

γ セクレターゼは β -amyloid precursor protein (APP) の膜内配列を切断し、アルツハイマー病 (AD) の発症に関わる $A\beta$ の産生を担うことから、AD の創薬標的分子の一つとして重要なプロテアーゼである。一方、 γ セクレターゼは APP 以外に種々の I 型膜蛋白質を基質とし、特に発生・分化に関わる Notch の切断はそのシグナル伝達に必須の役割を果たしている。従って γ セクレターゼの単純な阻害は、Notch シグナリングの阻害による重篤な副作用をもたらすという問題があり、AD 治療薬の開発においては基質特異的な切断活性の制御の実現が課題となっている。

γ セクレターゼはプレセニリン (presenilin; PS)、ニカストリン (nicastrin; NCT)、APH-1、PEN-2 の 4 者を基本構成因子とする膜蛋白質複合体である。しかし種々の生化学的解析から、これら 4 者の分子量合計を上回る 2~4 MDa の巨大複合体を形成することが明らかとなっており、基本因子以外に付加的な因子がその活性を制御している可能性が示唆されている。特に、 γ セクレターゼ活性は細胞表面膜から内膜系にかけて広く分布しているが、その局在を規定する因子は明らかでない。近年、 γ セクレターゼの細胞内局在の違いが、切断される基質の特異性を規定することが報告され、 γ セクレターゼの活性を空間的に制御する分子の存在が想定される。そこで本研究において申請者は、ショットガンプロテオミクスによる γ セクレターゼ構成因子の網羅的解析を行い、特に細胞内局在と活性との関連を解明することを目的として研究を進めた。

1. 活性型 γ セクレターゼを認識する抗 NCT モノクローナル抗体の性状解析

γ セクレターゼを構成する 4 者のうち NCT は、複合体形成の進展に伴って糖鎖および構造の成熟化を受け、ER における未成熟型 (imNCT) から活性型複合体中の成熟型 (mNCT) へと変化する。また imNCT の状態では APH-1 とサブコンプレックスを形成しているが、4 者が結合して初めて mNCT となることが知られている。当研究室において作出された抗 NCT モノクローナル抗体 (A5201A、A5226A) は、ヒト NCT に極めて特異的であり、 γ セクレターゼの会合状態を維持した CHAPSO 可溶化条件において、前者は imNCT のみ、後者は mNCT/imNCT 双方を認識するという選択性を有している。免疫染色において A5201A は、ER に存在する imNCT を強く認識し、この結果は生化学的解析と合致していた。一方、A5226A は mNCT をより特異的に認識し、細胞表面膜、特に GM1 のリガンドであるコレラトキシン (CTxB) 陽性のマイクロドメイン近傍がラベルされた。また細胞内では LysoTracker に陽性の酸性コンパートメントとの共局在が認められた。

2. 活性型 γ セクレターゼ相互作用分子の網羅的同定

これらモノクローナル抗体の反応性の差異から、A5226A の免疫沈降画分を A5201A と比較した差分に mNCT に特異的な相互作用分子が濃縮されると考えられた。そこで NCT ノックアウトマウス由来線維芽細胞 (NKO) にヒト NCT もしくはベクターのみを遺伝子導入し、それぞれ CHAPSO 可溶化条件で IgG、A5201A、A5226A による免疫沈降を行い、LC-MS/MS 解析に供した。N=4 の独立なサンプルのうち、少なくとも 1 回同定され、かつ NKO/NCT \times A5226A 群以外の 5 群からは全く同定されないか、A5201A 群より多く同定された分子を「mNCT 特異的結合分子」として選択した。 γ セクレターゼの構成因子である Pen-2/Psenen、既知の結合分子である catenin 類及び Tmp21/Tmed10 が同定され、本プロテオームが活性型 γ セクレターゼの相互作用分子として妥当であることが支持された。また細胞表面膜やエンドソーム、リソソーム、multivesicular body に局在する分子が多く同定されたが、ER に局在する分子は Bcap31 など少数であり、この結果は NCT 抗体による免疫染色の結果と一致するものと考えられた。

同定した分子群が A β 産生に与える影響を評価するため、内因性に A β を分泌する Neuro-2a 細胞に対し各遺伝子 3 配列ずつの siRNA を用いたノックダウン実験を行った。ノックダウン効率が低い、もしくは細胞生存に影響を与える配列が多く存在するなかで、CD81 のノックダウンにより A β 産生の顕著な減少が観察された。

3. γ セクレターゼとテトラスパニン

CD81をはじめ、CD9、TSPAN31、TSPAN8 はテトラスパニンファミリーに属する 4 回膜貫通蛋白質であり、脂質ラフトに類似したマイクロドメイン (Tetraspanin enriched microdomain; TEM) を構成することが知られている。またこれまでの生化学的解析から、 γ セクレターゼ活性は脂質ラフト画分に濃縮されることが示されている。本プロテオミクス解析において複数のテトラスパニン分子が同定されたことから注目し、さらに解析を進めた。免疫染色の結果、内因性 CD9 は A5226A 陽性の酸性コンパートメントに局在していた。また免疫共沈降実験により CD9 と mNCT を含む活性型 γ セクレターゼの特異的な結合が観察され、一部の活性型 γ セクレターゼは TEM に存在することが明らかになった。

本研究において申請者は、反応性の異なる 2 種の抗 NCT 抗体を用いて、活性型 γ セクレターゼに特異的な相互作用分子を複数同定することに成功した。さらに、 γ セクレターゼが細胞表面膜のマイクロドメインや酸性コンパートメントに局在し、特にテトラスパニンファミリー分子と共局在することを見出した。CD81 のノックダウンにより A β 産生が顕著に低下したが、CD9、TSPAN31、TSPAN8 のノックダウンでは大きな変化は見られなかった。TEM は複数のテトラスパニン分子によって構成されることが知られており、 γ セクレターゼ活性が発揮される場合は TEM のなかでもさらに特殊な環境である可能性がある。本研究におけるプロテオミクス解析では複数の膜輸送関連分子が同定されたことから、輸送分子機能と TEM の関連についてさらに解析を進めている。また本研究で用いた A5201A、A5226A はそれぞれ不活性型、活性型 γ セクレターゼの局在を区別して解析できる分子プローブとして有用である。今後の課題は、同定した分子が γ セクレターゼの局在に与える影響を解析することにより、「局在による活性制御」を行っているか否かの検証にあるものと考えられる。

以上のごとく、本研究は γ セクレターゼ制御因子に関して、抗体を用いたユニークなプロテオミクス解析から新知見をもたらしたものであり、博士(薬学)の学位に相応しいものと判定する。