

論文の内容の要旨

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

γ -セクレターゼはアルツハイマー病の原因と考えられているアミロイド β ペプチド ($A\beta$) の産生を担うプロテアーゼである。 $A\beta$ は前駆体タンパク質である APP から β -セクレターゼと γ -セクレターゼの 2 つのプロテアーゼで切り出される。APP はまず、 β -セクレターゼによる切断で C 末端側の 99 残基のアミノ酸 C99 となる。次に、この C99 が γ -セクレターゼによる切断によって切り出されると N 末端側が $A\beta$ となる。 γ -セクレターゼが C99 を切断する部位によってアミノ酸 40 個の $A\beta_{40}$ かアミノ酸42個の $A\beta_{42}$ を主に産生し、その比率は脳では $A\beta_{40}:A\beta_{42}=9:1$ とされている。 $A\beta_{42}$ は $A\beta_{40}$ に比べて凝集性が高く、 $A\beta_{42}$ の産生比率の上昇とアルツハイマー病発症は深く関連があることが明らかとなっており、 $A\beta_{42}$ の産生比率を抑えることがアルツハイマー病の治療や予防につながると考えられている。

γ -セクレターゼは PS、NCT、Aph1、Pen2 の 4 つのタンパク質を最小コンポーネントとして、活性を有することが知られている。 γ -セクレターゼを構成するタンパク質のうち、PS と Aph1 は複数のアイソフォームの存在が知られている。PS には PS1 と PS2 が、Aph1 には Aph1a と Aph1b が存在する。さらに、Aph1a はスプライシングの違いで Aph1aL、Aph1aS を生じる。ひとつの複合体中に複数種類の PS や Aph1 は存在しないことが確かめられており、したがって 2 つの PS と 3 つの Aph1 の組み合わせで 6 通りの γ -セクレターゼ

が存在する。最終的には、 γ -セクレターゼによって産生される $A\beta$ 分子種が決定されるため、 γ -セクレターゼを深く理解することは AD の治療に大変重要である。しかしながら、これまで 6 つの γ -セクレターゼにどのような機能の違いがあるのかについては報告がされていない。

そこで私は、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。酵母は内在性の γ -セクレターゼを持っていないため、任意の組み合わせで γ -セクレターゼを発現させ、それらの違いをはっきりと比較することができる。酵母再構成系では、2 つの代表的な γ -セクレターゼの基質に酵母転写因子 Gal4 を融合することで、切断されたときに活性化される遺伝子を利用したアッセイを行った。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。PS2/Aph1b の γ -セクレターゼは Notch の切断活性は PS1 の γ -セクレターゼに比べて低いが、APP の切断は PS1 の γ -セクレターゼと同程度であった。

次に、培養細胞を用いた PS、Aph1 のダブルノックダウンによって、残った単一組成の γ -セクレターゼの機能を確認してみることにした。PS/Aph1 がノックダウンされている間に産生された Notch 断片 (NICD) の量をウェスタンブロットによって検出した結果、PS2/Aph1b の γ -セクレターゼ複合体は Notch1 の切断活性は低いことがわかった。

同様に、PS/Aph1 がノックダウンされている間に産生された $A\beta$ の量もウェスタンブロットと ELISA によって検出、定量した。その結果、PS2/Aph1b の γ -セクレターゼは少なくとも PS2/Aph1a より高い活性で $A\beta$ 産生を行っていることが示唆された。PS2/Aph1b は $A\beta_{42}$ の産生比率 ($A\beta_{42}/A\beta_{40}$) も PS1 の γ -セクレターゼと比較して高いことが示唆された (図)。

これまで、 $A\beta$ 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 $A\beta_{42}$ 産生比率は PS1 に比べて高いことがわかった。今後は 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関連がある $A\beta_{42}$ 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をとる必要があることが本研究で明らかになった。