

審査の結果の要旨

氏名 住岡 暁夫

アルツハイマー病は老化に伴い発症する最も患者数の多い老人性認知症で、現在まで有効な治療法は確立されていない。APP (Amyloid Precursor Protein)は型膜タンパク質で、2回の切断を受けてA β を生成し、AD発症と強く相関する。また、家族性ADの原因因子でもある。現在までAPPの生理機能は未解明な点が多く、APPの機能解析はAD発症機構の解析、治療法の開発を考える上で非常に重要である。APPの切断によりA β 分泌と同時に細胞内に放出される細胞質ドメイン(AICD)は、アダプタータンパク質FE65と複合体を形成し転写活性化能を有することが2000年に報告された。しかし発現制御を受ける遺伝子の同定は明確に行われておらず、AICDとFE65複合体の転写活性化機構も未解明である。そこで本研究では、AICDが遺伝子発現において細胞内情報伝達機構に関与する仮説の検証を、AICD結合分子の解析を通してを行い、APPの生理機能の解明に取り組んだ。

AICDは短いペプチド(49アミノ酸)であるが、複数のタンパクが結合することが確認されている。APP結合分子及びその関連分子の中から、核への情報伝達を担う分子を探索するために、AICDに結合が報告されたタンパクを培養細胞に発現させ、Exportin依存的な核細胞質輸送経路の阻害剤・LMB存在化で、結合タンパクの局在を観察した。その結果、核移行シグナルを持ち既に報告されていたFE65以外に、これまで細胞質分子として考えられてきたX11L、X11L2がLMB処理時に核内に局在することを明らかにした。さらに、マウス脳を生化学的手法で分画し細胞内局在を検討し、X11L、X11L2が核に存在することを確認した。以上からX11L、X11L2が核移行性を有するタンパク質であることを明らかにした。

酵母Gal4 DNA-binding domainをFE65に融合したタンパク質(Gal4BD-FE65)は、転写活性化能を示すことが報告されている。同様にGal4BD-X11L2の転写活性化能をReporter gene assayで検証した。その結果Gal4BD-X11L2はGal4BDに比べ有意に高い転写活性を示し、Gal4BD-X11L2が転写活性化能を有することを明らかにした。さらにGal4BD-X11L2による転写活性化機構の詳細な解析を進め、この活性がMEK阻害剤(U0126)により抑制され、転写因子ELK-1とX11L2が相互作用することを明らかにした。これらのことからX11L2がErk情報伝達系カスケードの下流に位置して機能することが予想された。

ELK-1はETS DNA-binding domainを有し、1)SRFとELK-1からなる複合体を形成しDNAのSRE (serum response element)配列に結合する、もしくは2)ELK-1単独でDNA中のETS binding siteに結合する、ことが報告されている。前者の例にc-Fos promoterを介した遺伝子発現の活性化、後者の例にPS-1 promoterを介した遺伝子発現の抑制が知られている。内在性X11L2が遺伝子発現制御に果たす役割を解明する目的で、c-Fos promoter、PS-1 promoterを用いたReporter assay

を行った。内在性 X11L2 の発現を RNAi を用いてノックダウンした際、c-Fos promoter の活性は低下し、PS-1 promoter の活性は上昇した。これらの結果は、X11L2 は ELK-1 による転写制御に促進的に機能していることを示している。

次に転写制御に必要な X11L の N 末端領域の結合分子の探索を行った。ヒト脳 cDNA library から yeast two-hybrid 法を用いて結合分子をスクリーニングした結果、GR (Gulcocorticoid Receptor) を単離し、培養細胞系での相互作用を確認した。さらに X11L が GR シグナルへ与える影響を検討するため、GRE (GR の結合配列) を用いた promoter assay を行った。その結果 X11L により GR による遺伝子発現の促進が確認された。以上から、X11L は GR シグナルに関与することが示唆された。

Gal4BD-AICD による転写活性に必要な領域は 666-695 a.a. (APP695) である。この N 末端領域側 (666-680) を bait に two-hybrid screening による結合分子の探索を行ったところ、14-3-3 protein を単離した。14-3-3 protein family は標的タンパク質とリン酸化依存的な相互作用を行い、標的タンパク質の酵素活性や局在の制御を行うことが知られている。そこで、14-3-3 protein family の APP との相互作用の解析と Gal4BD-AICD による転写活性への寄与について検討を行った。Human 14-3-3 protein family は、*YAP1*、*PPP2R1B*、*PPP2R1A*、*PPP2R2B*、*PPP2R2A*、*PPP2R1C* の 7 分子から成る。これらの cDNA をクローニングし、APP との相互作用を検証した。APP 647-695 peptide と精製 GST-14-3-3 を用いた In vitro の pull down assay から、AICD と 14-3-3、Thr668-phosphorylated AICD と 14-3-3 がそれぞれ相互作用を行うことを明らかにした。また、マウス脳可溶化サンプルと抗 14-3-3 抗体を使用した in vivo の共役免疫沈降法から、脳における APP と 14-3-3 の相互作用が確認された。次に、Gal4-BD-AICD の転写活性への寄与について検討を行った。その結果、14-3-3 protein は Gal4BD-AICD と FE65 複合体による転写活性に促進的に寄与し、14-3-3 protein は Gal4BD-AICD と X11L2 の複合体による転写活性を促進することが分かった。以上の結果は、AICD による遺伝子発現機構に、Thr668 のリン酸化と 14-3-3 protein の相互作用が重要な役割を果たす可能性を示唆している。

要約すると、本研究では細胞質蛋白として考えられてきた X11L2、X11L の核移行性を見出し、その核内機能について解析を行った。その結果、X11L2 は Erk 情報伝達系の下流に位置し、ELK-1 による遺伝子発現制御に機能することが明らかにされた。さらに、ELK-1 が制御する遺伝子発現機構のうち ETS 結合部位を標的とする制御機構は、 β -secretase 阻害剤の影響を受けることから、AICD が転写制御に関わっていることが示唆された。また、X11L が GR シグナルへ関与する可能性を明らかにした。GR は社会的ストレスへの応答に関わる分子で、X11L は組織内での発現分布が GR と良く一致しており、X11L のノックアウトマウスは社会的ストレスへの応答に異常が見られることから、本研究から得られた知見は X11L の神経機能の理解をとうして、医療薬学への貢献が顕著であり、博士 (薬学) の学位に値すると判定した。