

## 審査の結果の要旨

氏名 磯尾紀子

本研究は A $\beta$  の C 末端長の多様性を生じる分子機構を明らかにするため、 $\gamma$ セクレターゼ複合体の構造保持と機能に重要な役割を担う可能性が示唆されている Pen-2 の、特に N 末端領域が  $\gamma$ セクレターゼ活性ならびに切断特性に及ぼす影響についての解析を試みたものである。その解析により、N 末端長の延長した Pen-2 は A $\beta$ 42 の産生比率の上昇効果を有し、その効果は下記の特徴を有するという結果を得ている。

1. ショウジョウバエ dPen-2、ヒト hPEN-2 蛋白を用いた検討、ショウジョウバエ由来 S2 細胞、哺乳類 PS1/2 ダブルノックアウトマウス由来線維芽細胞、バキュロウイルス・Sf9 細胞発現系で再構成した  $\gamma$ セクレターゼを用いた検討、過剰発現実験、ノックダウンレスキュー実験、*in vitro*  $\gamma$ セクレターゼ assay を用いた検討の結果、N 末端長の延長した Pen-2 の A $\beta$ 42 の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、実験系の種類を問わずに見られることが示された。
2. 様々な長さや配列を有する tag を N 末端部に付加した dPen-2 蛋白を S2 細胞に過剰発現させて、 $\gamma$ 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た結果、A $\beta$ 42 の産生比率の上昇の程度は延長するアミノ酸長には依存しないが、延長するアミノ酸配列には依存し、特に HA tag 配列で著明であるものの、その静電的な性質には依存しないことが示された。
3. N 末端領域の長さや配列に様々な改変を加えた dPen-2 蛋白を S2 細胞に過剰発現させて、 $\gamma$ 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た結果、A $\beta$ 42 の産生比率の上昇効果は、Pen-2 の N 末端長を延長した場合にのみ見られる効果であり、短縮した場合には見られないことが示された。

4. Reporter 細胞 (S2 細胞に SC100gal4、UAS-luciferase、EGFP を過剰発現させたモノクローナル細胞株) を用いて luciferase assay を行い、基質である SC100gal4 から  $\gamma$ セクレターゼによる  $\epsilon$ 切断を受けて産生された AICD 量を評価したところ、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  $\epsilon$ 切断には影響しないことが示された。
5. Tris/Bicine/Urea gel を用いて、A $\beta$ 38、A $\beta$ 40、A $\beta$ 42 を分離して検出したところ、N 末端長の延長した dPen-2 を過剰発現させた場合には、A $\beta$ 42 産生量の増加が見られると同時に A $\beta$ 38 産生量の低下を伴うことが示された。
6. *In vitro*  $\gamma$ セクレターゼ assay を行い、新規合成された A $\beta$ 40、A $\beta$ 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、N 末端長の延長した Pen-2 の酵素-基質反応に及ぼす影響について検討した結果、N 末端長の延長した Pen-2 の A $\beta$ 42 産生比率の上昇効果は、 $\gamma$ セクレターゼの性状に直接的に影響を及ぼし、A $\beta$ 42 切断酵素活性のみを上昇させ、A $\beta$ 40 切断酵素活性や基質との親和性には影響を与えないことが示された。
7. 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) による検討を行い、 $\gamma$ セクレターゼの catalytic pore を形成することが示唆されている PS1 NTF 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 において、N 末端長の延長した Pen-2 により、water accessibility の低下が生じ、catalytic pore の構造変化が生じることが示され、同様の結果が A $\beta$ 42-raising  $\gamma$ セクレターゼモジュレーターである fenofibrate 処理においても認められた。

以上、本論文は Pen-2 の N 末端部の改変が  $\gamma$ 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 $\beta$  の C 末端長の多様性を生じる分子機構の 1 つとして、 $\gamma$ 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明らかにした。本研究は  $\epsilon$ 切断には影響を与えずに A $\beta$ 42 産生を低下させる AD 治療薬の開発につながる A $\beta$  の C 末端長の多様性を生じる作用機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。