

論文の内容の要旨

論文題目 アルツハイマー脳アミロイド結合蛋白質 CLAC に関する研究

氏 名 橋 本 唯 史

序論

アルツハイマー病 (AD) は初老期に発症し、進行性の認知記憶障害を主症状とする神経変性疾患である。AD 患者脳では広汎な神経細胞死に加え、アミロイド蛋白質の蓄積が出現し、老人斑と呼ばれる。老人斑アミロイドは amyloid β -peptide ($A\beta$) が凝集した線維から形成される。 $A\beta$ はその前駆体蛋白 APP よりまず β -secretase、次いで γ -secretase によって2段階の切断を受け分泌された後凝集したものであり、 γ -secretase の切断部位の多様性により主に 40 番パリンで終わる $A\beta_{40}$ と 42 番アラニンで終わる $A\beta_{42}$ の分子種が存在する。 $A\beta_{42}$ は $A\beta_{40}$ に比べ凝集性が高く、AD 脳において最初期に蓄積する分子種である。AD の一部に常染色体優性遺伝形式を示す家族性 AD が存在し、その病因遺伝子として APP 及び γ -secretase の活性中心である presenilin1, presenilin2 が同定され、それらの変異が $A\beta_{42}$ の産生を亢進させる効果を持つことがわかった。これらの知見から AD の発症メカニズムとして、細胞外に分泌された $A\beta$ が凝集、線維化する過程に伴い神経細胞死が生じると考えるアミロイド仮説が提唱されている。

一方免疫組織化学的な検討から老人斑には $A\beta$ 以外に多種類の非 $A\beta$ 成分が蓄積していることが知られ、これらの成分は $A\beta$ の凝集、蓄積、または代謝に影響を与えていることが示されている。Apolipoprotein E (apoE) は *in vivo* のマウス脳で $A\beta$ の凝集を加速することが知られており、また apoE に存在する ϵ_2 , ϵ_3 , ϵ_4 の3つの遺伝多型のうち ϵ_4 アレルが AD の遺伝的危険因子となることが示されている。このように老人斑に蓄積する非 $A\beta$ 成分は $A\beta$ と相互作用することにより AD 発症に影響を与えている可能性があり、その研究は AD 発症メカニズムを明らかにする上で重要と考えられる。

私は、老人斑に含まれる非 $A\beta$ 成分の同定を目的として、AD 脳老人斑アミロイドをマウスに免疫し、モノクローナル抗体 mAb9D2 を得た。MAb9D2 は組織学的に老人斑アミロイドを特異的に認識し、生化学的に AD 脳の

SDS 不溶・蟻酸可溶画分に 50 kDa と 100 kDa のバンドを認識した。逆相 HPLC, ゲル濾過を併用し、AD 脳老人斑アミロイド由来画分をさらに精製し、mAb9D2 の抗原として新規蛋白質 CLAC (collagenous Alzheimer amyloid plaque component) を同定した。さらにヒト脳 cDNA library より CLAC をコードする前駆体蛋白 CLAC-P (CLAC precursor protein) cDNA をクローニングした。CLAC-P は膜貫通領域を持ち、II 型の配向性を持つ膜貫通型コラーゲンであることから collagen type XXV として登録された。CLAC-P mRNA は神経細胞特異的に発現していること、また CLAC の老人斑への蓄積は A β 42 の蓄積に次いで生じる早期病変であるが、後期に出現し A β 40・thioflavin S 陽性を示す β シート構造が豊富なアミロイド線維には蓄積しないことが分かった。これらの結果は、CLAC が A β 線維に対し高い親和性を持ち、早期から AD の病態に関与することを示唆しているが、 β アミロイドの蓄積に対してどのように作用するのかわからない。そこで私は、まず CLAC-P から CLAC が産生される代謝機構について検討し、さらに CLAC と A β の相互作用メカニズムを明らかにし、CLAC が A β の凝集過程に与える影響について検討した。

() CLAC の産生様式に関する検討

AD脳アミロイド画分から粗精製したCLACを、CLAC-Pの非コラーゲン (NC)領域を抗原として作製した特異抗体でイムノブロット解析したところ、細胞外領域に対する抗体では 50, 70, 100 kDaのバンドが認識されたのに対し、これらのポリペプチドは細胞内領域に対する抗体では認識されなかった。またヒトCLAC-P遺伝子を恒常発現するHEK293 細胞では、約 80 kDaのCLAC-P全長蛋白質に加え、培養上清中に約 70 kDaの分泌型 CLAC-P (sCLAC)のバンドが認められた。これらの結果から、1回膜貫通型蛋白であるCLAC-Pがプロテアーゼにより切断を受け、細胞外領域を分泌する可能性が示唆された。そこでCLAC-Pの細胞外部分の₁₀₇KIRIAR₁₁₂配列に注目した。この配列はproprotein convertase familyの1つであるfurinの認識配列(BXB₂BB; Bはリジンまたはアルギニン残基を表す)に一致し、CLAC-Pがfurinによって 112 番アルギニンと 113 番 グルタミン酸の間で切断を受け、カルボキシ末端側がsCLACとして分泌される可能性を考えた。

そこでfurin活性を欠く変異CHO-K1 細胞株RPE.40 細胞にヒトCLAC-P cDNAを導入すると、培養上清中のsCLAC分泌が消失し、さらにマウスfurin cDNAを導入すると分泌が回復した。また₁₀₇KIRIAR₁₁₂をKIAIAAと置換した変異型CLAC-P (RAmt) cDNAをCOS-1 細胞に導入すると、やはりsCLACの分泌が消失した。これらの結果から、CLAC-Pはfurinによって切断を受け、細胞外領域が分泌されることが判明した。またsCLACのアミノ末端はグルタミン酸残基で始まることから、分泌後アミノ末端が脱水縮合し、ピログルタミン酸化する可能性を考えた。そこで 113 番ピログルタミン酸に対する断端特異抗体を作製すると、この抗体はAD脳アミロイド画分で 50, 100 kDaのバンドを認識し、AD脳内に蓄積したCLACの一部はピログルタミン酸化した 113 番グルタミン酸から始まることがわかった。

以上のごとく、CLAC-P は細胞内において furin により切断を受け、その細胞外領域を sCLAC として分泌すること、分泌された sCLAC は不溶化し、CLAC として老人斑に蓄積すること、また蓄積した CLAC の一部はアミノ末端でピログルタミン酸化修飾を受けることが分かった。

() sCLAC と A β との相互作用に関する検討

CLAC は AD 脳において老人斑アミロイドに蓄積することから、線維化した A β と直接相互作用することが予想された。そこで両者の結合を評価するために *in vitro* A β 結合アッセイ系を樹立した。予め凝集・線維化させた合成 A β 1-42 をマルチタイタープレートに固定し、CLAC-P を恒常発現する HEK293 細胞から分泌された sCLAC を含む培養上清をインキュベート後、両者の結合を抗 CLAC-P 抗体により評価した。その結果 sCLAC は凝集 A β と結合することが示された。そこで sCLAC を含む培養上清を、凝集 A β あるいは可溶性 A β で前吸収した後 A β 結合アッセイを行うと、凝集 A β は sCLAC とプレート上の A β の結合を阻害したのに対し、可溶性 A β は阻害しなかった。この結果は sCLAC が凝集した A β と特異的に結合することを示すものと考えた。

次に sCLAC のコラーゲン様三重らせん構造の、A β との結合における重要性を検討するため、sCLAC を含んだ培養上清を加熱変性させた後に A β 結合アッセイを行った。sCLAC のコラーゲン様三重らせん構造の変性をトリプシン消化実験により評価すると、sCLAC はコラーゲン構造の変性に伴い A β と結合できなくなることがわかった。さらに CLAC-P は膜貫通型コラーゲンファミリーで保存された coiled-coil ドメインを膜貫通領域の近傍及び NC3 領域に有しており、これらのドメインはコラーゲン様三重らせん構造の形成に重要と考えられている。そこで coiled-coil ドメインに重要な 1 位及び 4 位の疎水性アミノ酸をリジン残基に置換した変異体を作製すると、これらの変異体もコラーゲン構造が保持されず、A β との結合能も失われた。これらの結果から、sCLAC のコラーゲン様三重らせん構造は A β との結合に必須であることが示された。

sCLAC と A β の相互作用機構を明らかにするため、まず A β 結合アッセイの反応液中に 0.5 M NaCl を添加すると、結合は阻害された。また sCLAC はヘパリンと結合することを見出し、A β 結合アッセイの反応液中にヘパリンを添加したところ、濃度依存的に結合が阻害された。ヘパリンは蛋白質の塩基性アミノ酸が豊富な領域に静電的に結合すると考えられ、sCLAC と A β との結合は sCLAC のコラーゲン配列の塩基性アミノ酸クラスター領域を介することが予測された。この予想は共同研究者の長田らによる、塩基性アミノ酸クラスター領域の中でも COL1 ドメインをプロリン残基に置換した CLAC 変異体が A β との結合能力を失うという結果から裏付けられた。

また sCLAC と A β の結合が、培養上清中の夾雑物質を介していないことを確認するため、CLAC-P のカルボキシ末端に FLAG tag を付加し、抗 FLAG 抗体アフィニティーカラムを用いて sCLAC を精製し、A β 結合アッセイを行った。その結果、精製 sCLAC は凝集 A β と結合し、さらに COL1 領域の塩基性アミノ酸クラスター領域を欠いた変異体 sCLAC (COL1mt) は結合が低下した。

以上の結果から、sCLAC はコラーゲン様三重らせん構造をとって凝集 A β と結合し、その結合には COL1 ドメインの塩基性アミノ酸クラスター領域が重要な役割を果たすことが分かった。

() sCLAC が A β の凝集に与える影響の検討

sCLAC は A β と直接結合することから、A β の凝集・線維化に影響を与える可能性が考えられた。そこで β シート構造を特異的に認識する蛍光色素 thioflavin T (thioT) を用いた定量的な *in vitro* A β 凝集アッセイを構築し、sCLAC の A β 凝集に対する効果を検討した。

DEAE カラム、ヘパリンカラム、逆相 HPLC を組み合わせ、培養上清中から sCLAC を精製する方法を確立した。精製 sCLAC を合成 A β 1-42 と混和し 37 °C でインキュベートしたところ、A β の凝集は抑制された。 *In vitro*

における A β の凝集過程は、可溶性 A β が緩徐に立体構造変化して凝集核を形成する nucleation phase と、一旦形成された凝集核に A β が結合して急速に線維が伸長する elongation phase からなる。A β 1-42 は凝集核形成能が高く、両過程が同時に進行するため、sCLAC が A β 凝集過程のどの phase を抑制したかの判別が難しい。そこで凝集核形成能の低い A β 1-40 を用いた A β 凝集アッセイを行い、sCLAC が A β 凝集の nucleation phase に及ぼす影響について検討した。その結果、sCLAC はアッセイ開始後数時間以内の nucleation phase では A β 凝集に影響を与えないが、その後の elongation phase において凝集を抑制することがわかった。さらに nucleation phase をバイパスして elongation phase を選択的に評価するために、アッセイ開始時に予め作製した A β 線維を凝集核として添加した。その結果 sCLAC は A β の凝集を elongation phase で抑制することが示された。

以上の結果から、*in vitro* において sCLAC は A β の凝集過程を特に elongation phase において抑制することが分かった。sCLAC は凝集した A β と結合することから、sCLAC は A β が凝集する際に形成される、特異な立体構造をとる凝集中間体に結合し、凝集の進行を抑制する可能性が考えられる。

結論

本研究において、私は AD 脳老人斑に特異的に蓄積する新規アミロイド結合蛋白 CLAC について次のことを示した。(1) CLAC は前駆体蛋白 CLAC-P から furin によって切断され分泌される。(2) CLAC は凝集した A β と特異的に結合する。(3) CLAC は A β の凝集を特に elongation phase において抑制する。これらの結果は、CLAC が AD 発症に対し抑制的に働く可能性を示唆する。今後 アミロイド蓄積を生じる APP Tg マウスと神経細胞に CLAC-P を過剰発現する CLAC Tg マウスの交配により、CLAC が β アミロイド蓄積に及ぼす影響を *in vivo* で検討する必要がある。また今回の検討により sCLAC が A β の凝集の中間体と結合する可能性が示唆された。近年 A β 凝集の初期に形成される中間体である、可溶性 oligomer あるいは protofibril が A β 毒性の本態であるとの仮説が提唱されている。CLAC と A β の凝集中間体の相互作用による毒性・蓄積制御機構について、今後さらに *in vitro*, *in vivo* の検討を進め、解明を図りたい。