。括弧内の番号は APP に従う。SP, signal peptide; KPI, Kunitz-type protease inhibitor domain; TM, transmembrane domain; CTF, C-terminal fragment.

そのとき同時に APP の C 末端断片(CTF $\gamma$ )が産生される。 $\gamma$ セクレターゼはまだ同定されていないが、プレセニリン(PS)1 (または 2) という 8 回膜貫通型タンパク質が、活性に必要な成分、またはそれ自身が $\gamma$ セクレターゼではないかといわれている。AB は 40 残基からなる AB40 と 42 残基からなる AB42 が存在するが、AB40 が主に産生し、分泌される。しかし、AD 患者の脳に最初に蓄積するのは AB42 である。さらに家族性 AD の原因遺伝子である APP の一部や PS1/2 の全ての変異は、AB42 の産生を上昇させる。以上から、AB42 の産生、蓄積が AD の発症に強く関与していると考えられる。AB の C 末端の長さを決定

するのは $\gamma$ セクレターゼであり、その切断機構を解明することはプロテアーゼの解析だけではなく、AD 発症の機序の解明について重要である。そこで私は、 $\gamma$ セクレターゼ活性のみを有する無細胞系を確立し、その生化学的解析を行った。

野生型(wt)APP と野生型(wt)PS2 を導入した CHO 細胞から膜画分を調製し、37°Cで反応した後、ウェスタンブロッティングによって AB を定量した。まず、 $\gamma$ セクレターゼ活性の経時変化と、温度依存性について調べた。AB 産生は、温度依存的に上昇し、37°Cでは10分から20分まで急激に AB 産生が上昇し、その後産生は減少した (図 2A)。CTF $\gamma$ も同様に調べたところ、AB と同様の結果が得られた。次に、 $\gamma$ セクレターゼの pH 依存性について調べたところ、 $\gamma$ セクレターゼはアスパラギン酸プロテアーゼといわれているが、一般のアスパラギン酸プロテアーゼとは異なり活性範囲は中性からアルカリ性側 (pH 9.0)であった。次にこの系が $\beta$ セクレターゼ活性を有していないことを示すために、 $\beta$ セクレターゼ阻害剤を用いて検討を行った。すでに報告されている IC<sub>50</sub> の10倍の濃度をこの系に加えても AB 産生には影響しなかった。このことから、この系は $\gamma$ セクレターゼ活性のみを有することが確認された。この系では、既に $\beta$ セクレターゼで切断された APP の C 末端99残基(CTF $\beta$ )が $\gamma$ セクレターゼの基質になっていると考えられる。

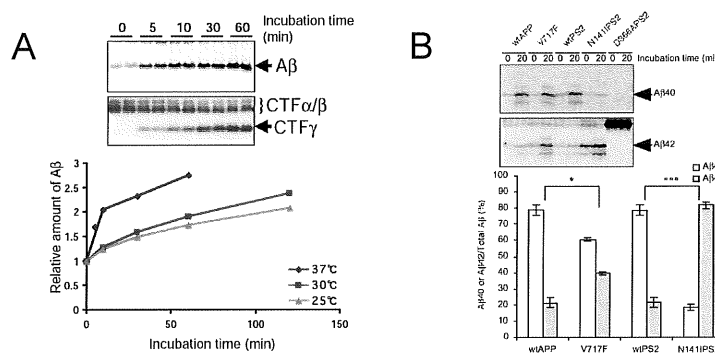


図2 (A)AB及びCTF $\gamma$ 産生の温度依存性及び経時変化。(B)各cell lineによるAB40とAB42産生の割合(\*,  $p < 0.001$ ; \*\*\*,  $p < 0.00001$ )。

次に、 $\gamma$ -cleavage と $\epsilon$ -cleavage の関係について調べた。AB は Val40 または Ala42 で終わっているため、CTF $\gamma$ は Ile41 または Thr43 から始まっていると考えられた。しかし、実際には Val50 から始まっていることがわかり、この切断を $\epsilon$ -cleavage と呼んでいる (図1B)。 $\epsilon$ -cleavage 部位は $\gamma$ -cleavage 部位の約10残基下流に位置し、膜・細胞質境界から数残基内側に存在する。この切断は $\gamma$ セクレターゼ阻害剤などによって阻害されることから、 $\gamma$ -cleavage と密接に関わっていると考えられる。しかし、10残基もの切断位置の違いから、果たしてこの $\epsilon$ -cleavage は単独で起きているのか、それとも AB 産生、特に AB40、AB42 産生には影響しているのかどうか分からなかった。そこで AB42 を特異的に上昇させる家族性変異を導入した APP や PS を細胞に発現させ、AB42 の産生と CTF $\gamma$ の産生の関係を解析した。

CHO 細胞に wtAPP または変異型(mt)APP(V717F) (図 1B) や、wtAPP と変異型(mt)PS2(N141I)を過剰発現させ、膜画分を調製した。そして、37℃で反応し、Aβ を解析したところ、mtAPP や mtPS2 では特異的に Aβ42 産生の上昇が観測された (図 2B)。特に mtPS2 では産生される Aβ の主な分子種は Aβ42 であった。γセクレターゼのドミナントネガティブフォームといわれる PS2 の変異体 D366A では、Aβ 産生が阻害されていることも無細胞系で確認された。同時に、CTFγについても解析を行った。各 cell line の膜画分を反応し、CTFγを調べたところ、ほぼ同じ移動度の CTFγが観測された (図 3A)。ドミナントネガティブフォームの D366A 変異体では、非常にわずかだが CTFγの産生が観測された。

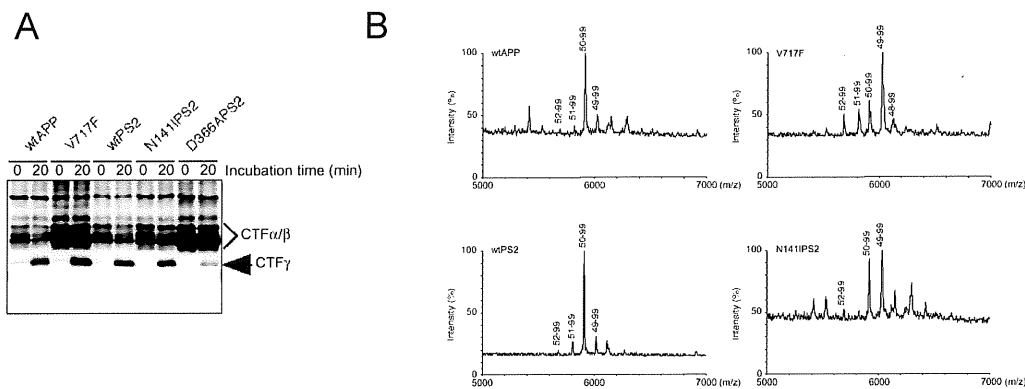


図3 (A)各cell lineにおけるCTFγの産生。(B)質量分析による産生されたCTFγの分子種の解析。各ピーク上の数字はそれぞれのCTFγの分子種を現す。

この細胞はγセクレターゼ活性がなく、多量の CTFβ の蓄積が確認された (また、αセクレターゼによって切断された APP の C 末端断片(CTFα)の蓄積も確認された)。これらの cell line の CTFγにどのような分子種があるのか質量分析を用いて解析を行った。膜画分を 37℃で反応後、超遠心し、その上清である可溶性画分を APP の C 末端 30 残基を認識する抗体で免疫沈降を行い、MALDI-TOF MS でそれぞれの分子量を測定し、分子種の違いを調べた。その結果、wtAPP や wtPS2 を過剰発現する細胞の膜画分では Val150 から始まっている CTFγ50-99 が主な分子種であったのに対し、mtAPP や mtPS2 では野生型に比べ 1 残基長い Leu49 から始まる CTFγ49-99 が主な分子種であった (図 3B)。

これらの変異体は野生型に比べ Aβ42 を多く産生するので、ε-cleavage はγ-cleavage によって産生される Aβ の分子種と関わっていると考えられる。そこで、次に PS1 の変異体 (M146L, M233T, G384A)を用いて同様に実験を行った。その結果、mtAPP や mtPS2 と同様に mtPS1 を過剰発現する細胞の膜画分では、CTFγ49-99 産生の上昇が観測された。M146L 変異体は野生型に比べ Aβ42 産生がそれほど上昇しないので、CTFγ49-99 産生の程度は wtPS1 にほぼ同程度であった。それに比べ、M233T と G384A 変異体は Aβ42 産生が非常に増加するので、CTFγ49-99 の顕著な増加が確認された。これらの CTFγ49-99 の増加が CHO

細胞特異的ではないことを示すために、HEK293 細胞を用いて同様に実験を行った。wtAPP または mtAPP (V717F, V717G)を過剰発現した HEK293 細胞から膜画分を調製し、37℃で反応させ CTF $\gamma$ の分子種を解析した。その結果、CHO 細胞と同様に mtAPP を過剰発現する細胞の膜画分から CTF $\gamma$ 49-99 産生の上昇が確認された。このことから、A $\beta$ 42 の産生と CTF $\gamma$ 49-99 の産生が関係することが示された。

しかし、質量分析では正確な量的比較は出来ない。そこで、CTF $\gamma$ を精製し、アミノ酸シケンサーを用いて CTF $\gamma$ のそれぞれの分子種を定量した。その結果、質量分析の結果と同様に wtAPP や wtPS2 を過剰発現する細胞の膜画分由来の CTF $\gamma$ は CTF $\gamma$ 50-99 が主な分子種であったが、mtAPP や mtPS2 を過剰発現する細胞の膜画分では CTF $\gamma$ 49-99 の産生の上昇が確認された (図 4A)。しかし、これらの上昇が単なる APP や PS の変異の効果ではないことを示すために  $\gamma$ セクレターゼ阻害剤を用いて検討を行った。 $\gamma$ セクレターゼ阻害剤である DFK-167 は、低濃度で A $\beta$ 40 の産生を抑え、逆説的に A $\beta$ 42 の産生を上昇させる。この阻害剤を wtAPP と wtPS2 を過剰発現する細胞の膜画分に加え反応させ、CTF $\gamma$ を定量した。その結果、A $\beta$ 42 を上昇させる濃度において、CTF $\gamma$ 49-99 の割合が有意に上昇した (図 4A)。

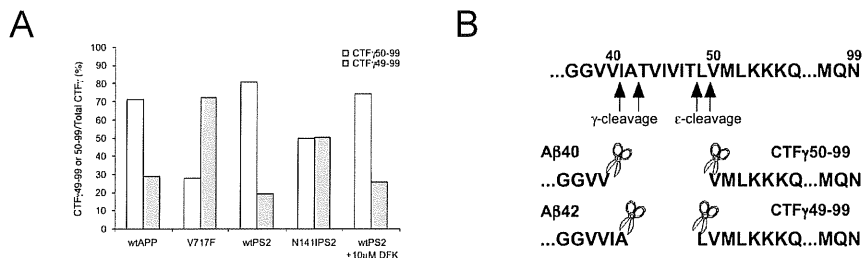


図4 (A)各cell lineにおけるCTF $\gamma$ 50-99とCTF $\gamma$ 49-99産生の割合。(B)A $\beta$ 産生とCTF $\gamma$ 産生のモデル。アミノ酸の番号はBに従う。

これらの結果から、CTF $\gamma$ 49-99 の産生が A $\beta$ 42 産生と対応していることが示され、 $\epsilon$ -cleavage と $\gamma$ -cleavage は密接に関わることが示された。しかし、それらの関係は一対一ではないことが分かる (図 2B と 4A)。今回の研究で Ile41 または Thr43 から始まる CTF $\gamma$ は全く検出されなかった。しかし、A $\beta$  は Val46 までの A $\beta$ 46 が報告されている。このことから次のようなメカニズムが考えられる。まず、CTF $\beta$  は $\epsilon$ -cleavage によって切断され、その後 $\gamma$ -cleavage を受ける。このとき、 $\epsilon$ -cleavage が Val50 の前で切断された場合、A $\beta$ 40 が産生される確率が上昇し、Leu49 の前で切断を受けた場合、A $\beta$ 42 が産生される確率が上昇する (図 4B)。 $\epsilon$ -Cleavage と $\gamma$ -cleavage が同じ酵素で起こっているかどうかは不明であるが、 $\gamma$ セクレターゼが同定されることによってその活性部位の構造が明らかとなり、これらのメカニズムが証明されていくと考えられる。