

論文の内容の要旨

論文題目 酵母膜画分を用いた γ セクレターゼの無細胞アッセイ系

氏 名 柳下 聡介

【序論】

γ セクレターゼは、プレセニリン(presenilin, PS), ニカストリン, Aph-1, Pen-2 の 4 種類の膜タンパク質が複合体を形成して活性を持つ酵素であり, 様々な膜タンパク質の切断に寄与している(Kimberly et al., 2003; Takasugi et al., 2003; Edbauer et al., 2003)。その基質としてよく知られているものの一つにアミロイド前駆体タンパク質(amyloid precursor protein, APP)がある。APP が β セクレターゼ (β -site APP cleaving enzyme 1: BACE1) によって切断されたときにできる C 末端側の断片である 99 アミノ酸残基の C99 を γ セクレターゼが切断し, アミロイド β タンパク質 (amyloid β -protein, A β) が産生される(Selkoe, 2001)。A β はアルツハイマー病の脳内に見られる老人斑を構成する成分であり, アルツハイマー病の病因であると考えられているタンパク質である。

産生される A β としては主に 2 種類が知られており, それらは A β の有するアミノ酸残基数を付して, それぞれ A β 40, A β 42 と呼ばれている。A β 42 は A β 40 よりも凝集性が強く, アルツハイマー病脳内に先に蓄積することが剖検脳を用いて明らかにされている(Iwatsubo et al., 1994)。

A β 40, A β 42 を産生する箇所を γ 切断部位と呼ぶが, γ セクレターゼが C99 を切断する場所は γ 切断部位以外にも, その C 末端側に複数存在することが知られている。その中でも特に重要なのは, A β 48, A β 49 を産生する箇所である ϵ 切断部位である (Gu et al., 2001)。これまでのいくつかの報告から, γ セクレターゼはまず C99 を ϵ 切断部位で切断して A β 48, A β 49 を産生し, それらを C 末端側から 3 残基ごとに切断して A β 40 や A β 42 を産生していることが示唆されている(Sato et al., 2003; Funamoto et al., 2004; Qi-Takahara et al., 2005; Yagishita et al., 2006)。この仮説はトリペプチド仮説と呼ばれる。これによれば, A β 40 は A β 49 から A β 46, A β 43 を経て産生され, A β 42 は A β 48 から A β 45

を経て産生されることになる。

私は以前、脂質ラフト画分を用いた *in vitro* アッセイ系を樹立し、この系を用いて A β 46 が γ セクレターゼによって、A β 40 と A β 43 へと切断され、A β 42 へとは切断されないということを明らかにした(Yagishita et al., 2008a)。この結果は、トリペプチド仮説を強く指示するものである。

本研究では、さらに詳しく γ セクレターゼの酵素学的解析を *in vitro* で試みるため、酵母を用いた実験系の樹立をすることとした。

酵母を用いた理由としては、

[1] 内在性の γ セクレターゼや APP が存在しないので、内在性因子の影響がない

[2] 遺伝子組み換えが容易である

[3] 目的のタンパク質を高レベルで発現できる

ことが挙げられる。

【本論文の内容】

1. 酵母膜画分における γ セクレターゼ活性の再構築

生化学的解析用に作成した *PEP4* 欠損酵母株 PJ69-4Apep4 Δ (genotype: *MATa*, *trp1-901*, *leu2-3,112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4 Δ* , *gal80 Δ* , *GAL2-ADE2*, *LYS2::GAL1-HIS3*, *met2::GAL7-lacZ*, *pep4::kanMX*)に、 γ セクレターゼ複合体を構成する PS, ニカストリン, Aph-1, Pen-2 および基質である C99 を発現させた。

この酵母から膜画分を採取し、gamma Buffer (50mM PIPES, pH 7.0, 250mM Sucrose, 1mM EGTA) で懸濁した後、無細胞アッセイに供した。

その結果、基質 C99 からの A β 産生を確認した。これは、酵母の膜画分においても、正しく γ セクレターゼ活性が再構築できたことを示唆する。そこで、私はここで再構築された γ セクレターゼ活性が、哺乳類細胞で再構築したときのそれと同等なのかどうかを検討することにした。以下の点について検討を行い、全て哺乳類細胞で再構築された γ セクレターゼと同等であることを確認した。

[1] 0.25% CHAPSO 存在下で A β 産生活性が上昇する。

[2] 0.1% ホスファチジルコリン(PC)存在下で A β 産生活性が上昇する。

[3] γ セクレターゼ阻害剤 L-685,458 で活性が阻害される。

[4] 至適 pH が 7.0 である。

次に、同様のことを C99 の細胞質側部分をほとんど削った C55 を基質としても行い、C99 と同様に γ セクレターゼの基質となることを確認した。なお、酵母の内在性因子に C55 を切断する活性を持つものがあることを見出したが、この活性は PC の添加によって阻害された。よって、PC を添加した条件においては、酵母内在性因子の寄与は無視できることになる。

これらの結果は、酵母内においても哺乳類細胞内におけるのと同等の γ セクレターゼ

を再構築できたことを示しており、哺乳類細胞の内在性因子の影響のない新しい γ セクレターゼのアッセイ系の樹立に成功したと言える (Yagishita et al., 2008b)。

2. A β 48, A β 49 の切断の検討

上記で新たに樹立したアッセイ系を用いて、私は「A β 49, A β 48 は *in vitro* でそれぞれ A β 40, A β 42 へと切断されるか」という課題に取り組もうと考えた。この問題については、現在までのところ示唆はされているが、直接的に生化学的手法で証明はなされていないからである。

そこで、酵母に A β 48, A β 49 を発現させて上記の方法でアッセイをした。しかし、予想に反して A β 産生は検出できなかった。

酵母に発現させた γ セクレターゼの活性が低いのではないかと考えて、次に私は、酵母に発現させた基質を、哺乳類細胞の一種である Chinese hamster ovary (CHO) 細胞由来の γ セクレターゼによって切断させるという実験系も新たに樹立した。この系では、CHO 細胞の全膜画分を酵素として用い、酵母膜画分を基質として用い、両者を 1% CHAPSO 存在下で混合した後、上記の系と同様にアッセイを行った。基質として C99 や C55 を用いた場合には、 γ セクレターゼ依存的な A β 産生を認めた。しかし、基質として A β 48, A β 49 を用いた場合には、 γ セクレターゼ依存的な A β 産生を認めなかった。

さらに、A β 48, A β 49 をコードする DNA から mRNA を *in vitro* で作製し、そこからタンパク質合成反応を行わせて基質を得ようと試みた。しかし、膜指向性を持たせるために付加した APP 自身のシグナルペプチドが *in vitro* で切断されず、 γ セクレターゼの基質となり得る A β 48, A β 49 を得ることができなかった。

このように、A β 48, A β 49 は *in vitro* assay 系においては A β 40 や A β 42 へとは切断されない。この理由として、以下のことが考えられた。

- [1] A β 48, A β 49 の膜に対する配向が正しくなされていない。
- [2] A β 48, A β 49 の凝集反応が優先的に進行している。
- [3] ϵ 切断がないと γ 切断が進行しないという制約がある。
- [4] A β 48, A β 49 が γ セクレターゼに基質として認識されていない。

3. γ セクレターゼ阻害剤 DAPT の作用機序についての検討

γ セクレターゼ阻害剤 DAPT は、アッセイ系によってその効果が大きく違うことが知られている。培養細胞に作用させたときは C 末端側の長い A β の貯留を引き起こす (Qi-Takahara et al., 2005; Yagishita et al., 2006) のに対し、可溶化した膜画分を用いたアッセイ系では濃度依存的に A β 産生を阻害する (Kakuda et al., 2006)。

そこで、本研究のアッセイ系では、DAPT がどのように作用するのかを確かめることとした。その結果、C 末端側の長い A β の貯留を引き起こすことなく、濃度依存的な A β 産生抑制を確認した。

4. 酵母内在性因子についての検討

酵母の内在性因子の中に私は C55 を切断する因子があることを認めた。この因子による C55 切断活性は L-685,458 で阻害された。この因子の正体は、酵母内に存在する Signal peptide peptidase (SPP) ではないかと考えられた。SPP は γ セクレターゼに相同性のある酵素として知られており、特に哺乳類 SPP は γ セクレターゼの簡易的なモデルとしてよく研究されている。現在までに、哺乳類 SPP は、L-685,458 によって阻害されるが、DAPT では阻害されず、(Z-LL)₂ Ketone によって阻害されることが知られている。

本研究で見出した酵母内在性因子が同様の性質を有しているかどうかを確認したところ、DAPT では阻害されず、(Z-LL)₂ Ketone によって阻害されることを見出した。

よって、酵母内在性因子は SPP である可能性が示唆された。