

博士論文

論文題目 プレセニリン、Aph1 の違いが γ -セクレターゼ機能に及ぼす影響

氏名 米村 洋而

目次

略語一覽	2
1. 序論	3
2. 材料	12
3. 方法	21
4. 結果	28
5. 考察	49
6. 参考文献	53
謝辞	61

略語一覧

A β	amyloid β protein	アミロイド β タンパク質
AD	Alzheimer's disease	アルツハイマー病
APP	amyloid precursor protein	アミロイド前駆体タンパク質
APS	ammonium persulfate	過硫酸アンモニウム
AICD	APP intracellular domain	APP 細胞内ドメイン
Aph-1	anterior pharynx-1	
BACE1	β -site APP-cleaving enzyme 1	
CHAPSO	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-2- -hydroxy-1-propanesulfonic acid	
CTF	C-terminal fragment	C 末端断片
DAPT	<i>N</i> [<i>N</i> (3,5-difluorophenacetyl)- <i>L</i> -alanyl]- <i>S</i> -phenylglycine t-butyl ester	
DMSO	dimethyl sulfoxide	ジメチルスルホキシド
DNA	deoxyribo nucleic acid	デオキシリボ核酸
DTT	dithiothreitol	ジチオスレイトール
FAD	familial Alzheimer's disease	家族性アルツハイマー病
HRP	horseradish peroxidase	
L-685,458	5 <i>S</i> -(tert-Butoxycarbonylamino)-6-phenyl-(4 <i>R</i>)-hydroxy- (2 <i>R</i>)-benzylhexanoyl)- <i>L</i> -leucyl- <i>L</i> -phenylalaninamide	
NCT	nicastrin	ニカストリン
NSAIDs	non-steroidal anti-inflammatory drugs	非ステロイド性抗炎症薬
NTF	N-terminal fragment	N 末端断片
ONPG	<i>o</i> -nitrophenyl- β - <i>D</i> -galactopyranoside	
PBS	phosphate-buffered saline	リン酸緩衝生理食塩水
PC	phosphatidyl choline	ホスファチジルコリン
PCR	polymerase chain reaction	ポリメラーゼ連鎖反応
Pen-2	presenilin enhancer-2	
PEG	polyethylene glycol	ポリエチレングリコール
PS	presenilin	プレセニリン
RNA	ribonucleic acid	リボ核酸
SDS	sodium dodecyl sulfate	ドデシル硫酸ナトリウム
TBS	Tris-buffered saline	トリス緩衝生理食塩水
TEMED	tetramethylethylene diamine	テトラメチルエチレンジアミン

1. 序論

アルツハイマー病

アルツハイマー型認知症 (AD) は認知機能低下や人格障害などの症状を呈する認知症のひとつである。この病気は 1906 年アロイス・アルツハイマー博士が、初老期型認知症と診断されていたアウグステ D という患者の剖検脳を観察し、後に老人斑、神経原繊維変化 (NFT) と呼ばれる病変について報告したのが最初である。この老人斑と神経原繊維変化という 2 つがアルツハイマー病の病理学的特徴とされている。電子顕微鏡を用いた解析や生化学的解析が進み、老人斑を構成するタンパク質はアミロイドβペプチド (Aβ) であることが明らかとなった(1-4)。また NFT は神経細胞内に Paired Helical filament (PHF) と呼ばれる繊維状成分の凝集体をつくっていることがわかり、これらは高度にリン酸化されたタウタンパク質であることが明らかにされた(5-8)。Aβは前駆体タンパク質 APP (Amyloid precursor protein) がβ-セクレターゼ(β-site APP-cleaving enzyme 1: BACE1)によって切断され、C 末端側の 99 アミノ酸 (C99) がγ-セクレターゼによる切断を受けて産生されることが明らかになった (図 1. Aβ産生経路) (9)。Aβはγ-セクレターゼの切断部位によって長さ (アミノ酸残基数) の異なるさまざまな Aβを産生するが、主にアミノ酸 40 個の Aβ40 と 42 個の Aβ42 を 9:1 で産生する (詳しくは後述する)。APP はα-セクレターゼによる切断も受け、この場合続いてγ-セクレターゼによる切断の結果、Aβではなく、毒性のない p3 を産生する (図 1. 非 Aβ産生経路) (9)。

アルツハイマー病のうち 1~5%以下といわれる家族性アルツハイマー病 (FAD: Familial AD) は常染色体優性遺伝であり、発症年齢が 60~65 歳以下と比較的若いのが特徴である。FAD を引き起こす変異は APP に 24 ケ、γ-セクレターゼの活性中心であるプレセニリン 1 (PS1) に約 160 ケ、PS1 のホモログ PS2 に約 10 ケ所報告されている(10)。APP の Swedish 型変異はβ-セクレターゼ(3)による切断サイト付近に存在し、β-セクレターゼによる切断が亢進する結果、Aβの産生量が増加することが知られている。また APP の London 型変異や Indiana 型変異は Aβ46 付近に変異があり Aβ42 産生が亢進される(11)。PS の変異は特定の部位ではなく広く全体にみられる (図 2)。ほとんどの FAD 変異型 PS をもつ人では Aβ42 の Aβ40 に対する割合 (Aβ42 産生比率) の上昇が確認されている(12-15)が、Aβ42 産生比率の上昇には 3 つのタイプが存在する。それは、Aβ40 が減少するタイプ、Aβ42 産生が上昇するタイプ、Aβ40 が減少し、Aβ42 が上昇するタイプである(16)。

これに対して AD のほとんどを占めるのは孤発性であり、60~65 歳以上に発症する。危険因子として *APOEε4* が知られている(17)。また最近の大規模ゲノムワイド解析からアルツハイマー病発症と関連のある遺伝子が新たにいくつか報告された(18)。これら

の遺伝子がどのようにアルツハイマー病を引き起こしているのか調べることで FAD と 孤発性 AD との詳細な違いが明らかになってくると考えられる。

アミロイド仮説

アルツハイマー病の発症機序として有力な説はアミロイド仮説と呼ばれる説である(19)。これは、脳でアミロイド β の凝集・蓄積が先行して起こり、その後にタウの過剰リン酸化が起こって、神経細胞死を招き、記憶障害などの症状を呈するようになるというものである。過去には、線維化した A β によって神経細胞死などが引き起こされると考えられていたが、老人斑と神経細胞死の程度が一致しないことが報告され(20)、2002年には A β オリゴマーがシナプス可塑性を阻害することが病因であるとする説が登場した(21,22)。毒性を持つ A β オリゴマーの大きさについては 2 量体、12 量体などさまざまな報告がある(23-26)。また近年、老人斑を形成しない 693 番目のグルタミン酸が欠損した FAD 変異型 APP (E693 Δ) が見つかった。この変異型 APP のトランスジェニックマウスは 8 ヶ月齢でオリゴマー A β の蓄積がニューロン内でみられる一方、老人斑の蓄積は 24 ヶ月齢でも認められなかった。また 8 か月齢より行動テストで異常がみられ、タウの異常リン酸化など AD でみられる病理変化がオリゴマー A β だけで観察された(27)。こういったことから、現在は繊維化する前のオリゴマー A β に神経毒性があると考えられている。

A β を標的とした抗 A β 抗体療法の治験で、A β を取り除くことでは症状を改善できなかったことから、A β が発症の原因ではないのではないかという見方も出てきた。しかし、最近アイスランド人のアルツハイマー病を発症していない高齢者から新たに見つかった APP の変異 (A673T) では APP の BACE1 による切断が起こりにくくなっており、*in vitro* では 40%の A β 産生の低下がみられたとの報告がある(28)。また α -セクレターゼのひとつである ADAM10 過剰発現マウスと AD モデルマウス Tg2576 をかけあわせると、A β 産生が減少し、海馬での神経再生も進んだという報告もある(29)。これらはアミロイド仮説を支持する結果であり、A β の産生によって AD が引き起こされるのはほぼ間違いないであろう。重要なのは、治療あるいは予防を開始する時期であるということがわかってきた。

A β 分子種

アルツハイマー病の脳では、A β は主に40アミノ酸のA β 40と42アミノ酸のA β 42がおおよそ9:1の割合で産生されるといわれている。A β 42はA β 40よりも凝集性が高く(30)、FAD 変異ではA β 42の産生比率 (A β 42/A β 40) が上昇することなどから、主にA β 40とA β 42が注目されてきた。しかし、これら2つのA β に加えて、近年、A β 43の存在と、その重要性が指摘された(31)。この論文において斉藤らは、A β 43特異的な抗体を用いてA β 43が老人

斑の中心にあって凝集の核となっていることを示した。またA β 43は、これまで凝集がA β 40に比べて速いといわれてきたA β 42よりも速く凝集することも明らかにした。細胞毒性についても検討しており、A β 43はA β 42よりも毒性が高いことがわかった。今後の研究においては、A β 40、A β 42に加えてA β 43についても注意していく必要があることが示唆された。

各A β 分子種はトリペプチド仮説と呼ばれる仮説に基づいて産生されると考えられている。この仮説ではC99がまず ϵ 切断と呼ばれる切断を受け、A β 49またはA β 48とこれに対応するAPP Intracellular Domain (AICD)を産生する(図3)。つづいてA β 49、A β 48は3または4残基ずつ γ -セクレターゼによる切断を受けて最終的にA β 37~A β 43を産生すると考えられている(32)(図3)。

γ -セクレターゼと各サブユニットの機能

γ -セクレターゼは、活性中心であるプレセニリン(PS)、ニカストリン(NCT)、Aph1、Pen2の4つを最小構成因子とし機能を有することが2003年に明らかとなった(33-35)。その後、2007年に共免疫沈降による実験で活性をもつ γ -セクレターゼ複合体中に含まれる4つのタンパク質は1:1:1:1の比率であると報告された(36)。またPS1とPS2が同じ複合体中に存在しないこと、Aph1aL、Aph1aS、Aph1bが互いに同じ複合体中に存在しないことも示された(36)。

PSは、PS1とPS2の2つのホモログが存在する9回膜貫通タンパク質である(37)。活性中心のアスパラギン酸は、第6と第7膜貫通ドメインに存在する(38,39)。PS1、PS2ともに脳を含む全身に発現している(40)が、脳でどちらが多く発現しているかについては報告がない。上述のとおり、FAD変異型PSの過剰発現はA β 42の産生比率の上昇と結びついており、A β 42/A β 40の上昇がADの発症と深く関わっていると考えられている。

Aph1は7回膜貫通タンパク質(41)でAph1aとAph1bが存在する。マウス脳におけるAph1a、bの発現は海馬では同等であることがわかっている(42)。Aph1aのノックダウンはPSのタンパクレベルの低下、などが観察されており、 γ -セクレターゼ構成タンパク質の安定化に寄与することを示唆するデータが報告されている(43)。一方Aph1bのノックダウンはPS、NCT、Aph1a、Pen2の量に影響をほとんど与えないことが報告されている(43)。2009年にはAph1bをもつ γ -セクレターゼはAph1aをもつ γ -セクレターゼに比べてA β 42(43)を多く産生する一方、 γ -セクレターゼの基質のひとつで細胞の分化に関連があるNotch1の切断にはあまり関わらないとする報告がされた(42)。

NCTは一回膜貫通タンパク質で、大きな細胞外ドメインが γ -セクレターゼの基質を認識し活性中心に運び入れる役割を持っているという報告がなされた(44)が、酵母再構成系を用いた当研究室の先行研究で特定のPS1二重変異ではNCTがなくてもAPPやNotch切断活性を有することを発見した(45)。

Pen2 は二回膜貫通タンパク質で、PS の第 6 膜貫通領域と第 7 膜貫通領域の間で自己消化を促す役割を持つと考えられ、Pen2 のノックダウンにより全長の PS が蓄積し、N 末側断片 (NTF) と C 末側断片 (CTF) が減少する(35)(46)。

γ-セクレターゼ複合体の形成過程

γ-セクレターゼがどういう順番で複合体形成をしていくのかについては2つの考え方がある。NCT と Aph1 のサブコンプレックスが始めに形成され、ここに PS が加わり、最後に Pen2 が結合してγ-セクレターゼ複合体が出来上がる(47,48)。または、NCT/Aph1 に PS/Pen2 が結合することでγ-セクレターゼが完成すると考えられている(49)。PS は Pen2 と結合することで自己消化を起こして N 末側断片 (NTF) と C 末側断片 (CTF) となり安定化し、活性をもつようになる。

γ-セクレターゼの立体構造

γ-セクレターゼが基質を切断する際、膜内においてどのように水分子を取り込んで加水分解を起こすのかという問題があったが、SCAM (substituted cysteine accessibility method) という、親水性環境でチオール基と反応する MTS 試薬を用いたシステイン導入部位の親水性環境を評価する実験により、第 1 膜貫通領域、第 6 膜貫通領域、GXGD モチーフのある第 7 膜貫通領域、PAL モチーフ周辺と 9 膜貫通領域が親水性ポアを形成していることが明らかとなっており(50-52)、このポアで膜内切断が起きていると考えられている。

また Aβ₄₂ の産生の亢進と PS の N 末側断片 (NTF) と C 末側断片 (CTF) の立体構造の変化の報告もなされている。これによると PS の NTF と CTF の距離が小さくなる (closed 型) と、大きいとき (open 型) に比べて Aβ₄₂ の産生が亢進する(53) (54)。Pen2 の N 末端側にタグを付加することで、活性中心ポアの構造変化と Aβ₄₂ の産生上昇がみられたという報告もあり(55)、これも NTF と CTF によって形成される活性中心ポアの構造の変化によって産生される Aβ分子種が変わってくることを裏付ける結果である。

γ-セクレターゼ活性の調節因子

γ-セクレターゼは 4 つのタンパク質から構成される複合体プロテアーゼであると述べてきたが、活性や基質選択性などの機能に影響を与える結合タンパク質の存在がいくつか報告されている。CD147 (basigin と呼ばれる) は、がん細胞に高発現している膜糖タンパク質で、CD147 のノックダウンによってγ-セクレターゼは Aβ産生を上昇させることが報告されている(56)。TMP21 (p24 cargo ファミリー) はε切断には影響を与えないがγ切断活性を抑制することが報告された(57)。GSAP (gamma-secretase activating protein) は 2010 年に報告された調節因子で、APP とγ-セクレターゼの両方に結合する

ことで γ -セクレターゼの APP 切断活性を上昇させるが、Notch の切断には影響を与えない(58)。しかし、最近になって GSAP の効果が再現できないという報告がなされており(59)、議論の余地があるといえる。GSAP のように Notch の切断に影響を及ぼさずに APP の切断活性を変えることが示唆されている調節因子の報告はあるが、現在までにこの逆の活性を示す調節タンパク質、つまり APP 切断に影響を与えず、Notch 切断活性を変えるものについては報告がないものの、存在しても不思議ではない。このように調節タンパク質によって γ -セクレターゼは 60 以上あるといわれる基質を選択しているのかもしれない。

γ -セクレターゼをターゲットとした治療

γ -セクレターゼ活性を抑制することで A β 産生の抑制は可能であるが、細胞分化や運命決定に重要な役割を果たす Notch シグナルの阻害による副作用が問題視されている。これらの問題を避けるものとして、Notch1 切断活性、A β 産生量は変えずに産生される A β の分子種だけを変える (A β 42 産生比率を下げる) という γ -セクレターゼモジュレーターや、Notch の切断活性は保ったまま APP の切断を抑制する Notch-sparing タイプの化合物が治療薬として期待されている。

本研究の目的

γ -セクレターゼは A β 産生過程の最終段階にかかわるプロテアーゼであり、この切断によって毒性の高い A β 42 または 43 となるか、そうでない 40 となるのかが決定される。したがって、この酵素についての詳細な解析はアルツハイマー病の予防や治療を考えるにあたって最も重要な研究と考えられる。それにもかかわらず、 γ -セクレターゼについて得られてきた知見のなかで PS、Aph1 の両方の違いに着目したものはこれまでになかった。

γ -セクレターゼは異なる 6 種類の組み合わせが存在し、どの組み合わせでも A β を産生することについてはわかっていた(43)が、これらの γ -セクレターゼの基質の選択性や A β 分子種の違いについては調べられてこなかった。現在までに行われた先行研究では、Aph1 ダブルノックダウン細胞に任意の Aph1 分子を過剰発現し、Aph1 による違いを見た研究(43)とマウスの Aph1 ノックアウト細胞に Aph1a、b のいずれかを過剰発現した研究がある(42)。また PS1、PS2 の違いについての先行研究もいくつかあるが、これら PS、Aph1 の両方の違いによる γ -セクレターゼへの影響を見たものはこれまでになかった。私は、 γ -セクレターゼホモログを持たない酵母を用いてひとつひとつの γ -セクレターゼを再構成することで、これらの γ -セクレターゼの違いを明らかにできると考えた。当研究室で立ち上がった酵母を用いた γ -セクレターゼの再構成系は次の点で優れている。まず、容易に任意の組み合わせで γ -セクレターゼを酵母内で再構成できること。遺伝子導入されたことの確認が栄養要求性を利用することで簡単にでき、さらに酵母転写

因子 Gal4 融合基質を共発現させることで、再構成 γ -セクレターゼによる切断活性を Gal4 下流の遺伝子発現でモニターできること。さらに、酵母形質転換体の膜画分を用いた γ -セクレターゼの *in vitro* アッセイが確立されていることである。この膜画分を用いた *in vitro* アッセイ系は、哺乳類細胞の膜画分を用いた γ -セクレターゼの *in vitro* アッセイ系で見られた結果を再現しており(60)、哺乳類細胞と共通の、あるいは哺乳類細胞と近い機構で γ -セクレターゼが働くことを示唆していると考えられる。この酵母再構成系を用いて、ひとつひとつの γ -セクレターゼの違いを明らかにすること、明らかになった違いによって新たなアルツハイマー病予防治療の戦略が考えられるのかどうか検討することを、本研究の目的とした。

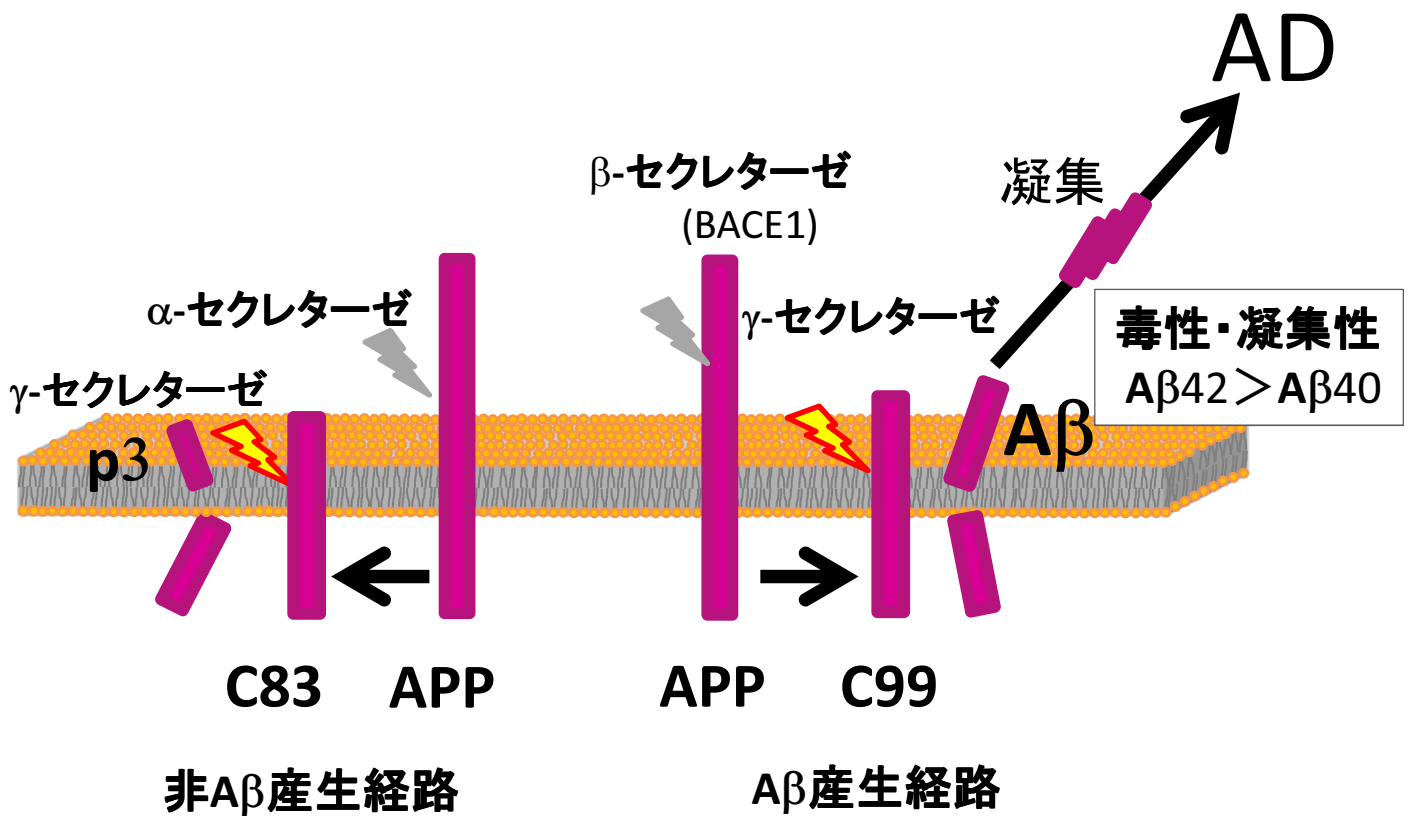


図1. APPの代謝経路

APPの代謝経路はAβを産生する経路と、産生しない経路がある。Aβ産生経路では、APPはβ-セクレターゼによる切断を受け、続いてγ-セクレターゼがC99を切断することでAβが産生される。非Aβ産生経路ではα-セクレターゼによってAPPが切断され、この切断によって生じるC83をγ-セクレターゼが切断する。このときAβではなく毒性のないp3が産生される。

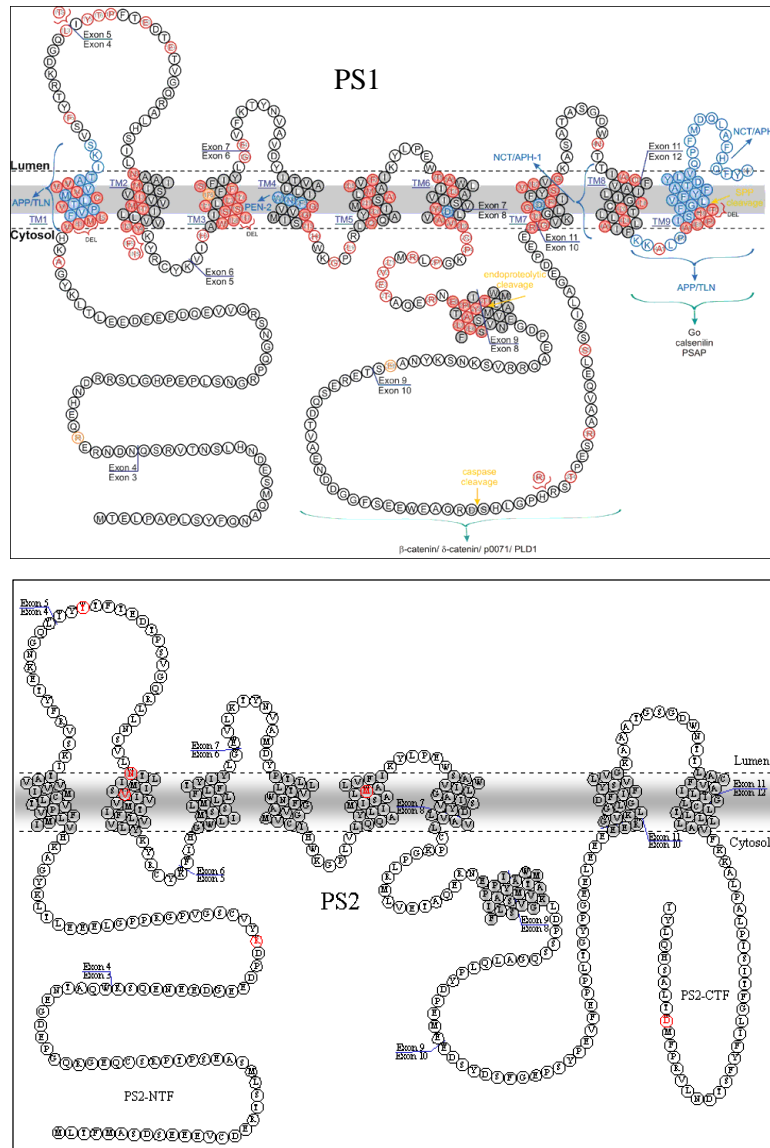
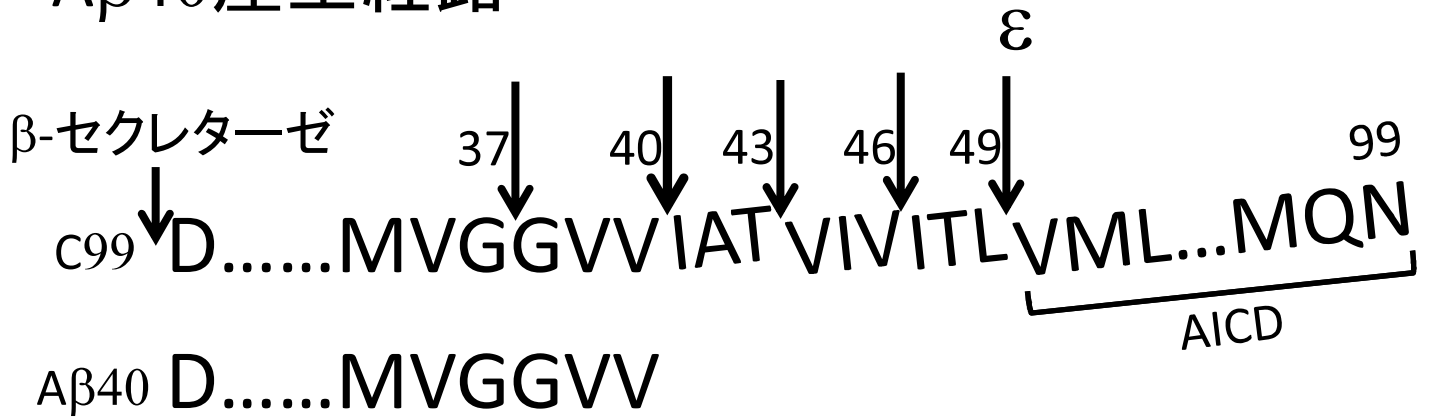


図2. PSのFAD変異の部位

PS1とPS2におけるFAD変異の部位が赤で示されている。変異は特定の部位ではなく全体に散らばっている。図はAlzforumより抜粋。PS1は2006年時点のデータ、PS2は2003年時点のデータである。

Aβ40産生経路



Aβ42産生経路

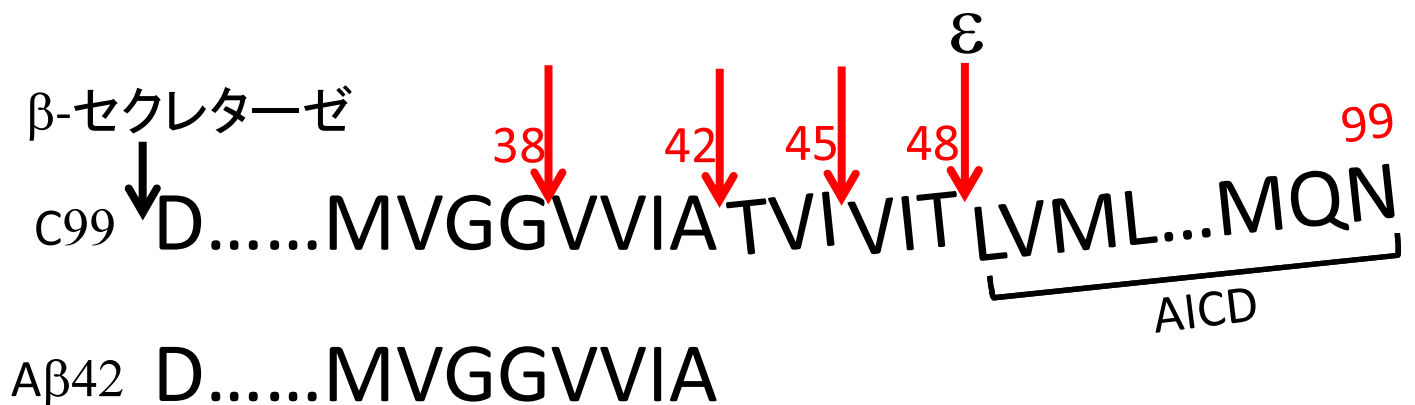


図3. トリペプチド仮説

C99はまずγ-セクレターゼによるε切断を受け、そこから3アミノ酸ずつ切断されて、Aβ40またはAβ42を産生するという説。はじめのε切断の位置によって産生されるAβ分子種が異なる。C99のC末端側にはε切断の位置二応じてC50-99またはC49-99のAICDが生じる。

2. 材料

キット類

キット類は以下の会社のものを用いた

- ・プラスミド抽出キット (Sigma)
- ・ラピッド DNA ライゲーションキット (Roche)
- ・ゲル抽出キット (Sigma)
- ・各種制限酵素
- ・A β ELISA kit (IBL 社)
 - Human A β 40 (1–40) Assay kit,27718
 - Human A β 42 (1–42) Assay kit,27719
 - Human A β 43 (1–43) Assay kit,27710
- ・ GenElute Mammalian Total RNA Purification Kit (Sigma)

酵母 (*S. cerevisiae*)

使用した酵母株は以下のものである

- ・ PJ69-4A (61)
(MATa, trp1-901, leu2-3, 112 ura3-52, his3-200, gal4 Δ gal80 Δ LYS2::GAL1-HIS3, GAL2-ADE2, met2::GAL7-lacZ)
- ・ PJ69-4A Δ pep4
(MATa, trp1-901, leu2-3, 112,ura3-52, his3-200, gal4 Δ gal80 Δ LYS2:: GAL1-HIS3, GAL2-ADE2, met2::GAL7-lacZ, pep4::kanMX)

細胞

用いた細胞は以下のとおりである。

- ・ Human Embryonic Kidney (HEK) 293 細胞 (62)
- ・ BACE1 安定発現 HEK293 (63)
- ・ Swedish 変異型 APP 安定発現 SH-SY5Y (64)
SH-SY5Y 細胞…ヒト神経芽腫細胞

siRNA

PS1 用 : Silencer Select Validated siRNA (Ambion ID: s111)

PS2 用 : Silencer Select Validated siRNA (Ambion ID: s11294)

Aph1a 用 : Silencer Select Pre-designed siRNA (ID:s27451)

Aph1b 用 : Silencer Select Pre-designed siRNA (ID:s224902)

プラスミド

プラスミドは以下のものを用いた。

酵母形質転換用

- pBEVY-T PS1 または PS2 を pBEVY-T ベクターの *Kpn*I サイトに、NCT を *Xba*I サイトにクローニングしたものを使用した。
- pBEVY-L Flag-Pen2 を pBEVY-L ベクターの *Kpn*I サイトに、Aph1aL(aS, b)-HA を *Xba*I サイトにクローニングしたものを用いた。
- p426ADH p426ADH ベクターの *Bam*HI、*Eco*RI サイトに C55-Gal4、Notch1-Gal4、C55、C99 がクローニングされてあるものを用いた。基質には酵母インベルターゼ (*SUC2*) のシグナル配列を付加し、膜へ局在するようにしてある。

細胞へのトランスフェクション用

pCSmNotch1-Myc (65)

γ -セクレターゼの直接の基質となるマウス Notch1 の部分配列で、C 末端側には Myc タグが融合してある(Raphael Kopan 博士よりご供与いただいた)

抗体

一次抗体には以下のものを使った。

- ・マウスモノクローナル抗 A β 抗体 82E1 (IBL)
- ・マウスモノクローナル抗 HA 抗体 12CA5 (Roche)
- ・マウスモノクローナル抗 FLAG 抗体 M2 (Sigma)
- ・ラビットモノクローナル抗 NICD 抗体 #4147 (Cell Signaling)
- ・ラビットポリクローナル抗 PS1CTF 抗体 G1L3*
- ・ラビットポリクローナル抗 PS2CTF 抗体 G2L*
- ・ラビットポリクローナル抗 Pen2 抗体 PNT3*
- ・モルモットポリクローナル抗 NCT 抗体 AB5890 (Chemicon)
- ・ラビットポリクローナル抗 Aph1aL 抗体 O2C2 (Covance)
- ・ラビットポリクローナル抗 Actin 抗体 A2066 (Sigma)

* G1L3、G2L、PNT3 は東京大学医学部岩坪威教授よりご供与いただいた

二次抗体として次のものを使用した。

- ・ウマ抗マウス抗体 (HRP 標識) #7076 (Cell Signaling)
- ・ヤギ抗ラビット抗体 (HRP 標識) #7074 (Cell Signaling)
- ・ロバ抗モルモット抗体 (HRP 標識) AP193P (Chemicon)

試薬

SDS-PAGE、ウェスタンブロット関連試薬

49.5%T/3%C Acrylamide mix

アクリルアミド 48 g

ビスアクリルアミド 1.5 g

Milli Q で 100 ml メスアップした。

40%T/3.3%C Acrylamide mix (nacalai tesque)

30%T/3.3%C Acrylamide mix (nacalai tesque)

ゲルバッファー (pH 8.45)

Tris 363.3 g

SDS 3 g

Milli Q で 1 l にし、25°C で pH 8.45 に合わせた。

40%(v/v) Glycerol

Lower バッファー Tris/Cl (pH 8.8) 1.5 M

SDS 1.6 %

Upper バッファー Tris/Cl (pH 6.8) 0.5 M

SDS 1.6 %

10% (w/v) APS

TEMED

10× Anode Buffer

Tris 242.2 g を 1 l となるように Milli Q 水に溶かし、HCl で pH 8.9 にした。

使用時は Milli Q 水で 10 倍希釈して使用した。

10×Cathode Buffer

Tris 121.1 g、Tricine 179.17 g、SDS 10 g を Milli Q 水に溶かし、1 l にメスアップした。使用時は Milli Q 水で 10 倍希釈して使用した。

10×Running buffer

Tris 30.3 g、Glycine 144.13 g、SDS 10 g を水に溶かし、1 l にメスアップした。使用時に Milli Q 水で 10 倍希釈して使用した。

Blotting buffer

Tris 30.28 g と Glycine 146.39 g を Milli Q 水に溶かし 1 l にし、10×Blotting buffer とした。使用時は Milli Q 水:メタノール:10×Blotting buffer が 7:2:1 となるように希釈して使った。

検出試薬

次の試薬を検出するタンパク質に応じて使い分けた。

ECL Plus、ECL Advance、ECL Prime、ECL Select (GE Healthcare)

Luminata Forte (Millipore)

10×PBS

NaCl	80 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	29 g
KCl	2 g
KH ₂ PO ₄	2 g

Milli Q 水で 1 l にする。

1×PBS

10×PBS を Milli Q 水で 10 倍に希釈して使用した。

20×TBS

Tris	121.14 g
NaCl	175.32 g

Milli Q で 1 l にメスアップした。

TBST

20×TBS	50 ml
Milli Q 水	945 ml
20% Tween	5 ml

2×SDS サンプルバッファー

SDS	2 g
Glycerol	10 ml
1M Tris/Cl (pH6.8)	8 ml

Milli Q で 50 ml にし、フェノールレッドを 20 mg 加えた。

免疫沈降関連試薬

IP バッファー	HEPES(pH 7.4)	50 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	2 mM

酵母膜画分調製関連試薬

γバッファー	PIPES (pH 7.0)	50 mM
	Sucrose	250 mM
	EGTA	1 mM

B88	HEPES (pH6.8)	20 mM
	Sorbitol	250 mM
	KOAc	150 mM
	Mg(OAc) ₂	5 mM

Sucrose solution

	HEPES (pH 7.4)	20 mM
	KOAc	50 mM
	EDTA	2 mM
	1.2M または 1.5M sucrose	

Tris+DTT	Tris/Cl (pH 9.4)	100 mM
	DTT	10 mM

(DTT は使用前に加えた)

Lyticase バッファー

Sorbitol	0.7 M
Yeast extract	1%(w/v)
Peptone	2%(w/v)
Glucose	0.5%(w/v)
Tris/Cl (pH7.4)	10 mM
DTT	1 mM

2×JR バッファー

Sorbitol	0.4 M
KOAc	100 mM
HEPES (pH7.4)	40 mM
EDTA	40 mM

βガラクトシダーゼアッセイ関連試薬

D バッファー	Tris/Cl (pH 8.0)	20 mM
	MgCl ₂	10 mM
	KCl	50 mM
	EDTA	1 mM
	Glycerol	5% (v/v)

ろ過滅菌し、使用する直前に DTT を加え最終濃度 1mM とした。また、プロテアーゼインヒビターmix (Sigma、P8340) を 1%となるように加えて使用した。

Z バッファー	Na ₂ HPO ₄	60 mM
	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	40 mM
	KCl	10 mM
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 mM

ろ過滅菌し、使用の直前に 100ml の Z バッファー当たり、270μl の 2-メルカプトエタノールを加えて使用した。

1M Na₂CO₃ ろ過滅菌して使用

0.4%(w/v) ONPG 溶液

Z バッファーに ONPG を溶かし、その日のうちに使用した。

2%(w/v)CHAPSO/γバッファー

プロテアーゼインヒビターミックス

DIFP	0.5 mM
PMSF	0.5 mM
TLCK	1 µg/ml
Antipain	1 µg/ml
Leupeptin	1 µg/ml
EGTA	1 mM

100 mM Thiorphan

50 mM phenanthroline

1%(w/v) phosphatidyl choline

クロロホルム : メタノール (2:1)

クロロホルム : メタノール : 水 (1:2:0.8)

メタノール

10%(w/v) SDS

2 M Tris/HCl (pH 6.8)

2 M Tris/HCl (pH 8.8)

酵母形質転換関連試薬

1M LiOAc

0.1M LiOAc

50% (w/v) PEG 濾過滅菌して使用した。

変性 ssDNA (2 mg/ml)

SD-LWHUAde 培地 (プレート)

Yeast Nitrogen base w/o aa	6.7 g
Glucose	20 g
Agar	20 g
3M NaOH	1 ml
Milli Q 水	450 ml

オートクレーブにかけた後、50ml の 10×dropout 溶液を加えた。さらに、必要に応じて 100×濃度の栄養素を加え、SD-LWU などの培地を作製した。

SD-LWHUAde 培地

10×YNB	10 ml
50% (w/v) Glucose	4 ml
10×dropout 溶液	10 ml
滅菌水	76 ml

必要に応じて 100×濃度の栄養素を加え、SD-LWU などの培地を作製した。

10×dropout 溶液

5.9 g の CSM (Complete Supplement Mixture)-L, W, H, U, Ade (MP Biomedical 4550-122) を Milli Q 水 1 l に溶解しオートクレーブして使用した。

100×栄養素溶液 100 ml の Milli Q 水に以下の量を溶解し、ろ過滅菌して使用した。

100×H (ヒスチジン)	L-ヒスチジン塩酸塩	1 g
100×Ade (アデニン)	アデニン硫酸塩	0.2 g
100×L (ロイシン)	L-ロイシン	1 g
100×W (トリプトファン)	L-トリプトファン	1 g

10×YNB

33.5g YNB (Yeast Nitrogen Base without amino acids, Difco) を Milli Q で溶かし 500ml とし、濾過滅菌して使用した。

YP

1% (w/v) Yeast extract, 2% (w/v) Peptone

YPD

1% (w/v) Yeast extract, 2% (w/v) Peptone, 2% (w/v) Glucose

細胞ライセート調製試薬

RIPA バッファー

Tris/Cl (pH 8.0) 50 mM

NaCl 150 mM

NP40 1% (v/v)

装置

PCR 装置

Mastercycler gradient (Eppendorf)

DNA シークエンサー

CEQTM8000 Genetic Analysis System (BECKMAN COULTER)

ルミノイメーリアナライザー

LAS3000 (FUJIFILM)

吸光光度計

U-2000spectrophotometer (日立工機)

超遠心機

CP70WX (日立工機)

ローター P40ST

卓上超遠心機 Optima MAX-E Ultracentrifuge (Beckman Coulter)

ローター TLA 100.3

3. 方法

コンストラクション

PS2-pBEVY-T-NCT、PS2N141I-pBEVY-T-NCT コンストラクトの作製

東北大学農学研究科二井勇人准教授が用意した pCR-Blunt に組み込まれていた PS2、FAD 変異型 PS2N141I を制限酵素 *Kpn* I で切り出し、*Kpn* I 処理した酵母発現ベクター pBEVY-T-NCT に組み込んだ。

Aph1b-HA-pBEVY-L-FlagPen2 の作成

理研バイオリソースセンターから頂いた Aph1b クローン (Clone ID IRAL037F15) をテンプレートにして PCR によって C 末端側に HA タグを付加した。

用いたプライマーは次の 2 つである。

Aph1B-HA-S

GCTCTAGAAA AAAATGACTGCGGCCGTGTTCTTC

Aph1B-HA-AS

GCTCTAGACTACGCATAGTCAGGAACATCGTATGGGTATCTGGAGCGC
TGGTTGTAAA

PCR 産物は電気泳動後ゲルから回収後、pCR-Blunt ベクターにクローニングした。このベクターから *Xba* I で切り出し、*Xba* I 処理した pBEVY-L-FlagPen2 とライゲーションし、Aph1b-HA-pBEVY-L-FlagPen2 コンストラクトを得た。

得られたコンストラクトはシーケンサーで塩基配列の確認を行った。Aph1 と NCT は GPD プロモーターで、Pen2 と PS は ADH1 プロモーターで発現される。

その他のコンストラクションは上記二井准教授が作製したものをを用いた(45)。

酵母の形質転換

YPAD 培地に酵母 (PJ69-4A または PJ69-4A Δ pep4) を植菌して 30°C で一晩培養した。翌日 OD₆₀₀ 0.2 となるように YPAD 培地で希釈し全体の量を 50 ml とした。約 4 時間 30°C で培養したあと、3000 × g で 5 分遠心し酵母を回収した。酵母を一度滅菌水で懸濁し再び遠心して、上清の滅菌水を捨て、100 mM 酢酸リチウム 1 ml に懸濁し 1.5 ml チューブに移した。Max speed で遠心し、酢酸リチウムをピペットマンで除き、100 mM 酢酸リチウムを約 400 μ l 加え、懸濁した。この懸濁液のうち 50 μ l を新しいチューブにとり、遠心して酵母を沈殿させ酢酸リチウムを取り除いた。この酵母に、50% PEG 240 μ l、1.0 M 酢酸リチウム 36 μ l、ssDNA 25 μ l、各プラスミド DNA 溶液(0.1~10

μg) 50 μl の順番でゆっくり加え、完全に混ざるまで約 1 分ボルテックスした。30°C で 30 分間インキュベートし、42°C で 25 分間ヒートショックをかけた。卓上遠心機で 7000 rpm で 1 分遠心して上清を除き、滅菌水 1.0 ml で懸濁し 200 μl を選択培地 SD-LWU にまいた。30°C で 3 日インキュベートした。

酵母生育によるγ-セクレターゼ活性評価

基質は C99 の C 末端側の 44 アミノ酸を除いた C55 (ヒト APP770 の 672-726 部位) を用いた。C55 の C 末端側に酵母転写因子 Gal4p を融合した C55-Gal4p もしくは Notch 膜貫通領域 (マウス Notch-1 の 1703-1754 部位) とその C 末端側に Gal4p を融合した Notch TM-Gal4p を発現させた酵母を用いた。再構成したγ-セクレターゼがこの基質を切断すると Gal4p が核に移行し *HIS3* と *ADE2* を活性化することを利用して、ヒスチジンとアデニンを抜いた培地での生育によってγ-セクレターゼ活性を評価した (図 4)。

形質転換した酵母から任意の 3 つを選び、SD-LWU の培地に一部ストリークした。残りを SD-LWHUAde にストリークした。酵母を 30°C で 3 日間インキュベート後、生育具合を観察し写真で記録した。

βガラクトシダーゼアッセイ

C55-Gal4p または Notch TM-Gal4p が再構成γ-セクレターゼで切断されると核移行する Gal4p は *lacZ* も活性化するので、βガラクトシダーゼ活性を測定することでγ-セクレターゼ活性を定量した。

形質転換した酵母を SD-LWU の液体培地で培養 OD₆₀₀ 0.8~1.0 まで培養した。ガラスビーズによる酵母の破碎で得られたライセートを 10 分間 15,000×g で遠心分離し、上清をアッセイに供した。上清と ONPG を混ぜて 30°C でインキュベーションし、黄色くなったところで 1 M Na₂CO₃ で反応を止め、OD₄₂₀ を測定した。活性は総タンパク質量と反応時間で割って、unit として求めた。

酵母膜画分の調製

PS、NCT、Aph1、Pen2 と C55 または C99 を発現させた酵母を OD₆₀₀ 1.0 まで培養した。Tris+DTT で洗浄し、5000rpm、5 分遠心を行った。ペレットを Lyticase バッファーで懸濁後、Lyticase または zymolyase で処理した。その後 JR バッファーで 2 度洗浄した。これを水で 2 倍希釈し、ホモジナイザーにかけた。その後 1,000×g、5 分の遠心で、核や破壊されなかった細胞を除き、上清を 27,000×g で遠心し、そのペレットを B88 で懸濁した。これを 1.5M と 1.2M のスクロース溶液の上に乗せ、200,000×g、3 時間遠心した後、液胞画分 (ゴルジ画分も含まれる) を注意深く除き、1.2M と 1.5M の中間にくる膜画分を採取し、γバッファーに懸濁して本実験で用いる膜画分とした。

膜画分を用いた *in vitro* での A β 産生

酵母膜画分 80 μg と等量の 2%CHAPSO $\cdot\gamma$ バッファーを加えて、氷上で 60 分インキュベートする。プロテアーゼインヒビターミックス、100mM Thiorphan、500mM phenanthroline を 1/1000 量加えた後、タンパク質濃度 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、CHAPSO 濃度 0.25%になるように 2%CHAPSO $\cdot\gamma$ バッファー、 γ バッファーで調整した。20 μl の phosphatidyl choline を添加し 37 $^{\circ}\text{C}$ 、24 時間インキュベートする。これをクロロホルム \cdot メタノール沈殿により濃縮し、SDS サンプルバッファーに溶解させ、100 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分ほど煮沸した。また A β 産生の至適 pH を求める目的で γ バッファーの pH を pH 5.5~8.0 にして、*in vitro* A β 産生実験を行った。

抗 A β 抗体 82E1 による免疫沈降

回収した培地 500 μl に 10 倍希釈した抗 A β 抗体 82E1 を 0.5 μl 加え、一晚 4 $^{\circ}\text{C}$ で転倒混和した。翌日、IP バッファーで 3 回洗ったプロテイン G ビーズ 50%slurry を 30 μl 加えて、2 時間 4 $^{\circ}\text{C}$ で転倒混和した。3 回 IP バッファーで洗浄した後 1 \times SDS-PAGE サンプルバッファーを加えて 100 $^{\circ}\text{C}$ 、5 分インキュベートし SDS-PAGE サンプルとした。

siRNA トランスフェクション

Forward transfection または Reverse transfection で行った。

Forward transfection

6well ディッシュに細胞が 30-50%コンフルエントになったところで siRNA の導入を行った。1 well 当たり、250 μl の Opti-MEM 培地に最終濃度 10 nM または 5 nM となるように 10 μM の siRNA を 2.5 μl または 1.25 μl 加えて希釈した溶液と 5 μl の RNAiMAX (siRNA 用トランスフェクション試薬) を 250 μl の Opti-MEM 培地で希釈した溶液を混ぜて約 500 μl とした混合溶液を 20 分間室温でインキュベートした後、各 well に加えてよく混ぜた。導入後 36 時間、48 時間、72 時間後に細胞を回収し解析した。

Reverse transfection

6well ディッシュの 1 well 当たり、500 μl の Opti-MEM 培地を加えた。そこに 10 μM の各 siRNA を 2.5 μl または 1.25 μl 加えてよく混ぜた。続いて RNAiMAX を 5 μl 加えてよく混ぜ、室温で 20 分インキュベートした後、各 well に細胞を翌日 30%となるように加えて、細胞が均等に広がるように混ぜた。導入後 36 時間、48 時間、72 時間後に細胞を回収し解析した。

RNA 調製

GenElute Mammalian Total RNA Purification Kit (Sigma) のマニュアルに従って行った。

RT-PCR

調製した RNA から PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit を用いて cDNA を合成し、次のプライマーを用いて PCR を行った。

Aph1aRT-S

CATTTGCCTGTCCTGGTCAGG

Aph1aRT-AS

CACTGTCCAGAACTGGAGATG

Aph1bRT-S

TTTCCGCGGTGGCCATGACT

Aph1bRT-AS

GAAGTGCTGGTTCCCTGAGG

BactinRT-S

GCCAGCTCACCATGGATGATG

BactinRT-AS

TTCTCCAGGGAGGAGCTGGAA

ライセート調製

細胞量に応じて RIPA バッファーを 70-150 ul 加えて、30 回ピペッティング後、氷上で 30 分間インキュベートした。その後 max speed で 4°C、30 分間遠心した。上清を新しいチューブにとり、ライセートとした。ライセートは DC プロテインアッセイキット (Bio-Rad) で濃度測定後、サンプルバッファーを加え、65°C で 10 分処理して SDS-PAGE サンプルとした。

SDS-PAGE

A β の検出用のゲル

Separating gel

49.5%T/3%C Acrylamide mix	2 ml
ゲルバッファー (pH 8.45)	2 ml
40% Glycerol	2 ml
10%APS	20 μ l
TEMED	2 μ l

Stacking gel

49.5%T/3%C Acrylamide mix	0.2 ml
ゲルバッファー (pH 8.45)	0.62 ml
水	1.68 ml
10%APS	20 μ l
TEMED	2 μ l

A β 分離用8M尿素ゲル

Separating gel

49.5%T/3%C Acrylamide mix	4.04 ml
ゲルバッファー (pH 8.45)	6.67 ml
40% Glycerol	2.21 ml
尿素	9.63 g
10%APS	60 μ l
TEMED	6 μ l

Stacking gel

49.5%T/3%C Acrylamide mix	0.5 ml
ゲルバッファー (pH 8.45)	1.55 ml
水	4.2 ml
10%APS	50 μ l
TEMED	5 μ l

A β 以外のタンパク質検出用のゲル

Separation gel (7.5%~15%)

Lower バッファー	1.5 ml
30% T/3.3%C アクリルアミド溶	1.5~3.0 ml
水	3.0~1.5 ml
10%APS	50 μ l
TEMED	10 μ l

Stacking gel

Upper バッファー	1 ml
30% T/3.3%C アクリルアミド溶液	0.6 ml
水	2.4 ml

10%APS	30 μ l
TEMED	6 μ l

ELISA

A β 40の測定の際は回収した培地を10倍希釈して用いた。A β 42、A β 43検出のときは希釈せずに培地を用いた。

各 well に 100 μ l の培地または希釈した培地を加えて、一晚 4℃でインキュベートした。翌日培地を除き、キット付属の洗浄バッファー250 μ l を各 well に加えて 20～30 秒経過したらバッファーを除き、よく水分を切って、再び洗浄バッファーを加えて同様の操作を計 7 回繰り返した。洗浄後、希釈した抗体を各 well に加え、60 分室温でインキュベートした。洗浄液で 9 回洗浄後、TMB 基質を加え、30 分後に Stop Solution で反応を止めて、吸光度を測定した。

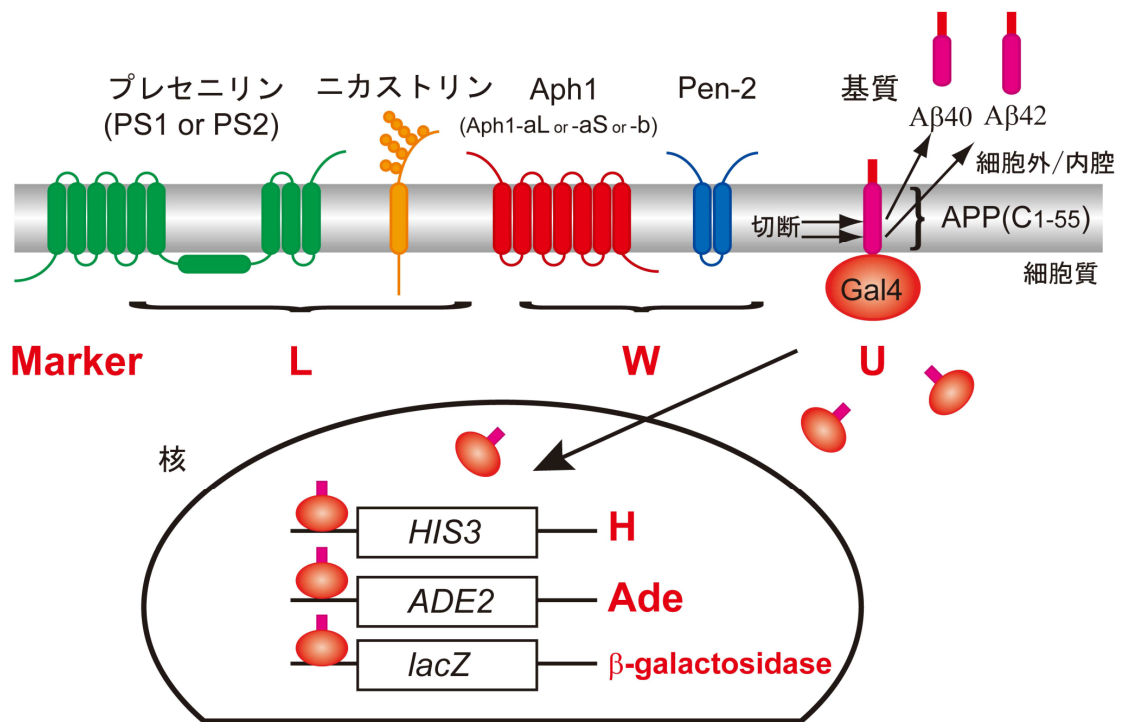


図4. レポーターアッセイによるγ-セクレターゼ活性評価

Gal4融合基質が再構成されたγ-セクレターゼによる切断を受けると、Gal4の核への移行により、*HIS3*、*ADE2*、*lacZ*が活性化される。このシステムでは、γ-セクレターゼも切断活性をヒスチジン、アデニンを欠いた選択培地で評価することができる。またβガラクトシダーゼ活性の測定によっても切断活性の評価ができる。

4. 結果

1. 酵母再構成系におけるレポーターアッセイによる γ -セクレターゼ活性評価

Notch-Gal4 を基質としたとき

酵母に mNotch1-Gal4 とともに、PS1/Aph1aL、PS1/Aph1aS、PS1/Aph1b、PS2/Aph1aL、PS2/Aph1aS、PS2/Aph1b、の各 γ -セクレターゼを 3 つのプラスミドを導入することで発現させた。酢酸リチウム法による形質転換を行い、ロイシン (L)、トリプトファン (W)、ウラシル (U) を欠いた寒天培地 (SD-LWU) に形質転換体を撒いた。形質転換が成功し、3 つのプラスミドが導入されていることは SD-LWU プレートで生育することによって確認した。生えてきたコロニーのうち 1 つをピックアップし、SD-LWU、SD-LWHUAde プレート (ヒスチジンとアデニンを SD-LWU からさらに抜いた培地) にストリークした。この操作を合計 3 回繰り返し、1 種類の形質転換体あたり独立した 3 つのコロニーについて調べた。30°Cでの 3 日間の培養後、酵母の生育を記録した。SD-LWHUAde プレートでは γ -セクレターゼによる Gal4 融合基質の切断により、核へ移行する Gal4 によってヒスチジンとアデニンの合成が促進され、生育可能となる。この結果、PS1 の γ -セクレターゼを発現した酵母の生育に比べて、PS2 の γ -セクレターゼを発現した酵母の生育は悪かった (図 5)。PS1 を発現した酵母は Aph1 の違いによる生育の差はほとんど見られなかったが、PS2 では PS2/Aph1aL を発現した酵母がとりわけ生育が悪かった (図 5)。次に、SD-LWU に画線培養しておいた酵母 (図 5 左) の一部を SD-LWU の液体培地に移し、一晚培養した。翌朝、OD₆₀₀0.2 となるように希釈しさらに、4 時間培養した後、これらの酵母からライセートを調製し、 β ガラクトシダーゼ活性の測定を行った。PS1 と PS2 の γ -セクレターゼを比較すると PS1 の方が、 β ガラクトシダーゼ活性が高かった。PS1 の γ -セクレターゼは Aph1 の違いによる β ガラクトシダーゼ活性への影響はみられなかった (図 6)。PS2 の γ -セクレターゼは Aph1aL のときよりも Aph1aS のときに活性が高かったが、Aph1aS と Aph1b では違いが見られなかった (図 6)。プレート上での酵母の生育の様子と酵母ライセートを用いて測定した β ガラクトシダーゼ活性の結果は、ほぼ相関するような結果となった (図 5、6)。

C55-Gal4 を基質としたとき

基質を APP 由来の基質である C55-Gal4 に変えてレポーターアッセイを行った。本来 γ -セクレターゼの基質となるのは APP が BACE1 で切断されて生じる C99 であるため、レポーターアッセイの基質は C99-Gal4 とするべきである。しかし、C99-Gal4 が基質のとき γ -セクレターゼによらない C99-Gal4 の切断により、常に Gal4 による *HIS3*、*Ade2*、*lacZ* の活性化が起こった。そのため C99 の C 末端側 44 アミノ酸を除いた C55

に Gal4 を融合して C99-Gal4 の代わりにの基質とした。膜画分を用いた *in vitro* A β 産生アッセイでは、 γ -セクレターゼの切断の結果、C55 は C99 と同程度の A β 産生が確認され (図 7)、C99 の代わりに C55 を用いることは大きな問題はないと考えられた。C55-Gal4 を基質としたとき、PS1 の γ -セクレターゼを発現した酵母は SD-LWHUAde プレートでよく生育し、Notch のときと同様に Aph1 の違いによる生育の差はみられなかった (図 8)。これに対し、PS2 の γ -セクレターゼを発現した酵母では、Aph1 分子種による生育の違いがはっきりとみられた。Aph1aL では SD-LWHUAde 培地上でほとんど生育できないが Aph1aS のときは Aph1aL と比較するとより生育できるようになった。さらに Aph1b のときは、PS1 を発現した酵母に近い生育具合を示した (図 8)。また、これらの酵母からライセートを調製し、 β ガラクトシダーゼ活性を測定したところ、PS1 の γ -セクレターゼはどの Aph1 が発現しているときもほとんど同じ活性を示した。これに対し PS2 の γ -セクレターゼは Aph1 の違いによって β ガラクトシダーゼ活性は大きく異なり、特に Aph1b のときは PS1 の γ -セクレターゼを発現した酵母が示す値に近い活性を示した (図 9)。

この実験では、ネガティブコントロールとして PS、NCT、Aph1、Pen2 のうちいずれかひとつを欠いた酵母を作製した。これらの酵母は SD-LWHUAde プレート上で生育できないこと、及び、ライセートを用いた β ガラクトシダーゼアッセイで β ガラクトシダーゼ活性がほとんどないことは確かめた (data not shown)。

2. 酵母膜画分を用いたアッセイ

異なる 6 つの γ -セクレターゼの A β 産生について調べる目的で、これらが発現させた酵母のミクロソーム画分を調製した。酵母の液胞プロテアーゼによる γ -セクレターゼ構成タンパク質の分解を抑えるため、液胞プロテアーゼの成熟を担うプロテイナーゼ A をコードする *Pep4* の欠損株(60)に各 γ -セクレターゼと基質 C55 を導入した形質転換体を作製し実験を行った。目的の γ -セクレターゼと基質を導入した酵母を SD-LWU 培地で培養し、OD₆₀₀ が 0.8~1 となったところで回収し、精製した lyticase で細胞壁を除いた後、ショ糖密度勾配で液胞画分を除く画分 (ミクロソーム画分、主に小胞体膜、細胞膜を含む) を回収した。得られた膜画分を用いて *in vitro* A β 産生アッセイを行った。先行研究(60,66)で PS1/Aph1a、PS2/Aph1a の γ -セクレターゼは pH 7.0 付近で A β 産生が最大となることがわかっていたため、まず pH 7.0 の γ バッファーを用いて A β 産生アッセイを行った。このサンプルを SDS-PAGE にかけて、抗 A β 抗体 (82E1) で A β の検出を試みた結果、Gal4 レポーターアッセイの結果とは異なり、PS2/Aph1b の γ -セクレターゼによる A β の産生はほとんどみられなかった (図 10A)。また、レポーターアッセイのときの基質 C55-Gal4 を *Pep4* 欠損株に γ -セクレターゼとともに発現させ *in vitro* アッセイを行ったが、C55-Gal4 からは A β 産生がみられなかった (図 10A)。PS2/Aph1b の γ -セクレターゼによる A β の産生はほとんどみられなかったことから、Aph1b の γ -セク

レターゼは A β 産生の至適 pH が Aph1a と異なるのではないかと考え、pH5.5~8.0 の各 γ バッファーを用いてアッセイを行った。結果は、PS1/Aph1b の γ -セクレターゼはやや酸性よりの pH6.0、pH6.5 で A β 産生が大きくなることが示唆された (図 10B)。また感度の高い検出試薬の使用と長時間の露出により、微量の A β が検出可能となった PS2/Aph1b については pH6.0~pH7.5 の広い pH 範囲にわたって A β 産生がほぼ等しくみられた (図 10C)。

次に、酵母マイクロソーム画分中の γ -セクレターゼ構成タンパク質がどのくらい含まれているかを調べるため、マイクロソーム画分中の PS、NCT、Aph1、Pen2 の発現量を各抗体で調べた。酵母マイクロソーム画分にサンプルバッファーを添加し、サンプルとした後 SDS-PAGE に供し、ウェスタンブロットによって確認した。その結果、PS1 の γ -セクレターゼや PS2/Aph1a の γ -セクレターゼを発現した酵母マイクロソーム画分に、PS、NCT、Aph1 などは量の違いがみられたものの検出可能であった。これに対し、PS2/Aph1b の γ -セクレターゼを発現させた酵母マイクロソーム中には Pen2 をほとんど検出することができなかった (図 11)。

調製した膜画分中のタンパク質が少ないことに *invitro* アッセイがうまくいかない原因があると考え、液相画分を含む膜画分全体を採取し SDS-PAGE、ウェスタンブロットによって Pen2 量を確認したところ、Pen2 のバンドは検出されたが、この膜画分全体を用いた *invitro* アッセイでは A β 産生が見られなかった。PS2/Aph1b の γ -セクレターゼを発現する酵母の膜画分を用いたアッセイを成功させるためには、なんらかの工夫が必要と考えられるがその条件は見いだすことができなかった。

3. 培養細胞を用いた γ -セクレターゼの解析

細胞種の検討

A β の産生量を確認する目的で家族性アルツハイマー病 Swedish 変異型 APP (APP^{swe}) を安定発現する SH-SY5Y 細胞、HEK293 細胞、BACE1 安定発現 HEK293 細胞を培養した。培地を回収し培地中に放出された A β を SDS-PAGE、ウェスタンブロットによって確認した結果、HEK293 細胞が培地中に放出した A β 量はほとんど検出することができなかった (data not shown)。そのため、PS、Aph1 のノックダウンによる A β 産生への効果を確認するには HEK 細胞を用いて実験を行うのは不適當と考えられた。一方、APP^{swe} を安定発現した SHSY5Y や BACE1 安定発現 HEK293 細胞由来の A β は豊富に存在することがわかり (data not shown)、ノックダウンによる A β 産生への影響の解析にも適當と考えられた。

そこで、まず APP^{swe} 安定発現 SHSY5Y 細胞に siRNA を導入し PS、Aph1 のノックダウンを試みた。siRNA 導入後 48 時間後に細胞からライセートを回収した。ライセートを SDS-PAGE にかき、ウェスタンブロットティングで PS のノックダウンを確認したが、ノックダウンが確認できなかった (data not shown)。次に、A β 産生が豊富にみ

られた、もう一方の細胞である BACE1 安定発現 HEK293 細胞に siRNA を導入しノックダウンを行うこととした。siRNA を導入し、導入から 48 時間後の細胞のライセートを調製し SDS-PAGE、ウェスタンブロットを行なった。その結果、PS1、PS2 のノックダウンが確認できた (図 12A)。また Aph1 については抗体の反応性の問題で検出できなかったため、RNA 抽出後 RT-PCR でノックダウンの確認をし、Aph1a、Aph1b ともにノックダウンされていることがわかった (図 12B)。以上の結果から、BACE1 安定発現 HEK 細胞を用いて siRNA によるノックダウンの解析を進めることとした。

PS、Aph1 のノックダウン効果が見られる時間の検討

siRNA 導入後 48 時間、72 時間で細胞を回収し、RNA 抽出用とライセート抽出用に分けた。ライセートの抽出用に分けておいた細胞からライセートバッファーで懸濁してライセートを調製した。ライセート中の PS、Aph1 を SDS-PAGE、ウェスタンブロットで確認した結果、PS1、PS2 ともに 48 時間と 72 時間でノックダウンが確認された。内在性の Aph1a を検出する抗体については、Aph1aL 特異的に認識する抗体を用いたため、Aph1aS がタンパクレベルでどの程度存在するのかについて正確なところは不明である。また抗 Aph1b 抗体は HEK のライセート中の Aph1b を認識できなかったため、内在性の Aph1b をタンパクレベルで確認することはできなかった。そこで、total RNA 抽出キットにより RNA を抽出し、RT-PCR によって siRNA による Aph1b のノックダウンの効果を検証した結果、Aph1b も siRNA によるノックダウンが確認された。Aph1a についても同様に RT-PCR を行った結果、Aph1a についても RT-PCR でノックダウンが確認できた(data not shown)。

各 γ -セクレターゼによる NICD の産生

γ -セクレターゼによる内在性 Notch1 の切断断片 (NICD) が検出できるかどうか調べるため、BACE1 安定発現 HEK293 細胞を γ -セクレターゼ阻害剤である DAPT 処理したものと、していないもののライセートを調製し、SDS-PAGE、ウェスタンブロットで NICD の検出を試みた。DAPT 処理した細胞ライセートには NICD のバンドが検出されず、DAPT 処理しない細胞ライセートでは NICD と考えられるバンドが検出されると考えたが、どちらのレーンにもバンドが検出されなかった。内在性 Notch の NICD の検出は困難であると考え、 γ -セクレターゼの直接の基質となる mNotch1-Myc コンストラクトを細胞にトランスフェクションして γ -セクレターゼの切断による産生される NICD の検出を試みた。その結果、DAPT 処理したものでは現れないバンドが DAPT 処理しないライセートに検出された。

そこで以下の実験を行った。各 siRNA 導入後 48 時間後に Lipofectamin LTX で mNotch1-Myc を過剰発現させた。同時に NICD の分解を防ぐために、プロテアソーム阻害剤 lactacystin を最終濃度 10 μ M となるように加えて、その 24 時間後 (siRNA 導

入から 72 時間後) に細胞を回収しライセートを調製した。このライセート SDS-PAGE し、ウェスタンブロットによって PS1、PS2、Aph1a のノックダウンを確認した (図 13)。また回収した細胞の一部から RNA を抽出し RT-PCR による Aph1b のノックダウンも確認した (図 13)。

ノックダウンが確認された細胞が産生した NICD を Notch1 の断端抗体を用いて検出した。酵母再構成系では PS1 の γ -セクレターゼは Notch の切断を行うが PS2 の γ -セクレターゼはあまり切断しないという結果であったが、酵母で見られた結果とは異なり、PS1、PS2 ともに Aph1a の存在下で NICD レベルが高く、Aph1b が存在するときは NICD の産生量は少なかった (図 13)。また、DAPT 処理した細胞由来のライセートからは NICD の検出が認められなかった (図 13)。基質の C 末端側に付加された Myc を認識する抗体で検出してみることで、過剰発現させた基質の量がほぼそろっていることも確認できた (図 14)。

A β 産生量の比較

PS と Aph1 の組み合わせの異なるそれぞれの γ -セクレターゼごとの A β 産生について調べるために siRNA を導入した後、48 時間経過してから 24 時間 (siRNA 導入から 72 時間後) に培地中に放出される A β を SDS ウェスタンブロットで調べた。まず、siRNA 導入後 72 時間で細胞を回収しウェスタンブロットと RT-PCR によってノックダウンが行われていることを確認した (図 15)。またこのとき NCT、Pen2 についてもウェスタンブロットによる検出を試みたが、NCT、Pen2 もノックダウンによる影響が見られ、Aph1a のノックダウンによって、Pen2 発現量の低下と糖鎖修飾を受けた成熟型 NCT が減少した。

培地を回収し、抗 A β 抗体 (82E1) で免疫沈降後、サンプルとした。このサンプルを Tris/Tricine ゲルで電気泳動し、A β を 82E1 で検出した。その結果、PS1 の γ -セクレターゼは Aph1 の違いによる A β 産生量の違いは見られなかったが、PS2 の γ -セクレターゼでは Aph1b のほうが Aph1a に比べて多くの A β を産生する傾向にあった (図 16A、B)。この変化が siRNA によるものであることを示す目的で、siRNA 導入から 0-36 時間の培地中の A β と 36-48 時間の培地中の A β を比較した。A β 産生量は 0-36 時間では各サンプル間で差はみられなかった (図 16C) が、siRNA 導入後 36-48 時間に産生した A β 量には差がみられ、PS2 の γ -セクレターゼは PS1 に比べて A β 産生量が少なかった (図 16C)。よって、これらの変化は siRNA によるノックダウンの結果と考えられた。

A β 分子種の電気泳動による比較

A β は産生される量の問題というよりも、近年では A β の質が重要と考えられている。産生された A β についてさらに詳しく調べるために、8M の尿素を含むゲルを用いて電気泳動を行った。この尿素を含むゲルで電気泳動を行うと、A β 42 と A β 43 の分離は難し

いが、A β を分子種ごとに分離できるので6種類の γ -セクレターゼが産生する A β 分子の違いについて調べることができる。その結果、PS2 を含む γ -セクレターゼはA β 42 (A β 43) の産生がやや多いようにみえた (図17)。

ELISA 法による A β 分子種の違いの定量

8M尿素を含むゲルを用いた電気泳動による A β の分離をした場合、A β 42と A β 43をはっきりと分離することは非常に困難であった。したがって、A β 42 や A β 43の産生量に違いが生じている場合でも、8M尿素ゲルの電気泳動による分離では正しく評価することができない。またバンド強度の定量化による評価よりも ELISA アッセイの方がより正確な測定が行えると考えられるため、ELISA でも A β 40、A β 42、 A β 43を定量することとした。A β 分子種特異的 ELISA は特異的抗体と A β の N 末端特異的抗体の組み合わせによるサンドイッチ ELISA の系の立ち上げを試みたが、検出感度が低く、特に産生量が低い A β 42、A β 43 の検出は困難と考えられた。従って、A β 40、A β 42、A β 43を特異的かつ高感度で検出可能な ELISA キットを用いて培地中に含まれる A β の検出を試みた。その結果、PS2をノックダウンしたものと PS1/Aph1a をノックダウンした細胞の産生する A β 40の濃度は同程度であった (図 18)。これは PS1/Aph1b をノックダウンした細胞及び、コントロール siRNA を導入した細胞と比べて多くの A β 40を産生したことを示している。A β 42についてはコントロール siRNA 導入細胞と比較して PS1/Aph1a のノックダウンをした細胞だけが有意に産生量が上昇した (図 18)。また A β 43は全てのサンプルで検出限界以下であった。

A β 42/A β 40の比率を計算した結果、PS2 のノックダウンにより、コントロール siRNA を導入した細胞 (つまり、PS1/Aph1a、PS1/Aph1b、PS2/Aph1a、PS2/Aph1b の全ての組み合わせをもつ) に比べて、A β 42 /A β 40の値が有意に低下した。また PS1 のノックダウンはコントロールと比較して有意な変化を引き起こさなかったが、PS2 ノックダウンの細胞と比べると A β 42 /A β 40の値は上昇するという結果を示した。このように、PS/Aph1 ダブルノックダウンによって産生された A β は A β 総量だけではなく、A β の分子種にも変化が見られた。酵母再構成系による Gal4 レポーターアッセイの実験結果と HEK293 細胞を用いた siRNA による各 γ -セクレターゼによる Notch、APP の切断活性、産生される A β 42の A β 40に対する割合 (A β 42/A β 40) の違いを表 1 にまとめた。

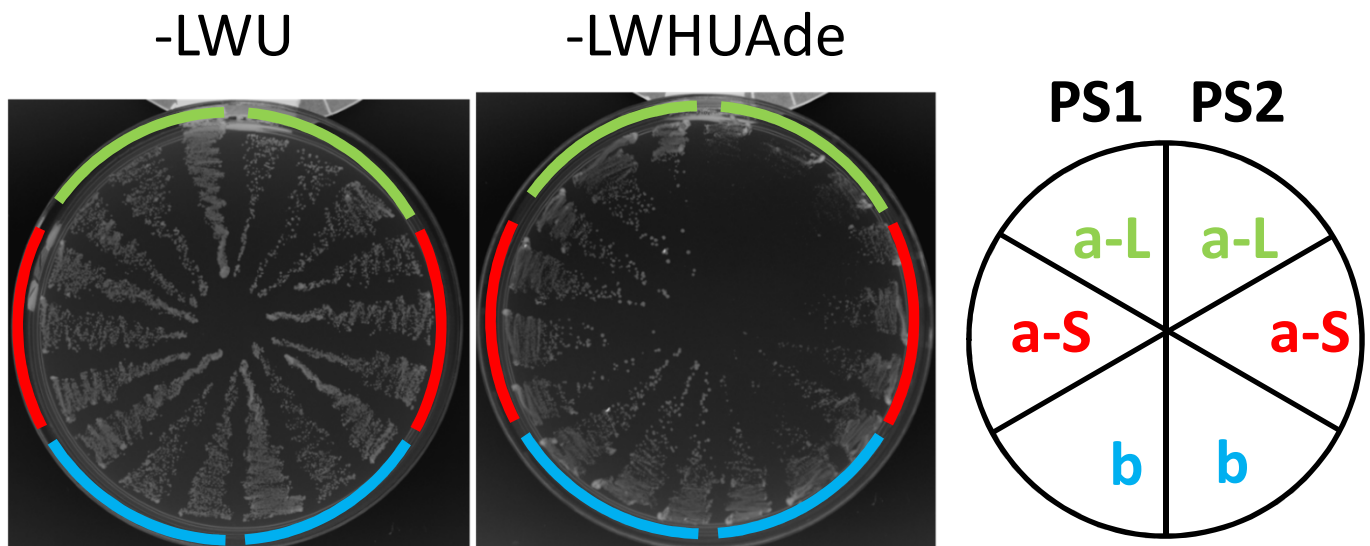


図5. 選択培地上での生育によるNotch1-Gal4の切断活性評価

PS1/Aph1a-L、PS1/Aph1a-S、PS1/Aph1b、PS2/Aph1a-L、PS2/Aph1a-S、PS2/Aph1bの各 γ -セクレターゼとNotch1-Gal4を発現させた酵母をプレートにストリークした。最も右に示した図に描かれているように各 γ -セクレターゼを発現した酵母がプレートに区切られている。3つのプラスミドが導入されたことは-LWUプレート上で生育することによって確認された(左)。さらにヒスチジンとアデニンを欠いた-LWHUAdeプレート上での生育によってそれぞれの γ -セクレターゼの切断活性がおおよそ判断できる(中央)。-LWHUAdeプレート上でよく生育する酵母内では γ -セクレターゼの切断が起こっていると考えられる。

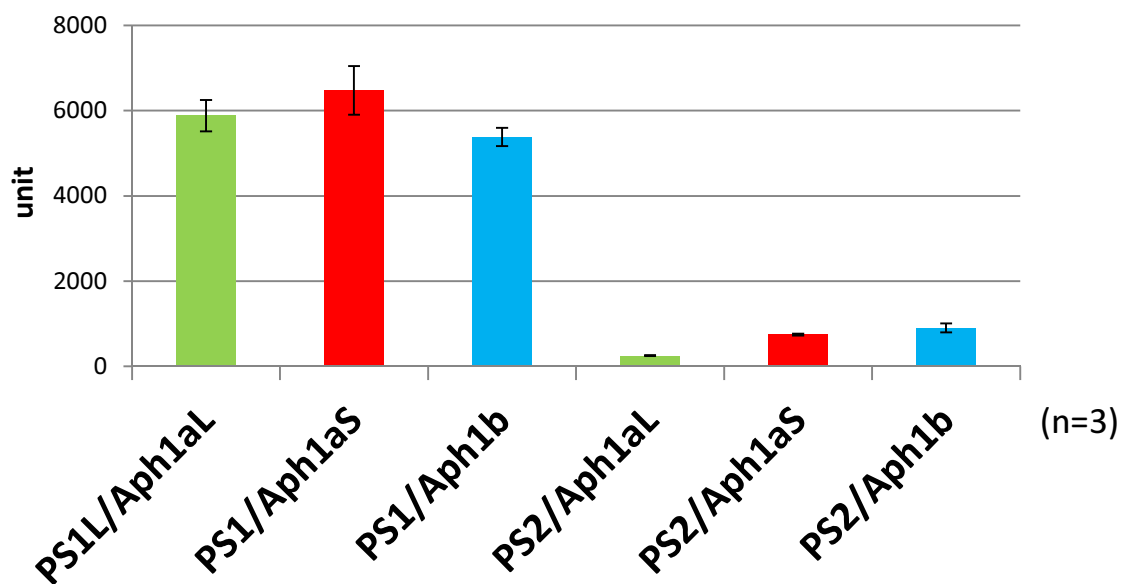


図6. β ガラクトシダーゼアッセイによるNotch1-Gal4の切断活性評価
 PS1/Aph1aL、PS1/Aph1aS、PS1/Aph1b、PS2/Aph1aL、PS2/Aph1aS、PS2/Aph1bの各 γ -セクレターゼとNotch1-Gal4を発現させた酵母をSD-LWUの液体培地で培養し、ライセートを調製した。ライセートを用いた β ガラクトシダーゼ活性の測定を行い、発現させた各 γ -セクレターゼによるGal4融合基質Notch1-Gal4の切断活性を評価した。n=3。エラーバーは標準偏差を示している。

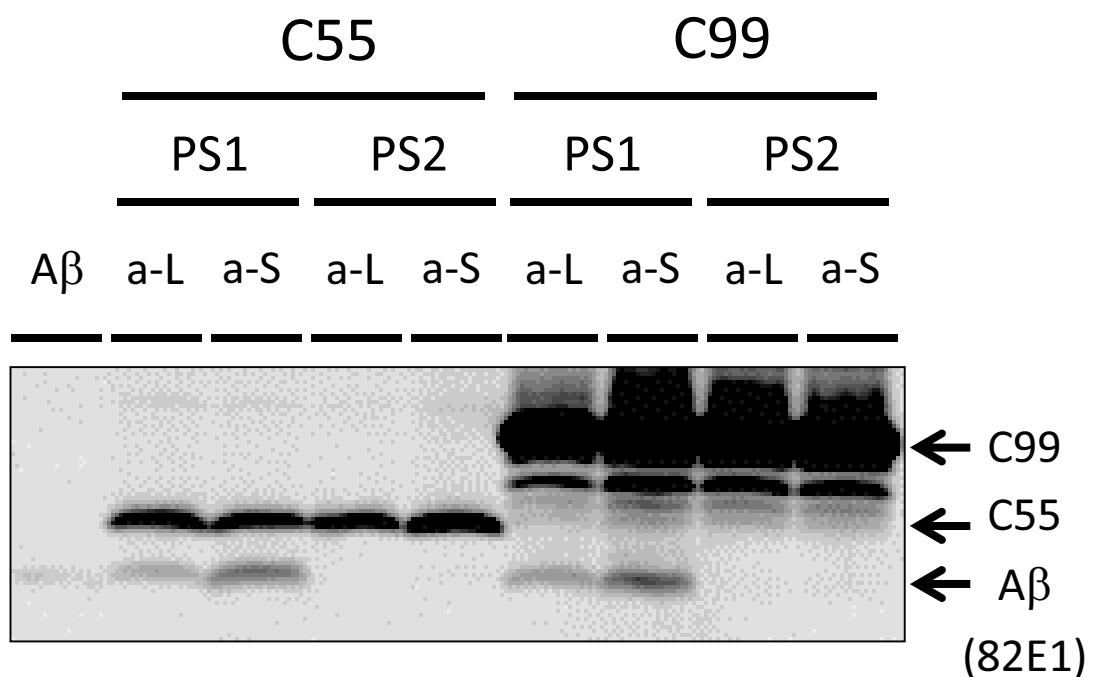


図7. 基質C55とC99から産生されるA β の比較

PS1/Aph1aL、PS1/Aph1aS、PS2/Aph1aL、PS2/Aph1aS、の各 γ -セクレターゼとC55(左から2~5レーン)またはC99(左から6~9レーン)を発現させた酵母から膜画分を調製して*in vitro*A β 産生アッセイを行った。膜画分(80 μ g)は37°Cで24時間インキュベートした後、クロロホルム・メタノール濃縮しサンプルバッファーに溶かした。最も左のレーンには、ポジティブコントロールとしてA β (30 pg)を泳動した。

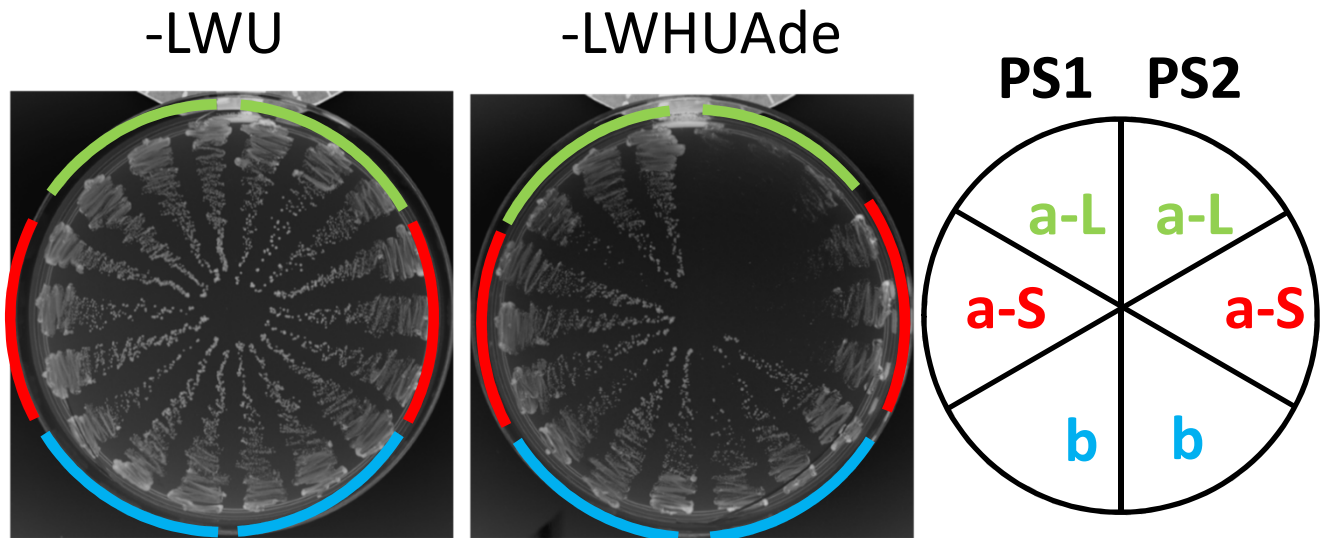


図8. 選択培地での生育によるC55-Gal4の切断活性測定

PS1/Aph1aL、PS1/Aph1aS、PS1/Aph1b、PS2/Aph1aL、PS2/Aph1aS、PS2/Aph1bの各 γ -セクレターゼとC55-Gal4を発現させた酵母をプレートにストリークした。最も右に示した図に描かれているように各 γ -セクレターゼを発現した酵母が区切られている。3つのプラスミドが導入されたことは-LWUプレート上で生育することによって確認された(左)。さらにヒスチジンとアデニンを欠いた-LWHUAdeプレート上での生育によってそれぞれの γ -セクレターゼの切断活性が推定された(中央)。

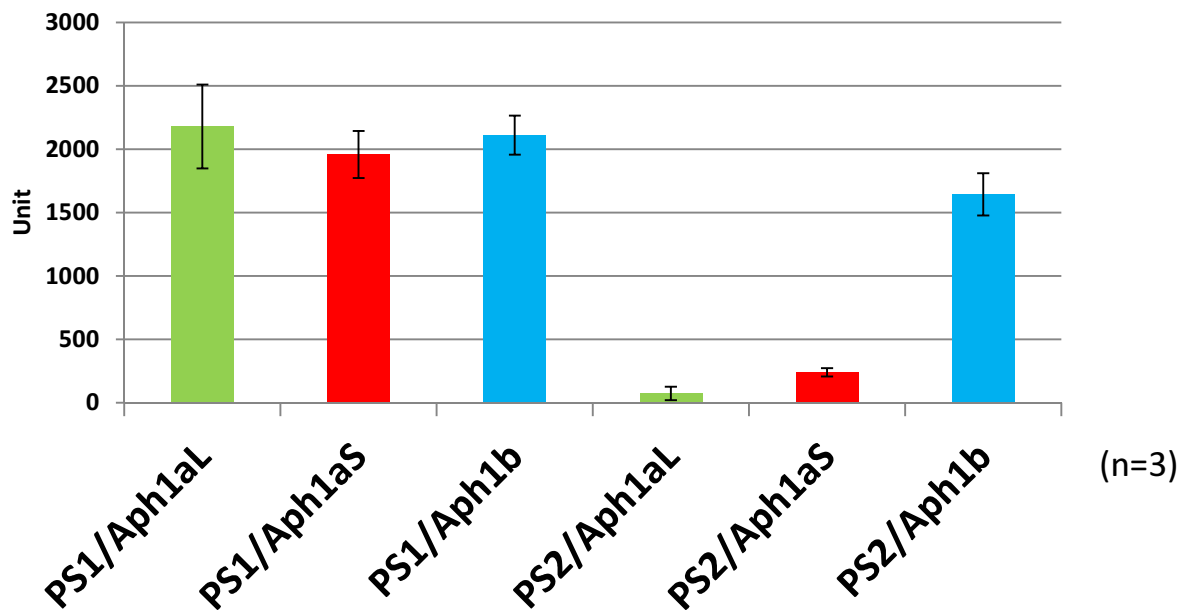


図9. β ガラクトシダーゼアッセイによるC55-Gal4の切断活性評価

PS1/Aph1aL、PS1/Aph1aS、PS1/Aph1b、PS2/Aph1aL、PS2/Aph1aS、PS2/Aph1bの各 γ -セクレターゼとC55-Gal4を発現させた酵母をSD-LWUの液体培地で培養し、ライセートを調製した。ライセートを用いて β ガラクトシダーゼ活性の測定を行い、発現させた各 γ -セクレターゼによるGal4融合基質の切断活性を評価した。n=3。エラーバーは標準偏差を示している。

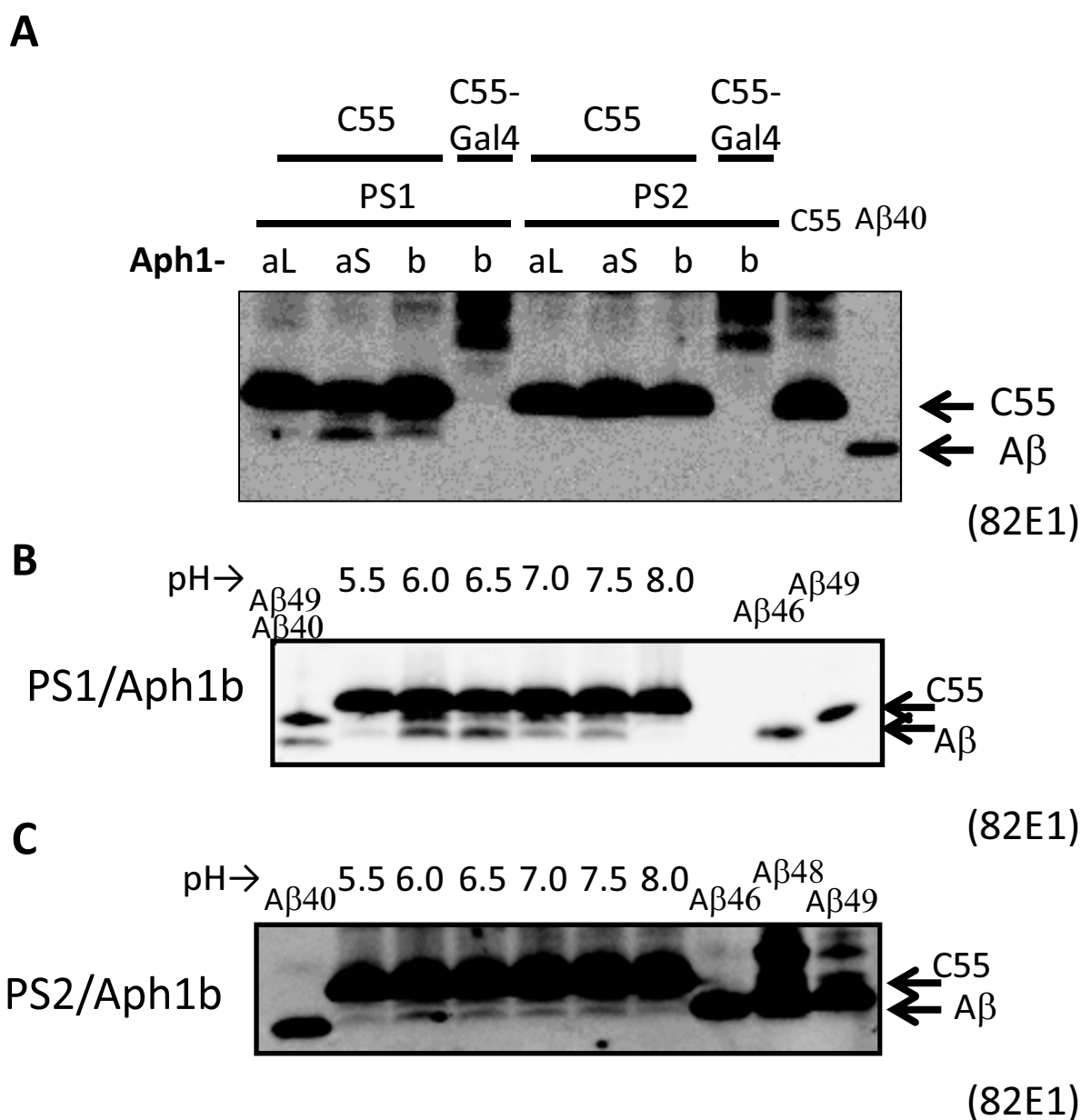


図10. 酵母膜画分を用いた*in vitro* Aβ産生アッセイ

A. 基質C55またはC55-Gal4と表示されたPS、Aph1の組み合わせのγ-セクレターゼを発現した酵母から膜画分を調製し、pH7.0のバッファーで37°C、24時間インキュベートしてAβを産生させた。クロロホルム・メタノール濃縮後SDS-PAGE、ウェスタンブロットでAβを検出した。ポジティブコントロールとして合成Aβ40ペプチドを30 μg泳動した。

B. PS1/Aph1b、C. PS2/Aph1bのγ-セクレターゼとC55を発現した酵母の膜画分を用いて、pH5.5~8.0のバッファーで37°C、24時間インキュベートしてAβを産生させた。クロロホルム・メタノール濃縮後SDS-PAGE、ウェスタンブロットでAβを検出した。ポジティブコントロールとして合成Aβペプチドを約30 μg泳動した。CはA、Bより検出感度の高い試薬を用い、長時間反応させ、微量のAβを検出した。

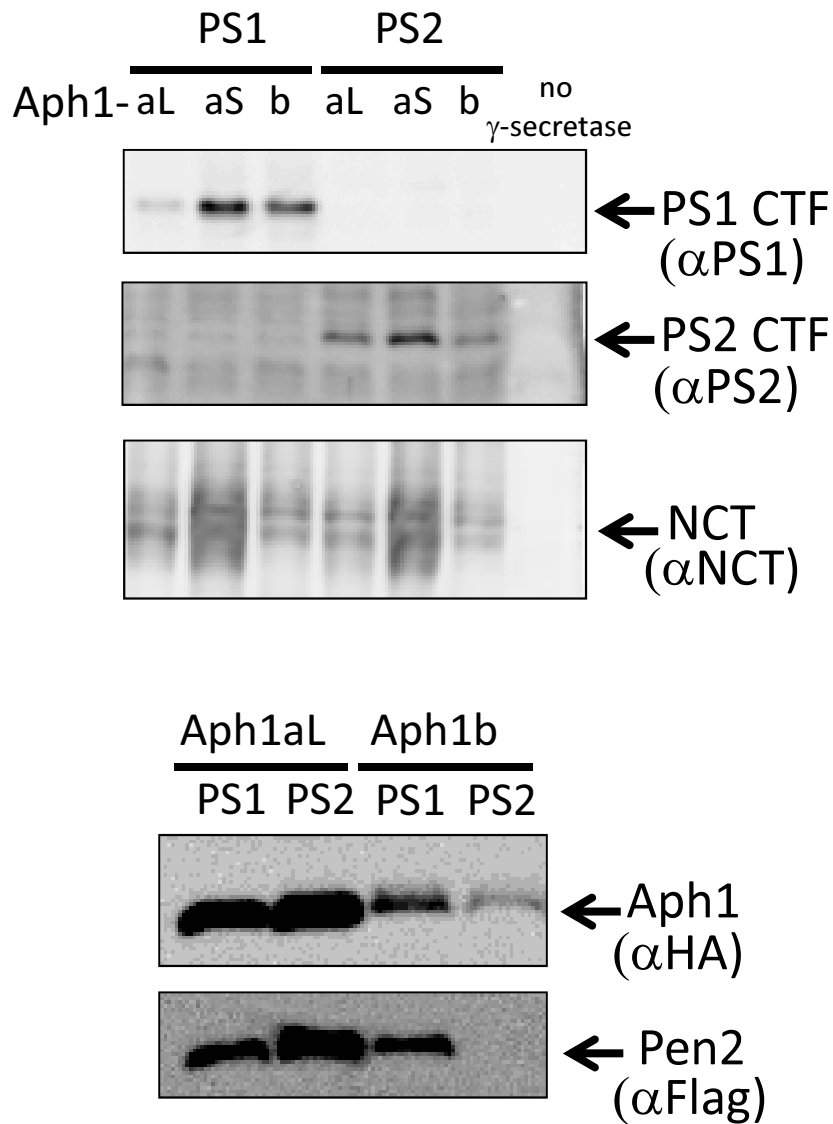


図11. 酵母膜画分中のγ-セクレターゼ構成タンパク質

表示されたPSとAph1の組み合わせでγ-セクレターゼが発現している酵母の膜画分をSDS-PAGEにかけ、ウェスタンブロットによりPS、NCT、Aph1、Pen2をそれぞれの抗体で検出した。

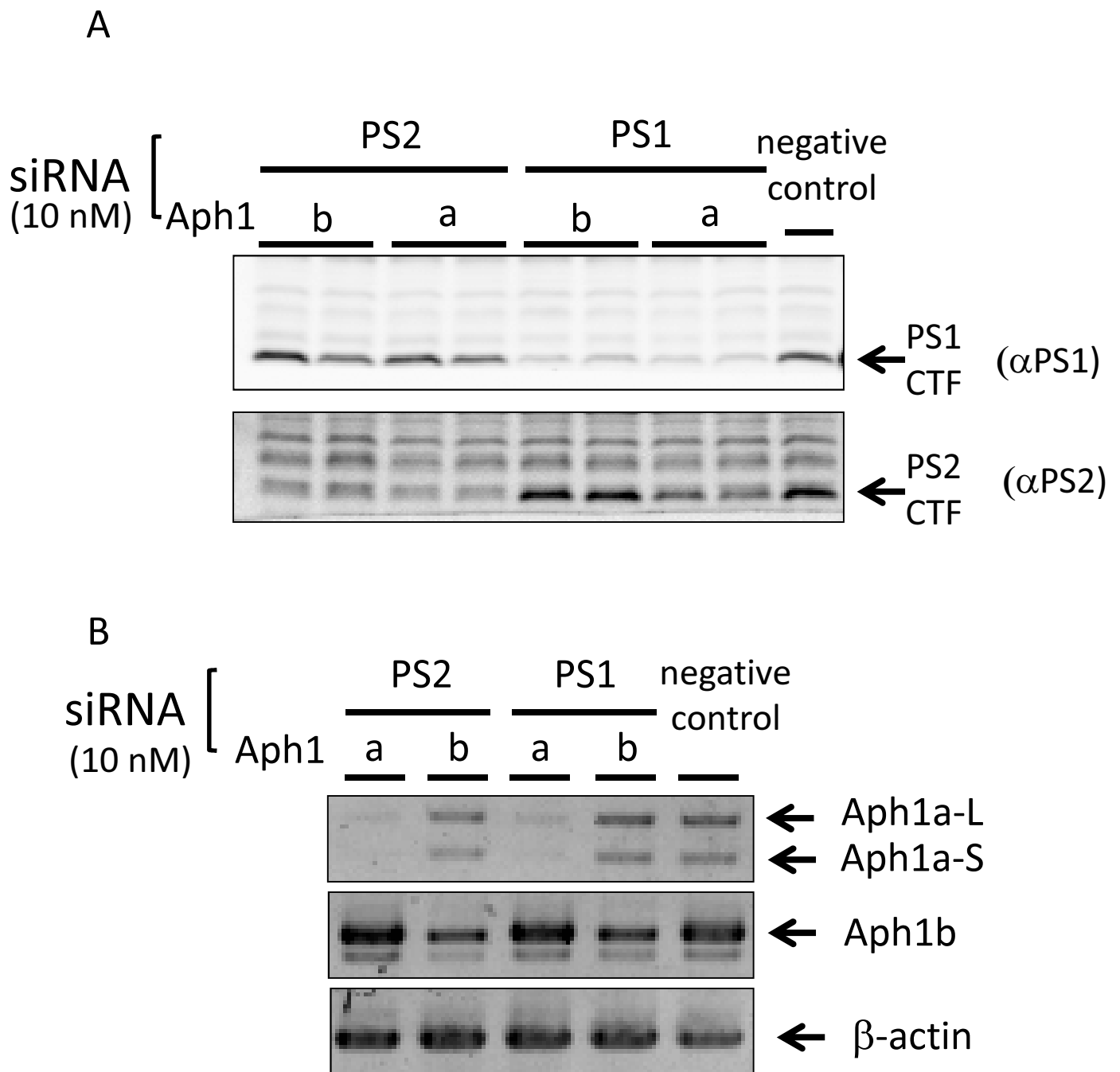


図12. BACE1安定発現HEK293細胞でのsiRNAによるノックダウン確認

表示してあるPS、Aph1の組み合わせでsiRNA(10 nM)を導入して48時間後の細胞の一部からライセートを調製し、SDS-PAGE、ウェスタンブロットでPS1、PS2を検出しノックダウンを確認した(A)。残りの細胞からはRNAを抽出しRT-PCRでAph1a、Aph1bのノックダウンを確認した(B)。

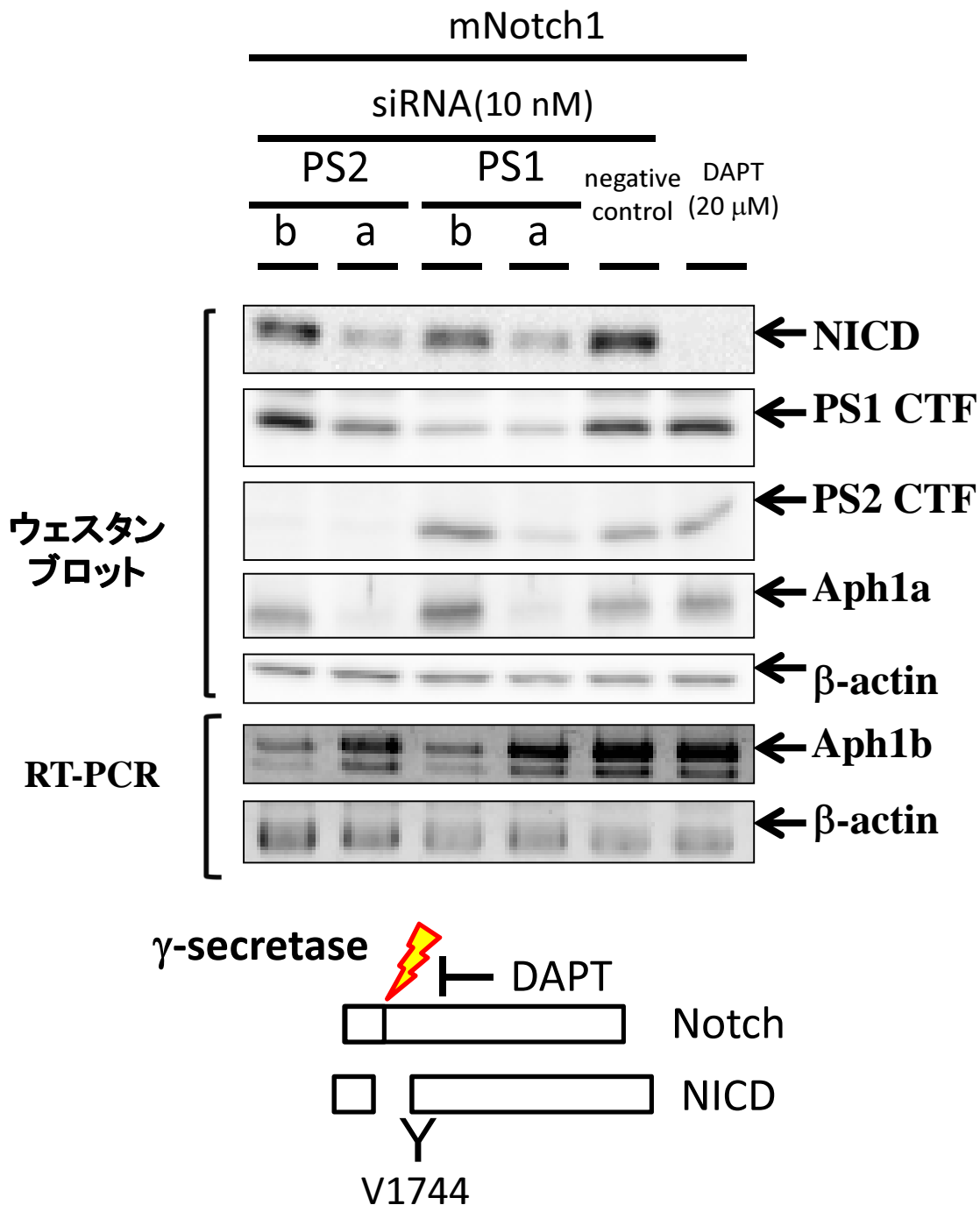


図13. siRNAによるNotchの切断活性の変化

siRNAを表示の組み合わせでそれぞれ10 nMとなるように導入し、48時間後にmNotch1をトランスフェクションした。同時にlactacystinを10 μMとなるように培地に加え、24時間後（siRNA導入後72時間）に細胞を回収した。回収した細胞から、ライセートの抽出とRNAの抽出を行い、それぞれウェスタンブロットとRT-PCRを行った。DAPTを加えた細胞ライセートをネガティブコントロールとして泳動した。切断端のみを認識するV1744抗体はNICDだけに反応する。

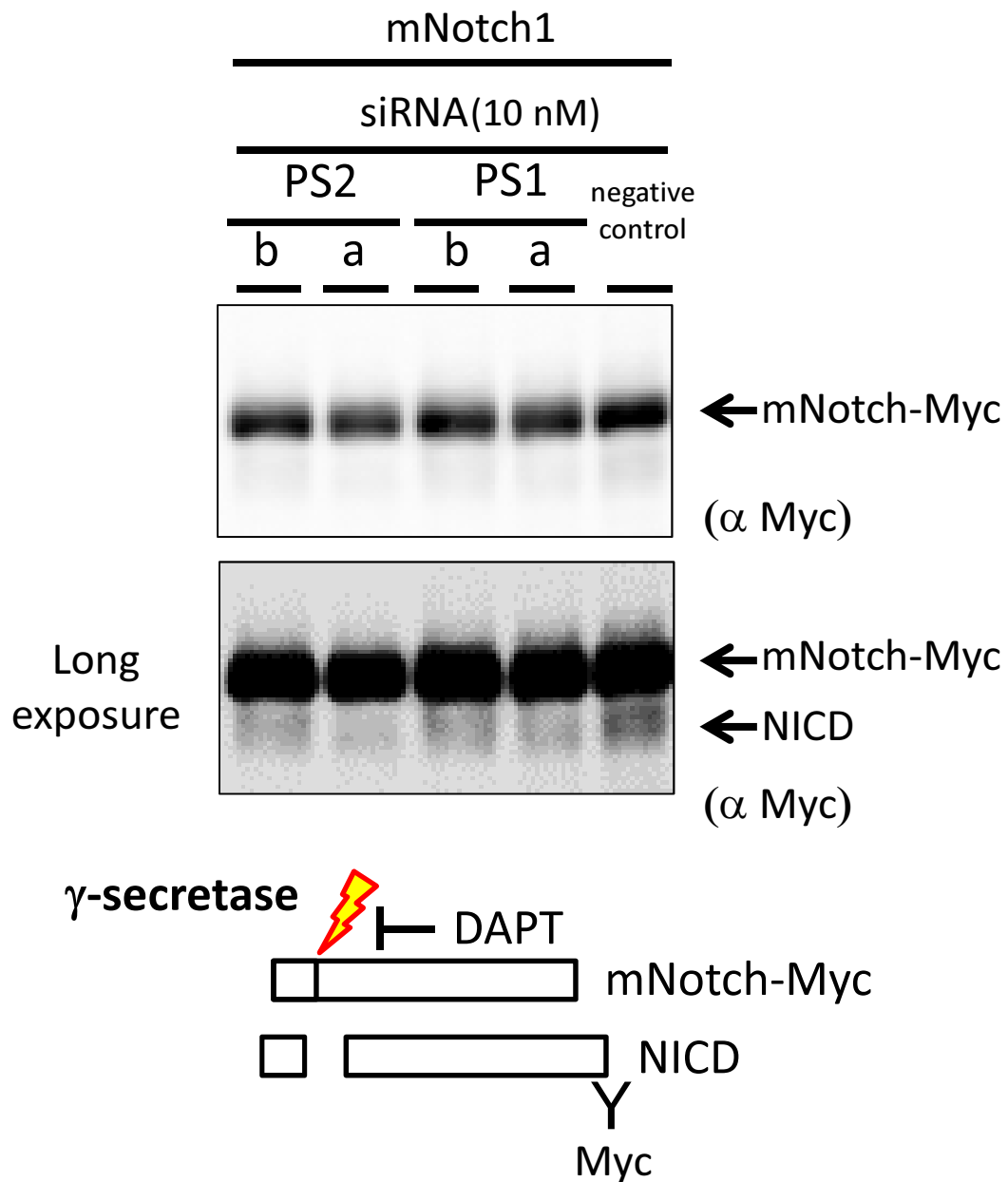


図14. 過剰発現させたmNotch-Myc量の確認

図13で泳動したライセートと同じサンプルをSDS-PAGE、ウェスタンブロットに供し、抗Myc抗体でmNotch-Mycの量を比較した。mNotch-Mycよりも分子量が小さいNICDも検出されている。

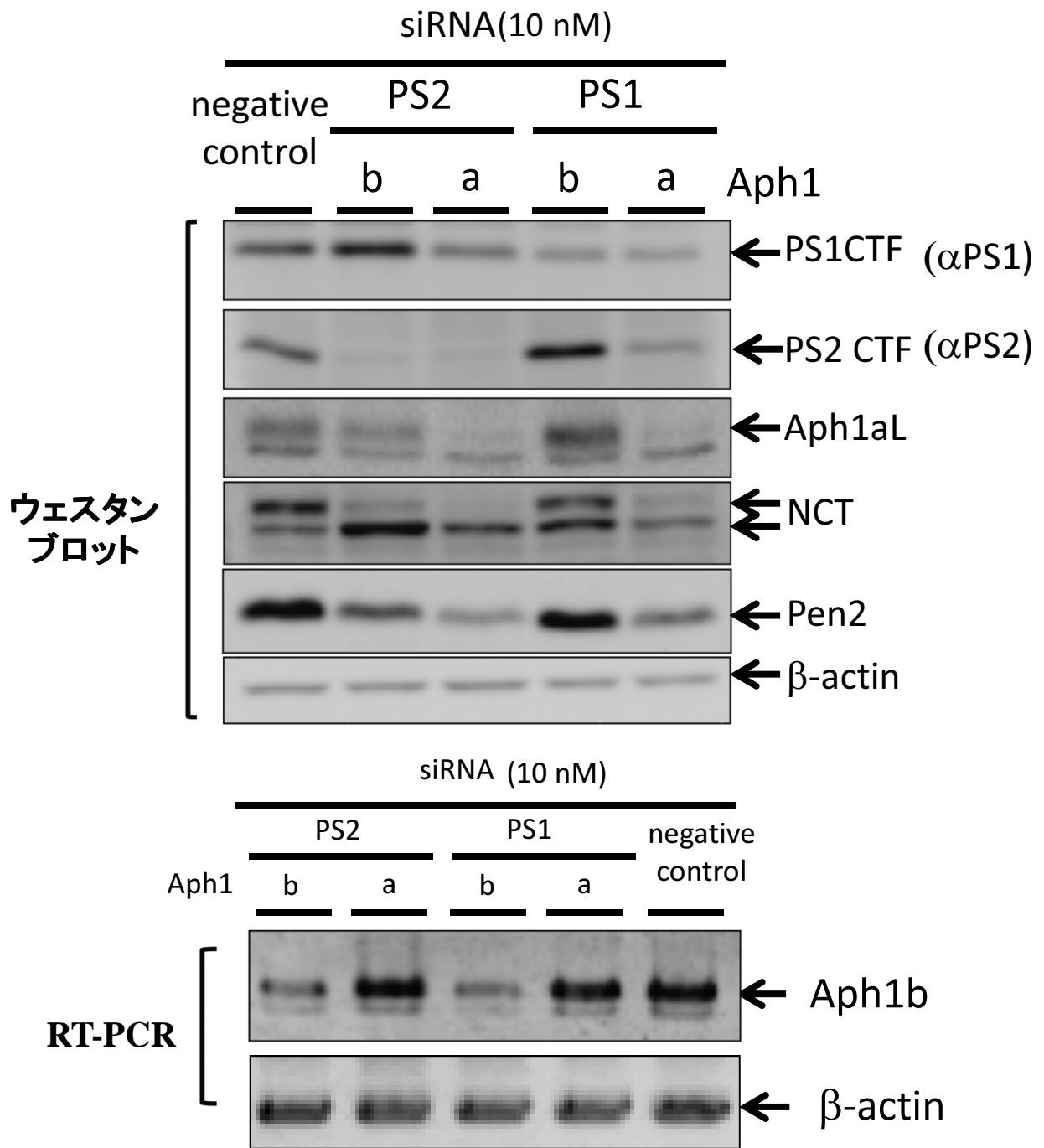


図15. siRNA導入後72時間後のノックダウンの確認

siRNAを表示の組み合わせでそれぞれ10 nMとなるように導入し、72時間後に細胞を回収した。回収した細胞から、ライセートの抽出とRNAの抽出を行い、それぞれウェスタンブロットとRT-PCRでノックダウンの確認を行った。また γ -セクレターゼ構成因子のタンパク質の検出も行い、PS、Aph1ノックダウンによる影響をみた。

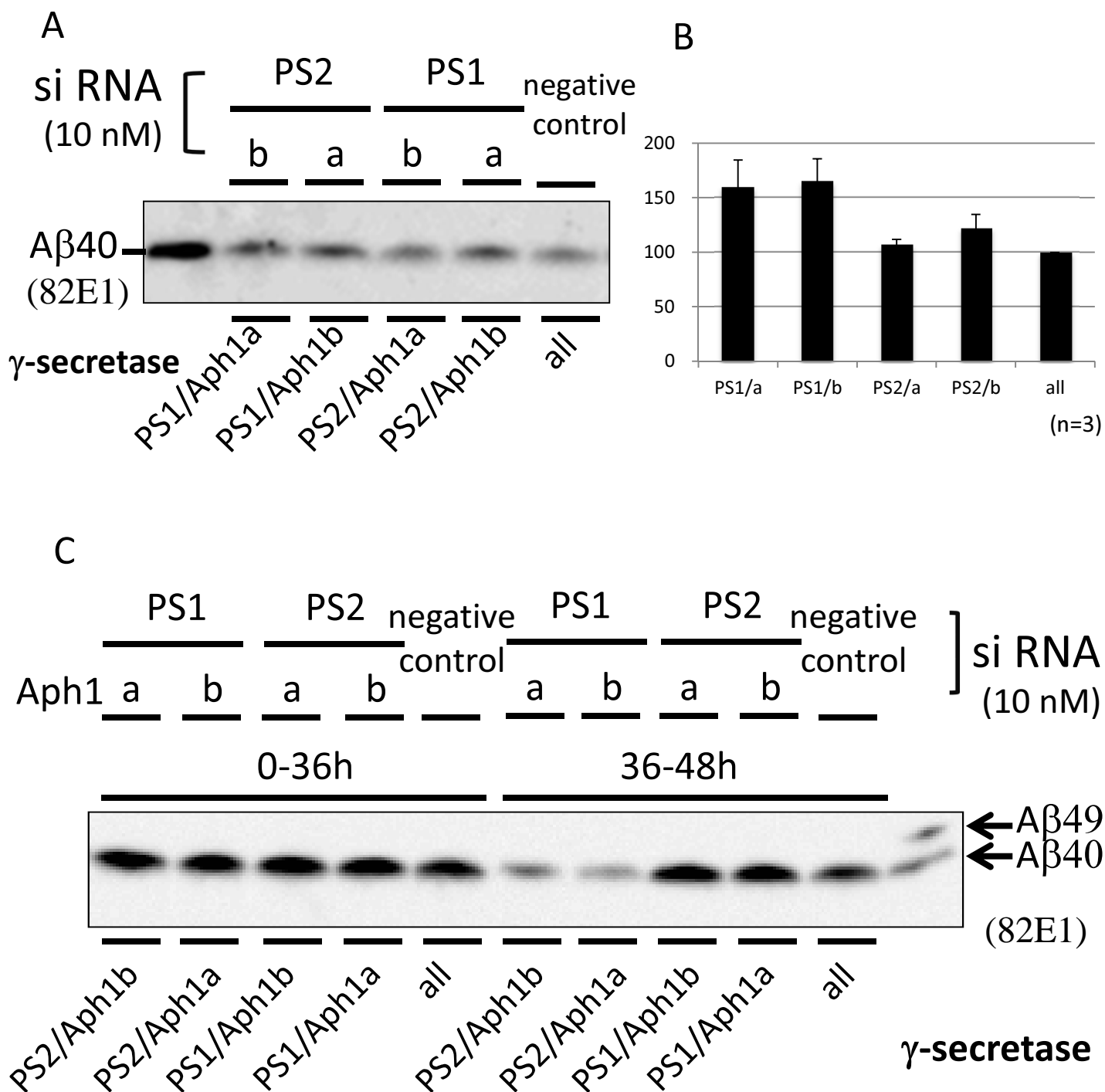


図16. PS、Aph1ノックダウンによるA β 産生量の変化

A. siRNA導入後48-72時間の間培地中に放出されたA β 量の比較を行った。B. Aのバンド強度をcontrol siRNA導入サンプルを100として定量した。エラーバーは標準偏差を示す。C. siRNA導入後36-48時間に培地に放出されたA β 量の違い。ネガティブコントロールとしてsiRNA導入後0-36時間に放出されたA β 量の違いを確認した。メンブレン写真の上にはsiRNAの組み合わせを、下には残っていると考えられる γ -セクレターゼの組成を記した。

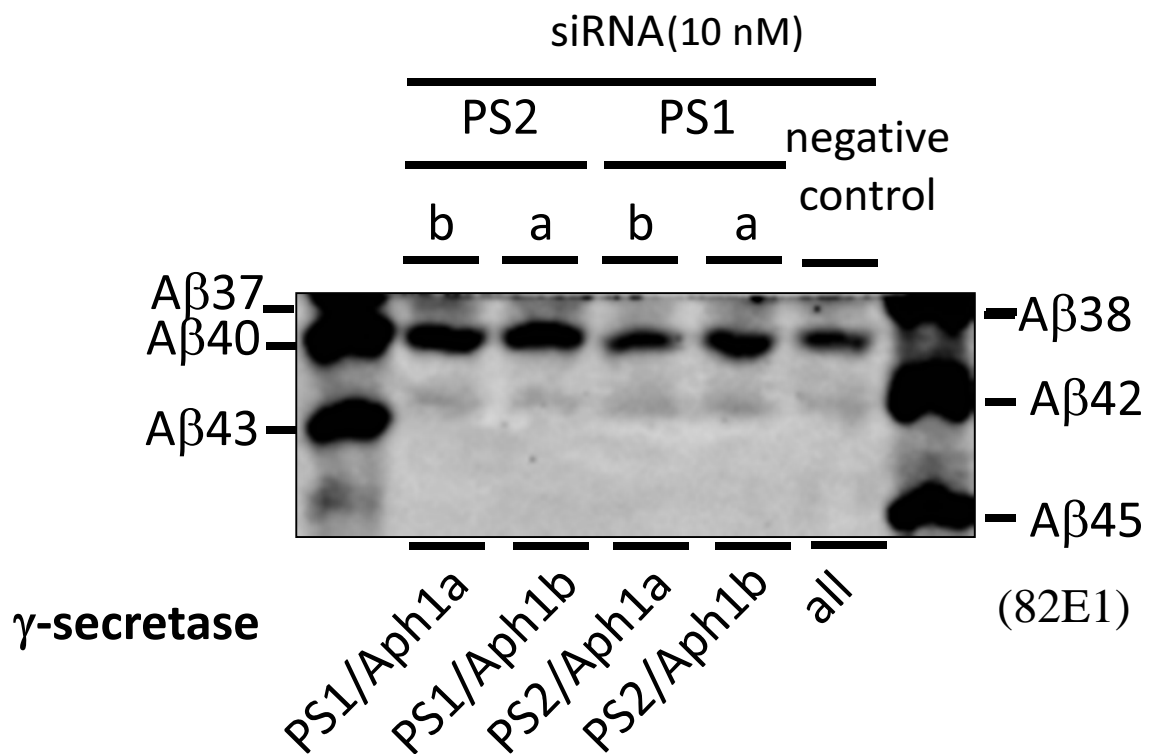


図17. 8M尿素入りゲルによるAβの分離

siRNA導入後48-72時間の間に培地中に放出されたAβの分子種の違いを見るために、8M尿素入りゲルで電気泳動しAβを分離した。両サイドにはそれぞれ表示してある合成Aβペプチド30 pgを泳動した。導入したsiRNAをメンブレン写真の上側に、下には残っているγ-セクレターゼを記してある。

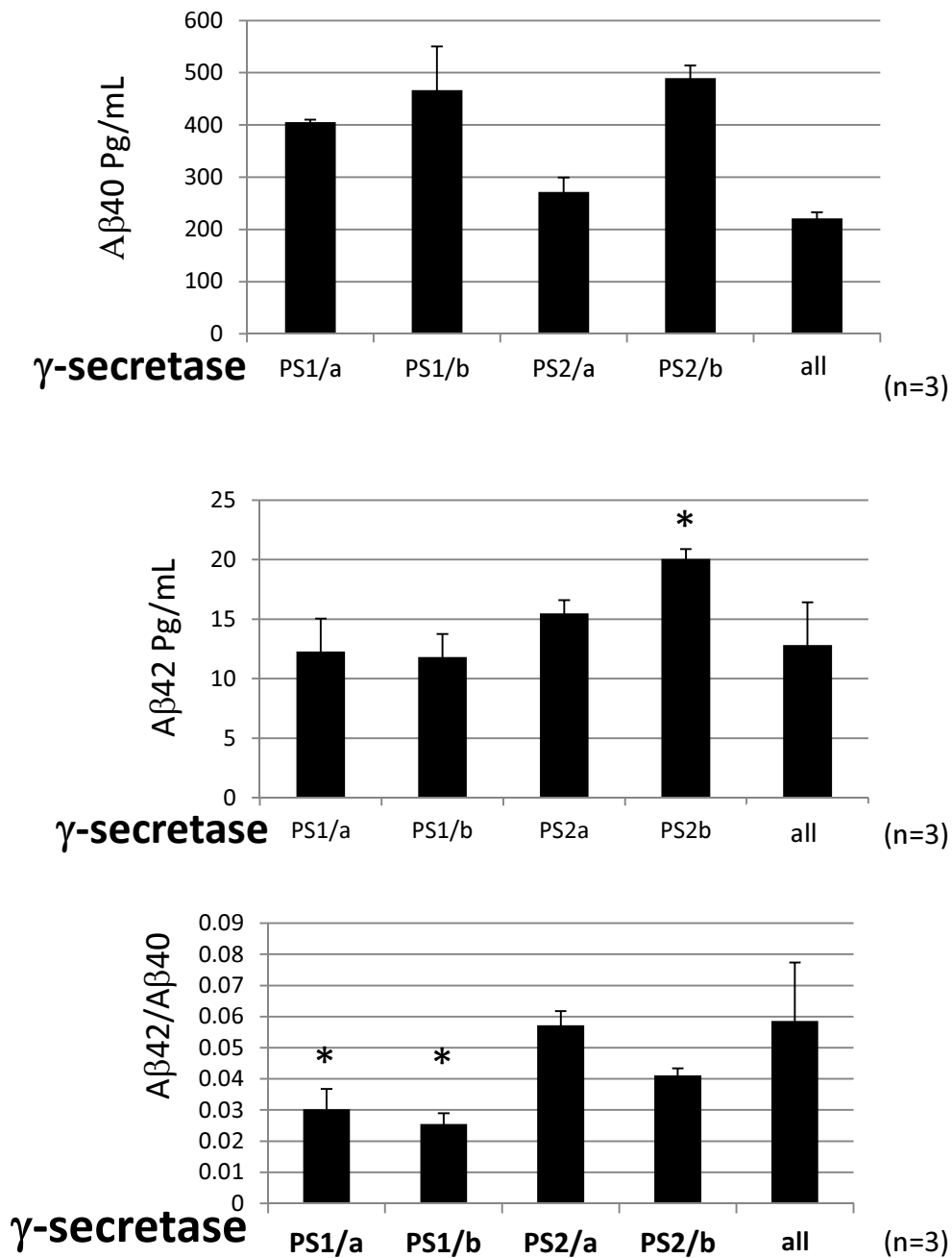


図18. ELISAによる培地中のAβ分子種の測定

Aβ40、Aβ42特異的ELISAキットを用いて、siRNA導入後48-72時間に培地中に放出されたAβ分子種について解析した。Aβ40濃度を上段に、Aβ42は中段にAβ42/Aβ40を下段に示した。グラフの横軸にはsiRNAの結果、残るγ-セクレターゼを示している。例えば、左端のPS1/aというのはPS2/Aph1bのノックダウンを行った細胞という意味である。Dunnet法による多重比較を行った。* $p < 0.05$ 。n=3。エラーバーは標準偏差を示している。

表1. 本研究で得られた γ -セクレターゼの性質の違い

	Notch-Gal4	C55-Gal4	NICD産生	A β 産生	A β 42/A β 40
PS1/NCT/Aph1a-L/Pen2	○	○	○	○	↓
PS1/NCT/Aph1a-S/Pen2	○	○			
PS1/NCT/Aph1b /Pen2	○	○	△	○	↓
PS2/NCT/Aph1a-L/Pen2	×	×	○	△	↑
PS2/NCT/Aph1a-S/Pen2	×	×			
PS2/NCT/Aph1b /Pen2	×	○	△	○	↑

5. 考察

私は異なる γ -セクレターゼのもつ機能の違いを明らかにする目的で、 γ -セクレターゼの酵母再構成系による機能解析を行った。その結果、レポーターアッセイで PS2/Aph1b の γ -セクレターゼは Notch1 と APP の 2 つの異なる基質に対して切断活性が異なるということを見出した。この結果を、培養細胞を用いた PS、Aph1 のノックダウンによって確認して、酵母でみられた PS2/Aph1b の γ -セクレターゼは PS2/Aph1a の γ -セクレターゼよりも APP 切断活性が高く、また PS2 の γ -セクレターゼは Notch 切断活性が低いという結果と同様の結果が得られた一方で、いくつか異なる結果が得られた。これらについて考察していく。

γ -セクレターゼの酵母再構成系の結果

C55 を基質としたとき酵母再構成系におけるレポーターアッセイの結果と *in vitro* A β 産生アッセイの結果が一致しなかった。特に、PS2/Aph1b の γ -セクレターゼのこれら 2 つの系での結果の違いは大きかった。Gal4 融合基質が切断されることを利用した Gal4 のレポーターアッセイは、本当に γ -セクレターゼ活性を反映していたのだろうか。

酵母が選択培地 SD-LWHUAde で生育することや、酵母ライセートに含まれる β ガラクトシダーゼ活性が高いことが γ -セクレターゼによる切断の結果であることを確かめる目的で、酵母の培地（液体培地、寒天培地）に γ -セクレターゼ阻害剤を添加する実験を試みた。まずは液体培地に γ -セクレターゼ阻害剤である DAPT、L-685,458 を添加したが、コントロールとして添加した DMSO と生育速度に変化が見られず、阻害剤による効果は見られなかった。過去の文献(67)を参考にして SDS を培地に加えることで酵母への薬剤の浸透を高め、阻害剤の効果を確認しようとしたが、これも効果が見られなかった(data not shown)。どうやら酵母は薬剤耐性が高く、これは酵母がもつ ABC (ATP Binding Cassette) トランスポーターによって薬剤が排出されているためと考えられている。この酵母の薬剤排出機構のため γ -セクレターゼ阻害剤の添加による効果を確認することはできなかつたと考えられた。主要な ABC トランスポーター遺伝子 *pdr5* を欠損させた変異体を用いることで阻害剤が効くことがわかれば、PS2/Aph1b を導入した酵母が示した選択培地での生育や β ガラクトシダーゼ活性が再構成された γ -セクレターゼによるものであると証明できるであろう。またトランスポーターノックアウトによる薬剤耐性の低い変異体が見られれば γ -セクレターゼ阻害剤のハイスループットスクリーニングができるようになる。これが可能になれば、Notch の切断活性は保ったまま APP の切断を抑えるような新たな化合物の発見が期待できる。

γ -セクレターゼ阻害剤による確認ができなかつたため、ネガティブコントロールとして PS なし/Aph1b や、活性が極端に低いことが多くの研究者によって確認されている

FAD 変異型 PS2N141I/Aph1b などの組み合わせで γ -セクレターゼを再構成した。これらのコントロールでは選択培地で酵母の生育が見られず、PS2/Aph1b の組み合わせのときにみられる選択培地上での生育は再構成された γ -セクレターゼによる切断の結果であると考えられた。

in vitro A β 産生アッセイ

in vitro アッセイで A β の産生が見られなかった原因は 2 つ考えられる。1 つは至適 pH の違いによるものである。*in vitro* アッセイでは pH を 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 のうち pH7.0 を選んで比較した。Aph1a では pH7.0 付近で A β 産生が最も多いが、Aph1b では酸性側で多く産生したり、A β 産生の至適 pH が広い範囲にわたっていることがわかった。pH5.5~8.0 の異なるすべてのバッファーでアッセイし少量ずつ混ぜて SDS-PAGE、ウェスタンブロットで評価するという実験が正確な活性評価に必要である。2 つ目は、酵母から調製した膜画分の問題である。酵母からの膜画分中に含まれる γ -セクレターゼ構成タンパク質の発現量が、発現させる PS、Aph1 の違いによってバラバラであった。先行研究では、Aph1a のノックダウンやノックアウトによる PS、NCT、Pen2 のタンパク質レベルの低下が報告されている(43)。酵母再構成系ではこれらの先行研究と同様に Aph1a を発現させないときに、Aph1a を発現させた酵母と比べて PS や Pen2 のタンパク質レベルでの低下がみられた。この結果が Aph1a が存在しないことで引き起こされているのであれば、同時に Aph1a も発現させた上で目的の組み合わせだけ免疫沈降法などで回収し、*in vitro* アッセイに用いることで正確な評価ができると考えられる。また、こちらのほうがより実際の複合体の状態を反映しているということも考えられる。培養細胞に siRNA の導入をすることによるノックダウンや、酵母に 1 種類の γ -セクレターゼだけを発現させるというのは制約のある状態で作られた複合体で生体内での本来の姿とは違う可能性も否定できない。

培養細胞系と酵母再構成系で得られた結果の違い

どちらか一方の PS のノックダウン時にノックダウンされなかった方の PS 量がコントロール siRNA 導入した細胞ライセート中にある量と比較して増加するという結果が見られた。これは、過去に報告があった、膜に存在できる PSCTF 量が一定であるためノックダウンによって減少した分をもう一方の PS が補っていると考えられる(68)。しかし、Aph1a 非存在下では安定化できずに分解していると考えられる。

(1) Notch の切断について

酵母再構成系と培養細胞を用いたノックダウンの系で、 γ -セクレターゼによる Notch の切断効率の違いが存在することが示唆された。酵母再構成系におけるレポーターアッセイの結果、PS1 が PS2 に比べて切断活性が圧倒的に高く、PS2 はほとんど切断しな

いと考えられる結果を示したが、培養細胞の系で siRNA によるノックダウンを用いて PS1 の γ -セクレターゼを残し、PS1 が産生する NICD を調べると、Aph1a のときは産生が見られたが、Aph1b のときは産生量が低下していた。PS2 の γ -セクレターゼを残したときも Aph1 の違いによって同様の結果となった。つまりノックダウンを用いた培養細胞系での結果は、酵母再構成系で見られた結果を再現しなかった。培養細胞系では、PS1 か PS2 かではなく Aph1a か Aph1b かによって産生される NICD 量が決定されているような結果を示した。PS2 のノックダウンは十分されており、ほとんど PS1 のみという状況で PS1/Aph1b の組み合わせは NICD 産生が低いという結果はとても興味深い。一方 PS1 のノックダウンは十分とはいえず、PS1 ノックダウン細胞が産生した NICD は PS1 と PS2 が産生したものの両方が含まれている可能性が考えられる。

(2) APP の切断について

APP を基質とした場合に酵母で再構成した各 γ -セクレターゼによる切断活性をレポーターアッセイで評価した結果と、BACE1 安定発現 HEK293 細胞に siRNA を導入し、PS、Aph1 のノックダウンによって特定の γ -セクレターゼに A β を産生させた結果は、PS1 は Aph1a、Aph1b とともに A β を産生し、PS2 では PS2/Aph1a より PS2/Aph1b のほうが多く A β 産生が見られたという結果になった。尿素を含むゲルで電気泳動した結果、A β 38、A β 40、A β 42(43)などが検出できた。また ELISA による定量では A β 40、A β 42 がそれぞれ検出されたが A β 43 は検出されなかった。検出された A β の A β 42の産生比率を計算してみると PS2 の γ -セクレターゼのほうが PS1 に比べて A β 42産生比率が高く、アルツハイマー病発症に寄与していると考えられた。先行研究では A β 42 産生が亢進することと PSNTF と PSCTF 間の距離が近いことが相関があることが知られており、PS2 の γ -セクレターゼでどうなっているのか気になるところである。また FAD 変異型の PS においては、Aph1 の違いによる影響がないかどうかについてもほとんど報告がない。今回の実験では PS2 は PS1 と比べて A β 42/A β 40 が約 2 倍となっていたが、Strooper 研究室の報告によると A β 42/A β 40 の比率が 1:9 (0.1) から 2:8 (0.25) となると毒性が出てくることが報告されており、生体内でどのくらい PS2 による A β 産生がおきているかはわからないが、PS2 による A β 産生を抑えることである程度は毒性のある A β 産生が抑えられそうである。

酵母では膜画分のインキュベーションによって産生される A β 分子の中で最も多いのが A β 43 であるという結果が得られている(60)、一方で培養細胞の系では A β 40 が最も多く、A β 43 は A β 42 よりも少ないことが報告されている(31)。精製した γ -セクレターゼをさまざまな組成のリポソームに戻すと産生される A β 分子種が異なる結果が得られており、産生される A β 分子種の違いをもたらす原因のひとつは膜の組成の違いによると考えられる。今後、酵母を用いた γ -セクレターゼの機能解析を行い A β 分子種まで詳細

に調べる場合はここに注意が必要であろう。また、酵母再構成系ではひとつひとつの γ -セクレターゼについて解析できる点が最大の魅力であるが、哺乳類細胞系で報告されている γ -セクレターゼ結合タンパク質が存在するかどうかにも注意する必要がある。CD147、GSAPなどは酵母に存在しないが、 γ -セクレターゼ活性の抑制する機能が報告されている。哺乳類細胞の系との違いをなるべく小さくするためには、酵母に存在しないタンパク質を補うような工夫が必要と考えられる。また、これらの調節タンパク質は複数そろってはじめて機能するのかどうかについてはまだ明らかになっておらず、酵母の系を使えば明らかにすることができ、酵母再構成系では調節タンパク質の機能をより深く解析できるかもしれない。

APP^{swe} 過剰発現細胞を用いた siRNA 実験をすることができなかったが、APP^{swe} は APP の輸送が APP^{wt} と異なることが報告されている(64)。Aph1 の局在が異なるのであれば今回とは異なる結果が得られるだろう。

酵母再構成系、ノックダウンを用いた培養細胞系の両方の結果から、PS2/Aph1b の γ -セクレターゼ複合体は Notch1 の切断活性は低いが APP の切断は PS1 の γ -セクレターゼと同程度か、少なくとも PS2/Aph1a よりは高い活性で行っていることが示唆された。さらに、PS2/Aph1b は A β 42 の産生比率 (A β 42/A β 40) も高いことが示唆された。これまで、A β 産生を抑制する目的の γ -セクレターゼ阻害の副作用として Notch シグナリングをも阻害してしまうことが挙げられてきた。しかし、ひとつひとつの γ -セクレターゼの違いについて酵母再構成系、培養細胞系で検討した結果、PS2/Aph1b の γ -セクレターゼは Notch1 の切断活性は低く A β 42 産生比率は PS1 に比べて高いことがわかった。PS2/Aph1b に親和性のある阻害剤などの開発により、アルツハイマー病発症に深い A β 42産生比率を抑制しつつ、Notch シグナリングはそれほど阻害しないという戦略がとれるかもしれない。さらに詳しい解析には *in vitro* のアッセイも必要であるが、今回、 γ -セクレターゼが組み合わせによって異なる性質を持つということが明らかになったことは非常に大きな発見である。

6. 参考文献

1. Glenner, G. G., and Wong, C. W. (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* **120**, 885-890
2. Glenner, G. G., and Wong, C. W. (1984) Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem Biophys Res Commun* **122**, 1131-1135
3. Glenner, G. G., Wong, C. W., Quaranta, V., and Eanes, E. D. (1984) The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis. *Appl Pathol* **2**, 357-369
4. Selkoe, D. J., Bell, D. S., Podlisny, M. B., Price, D. L., and Cork, L. C. (1987) Conservation of brain amyloid proteins in aged mammals and humans with Alzheimer's disease. *Science* **235**, 873-877
5. Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y. C., Quinlan, M., Wisniewski, H. M., and Binder, L. I. (1986) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**, 4913-4917
6. Ihara, Y., Nukina, N., Miura, R., and Ogawara, M. (1986) Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *J Biochem* **99**, 1807-1810
7. Kosik, K. S., Joachim, C. L., and Selkoe, D. J. (1986) Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**, 4044-4048
8. Kondo, J., Honda, T., Mori, H., Hamada, Y., Miura, R., Ogawara, M., and Ihara, Y. (1988) The carboxyl third of tau is tightly bound to paired helical filaments. *Neuron* **1**, 827-834
9. Cole, S. L., and Vassar, R. (2007) The Alzheimer's disease beta-secretase enzyme, BACE1. *Mol Neurodegener* **2**, 22
10. Dillen, K., and Annaert, W. (2006) A two decade contribution of molecular cell biology to the centennial of Alzheimer's disease: are we progressing toward therapy? *Int Rev Cytol* **254**, 215-300
11. Suzuki, N., Cheung, T. T., Cai, X. D., Odaka, A., Otvos, L., Jr., Eckman, C., Golde, T. E., and Younkin, S. G. (1994) An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science* **264**, 1336-1340
12. Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T. D.,

- Hardy, J., Hutton, M., Kukull, W., Larson, E., Levy-Lahad, E., Viitanen, M., Peskind, E., Poorkaj, P., Schellenberg, G., Tanzi, R., Wasco, W., Lannfelt, L., Selkoe, D., and Younkin, S. (1996) Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med* **2**, 864-870
13. Borchelt, D. R., Thinakaran, G., Eckman, C. B., Lee, M. K., Davenport, F., Ratovitsky, T., Prada, C. M., Kim, G., Seekins, S., Yager, D., Slunt, H. H., Wang, R., Seeger, M., Levey, A. I., Gandy, S. E., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Price, D. L., Younkin, S. G., and Sisodia, S. S. (1996) Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate A β 1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* **17**, 1005-1013
 14. Xia, W., Zhang, J., Kholodenko, D., Citron, M., Podlisny, M. B., Teplow, D. B., Haass, C., Seubert, P., Koo, E. H., and Selkoe, D. J. (1997) Enhanced production and oligomerization of the 42-residue amyloid beta-protein by Chinese hamster ovary cells stably expressing mutant presenilins. *J Biol Chem* **272**, 7977-7982
 15. Citron, M., Westaway, D., Xia, W., Carlson, G., Diehl, T., Levesque, G., Johnson-Wood, K., Lee, M., Seubert, P., Davis, A., Kholodenko, D., Motter, R., Sherrington, R., Perry, B., Yao, H., Strome, R., Lieberburg, I., Rommens, J., Kim, S., Schenk, D., Fraser, P., St George Hyslop, P., and Selkoe, D. J. (1997) Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat Med* **3**, 67-72
 16. Bentahir, M., Nyabi, O., Verhamme, J., Tolia, A., Horre, K., Wiltfang, J., Esselmann, H., and De Strooper, B. (2006) Presenilin clinical mutations can affect gamma-secretase activity by different mechanisms. *J Neurochem* **96**, 732-742
 17. Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G. W., Roses, A. D., Haines, J. L., and Pericak-Vance, M. A. (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* **261**, 921-923
 18. Lambert, J. C., Ibrahim-Verbaas, C. A., Harold, D., Naj, A. C., Sims, R., Bellenguez, C., Jun, G., Destefano, A. L., Bis, J. C., Beecham, G. W., Grenier-Boley, B., Russo, G., Thornton-Wells, T. A., Jones, N., Smith, A. V., Chouraki, V., Thomas, C., Ikram, M. A., Zelenika, D., Vardarajan, B. N., Kamatani, Y., Lin, C. F., Gerrish, A., Schmidt, H., Kunkle, B., Dunstan, M. L., Ruiz, A., Bihoreau, M. T., Choi, S. H., Reitz, C., Pasquier, F., Hollingworth, P., Ramirez, A., Hanon, O., Fitzpatrick, A. L., Buxbaum, J. D., Campion, D., Crane, P. K., Baldwin, C., Becker, T., Gudnason, V., Cruchaga, C., Craig, D., Amin, N., Berr, C., Lopez, O. L., De Jager, P. L., Deramecourt, V., Johnston, J. A., Evans, D., Lovestone, S., Letenneur, L., Moron, F. J., Rubinsztein, D. C., Eiriksdottir,

- G., Sleegers, K., Goate, A. M., Fievet, N., Huentelman, M. J., Gill, M., Brown, K., Kamboh, M. I., Keller, L., Barberger-Gateau, P., McGuinness, B., Larson, E. B., Green, R., Myers, A. J., Dufouil, C., Todd, S., Wallon, D., Love, S., Rogaeva, E., Gallacher, J., St George-Hyslop, P., Clarimon, J., Lleo, A., Bayer, A., Tsuang, D. W., Yu, L., Tzolaki, M., Bossu, P., Spalletta, G., Proitsi, P., Collinge, J., Sorbi, S., Sanchez-Garcia, F., Fox, N. C., Hardy, J., Naranjo, M. C., Bosco, P., Clarke, R., Brayne, C., Galimberti, D., Mancuso, M., Matthews, F., European Alzheimer's Disease, I., Genetic, Environmental Risk in Alzheimer's, D., Alzheimer's Disease Genetic, C., Cohorts for, H., Aging Research in Genomic, E., Moebus, S., Mecocci, P., Del Zompo, M., Maier, W., Hampel, H., Pilotto, A., Bullido, M., Panza, F., Caffarra, P., Nacmias, B., Gilbert, J. R., Mayhaus, M., Lannfelt, L., Hakonarson, H., Pichler, S., Carrasquillo, M. M., Ingelsson, M., Beekly, D., Alvarez, V., Zou, F., Valladares, O., Younkin, S. G., Coto, E., Hamilton-Nelson, K. L., Gu, W., Razquin, C., Pastor, P., Mateo, I., Owen, M. J., Faber, K. M., Jonsson, P. V., Combarros, O., O'Donovan, M. C., Cantwell, L. B., Soininen, H., Blacker, D., Mead, S., Mosley, T. H., Jr., Bennett, D. A., Harris, T. B., Fratiglioni, L., Holmes, C., de Bruijn, R. F., Passmore, P., Montine, T. J., Bettens, K., Rotter, J. I., Brice, A., Morgan, K., Foroud, T. M., Kukull, W. A., Hannequin, D., Powell, J. F., Nalls, M. A., Ritchie, K., Lunetta, K. L., Kauwe, J. S., Boerwinkle, E., Riemenschneider, M., Boada, M., Hiltunen, M., Martin, E. R., Schmidt, R., Rujescu, D., Wang, L. S., Dartigues, J. F., Mayeux, R., Tzourio, C., Hofman, A., Nothen, M. M., Graff, C., Psaty, B. M., Jones, L., Haines, J. L., Holmans, P. A., Lathrop, M., Pericak-Vance, M. A., Launer, L. J., Farrer, L. A., van Duijn, C. M., Van Broeckhoven, C., Moskvina, V., Seshadri, S., Williams, J., Schellenberg, G. D., and Amouyel, P. (2013) Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat Genet* **45**, 1452-1458
19. Goate, A., and Hardy, J. (2012) Twenty years of Alzheimer's disease-causing mutations. *J Neurochem* **120 Suppl 1**, 3-8
 20. Gomez-Isla, T., Hollister, R., West, H., Mui, S., Growdon, J. H., Petersen, R. C., Parisi, J. E., and Hyman, B. T. (1997) Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* **41**, 17-24
 21. Walsh, D. M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V., Cullen, W. K., Anwyl, R., Wolfe, M. S., Rowan, M. J., and Selkoe, D. J. (2002) Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* **416**, 535-539
 22. Selkoe, D. J. (2002) Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* **298**, 789-791
 23. Shankar, G. M., Li, S., Mehta, T. H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N. E., Smith, I., Brett, F. M., Farrell, M. A., Rowan, M. J., Lemere, C. A., Regan, C. M., Walsh, D. M.,

- Sabatini, B. L., and Selkoe, D. J. (2008) Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* **14**, 837-842
24. Klyubin, I., Betts, V., Welzel, A. T., Blennow, K., Zetterberg, H., Wallin, A., Lemere, C. A., Cullen, W. K., Peng, Y., Wisniewski, T., Selkoe, D. J., Anwyl, R., Walsh, D. M., and Rowan, M. J. (2008) Amyloid beta protein dimer-containing human CSF disrupts synaptic plasticity: prevention by systemic passive immunization. *J Neurosci* **28**, 4231-4237
25. Lesne, S., Koh, M. T., Kotilinek, L., Kaye, R., Glabe, C. G., Yang, A., Gallagher, M., and Ashe, K. H. (2006) A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* **440**, 352-357
26. Billings, L. M., Green, K. N., McLaugh, J. L., and LaFerla, F. M. (2007) Learning decreases A beta*56 and tau pathology and ameliorates behavioral decline in 3xTg-AD mice. *J Neurosci* **27**, 751-761
27. Tomiyama, T., Matsuyama, S., Iso, H., Umeda, T., Takuma, H., Ohnishi, K., Ishibashi, K., Teraoka, R., Sakama, N., Yamashita, T., Nishitsuji, K., Ito, K., Shimada, H., Lambert, M. P., Klein, W. L., and Mori, H. (2010) A mouse model of amyloid beta oligomers: their contribution to synaptic alteration, abnormal tau phosphorylation, glial activation, and neuronal loss in vivo. *J Neurosci* **30**, 4845-4856
28. Jonsson, T., Atwal, J. K., Steinberg, S., Snaedal, J., Jonsson, P. V., Bjornsson, S., Stefansson, H., Sulem, P., Gudbjartsson, D., Maloney, J., Hoyte, K., Gustafson, A., Liu, Y., Lu, Y., Bhangale, T., Graham, R. R., Huttenlocher, J., Bjornsdottir, G., Andreassen, O. A., Jonsson, E. G., Palotie, A., Behrens, T. W., Magnusson, O. T., Kong, A., Thorsteinsdottir, U., Watts, R. J., and Stefansson, K. (2012) A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature* **488**, 96-99
29. Suh, J., Choi, S. H., Romano, D. M., Gannon, M. A., Lesinski, A. N., Kim, D. Y., and Tanzi, R. E. (2013) ADAM10 missense mutations potentiate beta-amyloid accumulation by impairing prodomain chaperone function. *Neuron* **80**, 385-401
30. Jarrett, J. T., Berger, E. P., and Lansbury, P. T., Jr. (1993) The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* **32**, 4693-4697
31. Saito, T., Suemoto, T., Brouwers, N., Slegers, K., Funamoto, S., Mihira, N., Matsuba, Y., Yamada, K., Nilsson, P., Takano, J., Nishimura, M., Iwata, N., Van Broeckhoven, C., Ihara, Y., and Saido, T. C. (2011) Potent amyloidogenicity and pathogenicity of Abeta43. *Nat Neurosci* **14**, 1023-1032
32. Takami, M., Nagashima, Y., Sano, Y., Ishihara, S., Morishima-Kawashima, M.,

- Funamoto, S., and Ihara, Y. (2009) gamma-Secretase: successive tripeptide and tetrapeptide release from the transmembrane domain of beta-carboxyl terminal fragment. *J Neurosci* **29**, 13042-13052
33. Edbauer, D., Winkler, E., Regula, J. T., Pesold, B., Steiner, H., and Haass, C. (2003) Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat Cell Biol* **5**, 486-488
34. Kimberly, W. T., LaVoie, M. J., Ostaszewski, B. L., Ye, W., Wolfe, M. S., and Selkoe, D. J. (2003) Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 6382-6387
35. Takasugi, N., Tomita, T., Hayashi, I., Tsuruoka, M., Niimura, M., Takahashi, Y., Thinakaran, G., and Iwatsubo, T. (2003) The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex. *Nature* **422**, 438-441
36. Sato, T., Diehl, T. S., Narayanan, S., Funamoto, S., Ihara, Y., De Strooper, B., Steiner, H., Haass, C., and Wolfe, M. S. (2007) Active gamma-secretase complexes contain only one of each component. *J Biol Chem* **282**, 33985-33993
37. Spasic, D., Tolia, A., Dillen, K., Baert, V., De Strooper, B., Vrijens, S., and Annaert, W. (2006) Presenilin-1 maintains a nine-transmembrane topology throughout the secretory pathway. *J Biol Chem* **281**, 26569-26577
38. Wolfe, M. S., Xia, W., Ostaszewski, B. L., Diehl, T. S., Kimberly, W. T., and Selkoe, D. J. (1999) Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* **398**, 513-517
39. Steiner, H., Duff, K., Capell, A., Romig, H., Grim, M. G., Lincoln, S., Hardy, J., Yu, X., Picciano, M., Fechteler, K., Citron, M., Kopan, R., Pesold, B., Keck, S., Baader, M., Tomita, T., Iwatsubo, T., Baumeister, R., and Haass, C. (1999) A loss of function mutation of presenilin-2 interferes with amyloid beta-peptide production and notch signaling. *J Biol Chem* **274**, 28669-28673
40. Lee, M. K., Slunt, H. H., Martin, L. J., Thinakaran, G., Kim, G., Gandy, S. E., Seeger, M., Koo, E., Price, D. L., and Sisodia, S. S. (1996) Expression of presenilin 1 and 2 (PS1 and PS2) in human and murine tissues. *J Neurosci* **16**, 7513-7525
41. Fortna, R. R., Crystal, A. S., Morais, V. A., Pijak, D. S., Lee, V. M., and Doms, R. W. (2004) Membrane topology and nicastrin-enhanced endoproteolysis of APH-1, a component of the gamma-secretase complex. *J Biol Chem* **279**, 3685-3693
42. Serneels, L., Van Biervliet, J., Craessaerts, K., Dejaegere, T., Horre, K., Van Houtvin, T., Esselmann, H., Paul, S., Schafer, M. K., Berezovska, O., Hyman, B. T., Sprangers, B., Sciot, R., Moons, L., Jucker, M., Yang, Z., May, P. C., Karran, E., Wiltfang, J., D'Hooge, R., and De Strooper, B. (2009) gamma-Secretase heterogeneity in the Aph1 subunit: relevance for Alzheimer's disease. *Science* **324**, 639-642

43. Shirotani, K., Tomioka, M., Kremmer, E., Haass, C., and Steiner, H. (2007) Pathological activity of familial Alzheimer's disease-associated mutant presenilin can be executed by six different gamma-secretase complexes. *Neurobiol Dis* **27**, 102-107
44. Shah, S., Lee, S. F., Tabuchi, K., Hao, Y. H., Yu, C., LaPlant, Q., Ball, H., Dann, C. E., 3rd, Sudhof, T., and Yu, G. (2005) Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor. *Cell* **122**, 435-447
45. Futai, E., Yagishita, S., and Ishiura, S. (2009) Nicastrin is dispensable for gamma-secretase protease activity in the presence of specific presenilin mutations. *J Biol Chem* **284**, 13013-13022
46. Steiner, H., Winkler, E., Edbauer, D., Prokop, S., Basset, G., Yamasaki, A., Kostka, M., and Haass, C. (2002) PEN-2 is an integral component of the gamma-secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin. *J Biol Chem* **277**, 39062-39065
47. LaVoie, M. J., Fraering, P. C., Ostaszewski, B. L., Ye, W., Kimberly, W. T., Wolfe, M. S., and Selkoe, D. J. (2003) Assembly of the gamma-secretase complex involves early formation of an intermediate subcomplex of Aph-1 and nicastrin. *J Biol Chem* **278**, 37213-37222
48. Niimura, M., Isoo, N., Takasugi, N., Tsuruoka, M., Ui-Tei, K., Saigo, K., Morohashi, Y., Tomita, T., and Iwatsubo, T. (2005) Aph-1 contributes to the stabilization and trafficking of the gamma-secretase complex through mechanisms involving intermolecular and intramolecular interactions. *J Biol Chem* **280**, 12967-12975
49. Fraering, P. C., LaVoie, M. J., Ye, W., Ostaszewski, B. L., Kimberly, W. T., Selkoe, D. J., and Wolfe, M. S. (2004) Detergent-dependent dissociation of active gamma-secretase reveals an interaction between Pen-2 and PS1-NTF and offers a model for subunit organization within the complex. *Biochemistry* **43**, 323-333
50. Sato, C., Morohashi, Y., Tomita, T., and Iwatsubo, T. (2006) Structure of the catalytic pore of gamma-secretase probed by the accessibility of substituted cysteines. *J Neurosci* **26**, 12081-12088
51. Sato, C., Takagi, S., Tomita, T., and Iwatsubo, T. (2008) The C-terminal PAL motif and transmembrane domain 9 of presenilin 1 are involved in the formation of the catalytic pore of the gamma-secretase. *J Neurosci* **28**, 6264-6271
52. Takagi, S., Tominaga, A., Sato, C., Tomita, T., and Iwatsubo, T. (2010) Participation of transmembrane domain 1 of presenilin 1 in the catalytic pore structure of the gamma-secretase. *J Neurosci* **30**, 15943-15950
53. Uemura, K., Lill, C. M., Li, X., Peters, J. A., Ivanov, A., Fan, Z., DeStrooper, B., Bacskai, B. J., Hyman, B. T., and Berezovska, O. (2009) Allosteric modulation of

- PS1/gamma-secretase conformation correlates with amyloid beta(42/40) ratio. *PLoS One* **4**, e7893
54. Uemura, K., Farner, K. C., Hashimoto, T., Nasser-Ghodsi, N., Wolfe, M. S., Koo, E. H., Hyman, B. T., and Berezovska, O. (2010) Substrate docking to gamma-secretase allows access of gamma-secretase modulators to an allosteric site. *Nat Commun* **1**, 130
55. Isoo, N., Sato, C., Miyashita, H., Shinohara, M., Takasugi, N., Morohashi, Y., Tsuji, S., Tomita, T., and Iwatsubo, T. (2007) Abeta42 overproduction associated with structural changes in the catalytic pore of gamma-secretase: common effects of Pen-2 N-terminal elongation and fenofibrate. *J Biol Chem* **282**, 12388-12396
56. Zhou, S., Zhou, H., Walian, P. J., and Jap, B. K. (2005) CD147 is a regulatory subunit of the gamma-secretase complex in Alzheimer's disease amyloid beta-peptide production. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 7499-7504
57. Chen, F., Hasegawa, H., Schmitt-Ulms, G., Kawarai, T., Bohm, C., Katayama, T., Gu, Y., Sanjo, N., Glista, M., Rogaeva, E., Wakutani, Y., Pardossi-Piquard, R., Ruan, X., Tandon, A., Checler, F., Marambaud, P., Hansen, K., Westaway, D., St George-Hyslop, P., and Fraser, P. (2006) TMP21 is a presenilin complex component that modulates gamma-secretase but not epsilon-secretase activity. *Nature* **440**, 1208-1212
58. He, G., Luo, W., Li, P., Remmers, C., Netzer, W. J., Hendrick, J., Bettayeb, K., Flajolet, M., Gorelick, F., Wennogle, L. P., and Greengard, P. (2010) Gamma-secretase activating protein is a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Nature* **467**, 95-98
59. Hussain, I., Fabregue, J., Anderes, L., Ousson, S., Borlat, F., Eligert, V., Berger, S., Dimitrov, M., Alattia, J. R., Fraering, P. C., and Beher, D. (2013) The role of gamma-secretase activating protein (GSAP) and imatinib in the regulation of gamma-secretase activity and amyloid-beta generation. *J Biol Chem* **288**, 2521-2531
60. Yagishita, S., Futai, E., and Ishiura, S. (2008) In vitro reconstitution of gamma-secretase activity using yeast microsomes. *Biochem Biophys Res Commun* **377**, 141-145
61. James, P., Halladay, J., and Craig, E. A. (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**, 1425-1436
62. Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., and Nairn, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**, 59-74
63. Asai, M., Hattori, C., Iwata, N., Saido, T. C., Sasagawa, N., Szabo, B., Hashimoto, Y., Maruyama, K., Tanuma, S., Kiso, Y., and Ishiura, S. (2006) The novel beta-secretase inhibitor KMI-429 reduces amyloid beta peptide production in amyloid precursor

- protein transgenic and wild-type mice. *J Neurochem* **96**, 533-540
64. Yamakawa, H., Yagishita, S., Futai, E., and Ishiura, S. (2010) beta-Secretase inhibitor potency is decreased by aberrant beta-cleavage location of the "Swedish mutant" amyloid precursor protein. *J Biol Chem* **285**, 1634-1642
 65. Schroeter, E. H., Kisslinger, J. A., and Kopan, R. (1998) Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature* **393**, 382-386
 66. Yonemura, Y., Futai, E., Yagishita, S., Suo, S., Tomita, T., Iwatsubo, T., and Ishiura, S. (2011) Comparison of presenilin 1 and presenilin 2 gamma-secretase activities using a yeast reconstitution system. *J Biol Chem* **286**, 44569-44575
 67. Liu, C., Apodaca, J., Davis, L. E., and Rao, H. (2007) Proteasome inhibition in wild-type yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biotechniques* **42**, 158, 160, 162
 68. Thinakaran, G., Harris, C. L., Ratovitski, T., Davenport, F., Slunt, H. H., Price, D. L., Borchelt, D. R., and Sisodia, S. S. (1997) Evidence that levels of presenilins (PS1 and PS2) are coordinately regulated by competition for limiting cellular factors. *J Biol Chem* **272**, 28415-28422

謝辞

本研究は東京大学大学院総合文化研究科石浦研究室にて行われました。指導教官の石浦章一教授には修士課程から5年間にわたり、さまざまなことを教えて頂きました。温かくご指導いただきましたことを深く感謝します。また、石浦研究室で、酵母を用いたアルツハイマー病の研究という非常に興味深いテーマで長い間研究することができたことを大変ありがたく思います。この酵母を用いた系の立ち上げに多くの苦勞と時間を割いてくださった二井勇人現東北大学准教授と柳下聡介現埼玉医科大学助教がいなければこの研究を行うことは不可能でした。二井准教授と柳下助教にも心の底から感謝します。特に、二井准教授には修士の1年間、酵母のアッセイだけではなく、いろいろなことを教えて頂きました。柳下助教にはたびたび実験の相談にのっていただき大変助かりました。笹川昇現東海大学准教授にもいろいろなことを経験させていただき、感謝しております。石浦研究室の同期の2人、吉田碧さんと古戎道典君、とも良い関係が築くことができたことにも感謝しています。

両親には主に経済的な面で支えてもらいとても感謝しています。それから、精神的に大変なときには、3人の兄弟と妻の存在のおかげでいろいろと助かりました。

米村洋而