

審査の結果の要旨

氏名 荒木陽一

ベータ・アミロイド・ペプチド(A β)は、アミロイド前駆体タンパク質(APP)より、 γ -secretase 切断を受けることにより生じる。A β 産生、蓄積はアルツハイマー病(AD)の発症原因に深く関連する病理であると考えられている。従って、その分子機構を解明することが重要である。APPは、1回膜貫通型タンパク質で、その細胞内ドメインに結合する分子によって、細胞内輸送や代謝調節が行われていると考えられている。X11-like(X11L)はそのようなタンパク質分子の一つである。更に、X11Lに結合しAPP代謝を制御する分子の探索を目的としてYeast two-hybrid法が行われ、新規カドヘリン分子Alcadein(Alc α)が単離された。ヒトおよびマウスにおいてAlcは、 β -secretase、 γ -secretaseのホモログ分子を持つ新規ノクラシカルカドヘリンファミリーを形成することが明らかになった。

荒木は、これまでに、Alcの細胞質ドメインがX11LのPI(Phosphotyrosine Interaction)ドメインに結合すること、及び、APPの細胞質ドメインもX11LのPIドメインに結合することから、その結合様式の解析を行い、APP、Alcadeinは同時にX11LのPIドメインに結合して、APP/X11L/Alcadeinの三量体を形成することを明らかにしていた。この三量体が形成されると、APPの代謝が安定化されて、A β の産生が抑制されることを明らかにした。

本博士論文研究において、荒木は、ADとの関連においてAlcadeinがAPPとともにどのように細胞内で輸送・代謝を受けているかなどの機能解析を通じて、ADの発症機構の一端を明らかにした。

1. AlcadeinとAPPの γ -secretaseによる協調的代謝機構

APPは細胞内で1回目の切断により、CTF β /CTF γ を生じ、次いで γ -secretaseにより膜内で切断され、A β を培地中に放出するとともに、AICD(APP Intracellular domain)を細胞質に放出する。そこで、類似した構造をとり細胞内でAPPと複合体を形成しているAlcadeinについてその代謝様式を調べた。Alcadeinはまず細胞外で1回目の切断を受けて、培地中にsAlcを放出し、CTF1になる。ここに γ -secretaseの阻害剤であるL-685,458を作用させるとAPPCTF β /CTF γ 同様、Alc α CTF1が細胞内に蓄積することからこれが γ -secretaseの基質であることが示唆された。さらにCTF1が細胞内で γ -secretaseにより切断されると、培地中に β -Alcが、細胞内にその細胞内ドメインであるAlc α ICDが放出された。 β -Alcは、A β と異なりその2次構造内に β -turn構造を持っていない。A β は β -turn構造によりそのN末端側の β -helix構造が容易に β -sheetに変換し、異常に凝集して神経細胞毒性を持つとされている。 β -AlcもN末端側に β -helix構造、C末端側に β -sheet構造と2次構造は類似しているものの、 β -turn構造は持たないため、その溶液中での凝集性はA β に比して低いと考えられる。代謝様式自体は類似しているため、 β -Alcは、ADの進行具合を比較的反映した量がヒト髄液中に放出されていることが考えられ、ADの診断マーカーとして期待できる。

AICDはそのNPTY配列を用いて、FE65に結合しAICD-FE65複合体が核内に移行するこ

とにより転写活性化がおこることが知られている。Alc α ICD も NP 配列を持ち FE65 に AICD と競合的に結合するため、AICD-FE65 の結合を減少させ、この結果 AICD-FE65 の転写活性化能を著しく抑制することを示した。

2. Alcadin は新規 Kinesin-I カーゴレセプターである

Alcadin の細胞質ドメインを用いた Yeast two-hybrid 法により、モータータンパク質 Kinesin-I のサブユニットであるキネシン軽鎖 (KLC1) を単離した。Kinesin-I は、キネシン重鎖 (KHC) 2 つとキネシン軽鎖 (KLC) 2 つのヘテロ四量体からなる微小管依存性のモータータンパク質であり細胞内での物質輸送を広く担っていると考えられている。

まず、生体内での Alc と Kinesin-I 複合体の結合を確認するためにマウス脳の膜画分を可溶化し、Alc, KLC1, KLC2 抗体を用いて共役免疫沈降を行った。その結果、Alc より Kinesin-I のコンポーネントである、KHC, KLC1, 2 が共役免疫沈降され、生体内で Alc = Kinesin-I というカーゴ = モーター複合体が形成されている可能性が示唆された。次に、Alc に蛍光タンパク質 Venus を融合し実際の細胞内での Alc の動きを TIRFM (Total Internal Reflection Microscopy: 全反射顕微鏡) により観察した。その結果、Alc -Venus は細胞内で $\sim 1.2-1.6 \mu\text{m}/\text{sec}$ の方向性を持った運動を行っていることが明らかになった。これは同じく Kinesin-I のカーゴ受容体とされている APP ($\sim 3.0-3.8 \mu\text{m}/\text{sec}$) の約半分の速度であった。また微小管を破壊する薬剤である Nocodazole 処理によりこの運動が微小管依存性のものであることを確認した。

さらに GFP-KLC1 は普段は不活性化状態 (カーゴを運んでいない状態) にあり、細胞質に局在するが、Alc をここに共発現させると、GFP-KLC1 は微小管上を Alc と共に運動するようになった (カーゴを運んでいる状態)。またこれも Nocodazole 処理により、微小管依存性の運動であることが明らかになった。Kinesin-I は生理的条件よりもやや酸性条件下で活性化され微小管上のカーゴを運ぶようになると言われているが、Alcadin の細胞質ドメインには酸性領域があり、これが Kinesin-I の活性化を担っている可能性が示唆された。

以上のように、本研究は、新規ノンクラシカルカドヘリン分子 Alcadin が APP と類似した代謝様式を受けることによって、AICD-FE65 の転写活性化能を制御していることを明らかにした。さらに Alcadin は APP 同様、Kinesin-I に対するカーゴ受容体として働いていることを明らかにした。その成果は、AD の発症原因やその予防・治療法につながるものであり、細胞生物学、生化学、神経病理学、及び基礎創薬科学に貢献するものである。よって、本論文は、博士 (薬学) の学位を授与するに値するものであると判定した。