

## 論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 柳下 聡介

$\gamma$  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。特にアルツハイマー病との関連が有名であり、その関連基質がアミロイド前駆体タンパク質(amyloid precursor protein, APP)である。APP が  $\beta$  セクレターゼ ( $\beta$ -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  $\gamma$  セクレターゼが切断し、アミロイド  $\beta$  タンパク質 (amyloid  $\beta$ -protein, A $\beta$ ) が産生される。

A $\beta$  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 $\beta$  としては主に 2 種類が知られており、それらは A $\beta$  の有するアミノ酸残基数を付して、それぞれ A $\beta$ 40, A $\beta$ 42 と呼ばれている。A $\beta$ 42 は A $\beta$ 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。

A $\beta$ 40, A $\beta$ 42 を産生する箇所を  $\gamma$  切断部位と呼ぶが、 $\gamma$  セクレターゼが C99 を切断する場所は  $\gamma$  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 $\beta$ 48, A $\beta$ 49 を産生する箇所である  $\epsilon$  切断部位である。これまでのいくつかの報告から、 $\gamma$  セクレターゼはまず C99 を  $\epsilon$  切断部位で切断して A $\beta$ 48, A $\beta$ 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 $\beta$ 40 や A $\beta$ 42 を産生していることが示唆されている。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 $\beta$ 40 は A $\beta$ 49 から A $\beta$ 46, A $\beta$ 43 を経て産生され、A $\beta$ 42 は A $\beta$ 48 から A $\beta$ 45 を経て産生されることになる。

論文提出者は、以前に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 $\beta$ 46 が  $\gamma$  セクレターゼによって、A $\beta$ 40 と A $\beta$ 43 へと切断され、A $\beta$ 42 へとは切断されないということを明らかにし、トリペプチド仮説を強く指示した(Yagishita et al., *J. Biol. Chem.*, 2008)。

論文提出者は、学位請求論文において、さらに詳しく  $\gamma$  セクレターゼの酵素学的解析を *in vitro* で試みるため、酵母を用いた新しい実験系の樹立に成功した。

### 【本論文の骨子】

#### 1. 酵母膜画分における $\gamma$ セクレターゼ活性の再構築

論文提出者は、生化学的解析用に PEP4 欠損酵母株 PJ69-4Apep4 $\Delta$  (genotype: MATa, trp1-901, leu2-3,112, ura3-52, his3-200, gal4 $\Delta$ , gal80 $\Delta$ , GAL2-ADE2, LYS2::GAL1-HIS3, met2::GAL7-lacZ, pep4::kanMX) を作製し、 $\gamma$  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。そして、この酵母から膜画分を採取し、無細胞アッセイに供した。その結果、基質 C99 からの A $\beta$  産生を確認し

た。これは、酵母の膜画分においても、正しく $\gamma$ セクレターゼ活性が再構築できたことを示唆する。次に、ここで再構築された $\gamma$ 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以下の四点から検討を行い、全て哺乳類細胞で再構築された $\gamma$ 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  $A\beta$  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  $A\beta$  産生活性が上昇する。
- [3]  $\gamma$ 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 $\gamma$ 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新たに見出したが、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 $\gamma$ セクレターゼを再構築できたことを示しており、論文提出者は、哺乳類細胞の内在性因子の影響のない新しい $\gamma$ セクレターゼのアッセイ系の樹立に成功したと言える。

## 2. $A\beta$ 48, $A\beta$ 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、論文提出者は、「 $A\beta$ 49,  $A\beta$ 48 は *in vitro* でそれぞれ  $A\beta$ 40,  $A\beta$ 42 へと切断されるか」という課題に取り組んだ。この問題は $\gamma$ セクレターゼの基質切断機序解明の上で非常に重要な問題であるが、直接的に生化学的手法で証明はなされていない。

そこで、論文提出者は、酵母に  $A\beta$ 48,  $A\beta$ 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  $A\beta$  産生は検出できなかった。

酵母に発現させた $\gamma$ セクレターゼの活性が低いのではないかとの認識から、論文提出者は、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 $\gamma$ 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。この系は、CHO 細胞の全膜画分を酵素として、酵母膜画分を基質としてそれぞれ用い、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うというものである。基質として C99 や C55 を用いた場合には、 $\gamma$ セクレターゼ依存的な  $A\beta$  産生を認めた。しかし、基質として  $A\beta$ 48,  $A\beta$ 49 を用いた場合には、 $\gamma$ セクレターゼ依存的な  $A\beta$  産生を認めなかった。

さらに、 $A\beta$ 48,  $A\beta$ 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てもいるが、APP 自身のシグナルペプチドが *in vitro* で切断されず、 $\gamma$ セクレターゼの基質となり得る  $A\beta$ 48,  $A\beta$ 49 を得ることができなかった。

このように、A $\beta$ 48、A $\beta$ 49 は *in vitro* assay 系においては A $\beta$ 40 や A $\beta$ 42 へとは切断されない。この理由として、論文提出者は、以下のことを想定している。

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

### 3. $\gamma$ セクレターゼ阻害剤 DAPT の作用機序についての検討

$\gamma$  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 $\beta$  の貯留を引き起こすのに対し、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 $\beta$  産生を阻害する。

論文提出者は、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 $\beta$  の貯留を引き起こすことなく、濃度依存的な A $\beta$  産生抑制を確認した。

### 4. 酵母内在性因子についての検討

論文提出者は、本論文の研究を遂行する過程において、C55 を切断する因子が酵母の内在性因子の中に存在することを見出した。論文提出者は、この因子の正体として酵母内に存在する Signal peptide peptidase (SPP) を想定し、それを検証する実験を行った。

SPP は  $\gamma$  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  $\gamma$  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)<sub>2</sub> Ketone によって阻害されることが知られている。

論文提出者が、本研究で見出した酵母内在性因子について阻害剤実験を行ったところ、L-685,458 および (Z-LL)<sub>2</sub> Ketone によって阻害され、DAPT では阻害されないことを見出した。よって、酵母内在性因子は SPP である可能性が示唆された。

したがって、本審査委員会は博士（学術）の学位を授与するのにふさわしいものと認定する。