

論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 米村 洋而

γ -セクレターゼは、アルツハイマー病の原因と考えられているアミロイド β ペプチド ($A\beta$)の産生を担うプロテアーゼである。 $A\beta$ は前駆体タンパク質である APP から β -セクレターゼと γ -セクレターゼの 2 つのプロテアーゼによって切り出される。APP はまず、 β -セクレターゼによる切断で C 末端側の 99 残基のアミノ酸 C99 となる。次に、この C99 は γ -セクレターゼによる切断の結果、N 末端側が $A\beta$ となる。 γ -セクレターゼによる C99 の切断部位によってアミノ酸 40 個の $A\beta_{40}$ かアミノ酸42個の $A\beta_{42}$ を主に産生し、その比率は脳では $A\beta_{40}:A\beta_{42}=9:1$ とされている。 $A\beta_{42}$ は $A\beta_{40}$ に比べて凝集性が高く、 $A\beta_{42}$ の産生比率の上昇とアルツハイマー病発症は深く関連があることが明らかとなっており、 $A\beta_{42}$ の産生比率を抑えることがアルツハイマー病の治療や予防につながると考えられている。 γ -セクレターゼは APP のほかに Notch の切断をも担う。Notch の切断によって生じる細胞内ドメイン (NICD) は核へと移行し、細胞分化や運命決定に重要な役割を果たすため、 $A\beta$ 産生の抑制を目的とした γ -セクレターゼの阻害は Notch シグナル阻害による副作用が問題とされている。

γ -セクレターゼは、PS、NCT、Aph1、Pen2 の 4 つの膜タンパク質を最小コンポーネントとして、活性を有するプロテアーゼである。 γ -セクレターゼを構成するタンパク質のうち、PS と Aph1 は複数のアイソフォームの存在が知られている。PS には PS1 と PS2 が、Aph1 には Aph1a と Aph1b が存在する。さらに、Aph1a はスプライシングの違いで Aph1aL、Aph1aS を生じる。ひとつの γ -セクレターゼ複合体中に複数種類の PS や Aph1 は存在しないことが確かめられており、したがって 2 つの PS と 3 つの Aph1 の組み合わせで少なくとも 6 通りの γ -セクレターゼが存在する。 $A\beta$ 分子種は最終的に、 γ -セクレターゼによってどの分子種となるのかが決定されるため、異なる γ -セクレターゼの機能の違いを深く理解することは AD の治療に大変重要である。同時に、Notch シグナル阻害による副作用を避けるため、これらの γ -セクレターゼの Notch 切断活性の違いがあるのかどうかについても検討する必要がある。しかしながら、これまで 6 つの γ -セクレターゼにどのような機能の違いがあるのかについては報告がされていなかった。

論文提出者は、異なる PS、Aph1 の組み合わせで構成される γ -セクレターゼのもつ機能の違いを明らかにする目的で、 γ -セクレターゼの酵母再構成系による機能解析を行った。酵母は内在性の γ -セクレターゼを有しておらず、PS と Aph1 を任意の組み合わせで発現させて異なる γ -セクレターゼを再構成し、それらの違いをはっきりと比較することができる点が利点である。論文提出者は、Notch 膜貫通領域と APP 由来の基質 C55 の C 末端側 (細胞質内側) に酵母転写因子 Gal4 を融合することで、基質が切断されたときに核移行する Gal4 によって活性化される遺伝子を利用したアッセイを行った。Notch-Gal4 によるレポーター

アッセイの結果、PS1 の γ -セクレターゼは Aph1 の違いによらずよく Notch を切断することが示唆された。一方 PS2 の γ -セクレターゼは、どの Aph1 でも Notch 切断活性が PS1 に比べて低いことが示唆された。APP 由来の基質 C55-Gal4 を用いたレポーターアッセイの結果、PS1 の γ -セクレターゼは Aph1 の違いによらず、高い切断活性を示したが、PS2 の γ -セクレターゼは PS2/Aph1b のときのみ PS1 の γ -セクレターゼと同程度の活性を示し、PS2/Aph1aL、PS2/Aph1aS の γ -セクレターゼは切断活性が低かった。これらのことから PS2/Aph1b の γ -セクレターゼは Notch の切断活性については PS1 の γ -セクレターゼに比べて低く、APP の切断活性は PS1 の γ -セクレターゼとほぼ同程度であるという、基質に応じた異なる切断活性を示す γ -セクレターゼであることを論文提出者は新規に見出した。

次に、論文提出者は β -セクレターゼ安定発現した HEK293 細胞を用いた PS、Aph1 のダブルノックダウンによって、残った単一組成の γ -セクレターゼの機能を確認してみることとした。ノックダウンによって PS1/Aph1a、PS1/Aph1b、PS2/Aph1a、PS2/Aph1b が主に残されている細胞に Notch-Myc を導入し、産生された Notch 断片 (NICD) の量をウェスタンブロットによって検出した結果、Aph1b の γ -セクレターゼは Notch1 の切断活性が Aph1a の γ -セクレターゼに比べて低いことがわかった。このとき、抗 Myc 抗体によっておよそ等量の Notch が細胞に導入されていることも確かめられた。

同様に、ノックダウンによって PS1/Aph1a、PS1/Aph1b、PS2/Aph1a、PS2/Aph1b が残されている細胞によって産生された A β 量、A β 分子種についてもウェスタンブロットと ELISA によって検出、定量を行った。その結果、PS2/Aph1b の γ -セクレターゼは少なくとも PS2/Aph1a より高い活性で A β 産生を行っていることが示され、さらに PS2/Aph1b の γ -セクレターゼは A β 42 の産生比率 (A β 42/A β 40) も PS1 の γ -セクレターゼと比較して高いことがわかった。

これまで、A β 産生の抑制を目的とした γ -セクレターゼ阻害剤の問題点として、 γ -セクレターゼによる C99 切断の阻害と同時に Notch の切断も阻害してしまうことで Notch シグナリングが阻害されることが挙げられてきた。しかし、論文提出者は、ひとつひとつの γ -セクレターゼの違いについて酵母再構成系や培養細胞系で検討した結果、PS2/Aph1b の γ -セクレターゼは Notch1 の切断活性は低く A β 42 産生比率は PS1 に比べて高いことを明らかとした。今後は PS2/Aph1b の γ -セクレターゼに親和性のある阻害剤などの開発が可能となれば、アルツハイマー病発症に深い関連がある A β 42 産生比率を抑制しつつ、細胞分化に重要な役割を有する Notch シグナリングはそれほど阻害しないという戦略がとれることが本研究で示唆された。

以上の結果は、異なる γ -セクレターゼの酵素学的性質の違いについて新たな知見を加え、さらにこれらの違いに着目することで新規のアルツハイマー病治療や予防法の開発につながる可能性を示した。したがって、本審査委員会は博士 (学術) の学位を授与するにふさわしいものと認定する。