

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 γ -Secretase Activity Is Present in Rafts but Is Not Cholesterol-Dependent

和訳 γ セクレターゼ活性はラフトに存在するが膜内コレステロール濃度には影響されない

指導教員 井原 康夫教授

東京大学医学系研究科

平成 13 年 4 月入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

氏名 角田 聡子

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease, AD) は老年期に発症する進行性の痴呆の代表的疾患であり、神経原線維変化、老人斑の出現および神経細胞の脱落が主な病理学的特徴である。アミロイド β タンパク ($A\beta$) はこの老人斑の主要構成成分であり、1 型膜タンパクであるアミロイド前駆体タンパク (β amyloid precursor protein, APP) より切り出され産生されたものである。その APP の切断にはセクレターゼとよばれるプロテアーゼが関与している。セクレターゼには α 、 β 、 γ の 3 種類のセクレターゼがある。 $A\beta$ 非産生経路においては、APP は α セクレターゼにより切断され、 α -CTF (C-terminal fragment) ならびに APPs α が産生される。また $A\beta$ 産生経路においては、まず N 末側で β セクレターゼにより切断を受け β -CTF が生じ、ついでその膜貫通領域において γ 切断および ϵ 切断がおこり、それぞれ $A\beta$ 、 γ -CTF が産生される。この γ および ϵ 切断は γ セクレターゼが担う。 γ セクレターゼは現在 4 種類のタンパク (プレセニリン 1 または 2、ニカストリン、ペン 2 およびアフ 1) から成る高分子量複合体と考えられている。

以前から細胞内のコレステロールを減少させると $A\beta$ の分泌や細胞内 $A\beta$ が減少するという報告が数多くなされている。さらに高コレステロール血症治療薬であるスタチンの服用と AD 発症率の低下に関する疫学調査が報告され、コレステロールの AD 発症への関与は臨床的にも注目されている。試

験管内では、コレステロールの低下に伴い、 $A\beta$ の減少とともに α -CTFの増加ならびに β -CTFの減少がみられる。よって、 α 切断が促進し、同時に β 切断が抑制されることにより、産生される $A\beta$ が減少するのではないかと考えられている。しかしながら、コレステロール減少が γ 切断に与える影響については未だ不明である。 γ セクレターゼは膜タンパクであり、そのAPPの切断は膜内深く行われるため、膜コレステロールがその γ セクレターゼのコンフォメーションに影響を及ぼし、その結果酵素活性が阻害される可能性が考えられた。よって私は無細胞系をもちい、膜コレステロール含量を減少させた場合の γ セクレターゼ活性について検討した。

細胞は、野生型プレセニリン2 (WT PS2) 細胞としてAPP751とWT PS2を安定的に共発現させたChinese hamster ovary (CHO) 細胞、ならびに、変異型プレセニリン2 (MT PS2) 細胞としてAPP751と家族性変異型プレセニリン2であるN141Iを安定的に共発現させたCHO細胞を用いた。

全膜画分を30 mMのmethyl- β -cyclodextrin ($M\beta$ CD)で処理したところ、約40%のコレステロールが除去された。その画分を37°Cでインキュベートし $A\beta$ の産生をみたが、予想外にも変化はみられなかった。また $A\beta$ 40と $A\beta$ 42の産生比もWT PS2細胞、MT PS2細胞ともに影響をうけなかった。しかしながら全膜画分における検討では、コレステロールが $A\beta$ 産生部位において有効的に引き抜かれているかわからず、 $A\beta$ 産生部位での結果を反映していない可能性も考えられる。よってコレステロール含量が高く、また $A\beta$ 産生部位のひとつではないかと推測されている低密度膜画分において、同様の実験を行った。

ラフトとよばれる低密度膜画分は、コレステロールならびにスフィンゴリン脂質に富む膜ドメインで、物質輸送、シグナル伝達等多くの役割を担っていると考えられている。ラフトは不溶性の $A\beta$ が蓄積していることなどから、AD発症に関わっている重要な場所ではないかと近年注目を集めている。今回、1%CHAPSO処理およびショ糖密度勾配遠心法により調製してきた各画分でのタンパク分布を調べたところ、この低密度膜画分に γ セクレターゼの各構成要素が局在していることがわかった。特筆すべきは、活性型のニカストリンはほとんどが低密度膜画分に存在したことである。以上より、活性型の γ セクレターゼがラフトに集まっていることが考えられ、まずラフトにおける γ セクレターゼ活性の特性について調べた。

細胞から調製してきた低密度膜画分は37°Cでインキュベートすることにより、 γ セクレターゼ依存的な $A\beta$ の産生がみられることがわかった。また、WT PS2細胞では主に $A\beta$ 40が、一方、MT PS2細胞では主に $A\beta$ 42が産生された。これは、全膜画分における結果と一致した。

そして低密度膜画分において、コレステロールの低下による γ セクレターゼ活性への影響をみた。低密度膜画分は $M\beta$ CDにより、約50%のコレステロールが除去されたが、 $A\beta$ の産生量には影響がみられず γ セクレターゼ活性は保持された。また $A\beta$ 40と $A\beta$ 42の産生比もWT PS2細胞、MT PS2細胞ともに影響をうけなかった。

以上の結果より50%程度のコレステロールを除去した場合でも γ セクレターゼ活性に対する影

響はみられなかった。細胞が生命を維持するにはある程度のコレステロールは必要であるため、コレステロールの 50%の減少というのは生体内における γ セクレターゼ活性への影響を検討するのに充分であると思われる。しかしながら、わたしはさらに膜コレステロールが γ セクレターゼ活性発現に必要であるかどうかを確かめたいと考えた。そこで、コレステロール含量を極めて低くした場合の γ セクレターゼ活性への影響について調べることにした。

連続 2 回の M β CD 処理により約 90%のコレステロールが低密度膜画分より除去された。次にその画分の A β 産生量への影響をみたが、WT PS 2 細胞、MT PS 2 細胞から調製した低密度膜画分ともに 90%のコレステロールを除去したにも関わらず、A β 産生量ならびに A β 40 と 42 の産生比には影響がみられなかった。よって、 γ セクレターゼ活性は膜コレステロール含量低下で全く影響を受けないことが示された。

次に、A β 産生が確かにコレステロールに富む膜画分（ラフトそのもの）で行われていることを確かめるために、BC θ を用いてラフト画分の精製を試み、 γ セクレターゼ活性を検討することにした。BC θ はコレステロール濃度依存的に膜コレステロールと結合し、ラフトの特異的プローブとして有効であると考えられているものである。

WT PS 2 細胞より調製した低密度膜画分を BC θ とインキュベートした。続いて、アビジンマグネティックビーズを用い、BC θ 非結合画分と BC θ 結合画分に分け精製ラフトを調製した。その結果、ラフトのマーカーであるフロチリンやカベオリンの大部分が BC θ 結合画分に分画された。またラフトに存在する他のタンパクマーカーである src、G β 、fyn も同様に、大部分が BC θ 結合画分に分画された。また、 γ セクレターゼの構成要素である PS2 CTF および PS2 NTF も BC θ 結合画分に分画された。

次に BC θ が膜のコレステロール濃度依存的に結合することを確認するために、膜からコレステロールを減少させた場合の BC θ によるラフト精製への効果をみた。低密度膜画分を M β CD 処理し、その後 BC θ によるラフト精製を行った。その結果、フロチリンやカベオリンは BC θ 非結合画分に分画され、BC θ 結合画分においてはみられなくなった。よって確かに BC θ は膜のコレステロールと濃度依存的に結合し、ラフトが精製されていることが確かめられた。

続いて、BC θ によりラフト精製をおこなった各画分を 37°Cでインキュベートした。BC θ 結合画分において A β の産生がみられ、また精製前の低密度膜画分と同様、主に A β 40 が産生された。

また、この BC θ 結合画分における A β 産生は、 γ セクレターゼの特異的阻害剤を添加することにより抑制された。よって BC θ 結合画分における A β 産生は γ セクレターゼ依存的に起こっており、確かに γ セクレターゼ活性はラフトに存在することが示された。

次に、低密度膜画分での γ セクレターゼ活性が、細胞全体の活性のうちどれくらいを占めているかを調べることにした。不飽和レベルの基質濃度による A β 産生量への影響をさけるため、CHO 細胞より調製してきた低密度膜画分に外来性の基質である C99-FLAG を充分量加え、A β の産生を

みることにした。最初に、外来性基質を加えた際の低密度膜画分における γ セクレターゼ活性の特性を調べた。

CHO 細胞の膜画分から低密度膜画分を調製し、 $A\beta$ 産生反応をおこなった。加える C99-FLAG 基質の濃度を増加させると、 $A\beta$ の産生量は直線的に増加したが、500 nM 以上では産生される $A\beta$ はほとんど増加せず、基質が飽和量に達したと考えられた。 $A\beta$ 産生の経時的変化については、1 時間後から徐々に産生速度の低下がみられた。また低密度膜画分のタンパク質濃度による $A\beta$ 産生量の違いをみたところ、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でもっともタンパクあたりの $A\beta$ 産生量が高かった。以上の観察結果に基づき全膜画分と低密度膜画分の $A\beta$ 産生を比較したところ、全膜画分の活性のうち約 80% が低密度膜画分に存在すると算出された。

以上の結果より、低密度膜画分、つまりラフトには、 γ セクレターゼの構成要素が局在しており、またその酵素活性も非常に高いことがわかった。しかしながらその活性はコレステロールには依存しておらず、ラフトに γ セクレターゼが局在する意味は、コレステロールによる活性制御をうけるべく、というわけではないようだ。本研究で $A\beta$ の産生場所であることが示されたラフトであるが、産生される $A\beta$ と蓄積する $A\beta$ との関係は未だわかっていない。今後ますます AD 発症におけるラフトの機能の解明は鍵となるであろう。