

〔別紙2〕

審査の結果の要旨

氏名 渡邊 知倫

ユビキチン-プロテアソームシステム (UPS) は、細胞内のタンパク質分解において中心的な役割を果たしており、ユビキチン化されたタンパク質を特異的に分解することで厳密に制御された機構である。アルツハイマー病 (AD)、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、ポリグルタミン病など多くの神経変性疾患は、個々の疾患ごとに異なる異常タンパク質の蓄積によって構成された特徴的な病的構造物が認められる。中でも AD は認知症の原因として大きな割合を占める進行性の神経変性疾患であり、病理学的特徴として、 β アミロイド (A β) を主成分とする老人斑の蓄積と、異常リン酸化されたタウタンパク質を主成分とする神経原線維変化の蓄積が見られる。このような異常タンパク質の蓄積は、疾患発症の一因であると考えられており、UPS によるタンパク質分解系の破綻がその原因の 1 つとされている。AD においても UPS の破綻に関する報告が多数なされているが、その詳細な分子機構は未だ不明である。

AD 患者脳を用いた発症原因の解明を目的とした遺伝子発現変動については多数の報告があるが、殆どの解析は健常人と AD 患者間での発現量を比較したものである。この解析方法では、各個体間での遺伝子発現の多様性が高いことから、発現変動の顕著な遺伝子のみが検出可能であるという問題が生じる。この問題点を解決するために、申請者は、AD 患者では前頭葉に比べ側頭葉で著しい病変が見られることに着目した。同一 AD 患者の前頭葉と比較し側頭葉でより発現変動の大きな遺伝子を探索することにより、個体差の問題を解決できるだけでなく、より病的変化の進行に直結する遺伝子を見出すことができると考え、定量的 PCR 法により両領域間で発現変動に違いが見られる遺伝子の探索を行った。その結果、AD 患者脳の前頭葉と比較し側頭葉でより発現が低下し、かつ UPS に関連した遺伝子として E3 ユビキチンリガーゼである F-box and leucine-rich repeat protein2 (FBL2) を見出した。

まず、定量的 PCR 法および免疫組織化学を用いて、FBL2 のヒト脳における発現パターンと、AD 脳における変化について検討した。健常人において FBL2 mRNA の発現は、他の組織と比較し脳で非常に高く、脳内では海馬における発現が最も高かった。FBL2 タンパク質の発現は、神経細胞の細胞体および樹状突起に認められたが、アストロサイト、ミクログリアでは見られなかった。AD 患者脳での FBL2 mRNA 発現は、アミロイド蓄積を指標とする病理変化 (ブランクステージ) の進行とともに低下し、その低下は病変の著しい側頭葉でより顕著であった。FBL2 タンパク質もまた同様に、ブランクステージの進行とともに低下し、ブランクステージ後期ではグルタミン酸作動性神経細胞のマーカーである EAAC1 陽性神経細胞、神経細胞体のマーカーである NeuN 陽性神経細胞において発現が殆

ど見られなかったことから、FBL2 タンパク質の低下は、神経細胞の脱落に先行することが示唆された。さらに興味深いことに、AD の遺伝学的危険因子の 1 つであるアポリポタンパク質 E 遺伝子の $\epsilon 4$ アレル (ApoE4) 保有の AD 患者脳において、FBL2 mRNA 発現、FBL2 タンパク質の低下は ApoE4 非保有 AD 患者脳に比べより顕著であった。

FBL2 は、そのアミノ酸配列から SCF 型の E3 ユビキチンリガーゼと類推され、免疫沈降法により FBL2 が SCF 型 E3 ユビキチンリガーゼ複合体の構成成分である *skp1*、*cullin1* と結合することを確認した。次に、FBL2 が A β 産生に及ぼす影響について検討した。HEK293 細胞に APP と FBL2 を一過性に過剰発現させると、培養上清中の A β の分泌が減少すると同時に、sAPP β の分泌が低下した。この時、A β の産生および分解に関する酵素のタンパク質量に変化はなかった。SCF 型 E3 ユビキチンリガーゼ複合体を形成できない F-box 領域欠失 FBL2 変異体では、FBL2 の共発現による A β 分泌低下作用は見られなかった。また、FBL2 による A β 分泌低下作用は、マウス初代培養神経細胞にレンチウイルスベクターを用いて FBL2 を過剰発現させた場合にも確認された。さらに、スウェーデン型家族性 AD 変異 APP 遺伝子を過剰発現させた Neuro2a 細胞 (APP^{sw}-Neuro2a) に FBL2 を過剰発現すると、細胞内 A β 量が低下した。逆に、APP^{sw}-Neuro2a 細胞で siRNA を用いて内在性 FBL2 の発現を抑制すると、A β 、sAPP β の分泌が増加した。

E3 ユビキチンリガーゼは、基質と特異的に結合しユビキチン化することが知られている。FBL2 が A β 分泌に影響を及ぼすという結果に基づき、A β の前駆体である APP が FBL2 の基質である可能性について検討した。一過性に APP と FBL2 を過剰発現させた HEK293 細胞の抽出液を用いて、免疫沈降法により、FBL2 と APP ならびに APP の C 末端断片との結合を確認した。同時に、FBL2 の発現は APP ユビキチン化を促進した。さらに、組み換え体 FBL2-SCF 複合体を用いた *in vitro* の再構成系においても、APP ユビキチン化の促進が確認された。一方 F-box 領域を欠失した FBL2 変異体は APP と結合したが、APP ユビキチン化は促進しなかった。

次に、FBL2 による A β 分泌低下作用に、APP のユビキチン化がどのような影響を与えるかについて、APP と FBL2 を一過性に過剰発現させた HEK293 細胞を用いて検討した。シクロヘキシミド処理によりタンパク質合成を阻害した条件下で、FBL2 は APP の分解を促進したが、一方 F-box 領域欠失 FBL2 変異体の発現は APP の分解を阻害した。さらに、FBL2 は APP のエンドサイトーシスを阻害し、その結果細胞膜表面上の APP を増加させた。FBL2 によるこれらの作用は、APP の 651 番目のリジン残基をアラニンに置換した変異体では見られず、A β 分泌低下作用も見られなかった。これらの結果から、FBL2 は、APP の

651番リジン残基のユビキチン化を介して APP 代謝を調節し、A β 分泌を低下させるものと考えられた。

最後に、*in vivo* において A β 分泌に対する FBL2 の影響を評価するために、APP^{sw}/家族性 AD 変異プレセニリン 1 遺伝子 (PS1^{M146V}) を過剰発現したダブルトランスジェニックマウス (AD1) に、さらに thy1.2 プロモーターを用いて脳特異的に FBL2 を過剰発現するトランスジェニックマウスを掛け合わせた三重トランスジェニックマウス (AD1/FBL2) を作製し、生化学的および免疫組織化学的に検討した。7ヶ月齢の AD1/FBL2 トランスジェニックマウスの海馬では、CTF β が有意に低下し、可溶性 A β 及び不溶性 A β (トリス緩衝液不溶性・グアニジン溶液可溶性) の有意な低下が見られた。さらに、海馬及び大脳皮質内の A β 斑の蓄積も有意に低下した。以上の結果から、FBL2 は、*in vivo* において A β 分泌とともに A β 蓄積も低下させることが示された。

以上のごとく、本研究において申請者は、AD 患者脳でより病変の著しい側頭葉で前頭葉に比して発現が低下する遺伝子として FBL2 を同定した。さらに、FBL2 が、APP のユビキチン化を介して APP の分解を促進するだけでなく、エンドサイトーシスを阻害することで A β 分泌を低下させるという新しい APP 代謝調節機構を明らかにした。AD 患者脳では、この代謝調節機構の低下により細胞内 APP/A β 蓄積、分泌 A β 、CTF β の増加を介して神経機能障害、神経細胞死が誘発されることが病態の形成に重要な役割を果たしていることが示唆される。FBL2 依存性の APP 代謝調節機構の活性化は、既存の A β 治療戦略とは異なる新規 AD 治療薬の開発に繋がることが期待される。以上のごとく、本研究はアルツハイマー病の分子病態解析から新規創薬標的の同定に新知見をもたらすものであり、博士(薬学)の学位にふさわしいものと判定した。