

審査の結果の要旨

氏名 角田 聡子

本研究は、アルツハイマー病においてみられる老人斑の主要構成成分であるアミロイド β タンパク ($A\beta$) を産生する酵素、 γ セクレターゼ、の特性を解明すべく、膜画分における $A\beta$ 産生について検討したものであり、以下の結果を得た。

1. 野生型プレセニリン2 (WT PS2) 細胞 として APP751 と WT PS 2 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 細胞から調製した全膜画分を用いて、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。Methyl- β -cyclodextrin (M β CD)処理により、約 40%のコレステロールが除去されたが、 $A\beta$ の産生量ならびに $A\beta$ 40 と $A\beta$ 42 の産生比は変化しなかった。
2. ラフトとよばれる低密度膜画分を WT PS2 細胞ならびに MT PS2 細胞から 1% CHAPSO を用いてショ糖密度勾配遠心法によって調製した。各画分を調べたところ、この低密度膜画分に γ セクレターゼの各構成成分が局在していることがわかった。さらに、活性型のニカストリンのほとんどが低密度膜画分に存在したので、活性型の γ セクレターゼがラフトに局在するのではないかと思われた。
3. 低密度膜画分では γ セクレターゼ依存的な $A\beta$ の産生がみられた。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同じであった。
4. 低密度膜画分において、コレステロールの低下による影響をみた。M β 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 の産生比も影響を受けなかった。

5. さらにコレステロール含量を低くした場合の 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除去された。しかしながら、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。
6. 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、ラフトの特異的プローブと考えられているBC θ を用いてラフト画分をさらに精製した。その結果、ラフトのマーカであるフロチリンやカベオリンの大部分がBC θ 結合画分に画分され、ラフトをさらに精製することができた。 γ セクレターゼの構成成分であるPS2 CTFおよびPS2 NTFもBC θ 結合画分に画分された。
7. 精製ラフト画分の γ セクレターゼ活性を検討したところ、A β の産生がみられ、また精製前と同様、主にA β 40が産生された。また、この精製ラフト画分における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。よって確かに γ セクレターゼ活性がラフトに存在することが示された。
8. 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た。不飽和レベルの基質濃度による変動をさけるため、CHO細胞より調製した低密度膜画分もしくは全膜画分に、外来性基質であるC99-FLAGを充分量加え、A β の産生を測定した。その結果、全膜画分の γ セクレターゼ活性のうち約80%が低密度膜画分に存在すると算出された。

以上、本論文は、ラフトには、 γ セクレターゼの構成要素が局在しており、その酵素活性も非常に高いことを示した。しかしその γ セクレターゼ活性はコレステロールには依存していないことを明らかにした。本研究は、ラフトにおける γ セクレターゼの予想外の性質をはじめて明らかにしたものであり、学位の授与に値するものと考えられる。