

論文の内容の要旨

論文題目 γ セクレターゼによる A β 42 産生機構に関する研究
: Pen-2 アミノ末端の役割

指導教官 辻 省次 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 13 年 4 月入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

氏名 磯尾 紀子

アルツハイマー病(AD)脳に蓄積する老人斑は AD に疾患特異性が高く、その主要構成成分であるアミロイド β ペプチド(A β)は、前駆体蛋白である APP が細胞外部分で β セクレターゼによる切断を受けた後、膜貫通領域内で γ セクレターゼによる切断を受けて生成・分泌される。A β の C 末端長には多様性が存在し、それぞれ 40、42 アミノ酸からなる A β 40、A β 42 が主要な分子種である。細胞から分泌される A β の大部分は A β 40 であるが、量的に少ない分子種である A β 42 は A β 40 に比し非常に凝集性が高いこと、また AD 脳でも A β 42 が初期に蓄積し、遅れて A β 40 の蓄積が観察されること等から、特に A β 42 の産生・分泌・

蓄積の異常が AD 発症に深く関与すると考えられている。したがって A β の C 末端長を決定する γ セクレターゼは、AD の重要な創薬ターゲットと目されている。しかし γ セクレターゼには APP 以外にも多数の基質が存在し、プロテアーゼ活性全体を抑制するのみでは、重大な副作用を生じる可能性が懸念される。したがって γ セクレターゼの基質・切断特異性の理解は、副作用のない根本治療薬開発の糸口となることが期待されている。これまでに同定された γ セクレターゼ構成因子は Presenilin (PS)、Nicastrin (Nct)、Aph-1、Pen-2 の 4 分子であり、PS は活性中心サブユニットとして機能すること、Nct は基質受容体として機能することが示されてきた。しかし個々の分子が γ セクレターゼ内でそれぞれどのような役割を担っているのかはまだ完全に解明されていない。そこで γ セクレターゼ複合体形成過程の最終段階において PS の分子内切断・酵素活性の獲得に重要な役割を担うと考えられる Pen-2 が γ セクレターゼ複合体の形成、活性化に果たす役割を、特にそのアミノ末端部分に着目して解明することを目的として本研究を行った。

まずショウジョウバエ S2 細胞においてショウジョウバエ Pen-2 (dPen-2) またはその N 末端部に種々の tag (HA、myc、FLAG、His6-Xpress (Hx)、HA を 2 つ連ねた HA2 tag) を付加した dPen-2 をショウジョウバエ PS (Psn)、dNct、dAph-1 とともに過剰発現させ、ELISA による分泌 A β 量の測定、ウェスタンブロット解析を行い、コントロールと比較した。dNct、dAph-1 量は変化なく、Psn については全長型 Psn の減少とともに断片型 Psn の増加が見られた。分泌 A β 量はいずれもコントロールに比し軽度の上昇していたが、A β 42 産生比率は dPen-2 の N 末端に tag を付加した場合にのみ上昇した。中でも A β 42 産生比率上昇が特に顕著であった HA tag を付加した HA-dPen-2 を、S2 細胞において UTR に対する dsRNA を用いた RNAi 法により内因性 dPen-2 をノックダウンした条件下で過剰発現させて、同様に A β 42 産生比率を検討した。他の構成因子である Psn、dNct、dAph-1 について同様に内因性蛋白をノックダウン後に過剰発現させても、A β 42 産生比率はコントロールに比し差を認めなかったが、HA-dPen-2 では有意に上昇が認められた。そこで、dPen-2 の N 末端領域の長さや配列が重要な役割を果たしている可能性を考え、様々な dPen-2 の N 末端改変体 (N 末端 2-10 アミノ酸を欠損させた dPen-2/ Δ 2-10、その N 末端部に HA tag を付加した HA-dPen-2/ Δ 2-10、10 番 11 番アミノ酸の間に HA tag を挿入した dPen-2/10HA11、TMD1 までの全てのアミノ酸 (2-17 アミノ酸) をアミノ酸の electrostatic な性質を維持したアミノ酸にほぼ全て置換した dPen-2/ Δ 2-17/rep.、その N 末端部に HA tag を付加した HA-dPen-2/ Δ 2-17/rep.) を作製し、これらの発現が A β 42 産生比率に与える影響について検討した。コントロールに比し、N 末端長の延長した dPen-2/10HA11、HA-dPen-2/ Δ 2-17/rep. のみにおいて A β 42 産生比率は有意に上昇し、N 末端長を短縮させた場合には変化は見られなかった。したがって、A β 42 産生比率の上昇は、N 末端領域に HA tag が存在することが必ずしも必要ではなく、Pen-2 の N 末端長の延長により生じること、さらに N 末端領域の特定の一次配列ではなく、静電的性質などその性質が γ セクレターゼ切断の位置選択性に関与することが示唆された。

γ セクレターゼは A β の C 末端長を決定する γ 切断の他に、より細胞質内側に近い膜内切断にも関与することが知られている。これは ϵ 切断と呼ばれ、その切断により C 末端断片 (AICD) が細胞質内に放出され

る。A β 42 産生比率の上昇効果は、PS の家族性変異でも見られ、一部の変異については AICD 産生量の低下を伴うことが報告されている。N 末端長の延長した dPen-2 の A β 42 産生上昇効果も、AICD 産生量の低下を伴うか否かを検証するため、reporter 細胞 (SC100gal4、UAS-luciferase、EGFP を過剰発現させた S2 細胞) を用いて luciferase assay を行い、AICD 産生量を評価した。N 末端長の延長した dPen-2 の効果は AICD 産生を反映するレポーター活性、即ち ϵ 切断には影響しないことが確認された。

このように ϵ 切断には大きな影響を与えずに、切断部位を変化させる低分子化合物として γ セクレターゼモジュレーター (GSM) が注目されている。一部の NSAIDs など、A β 42 を低下させ A β 38 を上昇させる効果を有するものは A β 42-lowering GSM と呼ばれ、逆に A β 42 を上昇させ A β 38 を低下させる効果を有する一部の NSAIDs や、高脂血症治療薬である fenofibrate は A β 42-raising GSM と呼ばれる。このように A β 38 と A β 42 の挙動には逆の相関が見られることから、N 末端長の延長した dPen-2 が分泌 A β 42 産生比率上昇効果を示す際、A β 38 の産生にどのような影響を与えるかを検証した。Tris/Bicine/Urea gel を用いて、A β 38、A β 40、A β 42 を分離して検出を行ったところ、N 末端長の延長した dPen-2 を過剰発現させた場合には、A β 42 産生量の増加が見られると同時に A β 38 産生量の低下が見られた。

これまでに観察された、N 末端長の延長した dPen-2 による A β 42 産生比率の上昇効果が、ショウジョウバエ Pen-2 に特異的な現象である可能性を除外するため、ヒト PEN-2 (hPEN-2) でも同様の現象が見られるかどうかを検証したところ、N 末端長の延長した hPEN-2 でも著明な上昇効果が見られた。次にこの効果がショウジョウバエ由来細胞に特異的な現象であるかどうかを検討するため、哺乳類細胞 (PS1/2 ダブルノックアウトマウス由来線維芽細胞 (DKO 細胞) に APP Swedish 変異を恒常発現させた DKO NL 細胞) を用いて検討したところ、やはり A β 42 産生比率に有意な上昇が見られた。したがって N 末端長の延長した Pen-2 に見られる A β 42 産生比率の上昇効果は、Pen-2 蛋白の動物種、発現細胞系の種類を問わずに観察される現象であった。

N 末端長の延長した Pen-2 が分泌 A β 42 産生比率を上昇させる効果が、酵素-基質反応に直接作用するものかどうかを検討した。hPEN-2 または Hx-hPEN-2 を他の γ セクレターゼ構成因子とともにバキュロウイルス-Sf9 細胞発現系を用いて過剰発現させ、リコンビナント γ セクレターゼ複合体を再構成した。感染細胞から 1% CHAPSO 可溶膜画分を採取して酵素画分とし、基質としては大腸菌由来リコンビナント C100FLAGmycHis (C100FmH) 蛋白を用いて *in vitro* γ -secretase assay を行い、新規合成された A β を ELISA で測定した。hPEN-2、Hx-hPEN-2 のいずれを過剰発現させた場合にも A β 40、A β 42 が新規合成され、A β 42 産生比率は、Hx-hPEN-2 を含む γ セクレターゼを用いた場合に有意な上昇が見られた。次にこの酵素-基質反応において基質量を振り、新規合成された A β 40、A β 42 量それぞれについて、Michaelis-Menten plot に fit させて、Km 値および Vmax 値を算出した。A β 40 については、hPEN-2、Hx-hPEN-2 のいずれを過剰発現させた場合にも、Km 値、Vmax 値はほとんど差が見られなかったが、A β 42 については、hPEN-2 を過剰発現させた場合には Km 値 1.56 μ M、Vmax 値 11.5 pM/hr、Hx-hPEN-2 を過剰発現させた場合には Km 値 1.67 μ M、Vmax 値 24.0 pM/hr で、Km 値には差が見ら

れなかったが、Vmax 値は Hx-hPEN-2 で約 2 倍に上昇した。これらの結果から、N 末端長の延長した Pen-2 の A β 42 産生比率の上昇効果は、 γ セクレターゼの性状に直接的に影響を及ぼし、A β 42 切断酵素活性のみを上昇させ、A β 40 切断酵素活性や基質との親和性には影響を与えないと考えられた。

ここまで明らかとなった N 末端長の延長した Pen-2 による効果は、A β 42-raising GSM の効果と類似していると考えられた。そこで A β 42-raising GSM として報告されている高脂血症治療薬 fenofibrate による A β 産生活性への影響と比較検討した。ELISA による分泌 A β 量測定および Tris/Bicine/Urea gel を用いた A β 38、A β 40、A β 42 の分離検出により、fenofibrate 処理により A β 42 量の増加が見られるとともに、A β 38 量の減少が見られたことから、fenofibrate の A β 42-raising GSM としての薬理効果が確認された。

脂質二重膜非透過性のチオール基特異的反応試薬である MTSEA-biotin を用いた SCAM (substituted cysteine accessibility method)による検討から、PS は脂質二重膜内で TMD6 および TMD7 を含む catalytic pore を形成していることが示されている。この catalytic pore 内において、PS1 NTF 内の TMD6 に存在する 246 番アミノ酸 alanine および 250 番アミノ酸 leucine をそれぞれ cysteine に置換した A246C、L250C は、 γ セクレターゼの遷移状態模倣型阻害剤である L-685,458 により競合されることから、これらの残基が subsite として機能することが示唆されている。Pen-2 は直接 PS NTF と結合しており、A β 42-lowering GSM である sulindac sulfide による PS の構造変化などが示唆されていることから、N 末端長の延長した Pen-2 が、PS の catalytic pore に何らかの影響を与えている可能性を考え、SCAM により検証した。TMD1/2 間に存在し、catalytic pore 形成には関与していないと考えられている I114C 変異を持つ PS1 は、hPEN-2、FLAG-hPEN-2 のいずれを過剰発現させた場合にも、そのラベル量には差を認めなかった。しかし PS1/A246C および PS1/L250C は、FLAG-hPEN-2 を過剰発現させた場合には、hPEN-2 を過剰発現させた場合に比し、ラベル量の減少が認められ、PS1/L250C でのラベル量の低下がより顕著であった。この結果から、N 末端長の延長した Pen-2 は、catalytic pore 内で subsite 形成に関与する PS1 TMD6 に存在する A246C および L250C の water accessibility を低下させたと考えられ、catalytic pore の構造変化をもたらしたことが示唆された。同様の結果は A β 42-raising GSM である fenofibrate 処理においても得られた。

以上、Pen-2 の N 末端部の改変が γ セクレターゼ活性およびその切断特性に及ぼす影響について検討し、A β の C 末端長の多様性を生じる分子機構の 1 つとして、 γ セクレターゼの catalytic pore の構造変化を指摘し、そして Pen-2 の N 末端の延長がこの構造変化を惹起することを示した。Pen-2 の N 末端領域は、活性型 γ セクレターゼに組み込まれた状態では抗体や MTSEA-biotin が access できないような tight な構造をとっていると考えられ、catalytic pore を含めた TMD の構造保持、すなわち活性型 γ セクレターゼ複合体の構造保持に重要な役割を担う可能性が考えられた。したがってその部分に種々のアミノ酸配列が付加されたことにより catalytic pore を含めた γ セクレターゼ複合体の構造に変化をもたらし、A β 切断に影響を与えたと考えた。この A β の C 末端長の多様性を生じる作用機構をさらに詳細に解明することにより、 ϵ 切断には影響を与えずに A β 42 産生を低下させる AD 治療薬の開発が可能になることを期待したい。