

論文の内容の要旨

論文題目 γ セクレターゼ複合体の発現と脂質マイクロドメインへの局在解析

氏名 浦野 泰臣

膜タンパク質は、生物学的に重要な意味を持つタンパク質が多数含まれており、Gタンパク質共益型受容体に代表されるように創薬ターゲットとしても注目されている。しかし膜タンパク質の機能的な解析は、その疎水的な特性や細胞内における存在量の少なさから、多くの困難な点が指摘されている。本研究では膜タンパク質を効率良く解析するためのツールの開発、および機能的、生化学的に解析することを目的とし、アルツハイマー病 (AD) に関わる膜タンパク質である γ セクレターゼ複合体に焦点を当てて研究を行った。

高齢者痴呆の原因疾患の1つである AD はアミロイド β ($A\beta$) の産生と蓄積が発症に深く寄与する可能性が示されている。 $A\beta$ はその前駆体であるアミロイド前駆体タンパク質 (APP) から β セクレターゼおよび γ セクレターゼにより切り出される。 γ セクレターゼは1回膜貫通型タンパク質の膜貫通部位を切断する特異なプロテアーゼであり、その基質として APP に加えて、神経発生に関与する Notch 等が知られる。 γ セクレターゼは、Presenilin (PS)、Nicastrin (NCT)、APH-1、PEN-2 という4種の膜タンパク質を基本構成因子とする高分子量の膜タンパク質複合体である。

まず γ セクレターゼ複合体についてバキュロウイルス発現系による膜タンパク質の発現解析を試みた。膜タンパク質の解析を行う上での問題点として、十分な量の発現、特に機能的な膜タンパク質複合体の発現が期待される系が確立されていないことや、正しい立体構造を認識する抗体の作製が困難であることが挙げられる。本研究で着目したバキュロウイルス発現系は、脂肪酸アシル化などの翻訳後修飾が見込める上で大量発現が可能である。またその応用であるウイルスディスプレイ法は発芽型ウイルス (BV) 上に高品質の膜タンパク質の発現が期待される系として解析が進んでいる。そこで NCT について、ウイルスディスプレイ法を用いて発現を試みたところ、BV 上での発現が確認された。この NCT 発現 BV を免疫用の抗原として特異的な抗体の作製を行った結果、イムノブロットにおいて内因性の成熟型 NCT を認識する抗体が得られた。NCT 変異体や糖鎖消化酵素を用いた実験から、成熟型 NCT に付加される糖鎖自身あるいは糖鎖およびその付近のアミノ酸配列を認識する抗体等が単離されたことを明らかにした。次に他の γ セクレターゼ複合体基本構成因子についても BV 上への発現を試みたところ、PS1、APH-1a、PEN-2 もそれぞれ BV 上に発現していた。そこでこれら4種の組み換えウイルスの共感染による

γ セクレターゼの再構成を試みた。その結果、昆虫細胞や BV 画分において機能的な γ セクレターゼ複合体が再構成された。特に BV 画分では選択的に活性型の PS1 断片の発現が確認された。共免疫沈降の結果から BV 上に発現した各構成因子は複合体を形成しており、glycerol velocity gradient 実験により 400kDa 以上の高分子領域に分画されることが確認された。さらに *in vitro* γ セクレターゼアッセイ法により活性を確認したところ、4 つ全てを感染させたときにのみ高い活性が確認された。 γ セクレターゼの特異的な阻害剤である L-685,458 や DAPT を同時に反応させると BV 画分の活性は抑制された。また PS1 不活性型変異体である PS1 D385A を用いた共感染 BV では活性が確認されなかった。以上のことからウイルスディスプレイ法を用いることにより、BV 上で γ セクレターゼ複合体の機能的な再構成が可能となることが示された。

次に $A\beta$ の産生とコレステロールとの関わりを明らかにすることを目的として、脂質マイクロドメインと γ セクレターゼ複合体の関係について解析を試みた。コレステロールの輸送蛋白である ApoE の遺伝子多型である $\epsilon 4$ が AD の危険因子として確立されている他、高脂血症治療薬であるスタチンに AD を含む痴呆の発症予防効果があるとする疫学的な報告があるなど、近年コレステロールの代謝が AD の発症に深く関与する可能性が指摘されている。培養細胞レベルにおいてもコレステロール量を減少させると細胞外に分泌される $A\beta$ 量が減少することが報告されている。この APP の代謝に及ぼすコレステロールの影響を明らかにする上で注目されているのが脂質ラフトである。脂質ラフトはコレステロールとスフィンゴ脂質を主成分とする脂質マイクロドメインであり細胞内の情報伝達やタンパク質の選択的な輸送に重要な役割を果たすと考えられている。 β セクレターゼによる APP の β 切断は脂質ラフトにおいて起きる可能性が指摘されているが、 γ セクレターゼ複合体と脂質ラフトの関係は未知な点が多い。そこで本研究では γ セクレターゼ複合体の脂質ラフトへの局在と集積について明らかにすることを目的として、低温下での界面活性剤処理とシヨ糖密度勾配遠心による分画を行った。この方法を用いると脂質ラフトに存在するタンパク質は界面活性剤不溶性膜領域 (DRM) に回収されることが知られている。ヒト培養神経細胞を用いて分画を行った結果では、神経細胞において脂質ラフトに存在することが知られている flotillin-1 と同様に、内因性に発現する γ セクレターゼ各構成因子 (活性型 PS1、2、成熟型 NCT、APH-1、PEN-2) は DRM に回収された。共免疫沈降の結果、これら基本構成因子は DRM 中でも複合体構造を保持しており、*in vitro* γ セクレターゼアッセイの結果より DRM 中に γ セクレターゼ活性が濃縮されていることが確認された。これらの結果から、機能的な γ セクレターゼ複合体が DRM 中に存在することが示唆された。細胞表面ビオチン化実験により DRM に回収される NCT のほとんどが細胞膜の脂質ラフトに存在していた NCT であることが示された。選択的にコレステロールを抽出できる methyl- β -cyclodextrin (M β CD) 処理により脂質ラフトを分解させると、全ての γ セクレターゼ複合体構成因子について DRM から可溶性画分への局在の変

化が確認され、 γ セクレターゼ複合体がコレステロール依存的な脂質ラフトに存在することが明らかになった。さらに内因性のコレステロールの生合成を阻害するスタチン処理により細胞内のコレステロール量を減少させると、全ての構成因子とも可溶性画分への局在の変化が確認された。これらの結果から γ セクレターゼ複合体の脂質ラフトへの局在がコレステロールにより調節されている可能性が考えられた。活性型 γ セクレターゼ複合体には成熟型 NCT のみが含まれることが知られているが、可溶性画分では成熟型、未成熟型の両方のバンドが検出されるのに対して、DRM に回収された NCT は成熟型であった。Mannosidase I の阻害剤である kifnensine 処理により NCT の成熟化を阻害しても、増加した未成熟型 NCT は DRM に検出され、他の γ セクレターゼ複合体各分子の DRM への局在も変化しなかったことから、NCT の成熟型糖鎖修飾の有無に関わらず γ セクレターゼ複合体は脂質ラフトに集積可能であると考えられた。

本研究において、 γ セクレターゼ複合体の基本構成因子である PS、NCT、APH-1、PEN-2 についてバキュロウイルス発現系を用いて、BV 上に発現させることが出来た。さらに NCT に対する特異的なモノクローナル抗体を作製し、BV が直接免疫用の抗原として使用可能であることを示した。これまで発現が困難であり、抗体作製に煩雑な過程が必要とされる膜タンパク質について、ウイルスディスプレイ法は簡便、かつ有効なツールとなる可能性が示唆された。ウイルスディスプレイ法の応用として γ セクレターゼ複合体の BV 上での発現の検討を行い、機能的かつ選択的に再構成されていることを確認した。BV 上に発現した γ セクレターゼ複合体は、高分子量複合体を形成し、阻害剤によって活性が阻害される等、動物細胞に発現する γ セクレターゼと生化学的、酵素的に類似した特徴を示す上で、大量に発現可能であり、かつ活性におけるバックグラウンドが低いことから、阻害剤のスクリーニング等 γ セクレターゼの機能的な解析に有用であると考えられた。これは複数のタンパク質、特に膜タンパク質により構成される複合体について、機能的に BV 上に発現できる可能性を示した重要な結果であるといえる。また脂質ラフトに関する解析から活性型の γ セクレターゼ複合体が DRM に回収されることを示した。 γ セクレターゼ複合体はコレステロールに依存して脂質ラフト構造へ集積され、細胞膜上に局在する可能性が示唆された。APP 以外の基質である Notch や E-cadherin などは細胞膜に存在しており、その膜内領域の γ 切断は細胞膜で起きていることが予想されていることから、細胞表面上において脂質ラフトに存在する γ セクレターゼ複合体が基質の γ 切断に重要な役割を果たしていると考えられた。またコレステロールが γ セクレターゼ複合体の脂質ラフトへの局在を調節する可能性が考えられた。