

**Presenilin 遺伝子変異による
家族性アルツハイマー病発症機構に関する研究**

富田 泰輔

目次

第1章 序論

1-1 アルツハイマー病研究とは	p.1
1-2 A β の分子細胞生物学	p.1
1-3 A β と家族性アルツハイマー病	p.3
1-4 プレセニリンのクローニング	p.6
1-5 本研究の目的	p.6

第2章 プレセニリン上の変異が β アミロイド蛋白産生に及ぼす影響

2-1 目的	p.8
2-2 方法	p.8
2-2-1 ヒト PS 発現ベクターの作成	p.8
2-2-2 大腸菌による GST 融合 PS2 蛋白の発現	p.10
2-2-3 COS 細胞での DEAE-dextran 法による一過性発現	p.11
2-2-4 PS2 遺伝子を恒常的に発現する N2a 細胞の作製	p.12
2-2-5 抗体	p.12
2-2-6 PS 発現細胞の免疫細胞化学	p.14
2-2-7 PS 発現細胞のウェスタンブロット解析	p.15
2-2-8 A β C 末端断端特異的 sandwich ELISA による A β の測定	p.16
2-3 結果	p.17
2-3-1 PS 蛋白の代謝	p.17
2-3-2 PS 蛋白上の FAD 変異が A β 分泌に及ぼす影響	p.19
2-4 小括	p.20

第3章 プレセニリン蛋白のフラグメント化の意義とその代謝

3-1 目的	p.22
3-2 方法	p.22
3-2-1 ヒト PS 発現ベクターの作製	p.22
3-2-2 ラット初代細胞の培養	p.23
3-2-3 PS 遺伝子を恒常的に発現する N2a、HEK293 細胞の作製	p.24
3-2-4 抗体	p.25
3-2-5 各種細胞・臓器からの PS 蛋白の抽出	p.25
3-2-6 培養細胞のアポトーシス誘導ならびに caspase 阻害剤処理	p.25
3-2-7 培養細胞の cycloheximide 処理	p.26
3-3 結果	p.26
3-3-1 各種培養細胞における PS2 のプロセッシングパターン	p.26
3-3-2 2 種類のプロセッシング	p.27
3-3-3 内因性 PS2 蛋白のプロセッシングパターン	p.28
3-3-4 人工的なフラグメント型 PS2 の発現とプロセッシング	p.30
3-3-5 フラグメント型 PS2 の安定化	p.31
3-3-6 人工的な PS2 フラグメントが A β 42 産生に及ぼす影響	p.32
3-4 小括	p.33

第4章 プレセニリン蛋白の代謝における最 C 末端の役割

4-1 目的	p.34
4-2 方法	p.34
4-2-1 ヒト PS 発現ベクターの作製	p.34
4-2-2 抗体	p.37
4-2-3 IP-western 法による A β の検出	p.38
4-2-4 培養細胞における発現	p.38
4-3 結果	p.38

4-3-1	COS・N2a 細胞における最 C 末端変異型 PS2 の発現と、 Aβ 産生に及ぼす影響	p.38
4-3-2	IP-western 法による分泌 Aβ の測定	p.40
4-3-3	N2a 細胞における最 C 末端変異型 PS2 の代謝	p.40
4-3-4	最 N 末端欠損型 PS2 の代謝と Aβ 産生に及ぼす影響	p.41
4-3-5	プロセシングされない PS2 の代謝	p.42
4-3-6	エクソン 10 欠損型 PS2 が Aβ 産生に及ぼす影響	p.43
4-3-7	Asp 変異型 PS2 が Aβ 産生に及ぼす影響	p.43
4-3-8	最 N・C 末端欠損型 PS2 による内因性 PS1 の replacement	p.44
4-4	小括	p.45

第5章 考察

5-1	PS の代謝	p.46
5-1-1	小胞体における PS 蛋白の分解	p.47
5-1-2	PS の安定化	p.51
5-1-3	PS の安定化因子の同定	p.54
5-1-4	PS のプロセシング	p.57
5-1-5	PS 複合体の性質	p.59
5-2	γ セクレターゼと PS	p.60
5-2-1	γ セクレターゼによる Aβ40・Aβ42 の切り分けと PS	p.60
5-2-2	γ セクレターゼによる膜内配列の切断	p.64
5-2-3	PS 変異による Aβ42 産生上昇と FAD 発症	p.73
5-2-4	γ セクレターゼ活性サブユニットとしての PS	p.74
5-3	PS1、PS2 に特異的な機能	p.74
5-4	まとめ	p.76

References

図表

謝辞

第1章 序論

1-1 アルツハイマー病研究とは

社会の高齢化とともに老化に伴う神経変性疾患の増加が大きな社会問題となっている。高齢者の痴呆の原因としてもっとも頻度の高いものがAlzheimer病（AD）である。ADは進行性の記憶障害を主症状とする痴呆疾患であり、その病理学的特徴として大脳皮質の神経細胞の変性・消失に加え、老人斑（senile plaque）と神経原線維変化（neurofibrillary tangle）と呼ばれる二種類の異常構造物の蓄積が知られている（図表1）。老人斑は主に細胞外に蓄積したアミロイドと、変性神経突起や反応性グリア細胞の突起などから構成されている。これら蓄積物がADの原因か結果なのかについては依然不明である。しかし老人斑はADに対する疾患特異性が高いことから、その構成成分の実体及び形成機序はADにおける神経細胞死に深く関わっていると考えられてきた。その中でも常に中心的な役割を果たしてきたのが β アミロイド蛋白（A β ）である。

ADの多くは孤発例であるが、ごくわずかに常染色体優性遺伝形式を示す家系が存在する。これを家族性アルツハイマー病（FAD）と呼ぶ。FADの原因遺伝子を明らかにすることでAD発症の分子メカニズムの解明につながると考えられ、その原因遺伝子のポジショナルクローニングが精力的に進められた。

現在、これらの研究（生化学的・分子細胞生物学的・分子遺伝学的研究）の成果が繋がりつつあり、ADの分子レベルでの研究が大きな前進を見せている。特にFADに連鎖する遺伝子変異が、培養細胞及び個体に及ぼす影響の解析は、現在のAD研究の大きな流れとなっている（Selkoe, 1999）。

1-2 A β の分子細胞生物学

Glennerらは脳血管アミロイドを精製し、分子量4 kDaの蛋白を見出し、 β アミロイド蛋白（ β -amyloid、A β ）と名付けた（Glenner and Wong, 1984）。その後このA β が老人斑アミロイドの主要構成成分であることが免疫組織化学的に示され、AD発症メカニズムにA β の蓄積が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。その後老人斑の構成成分として様々な分子が同定されたが、A β よりも早期に、もしくは別個に沈着する分子は見出されておらず、現在ではA β の沈着が老人斑の本態であると考えられている。

ABのアミノ酸配列を元にcDNAクローニングが行われ、ABは β APP (β -amyloid protein precursor) と呼ばれる前駆体の一部であることが判明した (Kang et al., 1987)。 β APPは695ないし770アミノ酸の一回膜貫通型蛋白であり、ABはその細胞外ドメインから膜貫通部位の一部に相当する。続いて β APPの代謝経路が研究され、非AB産生経路 (non-amyloidogenic pathway) とAB産生経路 (AB generating pathway) の二種類の代謝経路が存在することが明らかにされた (図表2・3; Selkoe, 1999)。非AB産生経路では、まずABの中間部分に相当する16番目のリジン残基と17番目のロイシン残基の間で切断される。この切断を α 切断と呼ぶ。その結果 β APPのN末端部分のほとんどが分泌型 β APP (β APPs) として細胞外に分泌される。 α 切断には構成的に行われている切断と、PKCによって制御されている切断が存在する。構成的な α 切断についてはメタロプロテアーゼであるADAM10が、さらにPKCによって制御を受ける α 切断についてはTACEが行っていると考えられている (Lammich et al., 1999; Buxbaum et al., 1999)。これに対してAB産生経路では、まず β 切断と呼ばれる限定分解を受ける。 β 切断を行う酵素については、一回膜貫通型アスパルチルプロテアーゼであるBACE/Asp2がクローニングされている (Hussain et al., 1999; Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999; Lin et al., 2000)。 α ・ β 切断によって生じた β APPのC末端断片 (C83、C99) は引き続いて未同定の γ セクレターゼによって γ 切断を受け、p3及びABが生成・分泌される。

β APPのほとんどは細胞表面膜上にでるか、非AB産生経路によって代謝されていることなどから、当初ABを産生することが病的な現象ではないかと考えられた。しかしその後、ABがごくわずかながらも正常細胞からも分泌され、脳脊髄液中にも存在することが明らかとなった (Haass et al., 1992; Shoji et al., 1992; Seubert et al., 1992)。このことからABが何らかの原因でアミロイドとして脳内に蓄積を始めることが、神経細胞死、さらにはAD発症に大きな役割を果たしていると考えられた。現在この考え方は「アミロイド仮説」と呼ばれ、AD研究における中心的仮説の一つである。

細胞外に分泌されているABのほとんどは第40位のバリン残基で終わるAB40であるが、ごくわずかに最C末端の長さが異なるABも分泌されていることがわかっていった。また老人斑として蓄積するABにはAB40だけではなく、産生量の少ない分子種である第42位のアラニン残基で終わるAB42が大量に存在することが報告されていた。そうした中で、Lansburyらはこの最C末端の長さがABペプチドの凝集性の速度を規定していることを見出した。そしてABの凝集においては、まず凝集性の高いAB1-42が蓄積してseedとなり、加速度的にAB1-40を巻き込んで凝集を進めるという「seed仮説」を発表した (Jarrett and Lansbury, 1993)。さらに鈴木らはAB40・AB42の最C末端断端と特異的に反応する断端特異的モノクローナル抗体を樹立し、

β APP上のFAD変異によって特異的にA β 42の産生量が上昇することを見出した (Suzuki et al, 1994)。また岩坪らはこの抗体を用いてAD患者脳の免疫組織化学を行い、病理学的に老人斑として最初期に蓄積するA β はA β 42であり、A β 40は遅れて蓄積してくることを見出した (Iwatsubo et al, 1994)。この結果は生化学的にも証明された (Gravina et al., 1994)。A β 42が選考して蓄積する病理像は孤発例、家族性を問わずすべてのADに共通であり、A β 42の産生・分泌・蓄積の異常がアミロイド形成の引き金となっていると考えられた。このような知見からA β 42はアミロイド仮説におけるkey moleculeであると考えられている。そこでA β のC末端長を決定する γ 切断活性のコントロールはAD治療・予防薬の作用点になりうると考えられ、多くの研究者・製薬企業が γ セクレターゼに関する研究を行っている。

1-3 A β と家族性アルツハイマー病

アミロイド仮説をさらに強固にしたのがFADの原因遺伝子のポジショナルクローニングと、分子遺伝学・分子細胞生物学的解析である。FADは発症年齢によって早期発症型と晩期発症型の二種類に分類される。ともに常染色体優性遺伝形式を示し、その原因遺伝子のクローニングが精力的に進められた。

ダウン症 (Down's syndrome, DS) は第21番染色体のトリソミーによって生じる精神遅滞を伴う染色体異常症である。40歳を過ぎたDS患者脳内には老人斑や神経原線維変化が出現し、AD患者脳と同様の病理像を示すこと、さらに β APP遺伝子が第21番染色体に存在することから、 β APP上に何らかのFADの原因となる遺伝子変異があることが予測されていた。1990年、オランダの家族性脳血管性アミロイドーシス (HCHWA-D) の原因遺伝子が β APP上の点突然変異に連鎖することが報告された後、1991年にFADに連鎖する β APP遺伝子上の点突然変異が報告された。現在ではさらに数カ所のFADに連鎖する点突然変異が報告されている (図表3; On-line source: *APP mutations directory*)。

β APPの変異はA β に対してどの位置にあるかによってN末端側、中間部位、C末端側の三種類に分けられる。これらの変異が β APP代謝、特にA β 産生に及ぼす影響について、培養細胞を用いて検討された。まず β 切断部位の直前のアミノ酸が二重に置換するSwedish変異 (KM670/671NL) では、野生型に比べて5~8倍のA β 分泌量の増加が観察された (Citron et al., 1992; Cai et al., 1993)。この変異 β APPはBACE/Asp2に対する基質親和性が高く、 β 切断が起こりやすくなっているために全A β の産生量が増加すると考えられて

いる (Citron et al., 1993)。中間部の変異については産生するAβのN末端側の多様性を高めるが産生レベルに大きな変化は与えないという報告や、全Aβの産生レベルをあげるという報告がある (Haass et al., 1994; De Jonghe et al., 1998)。この変異を持つAβは凝集性が高まっているとの報告もあり、産生機構よりむしろペプチドの性質に影響を及ぼしている可能性もある。

C末端側の変異は4カ所5種類が報告されているが、長らくその影響は不明であった。しかしAβ40・Aβ42を見分ける断端特異的抗体を用いたsandwich ELISA法の開発により、これらの変異がAβ42の産生量を特異的に上昇させることが明らかにされた (Suzuki et al., 1994)。その分子的背景は不明であるが、FAD変異によって構造変化を起こし、第42位でのγ切断が起こりやすくなっていると考えられている。すなわち、βAPP上の点突然変異のほとんどはAβ産生、特にAβ42の産生を大きく亢進するものであった。

次にアミロイド仮説に基づいたAD発症の動物モデルとして、βAPPのトランスジェニックマウスが作成された。野生型βAPPのトランスジェニックマウスでは脳内でのアミロイド蓄積は報告されなかった。しかしFAD変異を持つβAPPのトランスジェニック動物では加齢とともに老人斑様のアミロイド斑の沈着が観察された (Games et al., 1995; Hsiao et al., 1996)。このことから*in vivo*におけるAβ産生レベルの亢進はアミロイドの蓄積につながるということが明らかにされた。以上の結果はβAPP上のFAD変異によってAβ42の産生が亢進し、アミロイドとして凝集・沈着、さらには神経細胞死をおこすという、アミロイド仮説を強く支持するものであった。

一方晩期発症型FADの原因遺伝子の一つとしてApoE遺伝子が報告されている。ApoEにはE2、E3、E4の三種類のアレルが存在する。このうちE4アレルは晩期発症型FADの原因遺伝子であることがわかっている (Strittmatter et al., 1993)。また孤発例においてもE4アレルがあると発症年齢が低下することから、ApoE4アレルはすべてのAD発症の遺伝的危険因子であると考えられている (Corder et al., 1993)。ApoE4がどのようにしてAD発症に寄与しているかについては定かではない。培養細胞レベルではApoE4はβAPPの代謝には直接大きな影響を与えない。ApoEは老人斑に局在する蛋白としても免疫組織化学的に同定されていた (Namba et al., 1991)。*in vitro*の混合実験より、ApoE4はAβの凝集能を著しく高めることが明らかにされた (Ma et al., 1994)。またApoE4アレルを持つ患者の脳内では老人斑が多く蓄積している (Schmechel et al., 1993)。さらにマウスApoe遺伝子をノックアウトした動物とβAPPのトランスジェニックマウスを掛け合わせるとアミロイド蓄積が顕著に抑制され、ヒトApoE4を掛け合わせるとアミロイドの沈着が回復するといった結果から、ApoEは細胞外に分泌されたAβの凝集・アミロイド蓄積を助けるシ

ャペロンの役割を果たしていると考えられている (Bales et al., 1997; Holtzman et al., 2000)。

このようにFADに連鎖する遺伝子変異はA β の産生を上昇させるか、凝集能を高めることによってアミロイド蓄積を亢進させるということが明らかとなった。そこでその最後のステップである蓄積したA β が神経細胞死を引き起こしているかどうかという点について注目が集まった。AD患者脳内に蓄積しているアミロイドが神経細胞死を引き起こす「原因」なのか、それとも細胞死が起こった末の「結果」であるのかという点は古くから議論が交わされてきた。この問題は、アミロイド仮説に基づいたFAD発症機構の解明という点で最も重要なポイントであるともいえる。そのなかでアミロイド仮説を強く支持しているのは合成A β ペプチドが初代培養神経細胞に毒性を示すという結果である (Yankner et al., 1990)。これまでに多くの研究者がその追試を行い、高濃度で凝集させたA β は培養細胞に対して毒性を持つという点については確立した事実となっている。

しかしAD脳内で起こっている神経細胞死がアミロイドの神経毒性によるものかどうかについてはまだ不明である。まず培養細胞レベルで神経毒性を示すA β の濃度は生理的なA β の濃度に比べて非常に高濃度である。また老人斑の内部には変性突起と呼ばれる神経突起が観察されるが、老人斑の初期形態であるびまん性老人斑内では顕著な変性突起・神経細胞死はみられない。また痴呆症状のみられない正常老人でもA β 42陽性の老人斑が沈着しており、痴呆症状とアミロイド蓄積の量は必ずしも比例しないことが報告されている (Fukumoto et al., 1996)。このような結果から、アミロイドが実際に脳内で神経毒性を発揮しているのかという点については疑問がもたれていた。

FAD変異型 β APPのトランスジェニックマウスの脳内では、顕著なアミロイドの蓄積がみられるにもかかわらず、神経細胞死が起こっているかについては一定の見解が得られていない。これは実際に「神経細胞死」という現象をどのようにとらえるか、どのように計測するかという測定系の問題点も含まれていると思われる。しかし一部のトランスジェニックマウスでは加齢とともに学習能力が低下しているとの報告もある (Hsiao et al., 1996)。またアミロイドが神経毒性を発揮するためにはヒトに近い種であることや、老化が必要であるといった報告もある (Guela et al., 1998)。このように*in vivo*でのアミロイドによる神経毒性については、今後トランスジェニックマウスの掛け合わせや、さらに高等な、寿命の長い動物を用いた検討によって明らかにされていくと考えられる。

1-4 PSのクローニング

βAPP上の変異が同定された直後、早期発症型FADのほとんどはβAPP遺伝子に連鎖せず、第14番染色体に連鎖することが示された (Schellenberg et al., 1992)。1995年、St. George-Hyslopらのグループによってその原因遺伝子がクローニングされた (Sherrington et al., 1995)。当初S182と呼ばれ、その後プレセニリン (Presenilin, PS) 1と呼ばれるようになったこの遺伝子は、467アミノ酸からなる新規の多回膜貫通型の蛋白をコードしており、膜貫通回数は6回から10回と予測されたが、特別な機能を示すモチーフは見出されず、その機能は不明であった (図表4)。現在では64種類50カ所にFADに連鎖する点突然変異が報告されており、その変異はほぼ分子全長に分布する (図表5)。クローニングされた時点での相同性の高い分子としては、*Caenorhabditis elegans*の精子形成に関わる*spe-4*のみであった (23% homology) が、この分子もはっきりとした機能は不明であった (L'Hernault and Arduengo, 1992)。またPS1に相同な分子が第1番染色体に存在していることがわかり、プレセニリン2 (PS2) と名付けられた (Levy-Lahad et al., 1995; Rogaev et al., 1995)。PS2はPS1と67%の相同性を持ち、膜貫通ドメイン (TMD) に限ると80%の相同性を持っている (図表6)。第14番染色体に連鎖しないFAD家系のうち、Volga German familyと呼ばれる家系と、いくつかの家系はこのPS2上の点突然変異に連鎖していることが明らかにされた。このようにPSは早期発症型FADの原因遺伝子としてその大半を占めていることがわかった。

1-5 本研究の目的

基本的にADは多遺伝子性疾患であり、様々な遺伝子・環境因子などが発症に関与していると予測されている。同様な多遺伝子性疾患として糖尿病がよく研究されている。糖尿病にも常染色体優性遺伝形式を示す家系が存在し、原因遺伝子が解明されつつあるが、その多くは糖尿病発症のkey moleculeであるインシュリンに関わる分子である。同様に単一の遺伝子変異によってADと同様の臨床・病理像を示すFADの分子メカニズムの研究を行うことによって、全てのAD発症機構の重要なポイントが解明され、将来的に全てのADの予防・治療・診断法の開発に大きく寄与するものと考えられる。特に新たに同定されたPS遺伝子

は、多くのFADの原因遺伝子であることから、PS変異によるFAD発症機構の解明は急務である。しかしPS遺伝子は機能不明な新規の蛋白をコードしていたため、PSがFAD発症に及ぼす影響については様々な推測がなされた。

本研究では、FAD発症機構におけるPSの役割を分子細胞生物学的に検討するために、まず培養細胞を用いたPS発現系を構築し、PSの代謝を検討した。そしてPSがA β 産生に及ぼす影響を検討した。さらにPS遺伝子の改変を行い、特にPSの代謝とA β 産生の関係に注目して検討を進めた。

第2章 プレセニリン上の変異が Aβ 産生に及ぼす影響

2-1 目的

新たなFADの原因遺伝子としてクローニングされたPS1、PS2はそれぞれ467、448アミノ酸からなる蛋白をコードしている遺伝子であった。そこでこれらの蛋白を培養細胞に発現させ、代謝を検討した。さらにAβ産生に対する影響を検討した。

2-2 方法

試薬類は、特に指定のない場合は和光純薬・関東化学・宝酒造・SIGMAのものをを用いた。基本的な操作、バッファー類に関してはMolecular Cloning 2nd edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)に従った。以下の章においても同様である。

2-2-1 ヒト PS 発現ベクターの作製

2-2-1-1 PCR (Polymerase chain reaction) 法によるヒト PS1、PS2 cDNA フラグメントの増幅

既に発表されているヒト PS1、PS2 遺伝子配列 (Genbank accession No. L42110 (PS1), L43964・L44577 (PS2)) をもとに、Open Reading Frame (ORF) の前後をはさんで ORF の全長が増幅されると同時に、制限酵素認識配列が導入されるように、PCR のプライマーを次のように設計した。括弧内はプライマーの名称を示す。

[PS1]

5'- cct caa gaa gct ttg ttt tct gtg aaa cag tat ttc -3' (S10F/Hind)

5'- gaa ctt ttc agg agg tac tg -3' (S6R)

[PS2]

5'- ccg gga tcc aga cct ctc tgc ggc ccc aag -3' (SM3)

5'- ggc act cga gtg taa aac tat aca act gc -3' (SM4)

Human brain MATCHMAKER cDNA Library (CLONTECH、HL4004AH) をテンプレートとして、LA Taq により OmniGene (Hybrid) で、95℃・1 分間熱変性、55℃・2 分間アニーリング、68℃・5 分間 DNA 合成を 30 回繰り返し、1940 bp (PS1)、1482 bp (PS2) の cDNA フラグメントを増幅させた。HindIII ならびに EcoRI または BamHI ならびに XhoI で処理し、PS1 を HindIII-EcoRI フラグメント、PS2 を BamHI-XhoI フラグメントとして得た。得られたフラグメントを pBluescript SK+ (Stratagene) にサブクローニングした。自動シーケンサー (Li-COR) を用いて SequiTherm Long-read Cycle Sequencing Kit (エア・ブラウン) により全長の塩基配列を確認した。その結果、既報のヒト PS1 遺伝子と塩基配列上で 100% 一致するクローン S182 α 、PS2 遺伝子と塩基配列で 99.9%、アミノ酸配列では 99.8% 一致するクローン STM2 α を得た。

2-2-1-2 ヒト PS cDNA クローンへの家族性アルツハイマー病点突然変異の導入

2-2-1-1 により得られた S182 α 、STM2 α クローンをヘルパーファージ M13K07 (Amersham Pharmacia) を用いて一本鎖とし、下記のプライマーを用いて dU-template 法により家族性アルツハイマー病において確認されている PS 遺伝子塩基配列の点突然変異を導入した。

5'- ttg ttg tcg tta cta tcc tc -3' (S5F)...S182 α 5 <M146V>5'- atg gac tga gtg gct ca -3' (S6F)...S182 α 6 <A246E>5'- cga aag gtt cgc ttc gta tg -3' (S7F)...S182 α 7 <P267S>5'- ttt tcc agt tct cat tt -3' (S8F)...S182 α 8 <A285V>5'- cgt gct gat cac cct ca -3' (TM1)...STM2 α 1 <N141I>5'- gtg cgc tcg tgg ccc ta -3' (TM2)...STM2 α 3 <M239V>

得られたクローン S182 α 5、S182 α 6、S182 α 7、S182 α 8、STM2 α 1、STM2 α 3 の全長塩基配列を

自動シーケンサーにより確認し、塩基配列上の変異が導入されていることを確認した。

2-2-1-3 真核細胞生物用 PS 発現プラスミドの作製

pBluescript に挿入されているすべての cDNA を HindIII と EcoRI または BamHI と XhoI で切り出し、SV40 ori をもち、選択マーカーとして Neo 遺伝子を持つ真核細胞用発現ベクター、pcDNA3 (Invitrogen) に挿入した。PS2 の N141I 変異と M239V 変異を共に持つ二重変異体 STM2 α 2 については、これらの変異の間に BstXI サイトが存在していることを利用して、STM2 α 1 から BamHI と BstXI で、STM2 α 3 から BstXI と XhoI で切り出したフラグメントを精製し、pcDNA3 に挿入することで作製した。塩基配列上の変異については自動シーケンサーによって確認した。

2-2-1-4 大腸菌用 PS 発現プラスミドの作製

抗原に利用することを目的に、pBluescript に挿入されている PS2 の cDNA をテンプレートとして、PS2 の最 N 末端の 2 番から 84 番までが増幅されると同時に制限酵素認識配列が導入されるように、PCR のプライマーを次のように設計した。

5'- ccg gat ccc tca cat tca tgg cct ct -3' (PS2N-GST/F)

5'- tgc ggt cga cgt gct tcg ctc cgt a -3' (PS2N-GST/R)

Pfu (Stratagene) により T-3000 を用いて 94℃・5 分間熱変性後、94℃・45 秒間熱変性、50～52℃・45 秒間アニーリング、68～72℃・5 分間 DNA 合成を 30 回繰り返す、さらに 72℃・10 分間 DNA 合成を行い非特異的な増幅を除いて、246 bp の cDNA フラグメントを増幅させた。BamHI ならびに Sall で処理し、BamHI-Sall フラグメントとして得た。得られたフラグメントを pBluescript SK+ にサブクローニングした。自動シーケンサーを用いて Thermosequencing cycle sequencing kit (Amersham Pharmacia) により全長の塩基配列を確認した。この BamHI-Sall フラグメントを pGEX-6P-1 (Amersham Pharmacia) に挿入した。

2-2-2 大腸菌による GST 融合 PS2 蛋白の発現

2-2-1-4の方法によって得られたプラスミドをDH5 α に遺伝子導入し、その単クローンを50 mlのLB培地で一晚培養した。その培養液を250 mlのLB培地中でOD₆₀₀が0.6になるまで約6時間、培養した。その後最終濃度が0.1 mMになるようにIsopropyl β -D-Thiogalactopyranoside (IPTG)を加え、3時間培養して融合蛋白の発現を誘導した。得た菌体を1% TritonX-100存在下でソニケーションにより破碎し、遠心して得た上清にあらかじめPBS(10 mM phosphate、150 mM NaCl、pH 7.6)で飽和させた50% Glutathion sepharose(Amersham Pharmacia)を1 ml加えて4℃で一晩インキュベートした。遠心によってsepharoseを回収し、PBSで洗浄後0.5 mlのElution buffer(50 mM TrisHCl pH 9.6、5 mM Glutathion)を加えて氷冷下で10分間抽出した。遠心して上清を回収し、あと二回、同様に抽出作業を行った。この上清を融合蛋白画分とした。融合蛋白が精製されているかどうかについては、電気泳動後のCBB染色、抗GST またPS2抗体によるウェスタンブロットによって確認した。

2-2-3 COS細胞でのDEAE-dextran法による一過性発現

特にことわりがない限りは、COS-1細胞(東京都精神研 丸山 敬先生より供与)はリボヌクレオシド及びデオキシヌクレオシドを含まず、ペニシリン (GIBCO BRL) 50 unit / ml、ストレプトマイシン (GIBCO BRL) 50 μ g / ml、10%非働化ウシ胎児血清(JRH BIOSCIENCES)を含む高グルコースダルベッコ改変イーグル培地(日研生物医学研究所またはGIBCO BRL)中(以下DMEM)で培養した。 1×10^6 cells / 75 cm² フラスコの密度でまき、3日おきに継代した。

COS細胞における一過性発現については以下のように行った。まず、COS細胞を6 well プレートに 1×10^5 cells / well、又は10 cm シャーレに 5×10^6 cells / dishにまいた。次の日、まずDEAE-dextran 500 μ g / mlとプラスミドDNAを含むSTBS(10 mM Tris-HCl、0.9% NaCl、pH 7.6)溶液(DD-DNA-STBS溶液)を作製した。この溶液にはそれぞれ導入するプラスミドを5 μ g / 1 well(6 well プレート)又は10 μ g / 1 dish(10 cm シャーレ)となるように加えた。共発現の場合は両プラスミドを等量ずつ加えた。DMEM培地を除き、STBSで二回洗い、DD-DNA-STBS溶液を1 ml(6 well プレート)又は3 ml(10 cm シャーレ)加えた。30分培養後、DD-DNA-STBS溶液を除き、あらかじめ用意しておいたDMEM-Chloroquin(Chloroquin 50 μ g / mlを含むDMEM)を加え、3時間から4時間培養した。DMEM-Chloroquinを除きSTBSで二回洗った後、実験に用いる培地を加え培養を続けた。その後24~72時間後にサンプルを回収した。

2-2-4 PS2 遺伝子を恒常的に発現する N2a 細胞の作製

特にことわりがない限りは、Neuro2a (N2a) 細胞 (丸山先生より供与) は DMEM 中で培養した。5×10⁶ cells / 75 cm² フラスコまたは 1×10⁶ / 25 cm² フラスコの密度でまき、3~6 日おきに継代した。

プラスミドを Mammalian Transfection Kit (Stratagene) を用いてリン酸カルシウム法でトランスフェクトした。まず細胞を 2×10⁵ cells / cm² の密度で 10 cm シャーレにまいた。24 時間培養後、10 ml の DMEM に交換し、更に 1 時間培養した。ここにマニュアルに従って調製したプラスミド 10 µg を含むプラスミドーリン酸カルシウム溶液 1 ml を加えた。24 時間培養後、D-PBS (8 mM Na₂HPO₄、1.5 mM KH₂PO₄、2.7 mM KCl、150 mM NaCl、pH 7.6) で二回洗い、DMEM を加え、更に 48 時間から 72 時間培養した。その後細胞を GENETICIN (GIBCO BRL) 400 µg / ml を含む DMEM 培地中で選択培養を行った。増殖した細胞の一部をポリクローン細胞株として取得した。取得したポリクローン細胞株を限界希釈法によりクローニングし、モノクローン細胞株を取得した。トランスフェクトしたプラスミドを発現しているかどうかは抗 PS2 抗体を用いたウェスタンブロット解析により確認した。

2-2-5 抗体 (図表 7)

2-2-5-1 抗 PS 抗体

PS 遺伝子配列より予測されるアミノ酸配列を元に、以下のようなペプチドを KLH とコンジュゲートしたものを抗原としてウサギに免疫し、その抗血清を得た。用いた全ての抗原ペプチドは、東京都臨床研 (現 理化学研究所) 西道隆臣先生に合成していただいた。また、精製済み PS1N、PS1L、PSC1/2 については西道先生より供与していただいた。

PS1N: MTELPAPLSYFQNAQMSEDNHLC-[KLH] (1-22 of PS1)

PS1L: [KLH]-CVSKNSKYNAESTERESQDTVAENDDGCC-[KLH] (309-336 of PS1)

PS2L: [KLH]-CQLPYDPEMEEDSYDSFGEPSPYEV (316-339 of PS2)

PSC1/2: [KLH]-CFHQFYI (462-467 of PS1)

PS2C2: [KLH]-CSHQLYI (443-448 of PS2)

大腸菌に発現させたGST融合PS2N末端蛋白を同様にウサギに免疫して、抗血清を得た。

anti-G2N2: [GST]-(2-84 of PS2)

以下の抗体については、供与していただいた。

2972 (Dr. Haassより供与) : GST融合PS2N末 (1-87) 蛋白

α PS2loop (Dr. Thinakaranより供与) : GST融合PS2ループ (269-394) 蛋白

anti-PS2N (井原先生より供与) : 6×His融合PS2 N末 (1-81) 蛋白

anti-PS2C (井原先生より供与) : PS2ペプチド (327-336)

2-2-5-2 抗ペプチド PS 抗体の affinity-purification

Affigel 10 (Bio Rad) もしくはAffigel 15を用いてペプチドをカップリングさせ、ペプチドカラムを作製した。ペプチドのpIが中性もしくは塩基性の場合Affigel 10を使用し、酸性の場合にはAffigel 15を使用した。まずAffigelを氷冷したDWで洗浄し、100 mM HEPESバッファー (pH 7.5) に溶かしたペプチド溶液に入れ、一晩反応させた。その後HEPESバッファー、DW、30%酢酸、DW、20%エタノール、DW、PBSの順で洗浄し、カラムに詰めた。抗血清はまず非働化処理 (56℃、10分間) し、10 ml PBSを加え、5.0 μmフィルターに通した。この抗血清をカラムに三回通し、十分な量のPBSで洗浄後、5.5 mlの50 mM クエン酸バッファー (pH 3.0) で抗体を溶出した。溶出した抗体は直ちに0.5 mlの1 M Trisで中和し、20%グリセロールの入ったPBSに対して透析した。

2-2-5-3 抗 GST 融合 PS 蛋白抗体の affinity-purification

Affigel 10またはCNBr-activated Sepharose 4B (Amersham Pharmacia) を用いて、GST蛋白もしくはGST融合PS蛋白をカップリングしたカラムを作製した。Affigel 10の場合は2-2-5-2と同様に作製した。CNBr-activated sepharoseの場合は、まずSepharoseを1 mM HClで数回洗浄し膨潤させ、5 mgから10 mg

の融合蛋白を含むカップリングバッファー (0.1 M NaHCO₃, 0.5 M NaCl pH 8.3) と一晩、4℃で混和した。遠心してSepharoseを回収後、ブロッキングバッファー (0.1 M Tris-HCl pH 8.0) を加えて一晩、4℃で混和した。遠心して回収したSepharoseをカップリングバッファー、0.1 M酢酸 pH 4.0、カップリングバッファーの順で洗浄し、カラムに詰め、PBSで洗浄してGST蛋白・GST融合PS蛋白カラムとした。2-2-5-2の方法に従って非動化处理・フィルターを通した抗血清をGST蛋白カラムに三通し抗GST抗体を吸着させ、そのflow throughを回収した。その画分をGST融合PS蛋白カラムに三通し、同様に溶出・透析を行った

2-2-5-4 抗 βAPP、Aβ 抗体 (図表 8)

ウェスタンブロット、sandwich ELISAに用いた抗体の抗原については、以下の通りである。

C4 (東大医学部 井原康夫先生より供与) : 666-695 of βAPP₆₉₅

22C11 (Roche Diagnosticsより購入) : 60-100 of βAPP₆₉₅

BNT77 (武田薬品工業より供与) : Aβ11-28

BA27 (武田薬品工業より供与) : Aβ1-40

BC05 (武田薬品工業より供与) : Aβ35-43

BAN50 (武田薬品工業より供与) : Aβ1-16

2-2-5-5 その他

anti-grp78 (StressGenより購入) : grp78 (BiP) のC末端

2-2-6 PS 発現細胞の免疫細胞化学

あらかじめ poly-L-lysine コート (10 μg / ml) したカバーグラスを 10 cm シャーレ上に並べ、そのうえに細胞をまき、培養、遺伝子導入 24 時間後、カバーグラスを回収した。カバーグラスを PBS で二回洗浄後、4% パラホルムアルデヒド (TAAB) -PBS 溶液で室温、30 分固定した。更に細胞を PBS で二回洗浄後、PBS-TB (0.5% TritonX-100、0.3% BSA を含んだ PBS) 溶液で室温、30 分間、permeabilization と blocking

を行った。PBS-TB 溶液に適切な抗体を加えた溶液を細胞に加え、室温で 2 時間又は 4℃で一晩、インキュベートした。PBS で 3 回洗浄後、更に PBS-TB 溶液に二次抗体 (FITC (又は Texas red) conjugated anti-rabbit antibody または FITC (又は Texas red) conjugated anti-mouse antibody、Jackson ImmunoResearch) を含有する溶液を細胞に加え、室温で 1 時間インキュベートした。PBS で三回洗浄後、Parmafluor (Immunon) を用いてマウントし、蛍光顕微鏡もしくはコンフォーカル顕微鏡 (Fluoview、オリンパス) で観察した。

2-2-7 PS 発現細胞のウェスタンブロット解析

2-2-7-1 COS 細胞からの全蛋白抽出

遺伝子導入を行った細胞を 24~48 時間培養し、D-PBS で洗ってスクレイパーによってかきとった。微量遠心機で 7000 rpm、5 min 遠心して細胞を沈殿させ、200 µl の TS 中によく懸濁し、200 µl の 2×SB (4% SDS、0.16 M Tris-HCl、30% Glycerol pH 6.8) によって細胞を溶解した。4℃下で軽くソニケーションを行った後、BCA protein assay kit (Pierce) により蛋白量を定量した。

2-2-7-2 N2a 細胞からの蛋白抽出

全ホモジネートの場合は、コンフルエントに達した細胞を用いて 2-2-7-1 の方法に従って抽出した。膜画分の回収については、以下の通り行った。コンフルエントに達した細胞を D-PBS で洗い、スクレイパーでかき取った。細胞を沈殿させ、500 µl の TSI (0.5 mM diisopropylfluorophosphate、0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride、1 µg / ml antipain、0.1 µg / ml leupeptin、1 µg / ml pepstatin、1 µg / ml N α-p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone、1 mM EDTA を含む TS) 中でソニケーションにより破碎し、100,000 ×g、4℃で 1 時間遠心した。沈殿に 500 µl の TSXI (1% TritonX-100 を含む TSI) を加え、ソニケーションにより沈殿をよく懸濁し、4℃で 30 分間、インキュベートした。100,000 ×g、4℃で 1 時間遠心し、その上清を膜画分として回収し、蛋白定量を行った。ウェスタンブロット解析を行う前に、サンプルと等量の 2×SB を加えた。

2-2-7-3 ウェスタンブロット解析

上記のように用意した細胞抽出液に最終濃度 1%になるように 2-mercaptoethanol を加えた。各レーンで同じ蛋白量が含まれるように調製し、特に表記がない限り熱処理を加えずに SDS-PAGE により蛋白を分離した。マーカー蛋白として Prestained SDS-PAGE standards, Broad range (Bio-Rad) または Prestained protein molecular weight standards (GIBCO BRL) も同時に電気泳動した。分離した蛋白を 150 mA・3 時間または 50 mA・15 時間の条件で PVDF membrane (Millipore) に転写した。転写したメンブレンを 5% skim milk / TS-T (0.1% Tween20 を含む TS) によって室温で 30 分、ブロッキングし、2.5% skim milk / TS-T を用いて適切な濃度に希釈した各種抗体と室温で 2~4 時間、又は 4℃で一晩反応させた。TS-T で 10 分間洗浄を 3 回繰り返し、2.5% skim milk / TS-T で 500~1000 倍希釈した二次抗体 (anti-rabbit Ig, horseradish peroxidase linked whole antibody、または anti-mouse Ig, horseradish peroxidase linked whole antibody (Amersham Pharmacia)) と室温で 1~2 時間、反応させた。TS-T で 10 分間、3 回洗浄した後、ECL kit (Amersham Pharmacia) を用いて Hyperfilm-ECL (Amersham Pharmacia) 上に感光させた。感光時間は 30 秒から 30 分の間で適切な時間を選んで行った。

2-2-8 Aβ C 末端断端特異的 sandwich ELISA による Aβ の測定

モノクローナル抗体 BAN50、BNT77、BA27、BC05 は武田薬品工業の鈴木らによって樹立された抗体である (Suzuki et al., 1994)。BAN50 はヒト Aβ の 1 番から 5 番を、BNT77 は Aβ の中間部分である 11 番から 16 番付近を認識する (Fukumoto et al., 1999)。これを一次抗体として用い、培地中に分泌された Aβ を 96 ウェルプレート中でキャプチャーする。BA27、BC05 はそれぞれ Aβ の C 末端 40 番、及び 42 又は 43 番のアミノ酸を断端特異的に認識する抗体である (Suzuki et al., 1994a)。これらを horse radish peroxidase (Roche Diagnostics) により直接標識した検出抗体を用いることにより、培地中の Aβ の C 末端を見分けて定量することが可能である。

2-2-8-1 ELISA プレーットの作製

96 ウェルプレート (Greiner) に 5~10 µg / ml の抗体を含む Coating buffer (0.1 M sodium bicarbonate, pH 9.6) を 100 µl / well ずつ入れ、4℃で一晩、静置した。D-PBS で 2 回洗浄し、ブロック液 (25% Block

Ace（雪印乳業）、0.05% NaN₃ を含む PBS）200 μ l / well を加え、4℃で一晩インキュベートし、使用するまで 4℃で保存した。

2-2-8-2 試料のサンプリング

COS 細胞については、6 well プレート中で遺伝子導入した細胞を 1 ml の DMEM 培地で 48~60 時間培養し、培地を回収した。N2a 細胞については、それぞれの細胞を 24 well プレートに 1×10^5 cells / well の密度でまき、3 日後にほぼコンフルエントに達したところで細胞を洗い、新しい DMEM 培地を 500 μ l 加え、24 時間培養し、培地を回収した。

2-2-8-3 ELISA 反応

化学的に合成された A β 1-40 又は A β 1-42 (Bachem) をそれぞれ 5 nM の濃度に buffer EC (400 mM NaCl、2 mM EDTA、10% Block Ace、0.2% BSA、0.05% NaN₃、0.075% CHAPS を含む 20 mM phosphate buffer pH 7.0) で希釈し、使用するまで -80℃で保存した。このペプチドを buffer EC で 3 pM より 800 pM の範囲で希釈し、ELISA のスタンダードとした。予め用意しておいた ELISA プレートを 3 回 D-PBS で洗浄し、使用する全てのウェルに 50 μ l の buffer EC を入れ、スタンダード又はサンプルを 50 μ l ずつ加えて 4℃で一晩、インキュベートした。D-PBS で 5 回洗浄し、buffer C (400 mM NaCl、2 mM EDTA、10% Block Ace、0.2% BSA、0.01% Thimerosal を含む 20 mM phosphate buffer pH 7.0) で適切な濃度に希釈した二次抗体を各ウェルに 75 μ l 加え、室温で 3 時間、又は 4℃で一晩インキュベートした。D-PBS で 5 回洗浄した後、TMB microwell peroxidase substrate system (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc.) によって発色し、1 M リン酸で反応を停止させた。その HRP 活性を 450 nm の吸光度として SPECTRA MAX 250 (Molecular Devices) を用いて定量した。

2-3 結果

2-3-1 PS 蛋白の代謝

FAD 原因遺伝子として新たにクローニングされた PS1、PS2 はそれぞれ 467 アミノ酸、448 アミノ酸の蛋白をコードしていると考えられた。配列上、最 N・C 末端と中央部のループ部分は比較的親水性が高いことから、これらの部位に対する抗体を作製し、各 cDNA を COS 細胞に一過性に発現させて蛋白としての性質を検討した（図表 7）。

まず免疫細胞化学を行うと、PS1、PS2 とともに細胞体全体に、核膜・ゴルジ体を含んだメッシュワーク上の局在様式をみせた（図表 9）。その局在は小胞体（ER）に局在することが知られている BiP と一致したことから、PS 蛋白は主に ER に存在すると考えられた。すべての抗体で同様のパターンが観察され、FAD 変異の有無によって大きく変化することはなかった。

次にウェスタンブロット解析を行った。PS1 を発現させると約 45 kDa の全長蛋白が確認された（図表 10）。さらに遺伝子導入を行っていない細胞でも低分子量側にバンドが観察され、これらのバンドは遺伝子導入に伴ってわずかに増加した。すでに報告されていた PS1 のプロセッシングと考えあわせ、PS1 の N 末側の抗体で観察された約 30 kDa のバンドは、内因性の PS1 の N 末端フラグメント（NTF）であり、C 末側の抗体で観察された約 20 kDa のバンドは内因性の C 末端フラグメント（CTF）であると考えられた（Mercken et al., 1996; Thinakaran et al., 1996）。PS1 遺伝子上の FAD 変異はこれらの泳動パターンに大きな影響を与えなかった。

PS2 では COS 細胞を用いた場合、PS1 で見られるような明らかに内因性 PS2 に対応するバンドは観察されなかった。PS2 を発現させると約 55~60 kDa の全長蛋白に加えて低分子量側に二種類のバンドが観察された（図表 11）。PS2 が PS1 と同様にプロセッシングを受けていると考え、さらに複数の PS2 特異的な抗体を用いて検討した。まず抗原部位が N 末側にある抗体では、全長バンドの量に比例して増加する 35~40 kDa のダブルットのバンドが観察された。このバンドはループ部分の抗体のうち PS2L にも反応した。PS2L ではしばしば 23 kDa のバンドも観察されたが、このバンドは一定量以上に増加しなかった。PS2L のループ部分の抗体や C 末端側に対する抗体では 19 kDa のバンドが主に観察された。これらの抗体でもしばしば 23 kDa のバンドが観察されたが、やはり一定量以上の増加は見られなかった。プロセッシングパターンは FAD 変異によって大きく変化することはなかった。以上の結果より COS 細胞に一過性に強制発現させた PS2 は主にループ部分でプロセッシングを受け、35~40 kDa の NTF と 19 kDa の CTF を形成すると考えられた。このプロセッシング部位は PS2L と anti-PS2loop・anti-G2L の抗原部位の間にあると考えられた。

次にマウスの神経芽細胞種由来の細胞である Neuro2a (N2a) 細胞に恒常的に PS2 を発現させ、その代謝を検討した (図表 12)。N2a 細胞では PS2L に反応する内因性の 23 kDa バンドが観察された。遺伝子導入を行うと COS 細胞と同様に全長バンドが観察され、N 末側の抗体で 35 kDa のバンドが検出された。それに対してすべてのループ部分や C 末側の抗体では、COS 細胞で見られた 19 kDa のバンドは観察されず、23 kDa のバンドが増加した。複数のクローンを取得して検討した結果、このバンドの増加は全長分子の発現量に比例せず、ほぼすべてのクローンで一定であった。

次に PS2 遺伝子上の FAD 変異として報告されている N141I、M239V 変異、さらにこれらの遺伝子変異を同時にあわせもつ二重変異体 PS2 をコードする cDNA を作成した。これらを COS 細胞に一過性に、N2a 細胞には恒常的に発現させ、ウェスタンブロット解析した (図表 13)。COS 細胞、N2a 細胞とも FAD 変異によってそのパターンが大きく変化することはなかった。以上の結果から、Neuro2a 細胞で恒常的に発現した PS2 は主に PS2L の抗原部位よりも N 末側でプロセッシングを受け、35 kDa の NTF と 23 kDa の CTF になっていると考えられた。

2-3-2 PS 蛋白上の FAD 変異が Aβ 分泌に及ぼす影響

PS1 や PS2 の FAD 変異が βAPP からの Aβ 産生にどのような影響を与えるかについて検討するために、培養細胞に PS を強制発現させ、培養上清中に分泌されてくる Aβ の量を Aβ40、Aβ42 にわけて測定した。まず PS1 とその FAD 変異が Aβ 産生に及ぼす影響について検討した (図表 14)。PS1、βAPP のプラスミドを共に 5 μg 用いて遺伝子導入を行うと、共発現効率は 67% であった。Aβ の分泌量には試行ごとに若干ばらつきがみられたが、これは一過性の共発現系であるためであると思われる。そこで分泌される全 Aβ (Aβ40+Aβ42) のうち、Aβ42 の占める割合 (Aβ42 の比率、%Aβ42) を用いて比較した。この値はほぼどのような細胞でも 10~20% であること、また FAD 変異型 βAPP では特異的に上昇することが知られている (Suzuki et al., 1994; Asami-Odaka et al., 1995)。野生型 PS1 を導入した場合は、分泌される Aβ42 の比率は遺伝子導入していない場合とほぼ同じであった (19.1%)。しかし FAD 変異を持つ PS1 と共発現させると Aβ42 の比率は 23.9~32.8% となり、PS1 の FAD 変異によって Aβ42 の産生が特異的に上昇していることが分かった。

次に同様の手法を用いて PS2 の FAD 変異が Aβ 産生に及ぼす影響について検討した (図表 15)。野生

型βAPPに加えて、βAPPNLと、C100と共発現も行った。二重免疫染色法で共発現効率を検討すると、80%以上であった。PS2とのβAPPの共発現により発現量・総Aβ分泌量が低下したが、これはPS2の発現効率が高いためと思われた。このとき野生型PS2の共発現によって、分泌されるAβ42の比率が変化することはなかった。しかしFAD変異のN141I変異を持つPS2との共発現によってAβ42の産生が特異的に上昇した。この影響はすべての種類のβAPPコンストラクトで観察された。さらに別のFAD変異であるM239V変異と、さらにこの二種類の変異を同時に持つ二重変異体を用いて検討した(図表16)。C100と野生型PS2を共発現させたときのAβ42の比率が13.8%であったのに対し、M239V変異によって23.5%と増加した。二重変異体では31.4%と増加が見られたが、これはN141I変異の場合とほぼ同じ値であった(31.8%)。

次にPS2を恒常的に発現させたN2a細胞から分泌されるAβを検討した(図表17)。BNT77を用いることにより、内因性マウスβAPP由来のAβを検出することが可能である(Asami-Odaka et al., 1995)。それぞれの細胞や、試行ごとに若干分泌量に違いが存在するため、Aβ42の比率を検討することにした。遺伝子導入を行っていない細胞、pcDNA3もしくは野生型PS2を導入した細胞からはAβ42の比率は約10.2%、11.5%、13.8%と大きな変化は見られなかった。しかしN141I変異型PS2を持つNeuro2a細胞から分泌されるAβ42の比率は52.0%と、野生型の約3.8倍に増加していた。またM239V変異型PS2を発現させたNeuro2a細胞から分泌されるAβ42も野生型(17.0%)に比べて58.3%と約3.4倍に増加していた(図表18)。さらに二重変異体においても59.3%と増加が観察されたが、N141IもしくはM239V変異のみの値と大きな変化は見られなかった。

以上の結果から、PS2上のFADに連鎖する点突然変異によってAβ42の産生が特異的に上昇することが分かった。

2-4 小括

アルツハイマー病の原因遺伝子として新たにクローニングされたプレセニリン遺伝子は分子量約50 kDaの蛋白をコードしていた。細胞に発現させるとプロセッシングを受け、NTFとCTFを形成した。その切断様式はCOS細胞における一過性発現とNeuro2a細胞における恒常的発現では異なっていた。しかし

プロセッシングは FAD 変異によって影響を受けなかった。PS の発現は A β の総産生量に大きな影響を与えなかったが、FAD 変異を持つ PS によって A β 42 の産生が特異的に上昇した。

第 2 章の結果の一部は以下の論文に発表した。

Tomita T, Maruyama K, Saido TC, Kume H, Shinozaki K, Tokuhira S, Capell A, Walter J, Grunberg J, Haass C, Iwatsubo T, Obata K: The presenilin 2 mutation (N141I) linked to familial Alzheimer disease (Volga German families) increases the secretion of amyloid β protein ending at the 42nd (or 43rd) residue. Proc Natl Acad Sci USA 94:2025-2030,1997

第3章 プレセニリン蛋白の代謝とAβ産生

3-1 目的

培養細胞に発現させた PS2 は PS1 と同様にプロセッシングを受けて NTF と CTF に分かれて存在していたが、PS1 と異なり内因性に多量のフラグメントは存在していなかった。また細胞種もしくは発現方法によって切断様式が異なっている可能性が示された。PS2 の機能とフラグメント化の間にどのような関係があるかを明らかにする目的で、1) 内因性 PS2 の発現様式、2) 二種類のプロセッシングの違いを検討し、さらに3) 人工的なフラグメント型 PS2 を培養細胞に発現させてその代謝と Aβ 産生に与える影響についても調べた。

3-2 方法

特記しない場合、2-2 に示した方法に従って行った。

3-2-1 ヒト PS 発現ベクターの作製

3-2-1-1 動物細胞用各種フラグメント型 PS 発現ベクターの作製

人工的にフラグメント型 PS2 を発現させるために、以下のようなプライマーを設計した。NTF 型ではフォワードプライマーとして SM3 を、CTF 型ではリバースプライマーとして SM4 を用いた。

[NTF 型] xxxstop では xxx 残基の次のコドンが終止コドンになるように設計した。

5'- cat tct ctc gag cta ttt ggg aca cag -3' (PS2TM6stxrc)...PS2/270stop

5'- agc tcg agc tag cca acc gtc cac ac -3' (PS2-303stop)...PS2/303stop

5'- ggc tcg agc tac gtg gta ttc cag tc -3' (PS2loopstop)...PS2/388stop

[CTF 型] xxxctf では xxx 残基に ATG コドンを、さらに直前に kozak 配列を挿入した。

5'- ccg gat cca cca tgg ggc ctc tga ga -3' (PS2floop/bamhi)...PS2/270ctf

5'- ccg gat cca cca tgg cga agc tgg ac -3' (PS2f304/bamhi)...PS2/304ctf

5'- ccg gat cca cca tga ctg gct acc ca -3' (PS2falg3/bamhi)...PS2/344ctf

pcDNA3 に挿入されている PS2 の cDNA をテンプレートとして、2-2-1-4 の方法に従ってそれぞれの cDNA フラグメントを増幅し、BamHI 並びに XhoI で処理して BamHI-XhoI フラグメントとして得た。このフラグメントを pcDNA3 に挿入し、塩基配列を自動シーケンサーで確認した。CTF 型のフラグメントについては pcDNA3 とほとんど同じ性質を持ち、選択マーカーとして hygromycin 耐性遺伝子を持つ真核細胞用発現ベクター、pcDNA3.1hygro (Invitrogen) にも挿入した。

3-2-1-2 大腸菌用 PS 発現プラスミドの作製

2-2-1-4 の方法に従って以下のようなプライマーを作製し、PS2 のループ部分の 301 番から 361 番までが GST に融合した蛋白を発現するベクターを作製した。また融合蛋白の発現・抽出は 2-2-2 に従って行った。

5'- ccg gat cca cgg ttg gca tgg cga ag -3' (PS2L-GST/F)

5'- cgg tcg acc ttc acg ccc ctt tcc tc -3' (PS2L-GST/R)

3-2-2 ラット初代細胞の培養

3-2-2-1 ラット初代神経細胞の培養

胎生 18 日齢のウィスター系ラットを妊娠ラットより摘出し、その大脳皮質を実体顕微鏡下で解剖して取り出した。0.01% DNase・0.125% trypsin 処理を 37℃、15 分間行って細胞を分散させた。10% FBS として反応を止め、フィルターを通して細胞分散液とした。2.5×10⁵ cells/ cm² の密度で 10 cm シャーレにまき、DMEM 中で一日培養後、DMEM-N2 (bovine insulin 5 µg / ml、human transferrin 100 µg / ml、

putorescine 100 μ M、sodium selenite 30 nM を含み、FBS を含まない DMEM) 中で 10 日間、培養した。

3-2-2-2 ラット初代アストロサイトの培養

3-2-2-1 の方法に従って生後 1 日齢のウィスター系ラットより大脳皮質を摘出し、細胞分散液を作製した。その後 DMEM 中で培養を続け、2、3 回継代する事で神経細胞・オリゴデンドロサイトを除いた。

3-2-2-3 ラット初代繊維芽細胞の培養

3-2-2-1 の方法に従って胎生 18 日齢のウィスター系ラットを摘出して頭皮を取り、0.01% DNase、0.125% trypsin、100 μ g / ml collagenase 処理を 37°C、15 分間行って細胞を分散させた。その後 DMEM 中で培養を行った。

3-2-3 PS2 遺伝子を恒常的に発現する N2a、HEK293 細胞

特にことわりがない限りは、human embryonic kidney 293 (HEK293)、PC12 細胞 (丸山先生より供与) は N2a 細胞と同様に培養した。

プラスミドを LipofectAMINE (GIBCO BRL) を用いてリポフェクション法でトランスフェクトした。まず細胞を 4×10^5 cells / well で 6 well プレートにまき、一晚培養した。導入するプラスミド 1 μ g を含む Opti-MEM (GIBCO BRL) 100 μ l に、LipofectAMINE を 10 μ l 含む Opti-MEM と混合した。室温で 30 分間インキュベートして脂質と DNA の複合体を作製し、さらに 800 μ l の Opti-MEM を加えた。一度 Opti-MEM で洗浄した細胞に脂質-DNA 複合体を含む Opti-MEM を加えた。6 時間培養後、20%FBS を含む DMEM を等量加え、更に 24 時間培養した。一過性発現の場合は、ここでサンプルを回収した。恒常的発現細胞株を取得する場合は、trypsin 処理によって細胞を分散し、そのうち半分を 10 cm シャーレにまいた。その後細胞を GENETICIN (GIBCO BRL) 500 μ g / ml を含む DMEM 中で選択培養を行った。増殖した細胞の一部をポリクローン細胞株として取得した。取得したポリクローン細胞株を限界希釈法によりクローニングし、モノクローン細胞株を取得した。トランスフェクトしたプラスミドを発現しているかどうかは PS2 抗体を用いたウェスタンブロット解析により確認した。

3-2-4 抗体

大腸菌に発現させたGST融合PS2ループ蛋白を2-2-5-2に従ってウサギに免疫して、抗血清を得た。

anti-G2L: [GST]-(301-361 of PS2)

3-2-5 各種細胞・臓器からのPS蛋白の抽出

3-2-5-1 細胞からの段階的蛋白抽出

10 cm シャーレにまいた細胞をTSで洗い、スクレイパーでかき取った。ペレットに1.3 mlのTSIを加えてよく懸濁し、うち300 µl分を全ホモジネートサンプルとして回収した。残った1 ml分の細胞を遠心して回収し、400 µlのTSIを加えてホモジェナイザーで破碎した。得たホモジネートを352,000×g、4℃で20分間遠心し、上清をTSIsupとして回収した。沈査に等量のTSXIを加え、ソニケーションにより懸濁・破碎後、4℃、30分間インキュベートして可溶化した。得たサンプルを352,000×g、4℃で20分間遠心し、上清をTSXIsupとして回収した。沈査は等量のTSXIを加え、ソニケーションによって懸濁してTSXIpelとして回収した。

3-2-5-2 臓器からの段階的蛋白抽出

8週齢のウィスター系ラットを解剖し、各種臓器を適当な大きさに摘出してその重量を測定した。その重量の3倍量のTSIを加えて3-2-5-1の方法に従ってフラクション化を行った。

3-2-6 培養細胞のアポトーシス誘導並びにcaspase阻害剤処理

[COS細胞]

細胞ライゼートを回収する場合は10 cm シャーレ上でPS2を、Aβの定量は6 well プレート上でPS2とC100を一過性に遺伝子導入し、50 µMのYVAD-CHO (caspase 1 特異阻害剤、ペプチド研) もしくはDEVVD-CHO (caspase 3 特異阻害剤、ペプチド研) 存在下で48時間培養した後にサンプルを回収した。

[N2a 細胞]

アポトーシスの誘導は FBS を含まない DMEM に 1 μ M の staurosporine を加えた培地 (DMEM-STS) を用いた。蛋白回収の場合は 10 cm シャーレにまき、コンフルエントに達した細胞を一度 D-PBS で洗浄した後に DMEM-STS に置換してアポトーシスを誘導後、各時間ごとに細胞全ライゼートを 2-2-7-1 の方法に従って回収・抽出した。caspase 阻害剤処理の場合は同時に DEVD-CHO を加えた状態でアポトーシス誘導・サンプル回収を行った。

3-2-7 培養細胞の cycloheximide (CHX) 処理

6 well プレートに N2a 細胞をまき、コンフルエントに達するまで培養した。その後一回 D-PBS で洗浄した後に FBS と 30 μ g/ml の cycloheximide を含んだ DMEM 培地 (DMEM-CHX) を加え、新規蛋白合成を阻害した。その後各時間ごとに細胞全ライゼートを 2-2-7-1 の方法に従って回収・抽出した。

3-3 結果

3-3-1 各種培養細胞における PS2 のプロセッシングパターン

培養細胞に過剰発現させた PS2 はその一部がフラグメント化を受けて存在していることが明らかとなった。そのパターンが COS と N2 細胞で異なっていたので、様々な細胞の PS2 のプロセッシングパターンを検討した。

内因性 PS1 のほとんどがフラグメントとして存在していることが報告されていたが、PS2 については報告されていなかった (Thinakaran et al., 1996)。しかしこれまで検討したすべての細胞では内因性 PS2 の全長バンドは見られなかったことから、PS2 も細胞内ではフラグメントの形で存在していると考えられた。そこで COS、N2a 細胞に加えて HEK293、PC12 細胞を用いて内因性 PS2 のフラグメントパターンを検討した (図表 19)。PC12 細胞以外の細胞では NTF に相当するバンドはほとんど検出されなかった。23 kDa CTF は PC12 細胞のほかに N2a 細胞でも観察された。COS、HEK293 細胞では内因性の NTF・

CTFはほとんど観察されなかった。さらにCOS-1細胞と同じ繊維芽細胞由来のhuman embryonic kidney 293 (HEK293)細胞を用いてPS2を恒常的に発現する細胞を取得し、ウェスタンブロット解析を行った。その結果HEK293細胞においても恒常的に発現させたPS2は35 kDa NTFと23 kDa CTFであり、基本的な切断様式はN2a細胞に近いことがわかった。しかし発現の非常に高いクローンではCOS細胞で見られるような19 kDa CTFが見られることもあった。またこの19 kDa CTFは発現量の多いN2a細胞のモノクローン株でもしばしば観察された。

次にラット初代培養神経細胞・アストロサイト・繊維芽細胞から蛋白を抽出して内因性PS2の発現を検討した。まず神経細胞を用いて分化と発現量について検討した結果、日数を経て分化が進むにつれてフラグメントの発現量が増加する傾向が観察されたが、10日間培養してもその発現量は非常にわずかであった。その時点でもアストロサイトと繊維芽細胞の内因性PS2フラグメントの発現量の方が多かった。しかしいずれの細胞でも全長PS2蛋白や19 kDa CTFは観察されなかった。

そこでCOS細胞にPS2を一過性に発現させたときのタイムコースを追ひ、発現量の増加に伴うプロセッシングパターンの変化を検討した(図表20)。遺伝子導入後16時間では全長バンドが見えるだけであったが、24時間後では全長バンドに加えて35 kDa NTFと23 kDa CTFのわずかな増加が観察された。48時間後にはこれまで見られていたような40 kDa NTFと19 kDa CTFが大量に生成していた。以上の結果からPS2を過剰に発現させたときにはまず35 kDa NTFと23 kDa CTFを一定量生成する経路が働き、その後発現量の増加に従って40 kDa NTFと19 kDa CTFが生成すると考えられた。

以上の結果から、培養細胞においてほとんどの内因性のPS2は新規合成後、35 kDa NTFと23 kDa CTFを生成するプロセッシング(standard cleavage)によってプロセッシングを受けており、全長蛋白の状態では存在していないと考えられた。

3-3-2 2種類のプロセッシング

KimらもPS2を培養細胞(H4 glioma)に過剰発現したときに、standard cleavageによって生じるフラグメント(25 kDa)よりも小さい約20 kDaのCTFが現れることを見いだしていた。このCTFはアポトーシスの誘導によって生成し、caspase 3阻害剤によってそのプロセッシングが阻害され、さらにPS2上のcaspase 3認識配列(D₃₂₆SYD₃₂₉)に点突然変異を導入することによっても阻害された。以上の結果から、

彼らはPS2がcaspase 3による alternative cleavage によっても切断されると報告した(Kim et al., 1997a)。

そこで恒常的にPS2を発現しているN2a細胞にアポトーシスを誘導してcaspase 3を活性化し、19 kDa CTFが生成されるかどうかについて検討した(図表21)。アポトーシス誘導剤としてはミトコンドリア経路によるアポトーシスを速やかに誘導することが知られている staurosporine (STS) を使用した。STS 処理後タイムコースを追って蛋白を回収し、ウェスタンブロット解析を行った。内因性の23 kDa CTFはSTS処理後8時間ではほぼ消失したが、19 kDa CTFの生成はその後16時間後でも確認されなかった。一方PS2を恒常的に発現させたN2a細胞では、まず全長蛋白がSTS処理後4時間でほとんど消失し、その後時間経過と共に23 kDa CTFも減少した。STS処理後8時間で19 kDa CTFが観察され、このフラグメント生成はDEVD-CHO処理によって阻害された。これらのことからN2a細胞においてもSTSによるアポトーシス誘導によってcaspase 3が活性化され、19 kDa CTFが生成すると考えられた。またFAD変異の有無はこのプロセッシングに大きな影響を与えなかった(図表22)。

バンドの大きさとプロセッシングパターンから、本研究においてCOS細胞の一過性発現で見出された19 kDa CTFは alternative cleavage によるCTFであると考えられた。caspaseはアポトーシス誘導時に特異的に活性化される10数種類のシステインプロテアーゼファミリーであり、基質の認識は配列特異的であることが知られている(Budihardjo et al., 1999)。そこでCOS細胞にPS2を一過性に発現させて、その基質特異性を利用した阻害剤であるcaspase 1特異的阻害剤(YVAD-CHO)やcaspase 3特異的阻害剤(DEVD-CHO)存在下で培養し、ウェスタンブロット解析を行った。その結果DEVD-CHO存在下で特異的に19 kDa CTFの生成が阻害された。同時にN2a細胞もDEVD-CHO存在下でSTS処理を行い、ウェスタンブロット解析を行った。この場合もDEVD-CHO処理によって19 kDa CTFの生成が阻害された。このことから19 kDa CTFはcaspase 3によって切断されたフラグメントであり、PS2のCOS細胞における一過性発現時のプロセッシングにも alternative cleavage が起こっていることが予測された。

以上の結果から、19 kDa CTFはcaspase 3によるプロセッシング産物であり、アポトーシスの誘導によって alternative cleavage が起こることがわかった。さらにCOS細胞の結果より、PS2の過剰発現によって何らかの機構によってcaspase 3の活性化が起こっている可能性が示された。

3-3-3 内因性PS2蛋白のプロセッシングパターン

このように PS2 は、standard cleavage により 35 kDa NTF-23 kDa CTF になるプロセッシングと、caspase 3 (alternative cleavage) によって 40 kDa NTF-19 kDa CTF になる 2 種類のプロセッシングを受けることがわかった。そこで次に *in vivo* で PS2 がどのようなプロセッシングを受けているかについて、ラット臓器を用いて検討した。ラット臓器の全ライゼートからは十分な内因性 PS2 フラグメントの発現を確認できなかったため、界面活性剤を用いて段階的な抽出を行い、内因性 PS2 のプロセッシングを検討することにした。

まず培養細胞を用いて各種フラグメントの可溶性を検討した (図表 24)。PS2 を一過性に発現させた COS 細胞と、恒常的に発現している N2a 細胞を界面活性剤を含まないバッファー (TSI) 中で破碎し、遠心後上清を回収し、主に細胞質が含まれる TSI_{sup} 画分とした。沈殿した核・ミトコンドリアを含む膜画分を 1% TritonX-100 によって可溶化し、遠心後上清を TSX_I_{sup} 画分、沈殿を TSX_I_{pel} 画分とした。これらの画分を用いてウェスタンブロット解析を行った結果、内因性の 23 kDa CTF は TSX_I 画分に見られ、TritonX-100 により可溶化されることがわかった。また発現させた PS2 の全長蛋白、NTF、CTF も基本的には TritonX-100 で可溶化されることがわかった。しかし COS 細胞の一過性発現のように強い過剰発現を行った場合は大部分の PS2 蛋白は可溶化されず、TSX_I_{pel} 画分に確認された。このような現象は多回膜蛋白ではしばしば見いだされることが報告されており、過剰発現による artifact であると考えられた。

次にラット臓器を用いて検討した (図表 25)。この場合も内因性フラグメントは TSX_I_{sup} 画分にのみ見いだされ、TSI_{sup} 画分や TSX_I_{pel} 画分には見いだされなかった。そこで各臓器で TSX_I_{sup} 画分を用いて複数の抗体で PS2 の発現パターンを検討した。その結果、内因性 PS2 は 35 kDa NTF と 23 kDa CTF として存在しており、全長蛋白や alternative cleavage 産物は確認できなかった。また腎臓を除くほぼすべての臓器で発現しており、その発現パターンはすでに報告されていた Northern blot の結果と合致していた (Rogaev et al., 1995)。NTF と CTF はほぼ同様の発現パターンを示し、臓器間での発現量に大きな違いは見いだされなかったが、心臓・肝臓・精巣において若干発現量が高かった。同時に同じ画分を用いて内因性 PS1 NTF の発現を検討した。既報と同じように肺・脾臓・精巣で高い発現が確認され、PS2 とは若干異なっていた (Lee et al., 1996)。

以上の結果から *in vivo* で PS2 はほとんどの臓器に広く発現している蛋白であり、standard cleavage によってプロセッシングを受けて 35 kDa NTF と 23 kDa CTF として存在していることがわかった。また 19 kDa CTF は検出できなかったことから、alternative cleavage は *in vivo* では非常に限られた条件でのみ起こる現象であると予測された。

3-3-4 人工的なフラグメント型 PS2 の発現とプロセッシング

このように PS はループ部分でプロセッシングを受ける蛋白である。しかしフラグメント型の PS が機能型分子なのか、それとも全長型の蛋白が機能型分子であり、フラグメント化を受けることで機能が調節されているかについては明らかではなかった。蛋白化学的解析により、PS1 の CTF の N 末端は 292 番目の Met、293 番目の Val、299 番目の Ala の三種類が存在していることが報告されており、この近辺で PS1 の standard cleavage が起こっていると考えられていた (Podlisny et al., 1997)。この近辺の配列は PS1 と PS2 で相同性が高いことから、PS2 の standard cleavage もこの近辺で起こっていることが予測された。そこで NTF、CTF に相当するフラグメント型分子をコードする cDNA を作製して細胞に発現し、その代謝と A β 産生に及ぼす影響について検討した (図表 26)。

まず standard cleavage による NTF と CTF に相当する蛋白を発現させる cDNA として、PS1 の 298 番目の Met と相同な 304 番目の Met から始まる PS2/304ctf と、それに対応する NTF 相当分子である PS2/303stop を作製した。次に PS2 のループ部分が A β 産生に必要などうかを検討するために、ループ部分を含まない NTF 型分子である PS2/270stop、逆にループ部分をすべて含んだ NTF 型分子 PS2/388stop と CTF 型分子 PS2/271ctf を作製した。さらにアポトーシス抑制遺伝子として報告されていた PS2 の C 末端側 100 アミノ酸 (alg3) に相当する PS2/344ctf も作製した (Vito et al., 1996)。NTF 側の分子については N141I 変異を持つものもあわせて作製した。

これらのフラグメントを COS 細胞に一過性に発現させ、ウェスタンブロット解析を行った (図表 27)。それぞれほぼ分子量に対応する移動度を示し、PS2/270stop は 30~33 kDa、PS2/303stop は 32~35 kDa、PS2/388stop は 45~50 kDa のダブレットを呈した。すべてのコンストラクトにおいて高分子量側にオリゴマーと考えられるバンドが観察された。また PS2/388stop からは alternative cleavage によるプロセッシング産物と思われる 35~40 kDa の NTF が見られた。N141I 変異によってその移動度、バンドパターンが大きく変化することはなかった。PS2/271ctf を発現させると 28 kDa の全長分子に加え、23 kDa と 19 kDa のバンドも観察された。PS2/304ctf を発現させたときにも 23 kDa の全長分子に加えてこの 19 kDa バンドが観察され、alternative cleavage による CTF である可能性が考えられた。共に高分子量側にも複数のバンドが観察された。PS2/344ctf は発現量が低く、15 kDa のバンドのみが観察された。

次にこれらの蛋白を N2a 細胞に恒常的に発現させ、ウェスタンブロット解析を行った。COS 細胞と同様に分子量に対応する移動度を示すバンドが観察されたが、19 kDa CTF は観察されなかった。また PS2/303stop は全長分子由来の 35 kDa NTF と、PS2/304ctf は 23 kDa CTF とほぼ同じ位置の移動度を示した。一方 standard cleavage が起こる配列が保たれている PS2/388stop や PS2/271ctf を発現させても、standard cleavage による 35 kDa NTF や 23 kDa CTF の生成は観察されなかった。

免疫細胞化学によってこれらの蛋白の細胞内局在を検討すると、すべて抗 BiP 抗体による染色像と類似した、細胞全体に広がるメッシュワーク状の染色像を呈し、主に小胞体に局在していると考えられた（図表 28）。

以上の結果から、PS2 の standard cleavage は PS1 で示された位置とほぼ同様の位置で起こっていること、また standard cleavage を受けるには PS2 のほぼ全長配列が必要である可能性が示された。逆に alternative cleavage はループ部分の caspase 3 認識配列が存在すれば起こることがわかった。

3-3-5 フラグメント型 PS の安定化

Ratovitski らは PS1 を恒常的に発現させた N2a 細胞に cycloheximide (CHX) 処理を行い、新規蛋白合成を阻害して PS1 蛋白の代謝を検討した。すると過剰発現させた全長 PS1 蛋白は迅速に分解されていくのに対して、内因性 PS1 フラグメントや、外因性 PS1 由来のフラグメントは CHX 処理後 24 時間後も分解されず、安定に存在していた。このことからフラグメント化した PS は全長蛋白と異なり、何らかの機序により高い安定性を獲得していると考えられた。この現象は安定化 (stabilization) と呼ばれている (Ratovitski et al., 1996)。また人工的な PS1 フラグメントは安定化されないこと、一方フラグメント化されないエクソン 10 欠損型 PS1 蛋白は全長分子の状態で安定化されていることから、PS1 蛋白はプロセッシングされる前に安定性を獲得するものと考えられた。

人工的なフラグメントと全長分子から生じたフラグメントの生化学的な違いを検討するため、恒常的に PS2 を発現する N2a 細胞に、CHX 処理を行った（図表 29）。βAPP は放射性同位体を用いた pulse-chase 実験から、その半減期が 30 分以内であることが知られているが、CHX 処理によって N2a 細胞の内因性 βAPP は 2 時間後には完全に消失した。その条件下で内因性の PS1、PS2 フラグメントは 24 時間後も安定に存在しており、非常に長い半減期を持っていることが確認された。PS2 を過剰発現させた N2a 細胞で

は全長 PS2 は迅速に分解を受け、CHX 処理後 24 時間でほぼ消失したのに対して、フラグメントは 24 時間後も安定に存在しており、PS1 フラグメントと同様に安定化されていると考えられた。それに対して人工的な PS2 の NTF に相当する PS2/303stop は CHX 処理後 4 時間で消失し、迅速に分解されており、安定化を受けていないと考えられた。さらに PS2/388stop も安定化されておらず、迅速に分解されていたことから、ループ部分をすべて含んでいても安定化されないことがわかった。

以上の結果から、全長蛋白由来のフラグメントと異なり、人工的な PS2 フラグメント、もしくはプロセッシングされない PS2 蛋白は安定化されないことが明らかとなった。

3-3-6 人工的な PS2 フラグメントが Aβ42 産生に及ぼす影響

これら人工的な PS2 フラグメントが Aβ 産生に及ぼす影響について検討した。まず COS 細胞を用いて一過性に C100 との共発現を行い、分泌されてくる Aβ 量をサンドイッチ ELISA 法によって検討した（図表 30）。分泌される Aβ42 の比率は野生型全長 PS2 を発現させたときで 13.5%、N141I 変異型全長 PS2 を発現させると 22.3%と約 2 倍に増加した。このとき NTF 型 PS2 を発現させても N141I 変異の有無に関わらず、常に Aβ42 の比率は 9.5～13.1 %であり、FAD 変異による Aβ42 上昇能が失われていた。また CTF 型 PS2 を発現させても Aβ42 の比率が大きく変化することはなかった。

恒常的にフラグメント型 PS2 を発現している N2a 細胞から分泌される Aβ についても検討した（図表 31）。すべての細胞で βAPP の発現量、Aβ の総分泌量はほぼ同じであった。野生型全長 PS2 を発現している N2a 細胞から分泌される Aβ42 の比率は 20.5%であり、N141I 変異型全長 PS2 の発現によって 52.1%に増加した。しかし NTF 型 PS2 を発現させた N2a 細胞からは N141I 変異の有無に関わらず Aβ42 分泌の増加は観察されず、野生型とほぼ同じ値を示した（野生型 12.3%～16.5%、N141I 変異型 14.2%～18.0%）。また CTF 型 PS2 を発現させた場合でも Aβ42 の分泌に大きな影響は見られなかった（10.1%～14.2%）。

PS の NTF と CTF は生体内では heterodimer を構成していることがわかっている。そこで次に 35 kDa NTF に相当する PS2/303stop を恒常的に発現している N2a 細胞に 23 kDa CTF に相当する PS2/304ctf を一過性に発現させ、N141I 変異による Aβ42 産生上昇能が回復するかどうかを検討した（図表 32）。野生型・N141I 変異型 PS2/303stop は共に PS2/304ctf との共発現によって Aβ の総分泌量を低下させたが、Aβ42 の比率に大きな影響を与えず、人工的な NTF と CTF の共発現によっても FAD の効果は回復しないと考

られた。

以上の結果より N141I 変異による A β 42 分泌上昇には全長型 PS2 の発現が必要であることがわかった。本研究を公表後、ほぼ同様の結果が報告された (Citron et al., 1998; Shirotani et al., 1999)。

3-4 小括

PS2 のプロセッシングには 35 kDa NTF と 23 kDa CTF に切断される standard cleavage と caspase 3 によって 40 kDa NTF と 19 kDa CTF に切断される alternative cleavage の 2 種類が存在するが、生体内ではほとんどすべての内因性 PS2 は standard cleavage を受け、安定化されたフラグメントとして存在している。しかし外因性にフラグメントのみを発現させても N141I 変異による A β 42 産生上昇はみられず、また安定化も受けていなかった。また N141I 変異を持つ NTF 型 PS2 と CTF 型 PS2 の共発現でも A β 42 産生に影響を与えることはできないことから、全長分子から生じた安定化されている NTF と CTF が病的機能型分子であると考えられた。

第3章の結果の一部は、以下の論文に発表した。

Tomita T, Tokuhiko S, Hashimoto T, Aiba K, Saido TC, Maruyama K, Iwatsubo T: Molecular dissection of domains in mutant presenilin 2 that mediate overproduction of amyloidogenic forms of amyloid β peptides. Inability of truncated forms of PS2 with familial Alzheimer's disease mutation to increase secretion of A β 42. J Biol Chem 273:21153-21160,1998

第4章 プレセニリン蛋白の最C末端の役割

4-1 目的

PS2の最C末端60アミノ酸を欠損させると standard cleavage を受けず、N141I 変異による Aβ₄₂ 産生上昇能も失われたことから、C末端側にこれらの機能を担うドメインが存在している可能性が考えられた。そこで最C末端側の変異体を作製し、Aβ産生という観点からその機能ドメインを探索した。さらに standard cleavage を受けることと PS2 の Aβ 産生に関わる機能との関連について検討した。

4-2 方法

特記しない場合、2-2、3-2 に示した方法に従って行った。

4-2-1 ヒト PS 発現ベクターの構築

4-2-1-1 最C末端改変型 PS2 発現ベクターの構築

最C末端改変型 PS2 発現ベクターを構築する目的で以下のようなプライマーを設計した。フォワードプライマーとしては SM3 を用いた

5'- ccg gat ccc tac ttc ttg aac aca gc -3' (PS2TM7STOP)...PS2/411stop

5'- gat ctc gag cta cgt gat gga gat ggg -3' (PS2421st)...PS2/421stop

5'- ctg ctc gag cta gtc cgt gga gaa gta -3' (PS2431st)...PS2/431stop

5'- ctg ctc gag cta cag ggt gtc cat gaa -3' (PS2441st)...PS2/441stop

5'- ccg gaa ttc tac tga tgg gag gcc ag-3' (PS2-445stop)...PS2/445stop

5'- ggg ctc gag tca gat gta ggc ctg atg gga-3' (PS2L446A)...PS2/L446A

5'- aca cca gaa ttc tca gat ggc gag ctg atg gga-3' (PS2Y447A/EcoRI)...PS2/Y447A

5'- aca cca gaa ttc tca ggc gta gag ctg atg gga-3' (PS2I448A/EcoRI)...PS2/I448A

5'- ccg gaa ttc tag acg tag agc tga tgg ga-3' (PS2-I448V)...PS2/I448V

5'- ccg gaa ttc tag aag tag agc tga tgg ga-3' (PS2-I448F)...PS2/I448F

5'- ccg gaa ttc tac ctg tag agc tga tgg ga-3' (PS2-I448R)...PS2/I448R,

5'- ccc ggg aat tct aat ggt gat ggt gat gat gga tgt aga gct gat ggg a (PS2Chis)...PS2/CHis,

5'- ccc ggg aat tct ata tat ata att ggt gac tga tgt aga gct gat ggg a (PS2Cdup)...PS2/CDup

pcDNA3 に挿入されている PS2 の cDNA をテンプレートとして、2-2-1-4 の方法に従ってそれぞれの cDNA フラグメントを増幅し、BamHI 並びに XhoI、または EcoRI で処理して BamHI-XhoI もしくは BamHI-EcoRI フラグメントとして得た。このフラグメントを pcDNA3 に挿入し、塩基配列を自動シーケンサーで確認した。

4-2-1-2 最 N 末端改変型 PS2 発現ベクターの構築

最 N 末端改変型 PS2 発現ベクターを構築する目的で以下のようなプライマーを設計した。フォワードプライマーとしては SM4 を用いた

5'- ccg gat cca cca tgt cgg ccg aga gc -3' (PS2FdAS)...PS2/dAS

5'- ccg gga tcc atg gag gaa gag ctg a -3' (PS2FdN)...PS2/dN

pcDNA3 に挿入されている PS2 の cDNA をテンプレートとして、2-2-1-4 の方法に従ってそれぞれの cDNA フラグメントを増幅し、BamHI 並びに XhoI、または EcoRI で処理して BamHI-XhoI もしくは BamHI-EcoRI フラグメントとして得た。このフラグメントを pcDNA3 に挿入し、塩基配列を自動シーケンサーで確認した。

4-2-1-3 エクソン 10 欠損型 PS2 (PS2/dloopN) 発現ベクターの構築

PS2 遺伝子のエクソン 10 がコードするアミノ酸領域を欠損させた PS2/dloopN を発現させる目的で、

以下のようなプライマーを設計した。P はリン酸基を示す。

5'- Pga aga ctc cta tga cag ttt tgg g -3' (PS2dE9F)

5'- Pag atg agt ata tca ggg cag gga a -3' (PS2dE9R)

pcDNA3 に挿入されている PS2 の cDNA をテンプレートとして、以下に示す、Long-PCR mutagenesis によって変異を導入した。

[Long-PCR mutagenesis]

まず氷冷下で以下のようにサンプルを調製した。

テンプレート	1~3.5 µg
primer	50 pmol
10×Pfu Buffer	1 µl
2.5mM dNTP	8 µl
Pfu	0.5~1 µl
Total	50 µl

T-3000 で 94℃・5 分間熱変性後、94℃・1 分間変性、48~54℃・1 分間アニーリング、72℃・8~12 分間 DNA 合成を 8~16 回繰り返す、さらに 72℃・10 分間 DNA 合成を行い非特異的な増幅を除いて、変異が導入されたインサートを含むプラスミド全長を増幅させた。DpnI (NEB) を 1 µl 加え、37℃、1~3 時間インキュベートしてテンプレートを分解した。酵素を除去した後に T4 polynucleotide kinase (Nippon Gene) によって PCR 産物の 5'末端をリン酸化した。この DNA 断片をライゲーションし、トランスフォームしてプラスミドとして回収した。得られたプラスミドの PS2 部分の塩基配列は自動シーケンサーで確認した。

4-2-1-4 アスパラギン酸変異型 PS2 発現ベクターの構築

TMD7 内の 366 残基目のアスパラギン酸をアラニンもしくはグルタミン酸に置換した PS2 (PS2/D366A、

PS2/D366E)を発現させる目的で、以下のようなプライマーを設計した。

フォワードプライマー

5'- gta gaa gat gaa ggc ccc gag gcc aag -3' (D366A/F)...PS2/D366A

5'- gta gaa gat gaa ttc ccc gag gcc aag -3' (D366E/F)...PS2/D366E

リバースプライマー

5'- agt gta cta gtg ggc aag gcg gct gcc -3' (D366/R)

pcDNA3 に挿入されている PS2 の cDNA をテンプレートとして、4-2-1-3 に示した Long-PCR mutagenesis によって変異を導入した。得られたプラスミドの PS2 部分の塩基配列は最終的には自動シーケンサーで確認した。

4-2-1-5 大腸菌用 PS 発現プラスミドの作製

2-2-1-4 の方法に従って以下のようなプライマーを作製し、PS1 のループ部分の 297 番から 379 番までが GST に融合した蛋白を発現するベクターを作製した。また融合蛋白の発現・抽出は 2-2-2 に従って行った。

5'- ccg gat cca ata tgg cag aag gag acc cg -3' (PS1L-GST/F)

5'- cgg tcg act tta ctc ccc ttg cct ctg g -3' (PS1L-GST/R)

4-2-2 抗体

大腸菌に発現させた GST 融合 PS1 ループ蛋白を 2-2-5-1 に従ってウサギに免疫して抗血清を得て、2-2-5-3 にしたがって affinity-purify を行った。

anti-G1L3: [GST]-(297-379 of PS1)

4-2-3 IP-western 法による A β の検出

分泌された A β を検出する目的で、10 cm シャーレに各種 N2a 細胞をまき、コンフルエントになるまで培養した。その後 4.5 ml の DMEM で 36 時間培養した。得られた培養上清から低速遠心によってデブリスを除き、2 μ g の BNT77、5 μ l の抗 mouse IgG・A・M goat IgG (Cappel)、100 μ l の 25% protein G agarose (GIBCO BRL) を加え、12 時間、4°C で反応させた。免疫複合体を遠心により沈殿させ、2 分間煮沸した後に、16.5% Tris-Tricine ゲルを用いた電気泳動によって分離した。Hybond-ECL (Amersham Pharmacia) にウェスタンブロットし、D-PBS 中で湯浴を用いて 5 分間煮沸して抗原性の賦活化を行った。D-PBS で一回洗浄後、メンブレンを 1% skim milk / DPBS-T (0.5% Tween20 を含む D-PBS) によって室温で 30 分間ブロッキングし、0.5% skim milk / DPBS-T に希釈した BA27 と BC05 (共に 8 μ g / ml) と 4°C で一晩、反応させた。その後バッファー系を DPBS-T とした方法で 2-2-7-5 と同様に発色し、感光させた。

4-2-4 培養細胞における発現

特に表記していない場合を除き、CMV プロモーターを持つプラスミド由来の蛋白の発現量を増加させるためにサンプルを回収する培地中に 10 mM Butyric acid を加えた (Ratovitski et al., 1997)。

4-3 結果

4-3-1 COS・N2a 細胞における最 C 末端改変型 PS2 の発現と、A β 産生に及ぼす影響

第3章までの結果から PS2 の最 C 末端 60 アミノ酸内に FAD 変異による A β 42 産生上昇に関わるドメインが存在することが示唆されたので、最 C 末端をそれぞれ 37、27、17、7、3 アミノ酸欠損させた PS2 cDNA を構築し検討した (図表 33)。まず COS 細胞で C100 と一過性に共発現させ、分泌される A β をサンドイッチ ELISA 法によって測定した (図表 34)。A β の分泌量には実験ごとに差異が見られたが、A β 42 の比率はほぼ一定であり、平均すると野生型全長分子では 13.4%、N141I 変異型全長分子では 25.9%であ

った。このとき最C末端の最低3アミノ酸の欠損によってもN141I変異によるA β 42の産生量の増加は見られなくなった(野生型10.9~14.4%、N141I変異型12.6~17.5%)。さらにPS2/411stop、PS2/441stop、PS2/445stopをN2aに恒常的に発現させ、分泌されるA β について検討した(図表35)。やはりCOS細胞の場合と同様に、最C末端3アミノ酸の欠損でもFAD変異によるA β 42産生上昇効果は失われていた。

この最C末端3アミノ酸を1アミノ酸ごとにアラニンに置換した変異PS2を作製し、COS細胞で一過性にC100と共発現を、N2a細胞には恒常的に発現させ、分泌されるA β について検討した(図表36、37)。PS2/L446A、PS2/Y447Aは野生型と同様にN141I変異によってA β 42産生を上昇させた。しかしPS2/I448AではN141I変異による上昇能が低下しており、分泌A β 42の比率は全長PS2の野生型とN141I変異型のほぼ中間値を示した。そこでこの最C末端Ile448がFAD変異効果に最も重要なアミノ酸であると考えた。

次にこの最C末端アミノ酸であるイソロイシンをバリン(PS2/I448V)、フェニルアラニン(PS2/I448F)、アルギニン(PS2/I448R)に置換して検討した。バリンは疎水性アミノ酸であり、イソロイシンと非常に類似した構造をもつ。フェニルアラニンも疎水性アミノ酸であるが、芳香環を持っている。アルギニンはチャージを持ち、親水性である。同様にCOS細胞にC100と一過性に、N2a細胞に恒常的に発現させ、分泌されるA β を測定した(図表38、39)。その結果PS2/I448V、PS2/I448Fは野生型と同様にN141I変異によってA β 42産生を増加させた。しかしPS2/I448Rではその上昇効果がまったく失われていた。以上の結果から、PS2がFAD変異によってA β 42産生を増加させるためには最C末端が重要な役割を持っており、特に最後のアミノ酸である448番目のイソロイシンの疎水性が重要である可能性が示された。

FAD変異によるA β 42産生上昇に対する最C末端の要求性をさらに検討するために、PS2の最C末端にアミノ酸の付加を行い検討した。ひとつにはタグとして頻用される6個のヒスチジンを(PS2/CHis)、もうひとつにはPS2の最C末端6アミノ酸(Ser-His-Glu-Leu-Tyr-Ile)を反復して付加したものを作製した(PS2/CDup)。共にN141I変異の有無に関わらずA β 42の比率は常に10%程度であり、FAD変異によるA β 42産生上昇能は失われていた(図表40)。

以上の結果から、COS・N2a細胞いずれの細胞においても、FAD変異によってA β 42産生を上昇させるためにはPS2の最C末端の疎水性が重要であると考えられた。またPS2/CDupでもA β 42産生上昇能が失われたことから、配列特異性よりも最C末端の高次構造が重要である可能性が示された。

4-3-2 IP-Western 法による分泌 A β の測定

ELISA で比色反応により測定している A β を、ウェスタンブロットでバンドとして可視化、測定するために、IP-Western 法による A β 測定系を検討した (Ida et al., 1996; Sudoh et al., 1998)。まず合成 A β を電気泳動し、バッファー系 (TS-T・PBS-T)、ブロッキング剤 (skim milk・BSA) を検討した。その結果バッファーとしては TS-T よりも PBS-T の方が A β の検出に優れていること、ブロッキング剤としては 1% skim milk が最も A β の検出に適していることを見出した。この時 BA27、BC05 の検出限界は約 12pg / lane であった (図表 41)。

この条件下で野生型・N141 変異型全長 PS2、PS2/L446A、PS2/I448R を発現している N2a 細胞から分泌される A β をそれぞれ BNT77 で免疫沈降し、BA27・BC05 でウェスタンブロットを行った。野生型全長 PS2 を発現している細胞からは BA27 によって 4 kDa と 3.7 kDa のバンドが観察された。マウス由来の細胞では、 β 切断は 11 番のグルタミン酸の位置でも起こる (Fukumoto et al., 1999)。細胞の性質と BNT77 の特異性から、4 kDa のバンドは A β_{1-40} であり、3.7 kDa のバンドは A β_{11-40} であると考えられた。この時 A β_{1-42} 、A β_{11-42} は共に検出されなかった。しかし N141I 変異型 PS2 を発現させた N2a 細胞では A β_{1-42} 、A β_{11-42} の分泌が上昇しているのが観察された。PS2/L446A を発現させた場合でもほぼ同様の結果が得られた。しかし PS2/I448R を発現させた場合は N141I 変異を導入した場合でも A β_{42} の分泌の上昇は観察されなかった。以上の結果から、IP-Western 法によっても FAD 変異による A β_{42} 産生に上昇に PS2 の正しい最 C 末端の構造が要求されることが確認された。さらに PS の遺伝子変異により A β_{1-42} のみならず A β_{11-42} も同時に増加していることから、PS の効果は C 末端側の切り出しである γ 切断に対してのみ影響していることが示された。

4-3-3 N2a 細胞における最 C 末端変異型 PS2 の代謝

次に N2a 細胞での最 C 末端変異型 PS2 の代謝を検討した (図表 42)。FAD 変異による A β_{42} 産生上昇能を全く失っていた最 C 末端欠損・付加型 PS2 は、いずれも standard cleavage を受けておらず、フラグメントは観察されなかった。次にアラニン置換型 PS2 のうち、PS2/L446A・PS2/Y447A からは全長 PS2 と同様に NTF と CTF が生じた。しかし PS2/I448A ではフラグメントは生成されるが、その量は低下して

いた。また I448 変異型 PS2 のうち PS2/I448V・PS2/I448F は野生型と同様のフラグメント生成が見られたが、PS2/I448R では全くフラグメントが観察されなかった。次に CHX 処理を行い、最 C 末端変異型 PS2 蛋白ならびにそのフラグメントの安定性について検討した。するとすべての全長蛋白は迅速に分解されていたのに対して、フラグメントとなった最 C 末端変異型 PS2 はすべて安定化されていた。

この結果から、正しい最 C 末端の構造は PS2 の standard cleavage にも必要であること、またそのフラグメント化と FAD 変異による A β 42 産生上昇能には強い相関があること、フラグメントが生じた場合、必ず安定化されていることがわかった。

4-3-4 最 N 末端欠損型 PS2 の代謝と A β 産生に及ぼす影響

PS2 の最 N 末端には酸性アミノ酸が並んでいる配列 (acidic stretch) と、casein kinase によってリン酸化を受ける部位が存在する。これらの配列を含め、PS2 の N 末端は PS1 と相同性の低いドメインである。これらの PS2 特異的な配列が A β 産生に及ぼす影響を検討するため、acidic stretch を含む 19 アミノ酸を欠損させた PS2 (PS2/dAS)、また N 末端部分のほぼ全長に対応する 74 アミノ酸を欠損させた PS2 (PS2/dN) をコードする cDNA を作製した (図表 43)。これらを N2a 細胞に恒常的に発現させ、butyric acid 非存在下で検討した。PS2/dAS を発現させた細胞では全長 PS2 に比べてやや分子量の小さなシングルバンドが検出された。その移動度は全長 PS2 で観察されるダブルバンドのうち分子量の小さなバンドとほぼ同一であった。さらに standard cleavage によると思われる NTF、CTF の生成が観察された。この NTF は全長 PS2 由来の NTF に比べて若干分子量が小さかったが、CTF はまったく同一の移動度を示した。一方 PS2/dN でも分子量の小さな全長蛋白・CTF が検出されたが、NTF については N 末抗体に対するエピトープがないために検出できなかった。CHX 処理によってこれら最 N 末端欠損型 PS2 並びにそのフラグメントの安定性について検討すると、すべての全長蛋白は迅速に分解されていたのに対して、フラグメントは全長 PS2 由来のフラグメントと同様に安定化されていた。

次にこれらの最 N 末端欠損型 PS2 を発現している N2a 細胞から分泌される A β について検討した (図表 44)。最 N 末端の欠損は A β 分泌量・A β 42 の比率に大きな影響を与えなかった (全長 PS2: 11%、PS2/dAS: 15%、PS2/dN: 9%)。また、FAD 変異による A β 42 分泌の特異的な上昇にも変化は見られず、野生型と同様に上昇させた (N141I 変異型全長 PS2: 32%、PS2/dAS: 33%、PS2/dN: 29%)。この結果から、PS2 の

持つ FAD 変異効果、フラグメント化や安定性に、PS2 特異的な配列を持つ最 N 末端部分はいらないことがわかった。

4-3-5 プロセッシングを受けない PS2 の代謝

PS2 の受ける代謝のうち、フラグメント化と安定性の獲得のどちらが FAD 変異による Aβ42 産生上昇に必要かどうかを検討することを考えた。そこでそれまでにプロセッシングを受けないことが報告されていた二種類の PS1 分子を参考に、以下の変異型 PS2 を作製した (図表 45)。

そのうちの一つはエクソン 10 欠損変異型 PS2 である。PS1 で知られている FAD に連鎖するエクソン 10 欠損型変異は、イントロンのアクセプターサイトの変異により standard cleavage 部位を含むエクソン 10 (ループ部分の N 末端部分) を欠損する (Perez-Tur et al., 1995)。しかしその後のフレームは一致しているため最 C 末端まで野生型と同じ配列の蛋白ができる。培養細胞に発現させると、この分子はフラグメント化を受けないが、全長分子の状態で安定化されており、さらに Aβ42 産生を上昇させる。当初フラグメント化されないことが Aβ42 産生上昇の原因であると予測されたが、現在ではイントロン-エクソン境界の点突然変異のために生じた S290C 変異が Aβ42 産生上昇に重要であると考えられている (Steiner et al., 1999a)。PS2 ではエクソン 10 を同様に欠損させると、その後フレームが合わないために終止コドンが現れる (Levy-Lahad et al., 1996; Prihar et al., 1996)。そこでエクソン 10 がコードしていると思われるアミノ酸 (296~325) を欠損させた PS2 (PS2/dloopN) を作製し、N2a 細胞に恒常的に発現させ、Aβ42 産生に及ぼす影響を検討した。ウェスタンブロット解析を行うと、予測どおり standard cleavage を受けていなかった。しかし PS2/I448R などと異なり、CHX 処理を行うと大部分の PS2/dloopN 蛋白は迅速に分解されたが、一部は 24 時間後も安定に存在していた。

もう一つのプロセッシング不能分子は Asp 変異型 PS である。Wolfe らは PS1 の TMD6・7 内に存在する二つのアスパラギン酸 (D257 と D385) をアラニンやグルタミン酸に置換した分子 (Asp 変異型 PS1) を発現させると、この分子は standard cleavage を受けないこと、さらに細胞内の γ セクレターゼ活性が阻害されて C83/100 の蓄積・Aβ 産生の低下が見られることを報告した (Wolfe et al., 1999)。これは PS1 ノックアウト動物由来の細胞と同じ表現型であることから、Asp 変異型 PS1 は内因性 PS の活性を阻害する dominant negative 型分子であると考えられた (De Strooper et al., 1998)。PS2 においてもこれらのア

スパラギン酸は保存されていることから、同様の現象が観察されるかどうか検討するため、Asp 変異型 PS2 (PS2/D366A、PS2/D366E) を作製し、N2a 細胞に恒常的に発現させた。これらの分子も PS1 同様に standard cleavage を受けず、C83 を蓄積させ、PS1 と同様の dominant negative 効果をもっているものと思われた。また CHX 処理を行うと、PS2/dloopN と同様に大部分の全長蛋白は分解されたが、一部は安定化されていた。

これらの分子は全長分子の状態で安定化を受けていることから、PS2 のプロセッシングは安定性の獲得に必ずしも必要ではないものと考えられ、むしろまず安定性の獲得が先んじて起こり、安定化された PS 分子がプロセッシングを受けているものと思われた。したがってフラグメント生成が見られない C 末端欠損・付加型 PS2 や PS2/I448R などでは、安定化を受けないためにプロセッシングされていないものと思われた。

4-3-6 エクソン 10 欠損型 PS2 が A β 42 産生に及ぼす影響

次にこのエクソン 10 部分の欠損が A β 産生に及ぼす影響について検討した (図表 46)。エクソン 10 部分の欠損のみ (野生型 PS2/dloopN) では A β 42 産生を上昇させなかった。しかし FAD 変異型 PS2/dloopN は A β 42 産生を上昇させた。このことからこの PS2/dloopN はプロセッシングされないこと以外は、全長 PS2 由来のフラグメントと同一の挙動を示していることがわかった。これらの結果は PS1 ですでに報告された結果 (Steiner et al., 1999a) と一致した。このことから PS2 のプロセッシングは FAD 変異による A β 42 産生の上昇効果に必ずしも必要ないことがわかった。

4-3-7 Asp 変異型 PS2 が A β 産生に及ぼす影響

Asp 変異型 PS2 が PS1 と同様に dominant negative 効果をもっているかどうかを検討するため、恒常的に PS2/D366A を発現している N2a 細胞に一過性に β APPNL を発現させ、分泌される A β を検討した (図表 47)。その結果 PS2/D366A を発現している細胞では、野生型 PS2 を発現している細胞に比べて A β の分泌量が約 20% に低下していることがわかった。また A β 42 の比率が若干上昇していることがわかった。しかしこれは A β 42 の分泌量が検出限界に近いために生じた artifact の可能性もある。以上の結果から PS2 が γ セクレターゼに対して dominant negative 効果を及ぼす場合でも安定化が必要であることが示唆され

た。

4-3-8 最 N、C 末端欠損型 PS2 による内因性 PS1 の replacement

恒常的に PS2 を発現させた N2a 細胞を解析すると、全長蛋白の発現量はクローンによって差異が観察されたが、生じるフラグメントの量はほぼ一定であった（図表 12）。また PS2 を発現させた N2a 細胞の内因性 PS1 フラグメント量は著しく減少し（図表 29）、逆に PS1 を発現させると内因性 PS2 フラグメントの量が低下した。これらの現象は Thinakaran らによって確認されていた（Thinakaran et al., 1996）。こういった現象から細胞内に存在しうる PS フラグメントの総量は、PS1・PS2 とで競合する、量の限られた因子（limiting co-factor）との相互作用によって一定量に保たれていると考えられた（図表 48）。この一定量の PS フラグメントは必ず安定化されていることから、limiting co-factor によって決められた量の PS のみが安定性を獲得し、過剰に存在するほとんどの PS 蛋白は迅速に分解されていくものと思われた。さらに PS を過剰発現させると内因性 PS フラグメント量が低下する現象については、外因性 PS が内因性 PS を置換するという意味で replacement と呼ばれている。

そこで外因性に発現させた PS2 が内因性 PS フラグメントの replacement を起こす現象に、最 N、C 末端の欠損がどのような影響を及ぼすかについて、モノクローン化した N2a 細胞を用いて検討した（図表 49）。最 N 末端を欠損させた場合は全長 PS2 を発現させた場合と同様に内因性 PS1 の量を減少させ、replacement が生じていることから、最 N 末端部分は limiting co-factor による PS フラグメント量の決定に関係しないと考えられた。しかし最 C 末端欠損型 PS2 のうち、FAD 変異効果をもちプロセシングされる PS2/L446A などは replacement を生じたのに対し、FAD 変異効果を持たず、フラグメント化・安定化されない PS2/441stop、PS2/I448R などは replacement を起こさなかった。このことから外因性 PS が内因性 PS の replacement を起こす、すなわち limiting co-factor との機能的な相互作用についても最 C 末端の構造が重要な役割を果たしているものと思われた。

さらにプロセシングと replacement の関係について検討するため、プロセシングされない PS2（PS2/dloopN、PS2/D366A、PS2/D366E）についても検討した。その結果、これらの分子も内因性 PS1 フラグメントの replacement を起こしていることがわかった。特に Asp 変異型 PS2 は FAD 変異効果が見られずむしろ γ 切断すべてを抑制することから、replacement を起こすことと γ 切断に対して影響を及ぼ

すことは密接な関連をもつ現象であると思われた。

以上の結果から、PS2 が γ 切断に影響を及ぼしうる機能型分子となるには内因性 PS の replacement を起こし、安定性を獲得することが必要であると思われた。またこれらの現象に PS2 のプロセッシングは必要ないことがわかった。したがって、正しい最 C 末端構造の保持を前提として、limiting co-factor と機能的に相互作用した結果、安定性を獲得した PS2 分子が機能型分子であると考えられた。

4-4 小括

PS2 の FAD 変異による A β 42 産生上昇効果に必要なサブドメインを決定するために、PS2 の最 C 末端側の詳細な改変を行った。その結果、Ile448 の疎水性を含めた最 C 末端部分の二次構造の保持が FAD 変異効果に必要であることがわかった。さらにこの FAD 変異効果を発揮しない PS2 蛋白は、安定化やプロセッシングを受けず、内因性 PS の replacement も生じない分子であったことから、これらの PS2 蛋白の代謝と FAD 変異効果の間には密接に関連していると考えられた。また PS2 のプロセッシングは安定化された後に起こること、replacement や FAD 変異効果に必要なことも明らかとなった。一方 dominant negative 分子である Asp 変異型 PS2 も全長分子の状態で安定化され、内因性 PS の replacement を起こしていた。これらのことから、正しい最 C 末端構造を介して安定化され、内因性 PS を replace することのできる PS が異常な γ セクレターゼ活性を発揮できる病的機能型分子であると考えられた（図表 50）。

第4章の結果の一部は以下の論文に発表した。

Tomita T, Takikawa R, Koyama A, Morohashi Y, Takasugi N, Saido TC, Maruyama K, Iwatsubo T: C terminus of presenilin is required for overproduction of amyloidogenic A β 42 through stabilization and endoproteolysis of presenilin. J Neurosci 19:10627-10634,1999

Tomita T, Iwatsubo T: Molecular cell biology of presenilins. Nippon Yakurigaku Zasshi 114:337-346,1999

第5章 考察

早期発症型 FAD の原因遺伝子としてクローニングされた PS は、現段階においてもその機能が明確になっていない多回膜貫通型蛋白である。現在までに FAD に連鎖する変異として、PS1 遺伝子では 64 種 50 ヶ所、PS2 遺伝子では 4 種 3 ヶ所の点突然変異が報告されている。さらに *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*、線虫) からヒトにいたるまで、さらには植物を含め、さまざまな生物において PS ホモログの存在が報告されており、非常に保存度の高い蛋白であることがわかっている (図表 49)。特に *C. elegans* や *Drosophila melanogaster* (*Drosophila*、ショウジョウバエ) では発生にかかわる lin-12/Notch シグナリングに関与していることが明らかにされ、注目されている。しかしその他の生物では PS の機能について何もわかっていない。

本研究において、私は

- (1) PS1、2 は生体内では二種類の cleavage を受けて NTF と CTF の二つのフラグメントになる
- (2) 細胞内で standard cleavage を受ける PS2 蛋白の量は一定に決定されており、その結果生じたフラグメントは安定化されていること
- (3) PS2 が安定化されるためには最 C 末端の高次構造の保持が重要であること
- (4) PS 遺伝子上の変異は γ 切断に影響を与え、A β 42 の産生を特異的に上昇させること
- (5) 安定化された PS2 蛋白が γ 切断に影響を及ぼしうる正常・病的機能分子であること

を示した。以下本研究中に他の研究者らによって見出された知見を含め、それぞれについて考察を加える。

5-1 PS の代謝

PS は生体内でプロセッシングを受け、内因性蛋白はほとんどフラグメントとして存在していること、さらにプロセッシングされない変異体が FAD に連鎖する遺伝子変異であることが初期に見出され、その代謝が大きな注目を浴びた (Thinakaran et al., 1996)。本研究の結果を含め、現在 PS は以下のような代謝を受け

と考えられる。

まず新規合成された PS のうち、limiting co-factor によって決定された一定量の PS 蛋白は、分解されずに安定化され、この作用には最 C 末端構造の保持が必要とされる（第 3、4 章; Ratovitski et al., 1997; Thinakaran et al., 1997）。大部分の安定化されなかった蛋白は迅速に分解されるのに対し、安定化された蛋白は standard cleavage によってプロセッシングを受け、安定な NTF・CTF フラグメントになる（第 3 章; Tomita et al., 1997, 1999）。この NTF と CTF は結合し、ヘテロダイマーを形成している（Capell et al., 1998; Thinakaran et al., 1998）。さらにこのヘテロダイマーは PS 以外の蛋白を含めた非常に巨大な複合体（600 kDa 以上）を形成している（Yu et al., 1998）。複合体を形成していない全長蛋白は主に小胞体に局在しているのに対し、安定化・フラグメント化された複合体は小胞体から Golgi 体に存在していることも明らかにされている（Zhang et al., 1998; Annaert et al., 1999）。内因性の PS はほぼすべてこの巨大な複合体として存在し、内因性の全長蛋白はほとんど見出されない。このことから内因性の全長 PS 蛋白は即座にプロセッシングもしくは分解されていると考えられる。また複合体の分子量が非常に大きいことから、PS 以外の蛋白が含まれている可能性が考えられている。本研究を含め、この Golgi 体に存在する PS 複合体が機能型である可能性を支持する結果が多数報告されており、PS の代謝がその機能に深くかかわっていることが予測される。

5-1-1 小胞体における PS 蛋白の分解

エクソン 10 欠損型 PS がプロセッシングを受けず安定化されていることから、PS が安定性を獲得するのはプロセッシングの生じる以前であることが示唆されている。しかしこの安定化の分子的機構は明らかではない。安定化を受けない新規合成された PS 全長蛋白の大部分や、また人工的に発現させた PS1 フラグメントはユビキチン・プロテアソーム系によって分解されることから、安定化を受けている蛋白は何らかの形でこの分解経路を逃れていると思われる（Kim et al., 1997b; Steiner et al., 1998）。膜蛋白のユビキチン・プロテアソーム系による分解については、小胞体における独自の蛋白分解経路（ER-Associated Degradation、ERAD）が知られている（Hiller et al., 1996）。この経路では分解される内腔内蛋白や膜蛋白は translocase である Sec61p/Sec63p 複合体を介して細胞質内に移行し、ユビキチン化を受けてプロテアソームによって分解される（Plempner and Wolf, 1999）。特に *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*、

出芽酵母)で研究がすすんでいるが、同じ機構が高等動物細胞にも存在することが明らかにされている。ERAD には正常代謝内で制御をうけて行われる regulated proteolysis と、蛋白のフォールディング・アセンブリーの状態に応じて行われる quality control の二種類があることがわかっている。この ERAD によって分解される膜蛋白としては HMG-CoA reductase や、CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) などが知られている。

5-1-1-1 HMG-CoA reductase

HMG-CoA reductase はコレステロールの新規合成経路に必須な、多回膜貫通型の酵素であるが、コレステロールの量に応じて細胞内の蛋白量が変化することが知られている (Hampton, 1998)。コレステロール産生時に生成する産物である farnesyl pyrophosphate (FPP) の量が増加すると、ERAD によって分解されることから、この ERAD は regulated proteolysis であると考えられる。しかし FPP の増加に引き続いてどのような分子機構によって HMG-CoA reductase が ERAD を受けるのかについてはよくわかっていない。*S. cerevisiae* の HMG-CoA reductase である Hmg2p の regulated proteolysis にかかわる分子として、Ring-H2 フィンガードメインを持つ 5 回膜貫通型蛋白である Hrd1p/Der3p、26S プロテアソームのコンポーネントの一つである Hrd2p/p97、機能不明の内腔内蛋白である Hrd3p が報告されている (Hampton et al., 1996)。しかしこれらの遺伝子はむしろ他の蛋白の分解を含めた ERAD そのものにも関与していることから、FPP の増加に伴う選択的な Hmg2p の分解過程には関与しないと考えられている。最近、FPP の増加による Hmg2p の選択的分解に必須な分子として、P-type Ca^{2+} ATPase である Cod1p が報告されており、HMG-CoA reductase の選択的な分解に Ca^{2+} が関与している可能性が示唆されている (Cronin et al., 2000)。PS に関していえば、過剰発現系以外にフラグメントの量が大きく変化する現象は報告されておらず、現段階では ERAD による regulated proteolysis が PS の代謝に大きく関与している可能性は低いと考えられる。しかし正しい高次構造をとって「安定化」されている状態の PS 複合体が正常代謝において分解されていくステップで、何らかの regulated proteolysis を受けている可能性はある。

5-1-1-2 CFTR

CFTR は通常表面膜上に存在する Cl⁻チャンネルであり、小胞体で合成された後に Golgi 体を介して表面膜上に輸送される。CFTR 上の変異により常染色体劣性の遺伝形式をとる嚢胞性繊維症 (cystic fibrosis) は

を引き起こすことが知られている (Kopito, 1999)。遺伝子変異の一つである deltaF508 変異は、何らかのフォールディング障害を引き起こし、異常 CFTR が ER に蓄積して ERAD によって分解されてしまうために、機能型 CFTR の発現ができず病態を引き起こすことが知られている (Ward et al., 1995)。

多くの膜蛋白は、小胞体で新規合成後正しいフォールディングを受けない場合は迅速に分解されることが明らかになっている。このような異常な蛋白は細胞質内、特に中心体近辺で aggresome と呼ばれる凝集体を作ることが知られている (Johnston et al., 1998)。中心体近辺には各種プロテアソームサブユニットが多く存在し、プロテアソーム活性も高いことから、小胞体膜上から細胞質に排出された膜蛋白は、凝集して微小管によって中心体近辺に輸送されて分解されと考えられる。PS1 を過剰発現させた場合でも aggresome を形成することから、過剰発現によって生じた多くの異常な膜蛋白は小胞体の quality control によって細胞質内に移行し、ユビキチン化され、aggresome となって分解されていくと考えられる。

フォールディング障害が起こった膜蛋白がどのような分子機構によって認識され、分解されるかについてはまだ明らかではない。酵母では内腔側の異常な可溶性蛋白や膜蛋白の蓄積時の quality control 時には、前述した Hrd1p/Der3p、Hrd2p/p97、Hrd3p に加え、機能不明の多回膜貫通型蛋白である Der1p や、Golgi-localized P-Type Ca^{2+} ATPase である Pmr1p が必要であることも明らかにされている (Knop et al., 1996; Durr et al., 1998)。また哺乳動物の膜蛋白である P-glycoprotein の場合、正しいフォールディングを受けなかった蛋白は内腔のループが未知のプロテアーゼによって切断を受け、それが引き金となって ERAD を受けることも報告されている (Loo and Clarke, 1998a)。またこのときのフォールディングには TMD 同士の相互作用が重要であると考えられている (Loo and Clarke, 1998b)。当研究室においても、PS の内腔側のループが安定性・フォールディングに関わっている可能性が示唆されている (当研究室瀧川ら、未発表データ)。過剰発現によって生じた「不安定な」分解される PS 分子がどのような機序により認識されているのかは、今後の課題でもある。

5-1-1-3 Unfolded Protein Response

蛋白のフォールディング障害は tunicamycin や A23187・thapsigargin といった薬物によって人工的に引き起こすことが可能である。tunicamycin は小胞体における N-結合型糖鎖付加を阻害し、フォールディングされない蛋白を小胞体の内腔側に増加させる。また A23187 や thapsigargin は小胞体から Ca^{2+} を流出させて Ca^{2+} イオンのホメオスタシスを破綻させ、結果的に蛋白のフォールディング障害を起こす。そこでこ

ういった薬物を用いて、特に *S. cerevisiae* を利用して小胞体に異常蛋白を蓄積させた場合の細胞内シグナリングが研究されてきた (Chapman et al., 1998)。

小胞体におけるこれらの異常蛋白の蓄積・凝集は ER stress を引き起こす。ER stress が起こった細胞は BiP や GRP94 などの小胞体シャペロンなどを増加させ、蛋白のフォールディングを戻そうとする反応 Unfolding Protein Response (UPR) を起こすことがわかっている。*S. cerevisiae* ではまず Ire1p と呼ばれる小胞体に局在する一回膜貫通型蛋白が、内腔側のセンサードメインを用いて異常蛋白の蓄積を感知することによって UPR が開始される。Ire1p は細胞質側に serine / threonine kinase ドメインと endoribonuclease ドメインの二つの機能ドメインを持つ。UPR 時にはその kinase ドメインで自己リン酸化を行い、nuclease ドメインが転写因子である *HAC1* mRNA の選択的スプライシングを行う。その結果生じる活性型 Hac1p により、UPR 時に誘導される蛋白の転写・生合成が起こると考えられている (Cox et al., 1993, 1996; Sidrauski and Walter, 1997)。このとき同時に ERAD も誘導していることもわかっている (Casagrande et al., 2000; Travers et al., 2000)。最近になり PS1 が哺乳動物細胞における Ire1 を介した UPR シグナリングに関与している可能性も示されている (5-2-2-4; Gething, 2000)。

5-1-1-4 過剰発現させた PS の不安定性

本研究においては、用いたコンストラクトから発現した不安定な PS2 蛋白の分解がプロテアソームによるものであるかどうかについては検討していない。しかし用いたすべての変異 PS2 蛋白は主に小胞体に局在が観察されたことなどから、膜蛋白として小胞体膜に挿入された後、分解を受けていると考えられる。本研究と同様に人工的な PS1 フラグメントを発現させた場合、全長蛋白と同様にプロテアソームによって分解されていることが報告されている (Steiner et al., 1998)。また PS1 が 26S プロテアソームの触媒活性部位である 20S プロテアソームのサブユニットである HC5 や ZETA と直接結合することも報告されている (Van Gassen et al., 1999)。PS1 を過剰発現させると不安定な全長 PS1 蛋白のみが Ire1 と結合することも報告されており、正しいフォールディングを受けていない「不安定な」PS1 が Ire1 によって認識され、UPR・ERAD を引き起こしていることも考えられる (Katayama et al., 1999)。本研究で見出された不安定な PS2 蛋白も、正しいフォールディングを受けないために小胞体の quality control によって選別されてプロテアソームによって分解されているものと考えられる。

COS 細胞で一過性に長時間 (48~72 時間) PS2 を過剰発現させると、細胞の形態が著しく変形し、細

胞死に至る様子が観察された (data not shown)。その一方 PS1 の過剰発現では 72 時間後も非常により形態を保っていた。最近、小胞体に特異的な caspase 12 を介して ER stress によってアポトーシスが誘導されるという報告がなされた (Nakagawa et al., 2000)。本研究で作製した PS1 コンストラクトの発現効率が非常に低いのに対し、PS2 の発現は非常によりことを考えると、COS 細胞では PS2 の過剰発現によって小胞体に過剰の不安定蛋白が蓄積し、ER stress によって細胞死が誘導された可能性も考えられ、興味深い。今後これらの現象についても検討していく予定である。

安定性を獲得する分子機構を検討するためには PS の分解機構を明らかにすることも必要である。主に酵母で見出されているこれらの現象が哺乳動物でも保存されているのか、PS の分解にも関与しているかは今後検討していくべきであろう。

5-1-2 PS の安定化

PS の代謝においては、選択的に一部の PS 分子が安定化されて残りは分解されることから、何らかの機構によって ERAD から免れることが必要である。さらに本研究で明らかになったように安定化を受ける PS は必ず内因性 PS フラグメントの replacement を起こすことから、PS の量を決定する limiting co-factor との機能的な相互作用によって ERAD から免れていると思われる。つまり limiting co-factor は PS に安定性を獲得させる「安定化因子」であるといえる。安定化された PS は非常に巨大な複合体を形成していることから、他の蛋白質と相互作用していると考えられている。本研究では、最 C 末端部分の高次構造の保持が安定化、すなわち limiting co-factor との機能的相互作用に重要であることが明らかとなった。さらに PS1 でも同様の結果を得、その性質は PS1、PS2 に共通であることが示唆された (当研究室瀧川ら、未発表データ; Tomita et al., 1999)。安定性の獲得に最 C 末端の構造が果たす役割について、考察してみたい。

5-1-2-1 安定性の獲得

多くの他の蛋白で、安定性を獲得する際にほかの蛋白との相互作用を必要とする例が知られている。多回膜貫通型蛋白であるアセチルコリンレセプターの α サブユニットは、小胞体で δ サブユニットとアセンブリーされることによって正しくフォールディングされ、安定化される (Blount et al., 1990; Kreienkamp et al., 1995)。このアセンブリーを受けなかった α サブユニットは ERAD によって分解される (Keller et al.,

1998)。Na⁺-K⁺ ATPase の場合も α サブユニット単独では ERAD によって迅速に分解されるのに対して、シャペロンを介して小胞体上で β サブユニットとアセンブリされることで安定性を獲得することが知られている (Beggah et al., 1997; Beguin et al., 1997, 2000)。おそらくこれらの蛋白の場合は、他のサブユニットとのアセンブリを受けることでコンフォメーションが変化し、正しい高次構造をとった複合体を形成することで、分解過程に対して耐性を獲得するものと思われる。またユビキチン・プロテアソーム系に関していえば、ユビキチンをはずす酵素 (deubiquitinating enzyme) である Fam はプロテアソームによって分解される AF-6 に直接結合し、ユビキチン化を阻害することで AF-6 蛋白を安定化しているといった例もある (Taya et al., 1998)。PS の場合、フラグメント型蛋白は巨大な複合体を形成しており、さらにすでに limiting co-factor の存在が予期されていることから、小胞体上で他の蛋白と正しいアセンブリを受け、フォールディングされることで安定性を獲得すると予測される。

5-1-2-2 PS の結合蛋白

PS の結合蛋白については、これまでに非常に数多くの報告がある (図表 52、Thinakaran, 1999)。その多くは two-hybrid screening か、GST 融合蛋白を用いてクローニングされたものである。また、多回膜貫通蛋白としての性質上、細胞質内ドメインである最 N 末端部分・ループ部分・最 C 末端部分を結合部位の候補として選んだスクリーニングが多い。このうち N 末端とループ部分は PS1 と PS2 の間で非常に相同性が低い。この相同性が低い最 N 末端については、安定化・A β 産生に必要なことが本研究により明らかにされた (第 4 章)。また Carlos Saura、Gopal Thinakaran らと共同研究を行い、ループ部分のうち、相同性が低い C 末端側を欠損させた PS1、2 も standard cleavage を受け、A β 産生に影響を与える機能型分子となりえることを明らかにした (Saura et al., 2000)。また PS1 複合体には、PS2 フラグメントは含まれておらず、逆に PS2 複合体の中には PS1 は含まれていない (Yu et al., 1998)。したがってこれらの部位に結合する分子は少なくとも PS の安定性に関係せず、むしろ PS1 や PS2 に特異的な機能に関与している可能性が高い。

外因性の PS の発現により内因性 PS1、PS2 の replacement が起こること、PS1 の NTF と PS2 の CTF のキメラ分子からは PS1-NTF と PS2CTF の安定な複合体が形成し、やはり内因性 PS1 と PS2 の replacement を起こすことを考えると、PS 複合体に含まれる共通の因子 (サブユニット) が安定化因子である可能性が高いと考えられる (Thinakaran et al., 1997; Saura et al., 1999)。PS1 と PS2 の最 C 末端部

分は相同性が非常に高いことから、この部分は limiting co-factor・安定化因子との結合部位である可能性が考えられる。現在、この可能性を検討するために PS の最 C 末端部分を bait とした two-hybrid screening を行っている。

これまでに PS の最 C 末端に結合する蛋白としては、Go、Calsenilin、PSAP などが報告されている。このうち、Calsenilin は Ca^{2+} と結合する EF-hand ドメインを 4 つ持つ、recoverin ファミリーに属する蛋白である (Buxbaum et al., 1998)。最近、 Ca^{2+} 依存性に転写を行う新規転写因子 (DREAM)、もしくは電位性 K^+ チャンネルの調節因子 (KchIP) としても報告された (Carrion et al., 1999; An et al., 2000)。われわれの行った two-hybrid screening においても、この蛋白ファミリーに属する新規遺伝子がクローニングされている (当研究室諸橋ら、未発表データ)。Calsenilin は PS1 の最 C 末端とも結合することから、安定化因子の候補として考えられた。そこで Calsenilin と PS2 の各種欠損型コンストラクトとの共発現を行い、免疫沈降実験を行った。その結果 Calsenilin は PS2 の最 C 末端 7 アミノ酸を欠損させた PS2/441stop と結合が明らかとなり、本研究の結果と合わないことから安定化因子の可能性は低いと考えている (当研究室諸橋ら、未発表データ)。しかし PS が Ca^{2+} ホメオスタシスに関与しているという報告もあり、PS の機能の調節因子としての可能性も残されている (Tanzi, 1998)。

レセプターなどさまざまな膜蛋白が、細胞質側に結合する蛋白によって局在や機能が調節されていることが知られている (Pawson and Scott, 1997)。そのときに用いられる結合ドメインのうち、PDZ ドメインは蛋白の最 C 末端に結合することが知られている (Fanning and Anderson, 1999)。PS の最 C 末端部分は Type II PDZ ドメイン結合コンセンサス配列を満たしていること、安定性に関する最 C 末端断端の要求性から、安定化因子は PDZ ドメインを持った蛋白であることも予測された (Songyang et al., 1997)。PSAP は新規の PDZ ドメインを持つ蛋白であり、PS1 の最 C 末端 4 アミノ酸を欠損させると結合しないことが報告されている (Xu et al., 1999)。しかし PDZ ドメインと仮想されているアミノ酸配列の一部が二次構造予測上では TMD と予測されることから、実際に PDZ ドメイン様の構造で PS1 と結合しているかどうかについては不明である。さらに PS2 と PSAP の結合能は低いこと、PSAP を発現させても細胞内の PS フラグメントの量に大きな変化は見られないことなどから、安定化因子である可能性は低いと考えている (当研究室諸橋ら、未発表データ)。

5-1-2-3 PS の C 末端部分を介した安定化機構

さまざまな種の PS において、C 末端部分は非常によく保存されている。その中でも TMD8 の直後には (K/R)(K/R)ALP₄₁₄ALP(I/V)SIXXGX(I/V)FYF という、非常に保存性の高い配列が存在している（図表 51、PALP モチーフ、アミノ酸番号は PS2 に相当）。本研究終了後、新たに PS2 の P414L 変異体が安定化されなくなることを見出した（未発表データ）。このアミノ酸変異はもともと PS のホモログである *C. elegans* の *Spe-4* や *Drosophila* の *Psn* の PALP モチーフ中に見出されていた、遺伝学的に PS の機能欠失型変異となる点突然変異である（L'Hernault and Arduengo, 1992; Guo et al., 1999）。したがってこれらの PS もこの変異によって安定性を獲得できず、機構を欠失しているものと思われる。PS2/P414L では最 C 末端断端の一次配列は完全に保存されていることから、最 C 末端の配列特異性・アミノ酸の性質よりも C 末端の高次構造が PS の安定性の獲得に重要であることを示唆する結果であるといえる。また *C. elegans* や *Drosophila* においても PS の安定化機構が保存されている可能性も考えられる。

残念ながら現段階では最 C 末端断端に結合する安定化因子は見出されていない。しかし最 C 末端を除くと、TMD を除いた親水性部分のうちで、十分な長さを持って PS1 と PS2 で保存されている領域は第 6 ループの N 末端側の部位と内腔側の第 1 ループのみである。このうち第 6 ループの N 末端部分はエクソン 10 でコードされている領域であり、この部位は安定性の獲得に必要な。また内腔側の第 1 ループを含んだ TMD1・2 を欠損させても安定化されることがわかっている（当研究室瀧川・綿引ら、未発表データ; Thinakaran, personal communication）。さらに NTF のみを発現させても安定化されないことから、C 末端部分に共通の安定化因子が結合していると考えたい。また人工的な CTF のみを発現させても replacement がおきないことから、安定化因子と PS の相互作用は、翻訳と同時に複合体を形成する co-translational なアセンブリーである可能性も考えている（未発表データ）。これらの知見をふまえ、私は PS が正しいフォールディングをうけたうえで、もしくは受けながら最 C 末端部分を介して何らかの因子と相互作用しているのではないかと考えている。

5-1-3 PS の安定化因子の同定

これまでに報告されてきた PS の結合蛋白のうち、実際に PS 複合体に含まれていることが報告されているのは β カテニンのみである（Yu et al., 1998; Georgakopoulos et al., 1999）。また相互作用にフォール

ディングが必要であるとする two-hybrid screening などでは真の結合因子が見出せない可能性もある。そこで PS の安定性にかかわる因子の同定として、two-hybrid screening のほか、今後以下のような試みも行いたいと考えている。

5-1-3-1 蛋白生化学的な PS 複合体の精製

一つは、巨大な PS 複合体の精製を生化学的に行い、これに含まれる分子を直接解析する方法である。この方法は PS が膜蛋白であるという点のほかに、いくつか困難な点が予測される。それは界面活性剤の問題である。PS 複合体を分子量別に分取する際、界面活性剤として CHAPS を用いると 150~200 kDa のフラクションに PS フラグメントが現れるのに対して、ジギトニンを用いると 400~600 kDa のフラクションに PS のバンドが見られることが報告されている(未発表データ; Capell et al., 1998; Yu et al., 1998)。したがって界面活性剤の種類によっては結合因子との相互作用が失われてしまう場合もあり、界面活性剤の選択にあたっては慎重な検討が必要であろう。さらに PS1 のループ部分に結合する蛋白である β カテニンは、PS2 には結合しないことがわかっている (Yu et al., 1998; Saura et al., 2000)。また PS2 のループ部分に結合する calmylin や sorcin は PS1 に結合しない (Stabler et al., 1999; Pack-Chung et al., 2000)。このような PS1・PS2 特異的な結合蛋白については、ループ部分欠損型 PS を用いることでコンタミネーションを少なくすることができると考えられる。いくつか困難な点が予測されるが、実際の PS 複合体から蛋白を精製するという方向性は真の結合因子の同定に最も直接的な方法であり、試みてみたい。

5-1-3-2 遺伝学的な PS 複合体構成因子の同定

また別の結合因子・安定化因子の同定の方法として、*C. elegans* や *Drosophila* を用いた遺伝学的解析が考えられる。ともに PS のホモログを持ち、ゲノム計画も終了している。PS を欠損させた場合のフェノタイプも確立されていることから、それを指標として suppressor もしくは enhancer を取得することによって PS の結合蛋白が取れる可能性が高い。そのような観点ではこれまでに *sel-10* が報告されている。*sel-10* は *C. elegans* の PS である *sel-12* 同様、もともと *C. elegans* の Notch である *lin-12* の表現型の modifier としてクローニングされた、F-box 蛋白をコードする遺伝子である (Hubbard et al., 1997)。その後 *sel-12* とも遺伝学的に関連していること、培養細胞系で SEL-12 蛋白と直接結合していることが報告された (Wu et al., 1998)。

F-box 蛋白は、ユビキチン・プロテアソーム系でのユビキチン化を行う基質認識蛋白 (E3) の SCF 複合体のコンポーネントの一つであり、N 末端部分に F-box ドメイン、C 末端部分に蛋白-蛋白相互作用に参与していると考えられるドメイン (ロイシンリッチリピートや WD40 リピート) を持つ蛋白である (Deshaies, 1999)。この C 末端側のドメインによって基質蛋白を認識し、SCF 複合体の基質特異性を決定していると考えられている。哺乳類では現段階で 30 種を越す F-box 蛋白が存在していることが知られており、さまざまな蛋白のプロテアソームによる分解に参与している。そのなかでも cdk inhibitor である Sic1 の分解にかかわる cdc4 や β カテニン・I κ B の分解に参与する β TrCP はよく研究されている (Bai et al., 1996; Jiang et al., 1998; Yaron et al., 1998; Winston et al., 1999)。これらは C 末端側の WD40 リピートによって基質内のリン酸化を認識して結合し、ユビキチン化を行う。SEL-10 蛋白も C 末端側に WD40 リピートを持っており、この部位で SEL-12 蛋白と結合していると考えられるが、この点は直接証明されていない。また SEL-12 蛋白側の結合部位や、リン酸化をうけるかどうかについても未同定である。

ヒト PS に関していえば、PS1、PS2 ともにリン酸化を受けることが報告されている (De Strooper et al., 1997; Seeger et al., 1997; Walter et al., 1996, 1997, 1998, 1999)。特に PS1 のリン酸化部位はループ部分に存在し、全長蛋白の状態ではリン酸化されないが CTF になって初めて受ける。このリン酸化は PKC によるものであることが報告されている。一方 PS2 にも最 N 末端部分とループ部分にリン酸化部位が存在し、casein kinase によってリン酸化を受けることがわかっている。遺伝学的、および蛋白の直接的な相互作用を考えると、リン酸化をうけた SEL-12 フラグメントが SEL-10 蛋白によってユビキチン化され、プロテアソームによる分解を受けているというように、生体内の PS フラグメントの量がリン酸化によって制御されている可能性もある。だとすればその分解経路は ERAD を介した膜蛋白のプロテアソームによる分解によるものであることも考えられ、非常に興味深い。最近、ヒトの SEL-10 ホモログが全長 cDNA クローニングプロジェクトによってクローニングされたので今後この遺伝子とヒト PS の代謝について検討していく予定である。また *Drosophila* ゲノム上にも、この *sel-10* 相同分子をコードする遺伝子が存在することを確認している。

また SEL-12 蛋白が実際に安定化・プロセッシングを受けているのかどうかについても明らかにしたいと考えている。最 C 末端部分はさまざまな種の PS の中でも保存度の非常に高い部位であるが、ヒト以外の PS が同様に安定化されるのか、どのような代謝を受けるのかについてはほとんど明らかになっていない。また *sel-12* のコードする最 C 末端部分は相同性が低く、本研究において見出された「安定性の獲得に必要な

な最 C 末端の性質」に合致しないことから、SEL-12 蛋白が安定性を獲得して機能するのか、そのために必要な機構はヒトに至るまで保存されているのかは興味深い点である。それに対して *C. elegans* の持つもう一種類の PS である HOP-1 蛋白の最 C 末端のアミノ酸配列は高等動物に近いことから、HOP-1 蛋白の代謝にも注目したい。また *C. elegans* 以外の PS 蛋白も、どのような生化学的性質を持つかについてはまったくわかっておらず、今後の解析が期待される。

SEL-10 蛋白は LIN-12 蛋白の細胞質内ドメインとも結合し、プロテアソームによる分解を通じてその量を決定していると考えられている (Hubbard et al., 1997)。また別の *lin-12* シグナリングの modifier である *sel-1* は、前述した ERAD のコンポーネントの一つである Hrd3p とホモロジーが高いドメインを持つことがわかっている (Grant and Greenwald, 1997)。これらの遺伝学的解析から、Notch シグナリングにユビキチン・プロテアソーム系・ERAD が深くかかわっていることが予測され、Notch シグナリングに必須なコンポーネントでもある PS の代謝過程・機能にこれらの経路に関連している可能性は高いと考えている。しかし遺伝学的に相互作用する因子が蛋白レベルで直接相互作用しない可能性も高く、PS 複合体に含まれる分子の性質を正しく見分けた上で解析を進めることが必要であろう。

5-1-4 PS のプロセシング

standard cleavage によるプロセシング部位については、PS1、PS2 ともに培養細胞・臓器から直接 CTF を回収してアミノ酸シーケンスが行われている (Podlisny et al., 1997; Shirotani et al., 1997)。しかしその位置は報告によって微妙に異なり、明確なプロセシング部位は不明であった。最近、プロセシング部位近辺の変異体の検討が行われ、プロセシング部位が Thr291-Met292-Val293 (PS1)、Ala297-Met298-Val299 (PS2) の近辺であることが明らかにされた (Jacobsen et al., 1999; Steiner et al., 1999b; Shirotani et al., 2000)。本研究において使用したエクソン 10 欠損型 PS2 (PS2/dloopN) はこのプロセシング部位を欠くために standard cleavage を受けなかったものと考えられる。このプロセシング部位の中でも Met をほかのアミノ酸に置換すると standard cleavage が阻害されることから、PS のプロセシングは配列特異性を要求すると考えられる。この Met はさまざまな種間で保存度が高いアミノ酸であり、*C. elegans* の SEL-12 蛋白、*Drosophila* の Psn 蛋白や *Danio rerio* (ゼブラフィッシュ) の PS についてはプロセシングが報告されている (Li and Greenwald, 1996; Guo et al., 1999; Leimer et al., 1999)。また *C. elegans* にヒト PS1 を

発現させるとフラグメントを生じることなども報告されている (Baumeister et al., 1997)。しかしこの近辺の配列は *C. elegans* の HOP-1 蛋白や *Arabidopsis thaliana* (シロイナズナ)、*Oryza sativa* (イネ) の PS では保存されておらず、これらの PS がプロセッシングを受けるかどうかについても、明らかにされていない。またプロセッシングを行う酵素 (presenilinase) についてもプロテアソームがその候補として上げられているが、未同定である (Honda et al., 1999)。

もう一種類のプロセッシングである、ループ部分の alternative cleavage による切断については、PS1 では A₃₄₂QSD、PS2 では D₃₂₉SYD で、主に caspase 3 によって切断されることが示されている (Kim et al., 1997a; Loetscher et al., 1997; Grunberg et al., 1998)。この切断は初代培養神経細胞の分化にしたがって出現することもわかっているが、その意義については明らかではない (Hartmann et al., 1997; Capell et al., 1997)。当初 PS2 の CTF 部分がアポトーシス抑制遺伝子としてクローニングされたこと、PS2 の FAD 変異体で alternative cleavage 産物が多いという報告がなされたことから、アポトーシスのネガティブフィードバック機構であるという考え方や、AD 発症機構との関連が指摘された (Vito et al., 1996a, 1996b, 1997; Wolozin et al., 1996)。また PS1 では alternative cleavage によって β カテニンとの結合能が失われることから、 β カテニンに関する機能を調節している可能性もある (Tesco et al., 1998)。しかし本研究においては細胞系以外ではほとんど alternative cleavage 産物は見られないこと、内因性の PS からの alternative cleavage 産物も検出されなかったことなどから、現在では alternative cleavage は非常に人工的、もしくは限定的に生じる現象であると考えている (第 2 章)。また当研究室の検討では PS2 の CTF 部分にアポトーシス抑制効果は観察されなかった (当研究室高杉ら、未発表データ)。

エクソン 10 欠損型 PS1 に関する知見から、standard cleavage が PS の病的機能、すなわち A β 42 産生上昇に重要であると考えられてきた。しかし FAD 患者脳でプロセッシングの違いは検出されなかった (Hendriks et al., 1997; Okochi et al., 1997)。その後エクソン 10 欠損による A β 42 産生上昇効果はむしろエクソン-イントロン境界の点突然変異によって生じたアミノ酸置換 (S290C) によるものであることが明らかにされた (Steiner et al., 1999a)。さらに本研究の PS2/dloopN の知見を含め、standard cleavage 近辺の変異体も FAD 変異効果に影響を及ぼさないことが示されたことから、PS の持つ病的機能に standard cleavage は関係がないと考えられた (Jacobsen et al., 1999; Steiner et al., 1999; Shirotani et al., 2000)。また alternative cleavage を起こさないように改変した PS でも FAD 変異効果が見られたことなどから、PS がループ部分で受けるプロセッシングは FAD 変異による A β 42 産生上昇効果には一切必要ないも

のと考えられた (Brockhaus et al., 1998)。逆に、PS のドミナントネガティブ変異体である Asp 変異体はプロセッシングを受けないが、全長蛋白の状態で安定化され、 γ セクレターゼ活性を阻害することから、プロセッシングの状態が PS の γ セクレターゼ機能に影響を及ぼすことはないと考えられる (第5章)。以上の知見から、私は PS の standard cleavage は安定化された PS が受ける「molecular signature」であり、機能的な意義に乏しいのではないかと考えている。

5-1-5 PS 複合体の性質

standard cleavage によって生じた安定な NTF・CTF は相互作用していることがわかっている (Capell et al., 1998)。さらにこの複合体は 600 kDa 以上の分子量を持ち、主に Golgi 体に存在していることも明らかにされている (Yu et al., 1998; Zhang et al., 1998)。これらの結果はわれわれも確認している (未発表データ; 当研究室岩田、諸橋ら、未発表データ)。現在本研究において作製した改変型 PS が細胞内のどの器官に局在し、どのような大きさの複合体を形成しているかを検討している。これらの改変と複合体の性質と機能の関係を検討することで、PS 複合体の A β に関する機能に関わる必要最低限のコンポーネントを明らかにすることができるものと考えている。

PS 複合体の局在する Golgi 体において主に γ 切断が起こることが知られており、細胞のフラクショネーションを行った場合も PS 複合体のフラクシオンに細胞内 A β が最も多いことが報告されている (Xia et al., 1998; 当研究室岩田ら、未発表データ)。さらに最近、Hela 細胞の膜画分に γ セクレターゼ活性があること、その活性が PS1 の抗体で免疫沈降を行うことによって消失することが報告された (Li et al., 2000)。この結果は PS1 複合体に γ セクレターゼ活性が含まれていることを示唆する。これらの状況に鑑みても PS 複合体の実体を明らかにすることは急務である。

PS のプロセッシングが報告された当初は、全長蛋白・フラグメントのいずれが機能型であるかについて激論が交わされたが、現在ではさまざまな知見からフラグメント型の複合体が機能型であると考えられている。PS の最 C 末端の高次構造を介した安定性の獲得は複合体形成のステップの第一歩であり、すべての PS の持つ機能を保証しているとも言える。今後安定化因子を含め、PS の代謝に関わる因子群をさまざまな手法を用いて明らかにしていきたい。

5-2 γ セクレターゼと PS

PS 遺伝子上の変異が多く、早期発症型 FAD に連鎖することから、PS 遺伝子変異がどのような分子機構によって FAD 発症を招来しているかを明らかにすることは、すべての AD 発症機構の解明に重要な意義をもつと考えられる。本研究により、安定化されている PS が遺伝子変異を持つ場合、 β APP から γ セクレターゼの切り出しに影響を与え、A β 42 の産生を特異的に上昇させることが明らかにされた。このことから PS 遺伝子変異による FAD 発症機構の本態は A β 42 の産生上昇であると考えられ、この知見はこれまで考えられてきたアミロイド仮説をさらに強固なものにした。またノックアウト動物や *C. elegans*、*Drosophila* の遺伝学的解析から、PS は正常機能として複数の膜蛋白の膜近辺・膜内の限定分解に関与していることも明らかにされた。以下 PS の持つ機能について、考察を加える。

5-2-1 γ セクレターゼによる A β 40・A β 42 の切り分けと PS

β APP から A β が分泌されるためには TMD 配列内での限定分解という、これまでに知られていない特殊な条件が必要である。また A β の産生過程では β 切断が律速段階であり、 γ 切断に関する分子細胞生物学的研究はあまりすすんでいなかった。しかし現在、 γ セクレターゼに関する分子細胞生物学的研究は非常に速いスピードですすんでいる。本研究を含め、これまでに明らかにされている β APP に関する γ セクレターゼの代表的な特徴は以下のとおりである。

- (1) 分泌される A β 42 の産生量は分泌される全 A β の約 10% 程度である (Suzuki et al., 1994; Asami-Odaka et al., 1994; Fukumoto et al., 1999)
- (2) 細胞内 A β 42 は細胞内全 A β の約 20~50% である (Turner et al., 1996)
- (3) A β 40 と A β 42 の細胞内産生部位は異なる可能性がある (Cook et al., 1997; Hartmann et al., 1997; Tienari et al., 1997; Wild-Bode et al., 1997; Xu et al., 1997; Lee et al., 1998; Sudoh et al., 1998; Greenfield et al., 1999)
- (4) A β 42 の一部には分泌されず細胞内に蓄積する分子種がある (Skovronski et al., 1998)

- (5) A β 40とA β 42の γ セクレターゼ活性はプロテアーゼ阻害剤に対して若干異なる特性を示す (Citron et al., 1996; Klafski et al., 1996; Yamazaki et al., 1997; Durkin et al., 1999; Murphy et al., 2000)
- (6) 配列特異性は低く、むしろ γ 切断部位より細胞質側の構造が切断に影響を与える (Lichtenthaler et al., 1997, 1999; Murphy et al., 1999)
- (7) FAD変異型BAPPは42位切断を多く受ける (Suzuki et al., 1994; Maruyama et al., 1996)
- (8) FAD変異型PSにより、 γ 切断部位が後ろへシフトし、A β 42の産生が上昇する (Borchert et al., 1996; Citron et al., 1997; Tomita et al., 1997; Xia et al., 1997; Murayama et al., 1999; Murphy et al., 2000)
- (9) PS1は γ セクレターゼ活性に必要な分子であり、PS複合体にその活性が含まれている (De Strooper et al., 1998; Li et al., 2000)

5-2-1-1 A β 40・A β 42の比率

培養細胞から分泌される全A β に対するA β 42の比率は、どのような細胞種を用いてもほぼ常に10~20%の一定値である (Asami-Odaka et al., 1994; Fukumoto et al., 1999)。カルパイン阻害剤やMG132、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加するとまずA β 40の分泌が低下し、同時にA β 42の産生が上昇する (Klafski et al., 1996; Yamazaki et al., 1997; Murphy et al., 1999)。さらに γ 切断部位のアミノ酸配列を元に作製したペプチド性競合阻害剤を用いた検討が徐々に報告されつつあり、その場合でも低濃度ではA β 42の産生が上昇する。しかしさらに高濃度にするとA β 42の分泌も阻害される (当研究室岩田ら、未発表データ; Wolfe et al., 1998, 1999a, 1999b; Durkin et al., 1999; Li et al., 2000)。このとき40位切断と42位切断のIC₅₀のオーダーは10倍以下の違いでしかない。こういったことから、ひとつの γ セクレターゼによってA β 40、A β 42が生成される、もしくは非常に性質の似通った二つの酵素がそれぞれを切り分けていると予測されている。低濃度でのA β 42の一過性の産生上昇については、40位切断は42位切断に比べて阻害剤に対する感受性が高いために、40位切断が先に阻害を受け、その分生じた基質 (C100) が42位切断を受けるために、一過性にA β 42の産生が上昇していると考えられる。また培養細胞にこのような阻害剤を添加して分泌されるA β を測定する場合、生合成の阻害のほかにA β の分解酵素の阻害を考える必要があるため、結果の解釈に難しい点がある。実際、ある種の培養細胞上清や、ラット脳内にはA β

を分解する酵素が存在していることが報告されている (Qiu et al., 1998; Iwata et al., 2000)。

γ セクレターゼには 40 位切断、42 位切断ともに明確な配列特異性は見られない。分泌される A β には N 末端が 5 番や 11 番で始まるものや、17 番から始まる p3 などが知られているが、C 末端側の 42 位で切断されているものの比率はどの分子種も 10%程度である (Tienari et al., 1997)。したがって内腔側の基質の長さも γ 切断に大きな影響を与えないようである。むしろ TMD 内のアミノ酸配列の位置関係によって切断部位が決定されているようである (Murphy et al., 1999)。さらに γ 切断部位よりも N 末端側にアミノ酸を挿入するとその分だけ切断部位もずれるのに対して、 γ 切断部位よりも C 末端がわに挿入しても切断部位は変化しないことから、内腔側からの TMD の長さが切断位置の決定に重要であると考えられる。一方 γ 切断部位よりも後ろ側のアミノ酸配列の変異によって A β 42 位へのシフトが起こることから、基質となる TMD 配列の C 末端側部分の構造が γ 切断、特に 40 位と 42 位の切り分けに重要であることが予測されている。

5-2-1-2 γ 切断が起こる細胞内小器官と PS の局在

分泌される A β は A β 40、A β 42 ともに Golgi 体から trans-Golgi network において生成されることが徐々に明らかになってきている (当研究室岩田ら、未発表データ; Xu et al., 1997; Greenfield et al., 1999; Sudoh et al., 1999, 2000)。この結果は機能型分子と考えられる安定化 PS 蛋白が Golgi 体に主に局在することと一致する。また変異 PS1 を発現させた細胞内では Golgi 体において A β 42 量が増加している (Xia et al., 1998; Petanceska et al., 1999)。しかし γ セクレターゼの局在については不明な点が多い。一部の細胞では A β 42 の産生が小胞体で見られるという報告があるが、この小胞体 A β 42 は分泌されず、また PS 遺伝子変異によって産生が変化することはない (Skovronski et al., 1998; Greenfield et al., 1999)。一方、表面膜上で α 切断を受けた β APP から生じた C83 は、細胞質内へのエンドサイトーシスを受けずに p3 となることから、表面膜上にも何らかの γ セクレターゼ活性が存在しているということも考えられる (Haass et al., 1993)。この p3 の最 C 末端も A β と同様の性質を持ち、PS 変異により p3₄₂ が増加する (Tienari et al., 1997)。このことから表面膜上の γ セクレターゼ活性も PS による調節を受けていると考えられるが、これは PS の局在と一致しない。しかし一部には PS が表面膜上に存在し、表面膜上の γ セクレターゼ様活性に関連しているといった報告もある (Ray et al., 1999)。さらに A β 40 が主にエンドサイトーシスによって産生されるとする報告もある (Perez et al., 1999)。このように γ セクレターゼ活性の局在については混

乱しているが、あくまで PS フラグメントが主に存在するのは trans-Golgi network であり、この部位で A β が最も多く産生されていることは間違いないようである。

5-2-1-3 γ 切断と PS

PS1 ノックアウト動物由来の細胞では γ 切断が起きず、C83・C100 が蓄積して A β 分泌がおきないという発見は、PS の機能と γ セクレターゼの関係を明らかにする上で重要な知見であった (De Strooper et al., 1998)。現在、PS は γ 切断に必須なファクターであると考えられている (Herreman et al., 2000; Zhang et al., 2000)。一方 PS1 ヘテロノックアウト動物由来の細胞では A β 分泌に大きな変化は見られないことから、FAD 変異は片方のアレルが機能を失ったことによっておきる loss of function 型変異ではないことがわかった (Davis et al., 1998; Qian et al., 1998)。また変異型 PS1 のトランスジェニック動物では A β 42 産生が上昇すること、さらに PS1 ノックアウト動物のフェノタイプを変異型 PS1 のトランスジェン導入により rescue できることから、FAD 変異は dominant negative 型変異でもなく、A β 42 産生を特異的に上昇させる gain of abnormal function 型変異であると考えられた。これは PS1 の FAD 変異ノックイン動物の脳内での A β 42 産生上昇に遺伝子量効果が観察されることとも合致する (Nakano et al., 1999)。

γ 切断がペプスタチンによって阻害されること、またペプチド性の γ 切断阻害剤がアスパルチルプロテアーゼであるカテプシン D を阻害することから、 γ セクレターゼはアスパルチルプロテアーゼであると考えられている (Wolfe et al., 1998, 1999b; Durkin et al., 1999; Murphy et al., 1999, 2000)。アスパルチルプロテアーゼは活性中心として二つのアスパラギン酸 (Asp) を必要とすることが知られている。Wolfe らはこの考え方をさらに進めて、PS の TMD6 と 7 の内部に Asp があることに注目し、これらのアミノ酸をアラニン・グルタミン酸に置換した変異体を作製して A β 産生を検討した。この Asp 変異 PS1 (PS1/D257A・E, PS1/D385A) は γ 切断を抑制して、A β 産生を低下させるドミナントネガティブ型 PS1 となることを見出し、PS1 が新規の膜内に活性中心を持つアスパルチルプロテアーゼであるという仮説を提唱した (Wolfe et al., 1999a, 1999c)。その後本研究を含め、PS2 を用いて同様の結果が報告され、PS2 も PS1 と同様の活性を持っていることが示唆された (Steiner et al., 1999a; Kimberly et al., 2000)。しかしその後 Haass らが PS1 のエクソン 8 欠損型 cDNA (D257 がアラニンに置換している alternative splicing 産物) を用いて A β 産生が起こることを報告し、PS1 が少なくともコンベンショナルなアスパルチルプロテアーゼではないとしている (Capell et al., 2000)。このような知見は、PS は γ セクレターゼの切断の調

節因子であり、アスパルチルプロテアーゼ・ γ セクレターゼそのものではないとの考え方を支持するものである。

5-2-2 γ セクレターゼによる膜内配列の切断

このようにさまざまな特徴をもつ γ 切断だが、もっとも特殊な特徴は TMD 内部配列を切断するという性質である。これは膜内の疎水性環境にあるペプチド鎖を加水分解するため、何らかの親水性環境を膜内に形成する、もしくは膜内から切断部位を親水性環境に露出させるという機構が必要である。最近になりそのような性質をもつ酵素・基質が、バクテリアから高等動物まで広く見出され始めている。このような限定分解は Regulated Intramembrane proteolysis (Rip) とも呼ばれており、注目されている (図表 53、Brown et al., 2000)。

5-2-2-1 APLP1

APLP1、2 は哺乳類に存在する β APP と相同性の高い分子である。しかし β APP の A β に相当する部位のアミノ酸配列は大幅に異なり、A β 産生は起こりえないため、AD 発症には大きく関与していないと思われる。しかし APP や APLP1、APLP2 の単独のノックアウト動物は正常であるのに対して APP と APLP2 とのダブルノックアウト動物や、APLP1 と APLP2 のダブルノックアウト動物は胎生致死となることから、正常機能としてはこれらの β APP ファミリー分子群は発生時期に相補的な役割を持っていると考えられている (Zheng et al., 1995; von Koch et al., 1997)。

β APP と同様に分泌型 APLP1 や APLP2 が観察されることから、 β APP と類似した代謝を受けているものと思われたが、 γ 切断を受けているか否かについては明らかにされていなかった。特に TMD 内の配列はかなり異なっている。しかし PS1 ノックアウト動物では APLP1 の CTF の蓄積が観察され、APLP1 も PS1 の関与する γ セクレターゼ活性によって切断されていることが明らかとなった (Naruse et al., 1998)。しかしその生理的意義については明らかではなく、今後の検討が必要である。

5-2-2-2 SREBP

膜内配列の限定分解の例としてまずあげられるのが Sterol Regulatory Element Binding Protein (SREBP)

の活性化機構である (Brown and Goldstein, 1999)。SREBP は小胞体に存在する二回膜貫通型蛋白であり、その N 末端部分に bHLH-Zip (basic-helix-leucine-helix-zipper) ファミリーに属する転写因子ドメインを持つ。通常は SREBP は小胞体膜上に存在するため、転写活性を持たない。しかし細胞内コレステロールの量が減少すると、二段階の連続した限定分解を受け、転写因子部位が切り離されて核に移行し、コレステロールの新規合成に関わる酵素の遺伝子の転写を活性化する。この切断の一段階目は、Golgi 体に局在する一回膜貫通型セリンプロテアーゼである S1P プロテアーゼによって、SREBP の内腔側のループがコレステロール量依存的に切断される (site-1 切断) ことによって開始される (Sakai et al., 1998)。さらに site-1 において切断された SREBP は連続して二段階目の切断を受ける (site-2 切断)。この site-2 切断はコレステロール非依存性の多回膜貫通型のメタロプロテアーゼである S2P プロテアーゼによるものである (Rawson et al., 1997)。この切断では site-1 切断の結果、 α ヘリックス構造がまき戻った SREBP の TMD 内の細胞質との境目のアミノ酸配列を切断すると考えられている (Duncan et al., 1998; Ye et al., 2000)。S2P 様の構造を持つ酵素はバクテリアなどにも存在し、膜結合性の転写因子の活性化やペプチド性フェロモンの分泌時の Rip に関与していることなどが明らかにされ始めており、注目されている (Rudner et al., 1999)。

SREBP の連続した二段階切断による活性化機構は、 β APP からの A β 産生様式に非常に類似している。特に site-2 切断に関しては γ 切断と同様、膜内の配列を切断することから同一の酵素が活性を担っていることも予測された。しかしプロテアーゼ阻害剤のスペクトルが異なること、また S2P を遺伝的に欠損している CHO 細胞である M-19 細胞からも A β が分泌されることなどから、現在ではこれらの酵素は異なることがわかっている (Tomita et al., 1998; Ross et al., 1998)。

さらに SREBP の活性化機構には、多回膜貫通型蛋白による酵素活性の制御という特徴も知られている。8 回膜貫通型蛋白である SREBP cleavage-activating protein (SCAP) は、site-1 切断の調節に関与する蛋白としてクローニングされた蛋白で、C 末端側に WD40 リピートをもち、小胞体において SREBP と直接相互作用して複合体を形成している (Hua et al., 1996; Sakai et al., 1997)。活性型 S1P は通常 Golgi 体に局在するため、小胞体の SREBP を切断することはできない。しかしコレステロール量が減少すると SCAP は SREBP とともに Golgi 体へ移動し、SREBP の切断が起きる。逆にコレステロールが十分存在する、もしくは SCAP がない状態では SREBP は Golgi 体に輸送されないため、切断を受けない。さらに点突然変異により SCAP がコレステロール非依存的に Golgi 体に移動するようになると、SREBP も常に活性化を

受けるようになる。このように SCAP は SREBP の輸送を調節することで S1P による限定分解を調節しているといえる (Nohturfft et al., 1999; DeBose et al., 1999)。

PS 複合体に β APP が安定に存在することはなく、PS が基質の輸送に関わっているという可能性についてはまだはっきりしていない。また PS が γ セクレターゼに関わるコンポーネントの輸送に関わっているという説もあるが、PS 複合体を含む膜画分のみで in vitro での γ 切断活性が見られることなどから、PS 複合体が γ 切断活性を直接担っていると考えたほうがよいと思われる。最大の問題点は SCAP が調節している S1P は site-1 切断であり、PS が調節している γ 切断はむしろ site-2 切断に類似していることである。しかし多回膜貫通型蛋白が蛋白の限定分解を調節する機構として、基質の輸送を調節しているという現象は、PS の機能を考える上で非常に興味深い。

5-2-2-3 Notch

Notch は元来 *Drosophila* において見出された、細胞の分化・運命決定に関わるシグナルを構成する分子 (レセプター) である (Artavanis-Tsakonas et al., 1999)。Notch シグナリングには数多くの限定分解ステップが存在していることが明らかになりつつある (図表 54)。新規合成された Notch は Golgi 体で furin によって S1 切断を受け、細胞外の N 末端フラグメント (p200) と TMD を含む C 末端フラグメント (p120) となり、さらにそれらが Cys-Cys 結合によって複合体を形成している (Blaumueller et al., 1997; Pan and Rubin, 1997; Logeat et al., 1998)。この複合体は細胞表面膜上に存在し、リガンドである Delta/Serrate/LAG-2 (DSL) ファミリー分子が結合すると細胞内にシグナルを伝える。その際に p120 は内腔側で S2 切断を受け、TMD を含んだ C 末端フラグメント (NEXT) となる。さらに NEXT は連続して膜内配列で S3 切断を受け、細胞質ドメイン (NICD) が細胞質内に切り離される (Schroeter et al., 1998; Struhl and Adachi, 1998)。NICD は転写因子である suppressor of hairless 蛋白などと結合し、直接核内に移行して細胞運命に関わる遺伝子群の発現を活性化すると考えられている (Chan and Yan, 1999a, 1999b)。

C. elegans では陰門形成の際、細胞間の Notch/lin-12 シグナリングを必要とすることが示されていた。このシグナルの modifier を取得する過程で PS のホモログである *sel-12* がクローニングされた (Levitan and Greenwald, 1995)。*sel-12* の loss of function 変異によって lin-12 蛋白の局在が変化し、lin-12 シグナリングが抑制されることから、lin-12 シグナリングに必須な分子であることが示唆されていた (Levitan and Greenwald, 1998)。その後 *C. elegans* には別の PS 相同分子、*hop-1* が見出され、*sel-12* 同様、陰門形成

時の *lin-12* シグナリングに関与していることがわかった (Li and Greenwald, 1997)。 *sel-12* や *hop-1* を欠損させた *C. elegans* の表現型は、ヒト PS を発現させることによって回復することから、 *lin-12* シグナリングにおける機能はヒト PS でも保存されているものと思われた (Levitan et al., 1996; Baumeister et al., 1997; Li and Greenwald, 1998)。また *C. elegans* に存在するもう一つの PS 相同分子 *spe-4* は、もともと精子形成に関与する分子としてクローニングされていた (L'Hernault and Arduengo, 1992)。同じ表現型を示す分子として DSL ファミリー分子である *spe-9* が報告され、精子形成時にも陰門形成とは異なる Notch 様シグナリングが必要であり、 *spe-4* が関係していると考えられた (Singson et al., 1998)。このように *C. elegans* では PS 相同分子は Notch 様シグナリングに関与していることが明らかにされた。さらに PS1 ノックアウト動物のフェノタイプが Notch1 ノックアウト動物と類似していたことや培養細胞系の結果から、高等動物においても PS が Notch シグナリングに関与していると考えられていた (Shen et al., 1997; Wong et al., 1997; Berezovska et al., 1999)。また *Drosophila* でも *Psn* の欠損により Notch 欠損型の表現型を示すこと、表面膜への Notch の局在が変化することが報告されていた (Ye and Fortini, 1998, 1999a; Guo et al., 1999; Lukinova et al., 1999)。

その後 PS1 ノックアウト動物由来の細胞では Notch1 の S3 切断が起きないこと、また S3 切断がペプチド性 γ 切断阻害剤で阻害されることが明らかにされ、PS1 は Notch の膜内配列の S3 切断を制御することによって Notch シグナリングに関与していることが明らかとなった。(De Strooper et al., 1999)。PS と Notch が直接結合している可能性も示されている (Ray et al., 1999b)。 *Drosophila* においても、遺伝学的な解析から Notch シグナリングにおける S3 切断に *Psn* が必要であることが示された (Struhl and Greenwald, 1999)。さらに dominant negative 型変異である Asp 変異型 PS1 は、 γ 切断を阻害するのと同様に S3 切断も阻害することから、 γ 切断と S3 切断の分子機構も非常に類似しているものと思われた (Ray et al., 1999b)。また本研究において使用した dominant negative 型 PS2 (Asp 変異型 PS2) を発現させた N2a 細胞でも S3 切断が阻害されていることから、PS2 も S3 切断と γ 切断をともに制御していると考えられた (Steiner et al., 1999c; Selkoe, 2000; 未発表データ)。PS2 ノックアウト動物は PS1 と異なり発生異常を呈さなかったが、PS1・PS2 ダブルノックアウト動物は PS1 ノックアウト動物よりも激しい発生異常を示したことから、遺伝学的に PS2 も Notch シグナリングに関係しているものと考えられた (Donoviel et al., 1999; Herreman et al., 1999)。この PS1・PS2 ダブルノックアウト動物由来の細胞では γ ・site 3 切断が完全に阻害されていたことから、PS がこれらの切断に必要な不可欠な分子であることが示された

(Herreman et al., 2000; Zhang et al., 2000)。その一方、PS1 に依存しない Notch シグナリング経路が存在していることも報告されている (Takahashi et al., 2000)。

すでに内腔側の S2 切断を受けた NEXT に相当する蛋白を培養細胞に発現させると S3 切断が構成的に生じることから、 β APP と同様に Notch も内腔側での切断が膜内配列の切断に必須であり、律速段階であると考えられる。この S2 切断については、 β APP の PKC 依存的な α 切断にも関与している TACE (TNF- α converting enzyme) によって行われていることが判明し、 β APP と Notch の切断がほとんど共通の分子機構によるものであることが示唆された (図表 54: Brou et al., 2000; Mumm et al., 2000)。

しかし若干性質が異なる面もある。まず Notch からの NICD の生成はリガンドとの結合に依存しているのに対して、 β APP の α 、 β 、 γ 切断はむしろ構成的に生じている。また Notch の S2 切断を担っている TACE のノックアウト動物由来の細胞では、PKC 依存的な α 切断は抑制されるのに対し、構成的に生じている α 切断には影響が見られず、TACE 阻害剤による影響も受けない。さらに S3 切断はリガンドとの結合が起こった表面膜近辺で起こっていると考えられているのに対して、 γ セクレターゼ活性の局在は明確ではない。S3 切断は細胞質側に近い膜内のアミノ酸配列に左右されるのに対して、 γ 切断は TMD のほぼ中央部で切断を受け、アミノ酸配列の特異性が低い。このような性質の違いから、Notch の S3 切断に働く γ セクレターゼ様活性と β APP の γ セクレターゼは必ずしも同一の酵素ではない可能性もある。その場合、PS 複合体には Notch の切断を行うものと、 β APP の切断を行う二種類があると考えられる。

PS の FAD 変異が Notch シグナリングに及ぼす影響については、まず *C. elegans* を用いた表現型によるアッセイが行われた。野生型ヒト PS は *sel-12* の欠損型表現型を回復したのに対し、FAD 変異型 PS は回復させることはできなかった (Levitan et al., 1996; Baumeister et al., 1997)。さらに *Drosophila* を用いた遺伝学的解析においても FAD 変異は部分的な loss of function 型変異形質を示していた (Ye and Fortini, 1999b; Guo et al., 1999)。実際に Notch の生化学的解析を行うと、FAD 変異型 PS1 によって S3 切断活性が低下している (Song et al., 1999)。私はこの現象を PS2 でも確認した (未発表データ)。A β 42 産生を異常に上昇させている変異型 PS ほど、S3 切断の阻害が強く生じるようである (未発表データ; Kulic et al., 2000)。これは PS の FAD 変異により、 γ 切断部位が C 末端側にシフトしたことによると考えられる。この場合、PS の FAD 変異は S3 切断に関しては loss of function 型変異であると考えられ、 β APP の γ 切断に対する影響とはやや異なっている。

ではなぜ PS1 ノックアウトマウスの発生異常は FAD 変異型 PS1 のトランスジェン導入によって回復さ

れたのだろうか？おそらく基本的に FAD 変異型 PS は S3 切断の partial loss of function であるが、トランスジェニックマウスでの場合は高発現できるプロモーター (PDGF や Thy-1) を用いているため、partial loss of function をカバーできるだけの PS が発現しているためにレスキューされているのではないだろうか。いずれにせよ、FAD 変異が γ 切断とやや性質の異なる S3 切断については loss of function 型変異となっているのは興味深い。

遺伝学的な研究により、多くの Notch シグナリングに関連する分子が報告されている。その中でも Notch 分子そのものの代謝に関連している分子としては ERAD に関連していると考えられる *sel-1*、*sel-10* のほかにも、*sup-17/Kuzbanian* (ADAM10、メタロプロテアーゼ)、*sel-1* (Hrd3 と相同性を持つ分子)、*sel-5* (serine / threonine Kinase、GAK1)、*sel-9* (COP vesicle 輸送に関わる蛋白 p24)、*warthog* (*Drosophila* rab6)、 Ca^{2+} -ATPase (様々な膜蛋白の輸送に関与) などが知られている (Grant and Greenwald, 1997; Wen et al., 1997, 1999; Purcell and Artavanis-Tsakonas, 1999; Fares and Greenwald, 1999; Periz and Fortini, 1999)。この中でも *sup-17* や *sel-5* は *lin-12* がリガンド依存的にシグナルを伝える過程、すなわち二段階切断による活性化に関与していることが遺伝学的に示されており、これらと *sel-12*/PS の機能との関連も興味深い。さらに *sup-17* のヒトホモログ ADAM10 は β APP の α 切断を行っていることも示唆されている (Lammich et al., 1999)。今後このような遺伝学的な解析から S3 切断や γ 切断を行うプロテアーゼが同定される可能性も高いといえる。

5-2-2-4 Ire1

PS1 の γ セクレターゼ活性の新たな基質として報告されたのが $\text{Ire1} \alpha \cdot \beta$ である (Niwa et al., 1999)。これは *S. cerevisiae* において UPR に必要な蛋白として同定された *Ire1p* のヒトホモログである (5-1-1-3)。前述したように UPR 時には *Ire1p* は endoribonuclease 活性を用いて *HAC1* mRNA のスプライシングを行う。しかしこのスプライシングは核内で起こるため、小胞体に局在する *Ire1p* は *HAC1* mRNA のスプライシングを行うことはできない。そのため *Ire1* 活性がどのようにして核内に移行するのか不明であった。

最近、*Ire1* α の細胞質ドメインも *Ire1p* と同様に *HAC1* mRNA のスプライシングを行うこと、UPR 誘導により *Ire1* α が何らかの限定分解を受け、*Ire1* の免疫反応性が核内に移行することが見出された (Niwa et al., 1999)。さらに PS1 ノックアウト動物由来の細胞ではこの核移行が観察されず、UPR に対して応答性が低下していることが報告された。同様の実験を S2P 欠損細胞で行っても変化は見られなかった。これま

で報告されている PS の機能から考えると、活性型 Ire1 が PS の制御する γ セクレターゼ様活性によって切断され、その細胞質内ドメインが核に移行して UPR を開始するといったことが考えられた。また PS1 の FAD 変異体が Ire1 を介した UPR に抑制的に働くといった報告もされ、PS1 が UPR シグナリングに関与する因子であることが示唆された (Katayama et al., 1999)。哺乳類の UPR では Ire1 に加え、小胞体に局在する別の一回膜貫通型の転写因子である ATF6 が UPR に関与していることがわかっている (Haze et al., 1999)。ATF6 も UPR の誘導によって膜近辺で限定分解されて転写因子ドメインが切り出されることがわかっており、この切断にも PS が関与している可能性もある (Brown et al., 2000)。このように PS を介した Rip が UPR においても重要な役割を果たしていると考えられた (Gething, 2000)。

しかし Ire1 α の C 末端断片は非常に微量であり、生化学的にほとんど検出されない上に、切断部位ははっきりと決まっていない。また TMD の配列についても β APP や Notch と相同性も見られない。Notch の S2 切断や β APP の β 切断に相当する内腔側の切断が起こっているかどうかについても不明である。Ire1 α の細胞質内ドメインには TRAF2 が結合し、JNK を介して核内にシグナルを伝えているという報告もある (Urano et al., 2000)。さらに PS ホモログは現在までに *S. cerevisiae* に同定されていないため、PS を介した UPR は高等動物に特異的なのか、*S. cerevisiae* の Ire1p シグナリングではどのようにシグナルが核内に伝わっているのか、などの問題点もある。今後 UPR シグナリングと PS との関係についても研究が進められると考えられる。

5-2-2-5 膜内における限定分解の機構

このようにさまざまな酵素と基質が報告され始めている Rip だが、膜内配列に対して加水分解が行われる分子機構についてはほとんどわかっていない。SREBP では、実際の S2P 切断部位は TMD と細胞質の境目なのではないかという報告もある。しかし S2P の活性中心と考えられるメタロプロテアーゼのコンセンサス配列である HEXXH や Zn^{2+} との結合に必要な Asp が hydropathy plot 上で疎水性の高い部位に存在することなどから、S2P が膜内にポア状の構造をもつプロテアーゼであり、膜内の基質を直接 TMD 内で切断していることも考えられる (Zelenski et al., 1999)。

膜内配列を切断するという現象は、膜貫通型蛋白の TMD が分解される時にも起こっている。ミトコンドリアやバクテリアでの膜蛋白質の quality control に関わっている酵素として、AAA (ATPase associated with a variety of cellular activities) protease ファミリーが知られている (Langer, 2000)。このプロテアー

ゼはメタロプロテアーゼドメインに加えて AAA ドメインを持つ蛋白で、生体内では 1000 kDa 前後の巨大な複合体を形成している。最近、この AAA ドメインがシャペロン様活性を持ち、蛋白のフォールディング状態を認識して ATP 依存的に TMD を膜内から引き出して分解していることが報告された (Leonhard et al., 2000)。またこの AAA protease は各オルガネラ・生物における蛋白の Quality control 以外にも、細胞質内の蛋白の量の調節を行っている。このことから AAA protease も ERAD と同様に、quality control と regulated proteolysis の二重の機能を持っていると考えられている。AAA protease が関与する regulated proteolysis に TMD 内の切断を受けるような基質はまだ知られていないが、TMD 部分を引き出して膜内の配列で切断するといった機構は γ 切断のアナロジーとなりうるのではないだろうか。

β APP の γ 切断は、 α もしくは β 切断が起きた後に受ける限定分解である。私は膜内で直接基質を切断するというよりも、内腔側の切断の結果、 β APP の細胞質側のコンフォメーションが大きく変化し、TMD の一部が細胞質内に露出して γ 切断を受けるのではないかと考えている。その場合、膜内で安定な構造をとった α -ヘリックス構造が再び細胞質側に出てくるというよりも、PS 複合体中にシャペロン様活性が存在し、TMD を引き出して切断するといったことも考えられるのではないだろうか (図表 55)。

5-2-2-6 PS 遺伝子変異による A β 42 産生上昇

PS が γ 切断に必須なコンポーネントであることはわかったが、なぜ FAD 変異によって A β 42 産生が上昇するのかについては、ほとんどわかっていない。PS の TMD1 から TMD2 の間と、standard cleavage 部位近辺に FAD 変異が密集しているため、これらの部位は hotspot とも呼ばれているが、その他にも変異は N 末端から C 末端まで数多く見受けられる (Thinakaran, 1999)。ほとんどすべての変異は PS1 と PS2 で相同なアミノ酸に生じており、同一の機構で A β 42 産生を上昇させているものと思われる。また β APP の TMD 内にアミノ酸を挿入し、主な γ 切断部位をずらした後に FAD 変異型 PS を発現させると、 γ 切断部位がさらに C 末側にシフトする (Murphy et al., 2000)。PS の FAD 変異による A β 42 産生の上昇は、A β 42/43 の間を特異的に切断するプロテアーゼ活性を上昇させるのではなく、 γ 切断活性を C 末端側にシフトさせているものと考えられる。

PS がどのような機能を持っているのかについては様々な意見がある (Haass and Mandelkow, 1999)。界面活性剤存在下で PS1 複合体を含んだ画分を用いて γ セクレターゼ活性が見られたという結果からは、PS が膜輸送に関わっているという可能性は低いのではないかと考えられる。また TMD6・7 の Asp 近辺

の配列がこれまでに知られているアスパルチルプロテアーゼとしてのコンセンサス配列を満たさないこと、Asp が置換されていても A β を分泌するエクソン 8 欠損型 PS1 の発見は、PS 自体がプロテアーゼ活性を持つという Wolfe らの仮説よりも、 γ セクレターゼの調節因子であるという可能性を支持するものである。

その調節機構としては二つの可能性が考えられる。一つは PS が酵素である γ セクレターゼの切断位置を決めており、FAD 変異によってその位置がずれているという考え方である。もう一つは PS がシャペロン様活性により β APP の基質としての高次構造を制御しており、FAD 変異により β APP の構造を変化させ、A β 42/43 位での γ 切断を受けやすくしているという考え方である。現段階ではどちらともいえないが、いずれにしても PS そのものが機能を持っているというよりも、PS 複合体に含まれる蛋白もしくはほかの蛋白と相互作用した PS 複合体そのものがこのような機能を担っていると考えている。また FAD 変異により γ 切断では gain of abnormal function となり、S3 切断では loss of function となることから、それぞれの複合体に含まれているコンポーネントが異なっていることも考えられる。したがって PS 複合体に含まれる各因子の同定は必須である。

では PS 上の点突然変異はその機能にどのような影響を及ぼすのだろうか？それについては G 蛋白結合型レセプターなどと同様に、PS 複合体の構造と活性に相関があると考えている。つまり PS のコンフォメーションが結合蛋白との相互作用や機能を、特に A β 40 と A β 42 の切り分けるバランスを決定しているのではないだろうか。したがって今後 PS のフォールディング・高次構造を検討し、FAD 変異の与える影響について検討したいと考えている。しかし多回膜貫通型蛋白の X 線結晶解析や NMR による構造解析は容易ではない。膜貫通部位のトポロジーに関する結果も一定ではなく、また安定性の獲得が機能に必要なだとすれば、一過性発現によって検討する従来の方法では「安定な機能型」よりも「分解型」の PS の構造を検討している可能性もある (Doan et al., 1996; Lehmann et al., 1997; Nakai et al., 1999)。そこで cystein scanning などを用いて機能を持った形の PS の TMD 同士の位置関係を決定することにより、正しい PS の高次構造を検討したい。そして FAD 変異や Asp 変異などで PS の構造がどのように変化しているかを検討することで、PS の立体構造活性相関を明らかにしたい。その結果から、PS 複合体の中で機能を持つ、もしくは機能発揮に重要な新たなドメインを見出すことができるのではないだろうかと期待している。

このように PS 遺伝子変異は非常に多くの FAD 家系に連鎖しているのにもかかわらず、なぜ PS 上の点突然変異・アミノ酸置換が A β 42 産生を上昇させるのかはわかっていない。PS のはっきりとした機能が未知である今、そのメカニズムを明確にするのが困難であることも否めない。しかし A β 42 の産生が上昇す

ることは FAD 発症の重要なステップであると考えられることから、今後様々な手法を用いて FAD 変異が「安定性を獲得した」PS 複合体の機能にどのような効果を及ぼしているのかを明らかにしていきたいと考えている。

5-2-3 PS 変異による A β 42 産生上昇と FAD 発症

本研究で明らかにされた PS 変異による A β 42 産生上昇が、FAD 発症にどのように寄与していると考えられているのか、簡単にまとめたい。PS 変異の患者脳内では、孤発例に比べて A β 42 の蓄積を主体とする老人斑の蓄積が増加していることが観察されている (Mann et al., 1996)。序論でも述べたように、 β APP の FAD 変異によって A β 42 産生が特異的に上昇し、さらにそのトランスジェニック動物でアミロイドの蓄積が観察されたことから、同様の効果が期待された。はたして、PS1 トランスジェニック動物脳内では A β 42 の産生が上昇し、さらに β APP トランスジェニック動物と掛け合わせると脳内のアミロイド沈着が著しく促進された (Duff et al., 1996; Borchelt et al., 1996, 1997; Holcomb et al., 1998; Oyama et al., 1998)。このアミロイド沈着マウスでは神経細胞死・機能障害がみられるかどうかについてはまだ意見が分かれるところではあるが、少なくとも *in vivo* でも PS の遺伝子変異は A β 42 産生を上昇させ、アミロイド形成・沈着を促進するという効果があることは間違いないようである。

アミロイドの蓄積を促進するだけでは従来のアミロイド仮説の域を出ないが、一部の研究者はそれに加えて PS 変異が直接神経細胞死、特にアポトーシスを促進していると考えている。確かに AD 患者脳内では TUNEL 陽性細胞が検出されることから、アポトーシスによってある程度の神経細胞が死んでいることが予測されている。しかし FAD 変異型 PS1 トランスジェニック動物では明確なアポトーシスの亢進は報告されていない。

アミロイド仮説では、A β の凝集・蓄積が AD 発症に深く関わっていると考えられる。この数年、BACE の同定、 γ 切断阻害剤の開発など、A β 産生に関連する標的分子の同定ならびにその阻害剤の研究開発が欧米の製薬企業主導の研究により精力的に進められている。さらに Elan Pharmaceuticals はアミロイド沈着トランスジェニック動物にヒト A β ペプチドを用いて免疫を行い (A β ワクチン)、抗 A β 抗体を脳内に移行させ、A β に対する免疫応答性を高めることにより、アミロイド沈着を抑制する試みを成功させた (Schenk et al., 1999)。このようにアミロイド仮説に基づいた治療・予防薬の開発は急ピッチで進められている。

PS は A β の C 末端長を規定してその凝集性を決定していることから、今後 PS 複合体の持つ機能を明らかにすることで AD 治療・予防薬の新たな標的分子を見出すことができるのではないだろうかと期待される。

5-2-4 γ セクレターゼ活性サブユニットとしての PS

2000 年 6 月、Merck 社をはじめとするいくつかのグループにより、アスパルチルプロテアーゼと基質の遷移状態を模倣した γ 切断阻害剤によって PS1・PS2 フラグメントが特異的に結合・標識されることが報告され、PS が γ セクレターゼの活性中心を持っていることが示唆された (Li et al., 2000; Esler et al., 2000; Seiffert et al., 2000)。さらに全長 PS1 蛋白は阻害剤と結合しないことから、全長分子は zymogen であり、フラグメントとなった PS1 蛋白が γ 切断活性を持った分子であると考えられた。アスパルチルプロテアーゼである HIV プロテアーゼ阻害剤の光学異性体が γ 切断を阻害することから、これらの酵素は類似した活性中心を持つものと考えられる (Shearman et al., 2000)。また 2000 年 7 月に開かれた World Alzheimer Congress において、PS の Asp 近辺の配列が新規膜貫通型アスパルチルプロテアーゼ type 4 prepilin peptidase の活性に必要な Asp 近辺の配列と類似していること、さらに Asp 変異型 PS1 が C83 や C99 と結合することが報告された (LaPointe and Taylor, 2000; Xia et al., 2000)。以上の結果から、フラグメント化して複合体となった PS が、 γ セクレターゼの活性中心サブユニットとして機能しているものと考えられた。今後、Rip に関与するプロテアーゼとしての PS 複合体の性状解析を中心に、PS の研究が多岐にわたって加速的に進められていくものと考えられる。

5-3 PS1、PS2 それぞれに特異的な機能

PS1 と PS2 は相同性の高い分子であるが、その N 末端部分とループ部分の相同性は非常に低い。これらの部位は FAD 変異による A β 42 産生には関与しないことが本研究などにより明らかにされた。そこで逆にこれらの部位が PS1、PS2 のどのような機能に関わっているかを簡単に考えてみたい。

リンパ球系のアポトーシスを指標とした cDNA 発現スクリーニングにおいて、PS2 の C 末端部分がアポトーシス抑制性の遺伝子としてクローニングされている (Vito et al., 1996)。その後 PS2 を過剰発現した

細胞がアポトーシスをおこすことが報告され、前述したように alternative cleavage がそのネガティブフィードバック的に働くことも予測されている (Wolozin et al., 1996; Janicki and Monteiro, 1997)。当研究室においても、PS2 の発現がスタウロsporin 誘導性のアポトーシスの感受性を高めることが明らかにされ、その効果が PS2 特異的であること、PS1 と相同性の低い PS2 の N 末端部分が重要な役割を果たしていることがわかってきている (当研究室高杉ら、未発表データ)。PS1 ノックアウト動物と異なり、PS2 ノックアウト動物では著しい発生異常は見られなかったが、肺においてわずかに TUNEL 陽性細胞の増加が観察されている (Herreman et al., 1999)。今後 PS1、PS2 ノックアウト動物由来の細胞を用いた検討も進めていく予定である。

その他に PS は細胞内 Ca^{2+} ホメオスタシスに関与しているという報告も多い。細胞内の主な Ca^{2+} ストアである小胞体に PS が存在し、さらに UPR シグナリングに関連する分子であるということを考えると興味深い。特に PS2 は IP_3 レセプターを介した Ca^{2+} 電流の調節を行っているという報告や、PS2 特異的なループ部分に、 Ca^{2+} と結合する EF-hand を持つ μ -calpain、calmyrin、sorcine といった蛋白の相互作用が報告されている (Shinozaki et al., 1998; Leissring et al., 1999; Stabler et al., 1999; Pack-Chung et al., 2000)。これらを考えあわせると、PS2 が何らかの形で Ca^{2+} の調節に関与している、もしくは Ca^{2+} 依存的に何らかの機能を持っている可能性もあると考えられる。

一方 PS1 特異的な機能としては、神経細胞の分化に関与しているという報告がある (Hong et al., 1999)。当研究室においても FAD 変異型 PS1 の発現によってヒト teratocarcinoma 由来の Ntera2 細胞の神経細胞への分化が抑制される現象を確認している (Tokuhiro et al., 1998)。こういった PS1 に特異的な機能は PS1 の N 末端やループ部分に特異的に結合する蛋白に関連しているのかもしれない。特に β カテニンと PS1 については研究が進められており、PS1 が β カテニンの安定性や輸送に影響を与え、下流の転写因子の調節を行っているという報告もある (Zhang et al., 1998; Kang et al., 1999; Nishimura et al., 1999)。 β カテニンは発生過程に重要な役割を果たしている Wntless/Wnt シグナリングに関わる分子であり、その安定性が Wntless/Wnt シグナリングの活性を決定していることがわかっている (Peifer, 2000)。ともに発生に関わるシグナリングである Notch と Wntless/Wnt の調節に PS が関与しているとすれば、病態のみならず基礎生物学的にも PS の研究が寄与するところは大きいといえるだろう。

5-4 まとめ

PS1 の遺伝子変異が早期発症型 FAD の大部分を占めていることから、PS 変異による FAD 発症機構は、AD に共通する発症メカニズムの重要なポイントを加速しているものと思われる。その中で PS 変異が Aβ42 産生・沈着を促進するという結果は、AD 研究における「アミロイド仮説」をさらに強固なものにした。

また PS の研究は AD 研究のみならず、細胞生物学等の様々な分野に大きな影響を及ぼした。特に Notch シグナリングにおいては、PS は長い間謎であった NICD の生成過程に関与しているという意味で、重要な役割を果たしている。さらに Rip という proteolysis の新たな研究分野の中でも、PS は大きな意義を持っているといえる。今後どのような新たな基質が現れてくるのだろうか。興味は尽きない。

PS は動物、植物から粘菌にいたるまで様々な種において保存されているにもかかわらず、*S. cerevisiae* や大腸菌など、単細胞生物ではそのホモログが見出されていない。現在までにわかっている PS ホモログを持つ生物のうち、*Dictyostelium discoideum* は、その生活環においてアメーバ様の単細胞生物期と、胞子体を形成している多細胞生物期をともに持つ生物である。しかし S2P 様の酵素が関与する Rip システムは単細胞生物においても見出されている。こういったことから、PS は多細胞生物において、分化する細胞と分化しない細胞の細胞間認識・分化方向の決定を行う Notch 様シグナリングの中で Rip システムを制御する機能を持った分子なのではないかと考えている。

本研究において見出された「PS の C 末端を介した安定性の獲得が、機能分子となる上で必要である」という結果は、今後こういった基礎生物学的な研究にも何らかの示唆を与えることが期待される。今後は安定性を獲得した PS 複合体の分子的な実態を明確にすることにより、PS の関与する Rip システムの分子メカニズムを明らかにしたいと考えている。