

論文の内容の要旨

論文題目

遺伝学的アルツハイマー病予防因子 *PICALM/CALM* の病的機能解明に関する研究

氏名 金津 邦彦

【序論】

アルツハイマー病 (AD) は老年期認知症の大半を占める神経変性疾患であり、患者脳において老人斑として蓄積するアミロイドβペプチド (Aβ) がその発症と密接に関連している。Aβは前駆体タンパク質 (APP) よりβ-, γ-secretase による連続した2段階の切断を受けて産生される。AβのC末端長には多様性が認められ、そのうち主要なものは40もしくは42アミノ酸からなるAβ40およびAβ42である。特にAβ42は毒性および凝集性が高く、また優性遺伝形式を示す家族性ADに連鎖する遺伝子変異はAβ42産生比率を上昇させることから、γ-secretase活性の制御によりAβ42産生比率を抑制させることがADの治療・予防において重要であると考えられている。

近年、Genome-wide association study (GWAS) により、遺伝学的AD予防因子として *Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein (PICALM)* 遺伝子が同定された。*PICALM* 遺伝子にコードされている *CALM* タンパク質はクラスリン依存的エンドサイトーシス (CME) に関わる分子であることが知られているが、AD発症メカニズムに及ぼす影響については未だ明らかになっていない。そこで私は、*CALM* がAD病態形成に寄与する分子機構の解明を目的として研究を進め、*CALM* がγ-secretaseのCMEを特異的に制御することを見出した。そして*CALM* ノックダウンによりγ-secretaseの細胞内局在が後期エンドソームから細胞表面膜へとシフトし、Aβ42産生比率が低下することを明らかにした。そこで本研究では引き続き、*CALM*の分子機能とAβ産生機構の連関、および*in vivo*における*CALM*のAβ蓄積病態への影響を解析した。

【方法・結果】

1. CALM の PtdIns(4,5)P₂ 結合能が γ -secretase の CME を介して A β 42 産生比率を制御する

CALM は PtdIns(4,5)P₂ およびカーゴ分子と結合する ANTH ドメインを N 末端側に持ち、C 末端側には CME 関連分子との結合モチーフを持っている (Fig. 1A)。まず私は ANTH ドメインの A β 産生への影響を調べるため、ANTH ドメインを欠損させた CALM- Δ N を発現させた Neuro2a 細胞からの分泌 A β 測定を行った結果、分泌される A β 42 比率が有意に低下していた (Fig. 1B, C)。また CALM- Δ N 発現群においては、活性型 γ -secretase の構成因子である成熟型 Nct (mNct) の細胞表面量の増加も観察された (Fig. 1D)。これらの結果は CALM ノックダウン細胞においてみられる表現型と類似しており、ANTH ドメインが γ -secretase のエンドサイトーシスおよびそれを介した A β 42 産生活性制御に重要であることを示唆している。次に私は ANTH ドメインと PtdIns(4,5)P₂ の相互作用が上記の A β 42 産生活性制御に重要であるか否かを検証するために、X 線結晶構造解析から PtdIns(4,5)P₂ 結合に関連すると思われるリジン残基に変異を導入した変異体 CALM-KKK/EKE を解析した。その結果、CALM- Δ N と同様の A β 42 比率低下および細胞表面 mNct 量の増加が観察された (Fig. 1B-D)。これらの結果から、ANTH ドメインの機能、特に PtdIns(4,5)P₂ 結合能が γ -secretase 内在化を介した A β 42 産生活性を制御することが明らかになった。

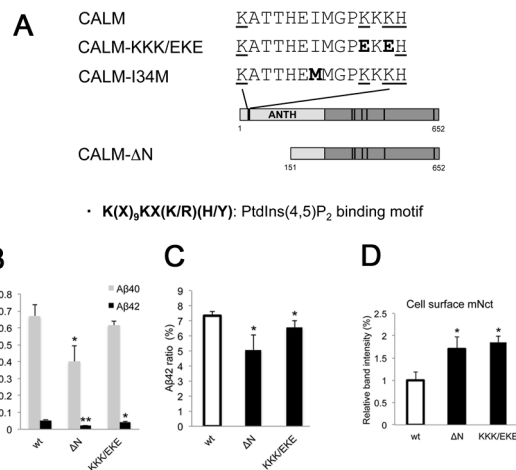


Fig. 1 ANTH ドメインの A β 産生機構への影響解析

(A) 実験で用いた CALM 変異体の模式図 (B) CALM- Δ N, KKK/EKE を発現させた N2a 細胞からの分泌 A β 量測定 (n=5, *p<0.05, **p<0.005) (C) (B) における A β 42 比率 (n=5, *p<0.05) (D) 細胞表面 mNct の定量 (n=3, *p<0.05)

2. Rare variant である I34M 変異は PtdIns(4,5)P₂ および γ -secretase との相互作用における loss of function 変異体である

最近、PICALM 遺伝子にアミノ酸置換を伴う rare variant が報告された。その 1 つは I34M 変異を引き起こすが、この変異は PtdIns(4,5)P₂ 結合モチーフの近傍に位置し (Fig. 1A)、A β 42 産生および PtdIns(4,5)P₂ 結合能を変化させる可能性が考えられた。そこでまず私は CALM-I34M 発現細胞を解析した。その結果、分泌 A β 42 比率の低下および細胞表面 mNct 量の増加が観察された (Fig. 2A-C)。これは CALM- Δ N や CALM-KKK/EKE 発現細胞と同様の傾向であり、I34M 変異には A β 42 産生および γ -secretase 内在化を低下させる「CALM 機能低下効果」があることが示唆された。

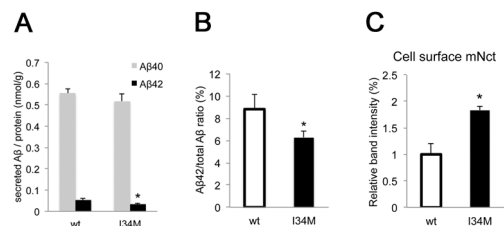


Fig. 2 I34M variant の A β 産生機構への影響解析

(A) CALM-I34M を発現させた N2a 細胞からの分泌 A β 量測定 (n=5, *p<0.05) (B) (A) における A β 42 比率 (n=5, *p<0.05) (C) 細胞表面 mNct の定量 (n=3, *p<0.05)

次に、I34M 変異の PtdIns(4,5)P₂ 結合能における影響をリポソーム共沈降実験により評価した。

GST-CALM-ANTH タンパク質は PtdIns(4,5)P₂ を含むリポソームによって特異的に沈降し、この沈降が KKK/EKE 変異によってほぼ消失することが確認された。このとき I34M 変異を含む GST-CALM-ANTH タンパク質において、結合比率の有意な低下がみられたことから、I34M 変異が PtdIns(4,5)P₂ 結合能に影響することが明らかになった (Fig. 3A)。ANTH ドメインは脂質の他にカーゴタンパク質との結合も担っており、私は修士課程において CALM の ANTH ドメインが Nct と結合することを明らかにしている。興味深いことに、GST pull-down 実験において I34M 変異が Nct との結合も有意に低下させるという結果が得られた (Fig. 3B)。一方、KKK/EKE 変異は Nct との結合に影響を与えなかったことから、CALM による γ -secretase の認識には PtdIns(4,5)P₂ との相互作用は必要ではないことが示唆された。以上の結果より、I34M 変異は CALM の PtdIns(4,5)P₂ および γ -secretase との結合能を低下させる変異であり、その結果 γ -secretase の内在化誘導能が低下し A β 42 産生比率を低下させることが明らかになった。

3. CALM の部分欠損は *in vivo* における脳内 A β 42 量および A β 斑蓄積を減少させる

最後に、CALM の A β 病態形成への影響を *in vivo* で検討するために、*Picalm*^{+/-}マウスと AD モデルマウス A7 を掛け合わせ、解析した。特に A7 を含めた多くの AD モデルマウスにおいて A β 斑蓄積が早期かつ顕著に観察される梨状皮質に着目した。生化学的解析を行ったところ、RIPA 可溶性画分の A β 量には差がみられなかったのに対し、RIPA 不溶性画分における A β 42 量の有意な減少がみられた (Fig. 4A)。また A β 斑蓄積を免疫組織化学により評価したところ、A7/*Picalm*^{+/-}マウスにおいて A β 斑の有意な減少がみられた (Fig. 4B、C)。以上の結果より、CALM が *in vivo* における A β 病態形成に寄与することが明らかになった。

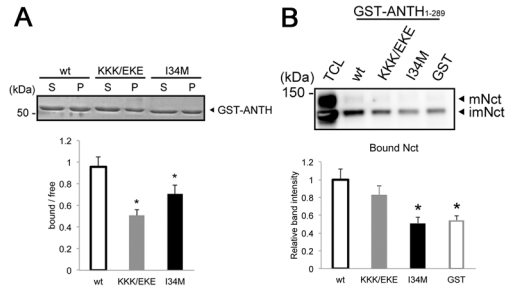


Fig. 3 I34M variant の結合能への影響解析

(A) リポソーム共沈降実験による PtdIns(4,5)P₂ 結合能評価 (n=3、*p<0.05) (B) GST pull-down 実験による Nct 結合能評価 (n=3、*p<0.05)

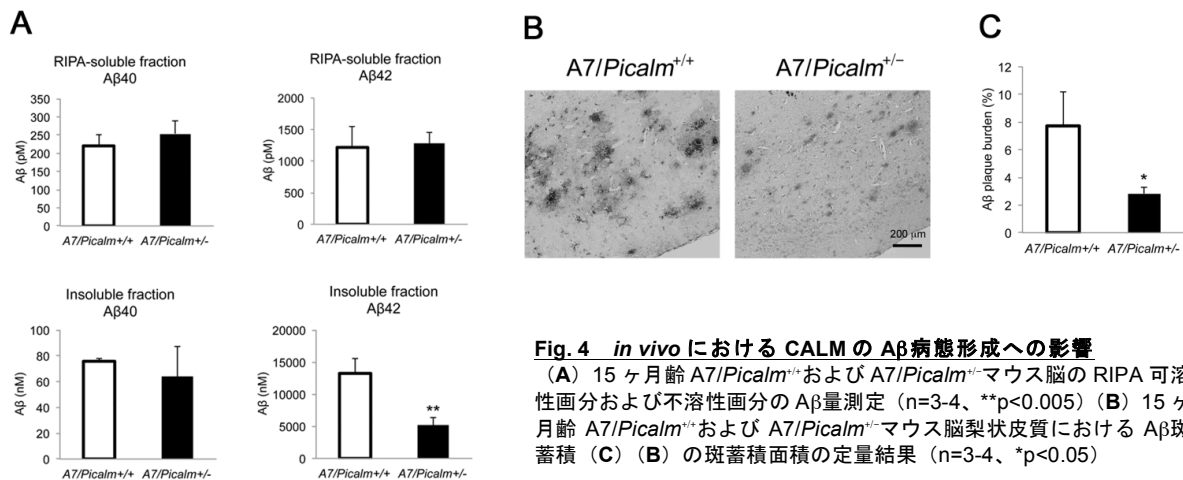


Fig. 4 *in vivo* における CALM の A β 病態形成への影響

(A) 15ヶ月齢 A7/*Picalm*^{+/+}および A7/*Picalm*^{+/-}マウス脳の RIPA 可溶性画分および不溶性画分の A β 量測定 (n=3-4、**p<0.005) (B) 15ヶ月齢 A7/*Picalm*^{+/+}および A7/*Picalm*^{+/-}マウス脳梨状皮質における A β 斑蓄積 (C) (B) の斑蓄積面積の定量結果 (n=3-4、*p<0.05)

【総括】

本研究において私は、CALM の機能、特に PtdIns(4,5)P₂ 結合能が γ -secretase の CME を介した A β 42 産生制御に重要であることを解明した。さらに CALM の部分的機能欠損が A β 斑蓄積を低下させることも示した。すなわち、「CALM がカーゴアダプターとして γ -secretase の CME を制御し、A β 42 産生活性の高い後期エンドソームからリソソームにおける γ -secretase による切断を亢進させる結果、AD の病態形成に寄与する」という作用機序が明らかとなり (Fig. 5)、遺伝学的予防因子である CALM の機能制御による AD 治療・予防薬開発が期待される。と同時に、細胞内小胞輸送関連分子である CALM の部分的機能欠損により副作用なく A β 蓄積病態を特異的に抑制できたことから、特異性を出しづらく創薬標的分子機構としては適さないと捉えられてきた細胞内小胞輸送の制御による新たな創薬の可能性を示唆するものと考えている。

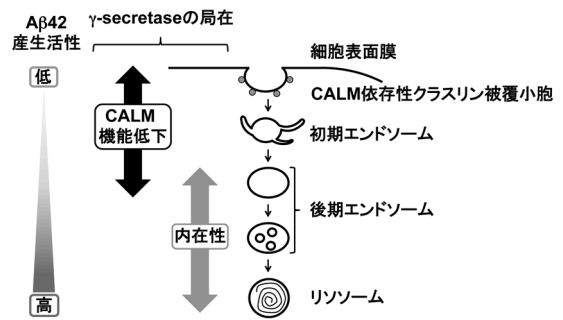


Fig. 5 本研究結果から得られたメカニズム概念図