

【序論】

アルツハイマー病 (AD) は、進行性の認知機能障害を呈する神経変性疾患であり、高齢化社会の進んだ現在、その根本的な治療法・予防法の確立が急務となっている。AD 患者脳の病理学的特徴である老人斑の主要構成成分は、約 40 アミノ酸からなる amyloid- β peptide ($A\beta$) である。現在、 $A\beta$ の産生および蓄積が、AD の発症に深く関係しているとする「アミロイド仮説」が強く支持されており、 $A\beta$ 産生の制御は AD の根本治療法として有望と考えられている。 $A\beta$ は、前駆体蛋白質 Amyloid Precursor Protein (APP) から、2つのプロテアーゼによる連続した2段階の切断によって産生される。まず、BACE1により細胞外領域が切断され、C末端断片 APP CTF (C-terminal fragment) が産生される。その後、APP CTF は γ -secretase により切断され $A\beta$ が産生される。 $A\beta$ 産生に関わる酵素・基質はともに膜貫通タンパク質であることから、当研究室では、 $A\beta$ 産生機構を制御する要因として脂質に着目し、Shingosine-1-phosphate (S1P) が BACE1 活性に関連していること、またセラミドが $A\beta$ 産生に影響を与える可能性を見出した。そこで、スフィンゴ脂質およびセラミドに関連する脂質代謝酵素についてマウス神経芽腫由来培養細胞株 N2a 細胞を用いて RNAi スクリーニングを行ったところ、Lipid Phosphate Phosphatase 3 (LPP3) をノックダウン (KD) すると $A\beta$ 産生が低下することを見出した。LPP3 は、脂質のリン酸基の脱リン酸化を行う酵素であり、主な基質としてホスファチジン酸 (PA) が知られている。そこで本研究において、申請者は LPP3 が $A\beta$ 産生に影響を与えるメカニズムを検討した。

【結果・考察】**1. LPP3 KD により $A\beta$ と sAPP β の産生量が減少する**

LPP3 により $A\beta$ 産生経路のどの部分が影響を受けるかを検討するために、LPP3 を KD した N2a 細胞において、cell lysate、培養上清中の APP の代謝産物の変化を ELISA、ウェスタンブロット法 (WB) により調べた。non target siRNA 処理群 (N.T.) に比して LPP3 KD 群では、全長 APP (APP FL) に変化はなかったが、 $A\beta$ の分泌量の低下に加え、 β 切断の産物である sAPP β および APP CTF の産生量が減少した。このとき、細胞内 PA 濃度の増加が確認されたことから、LPP3 タンパクは KD されていると考えられた。一方、N2a 細胞に LPP3 を過剰発現させると、 $A\beta$ 産生量の増加がみられた。これらの結果から、LPP3 発現量は $A\beta$ 産生量に比例することが示唆された。

2. LPP3 KD により BACE1 量および活性が低下する

LPP3 の KD により sAPP β および APP CTF の産生量が減少した原因を検討するために、それぞれの切断に関わる酵素の発現量を調べた。N2a 細胞の cell lysate 中の BACE1 および γ -secretase の発現量を WB で検討した。 γ -secretase の発現量の指標としては、活性中心サブユニットであるプレセニン1の C末端断片 (PS1 CTF) の量を調べた。その結果、LPP3 を KD した細胞では、BACE1、 γ -secretase の発現量がともに減少しており、特に BACE1 量が顕著に低下することが明らかになった。次に、LPP3 KD 細胞の 1% CHAPSO 可溶化膜画分中における、各酵素の酵素活性の変化を *in vitro* assay により検討した。その結果、BACE1 の活性は有意に減少していたが、 γ -secretase 活性に変化は見られなかった。以上の結果から、LPP3 KD による $A\beta$ 、sAPP β 産生の減少は、BACE1 量の減少による β 切断活性の低下によるものと考えられた。

3. LPP3 KD は BACE1 の安定性の低下を引き起こす

LPP3 KD 細胞に発現している BACE1 の mRNA 量には変化が見られなかった。そこで次に、BACE1 タンパク質の安定性について検討した。N2a 細胞をシクロヘキシミドで処理し、タンパク質の新規合成を止めた状態において BACE1 の分解速度を検討したところ、LPP3 KD 細胞では BACE1 が速やかに分解されていることが明らかとなった。以上の結果から、LPP3 KD により、BACE1 の分解速度が上昇し、その結果 BACE1 のタンパク量が減少したことが示唆された。

4. LPP3 KD により BACE1 の局在が変化する

BACE1 は主に early endosome から recycling endosome に局在し、ユビキチン化や GGA3 などのアダプター分子との結合を介して late endosome へと輸送され、lysosome において分解されることが明らかとなっている。そこで、BACE1 分解速度の上昇の原因を探るため、BACE1 の細胞内局在の変化について検討した。HeLa 細胞に BACE1-GFP を一過性に過剰発現させ、その局在を GFP の蛍光で観察した。N.T.では、BACE1 は LAMP1 陽性オルガネラとの共局在は見られなかったが、LPP3 を KD した細胞では、LAMP1 陽性オルガネラと局在が一致する BACE1 が増加していた。一方、通常 lysosome で分解される APP CTF は LPP3 の KD により蓄積していなかったことから、lysosome におけるタンパク分解機能の全般的な低下は生じていないと考えられた。これらの結果から、LPP3 KD による late endosome/lysosome への輸送が加速したことにより、BACE1 の安定性が低下したと考えられた。

【まとめと考察】

本研究により、申請者は LPP3 が BACE1 の分解速度およびその局在を規定していることを示唆した。LPP3 の KD は BACE1 の late endosome への輸送を促進し、その分解の加速を介して A β 産生量の減少を導いたものと考えた。最近、LPP3 の主要な基質である PA が early endosome から生じる tubular endosome 形成に関与していることが報告され、今回見出した BACE1 の輸送制御機能との関連は興味深い。しかし、BACE1 の減少が、recycling される量の減少、または late endosome への輸送の増加のいずれによるものかは不明である。また LPP3 の発現量低下が BACE1 に与える影響の特異性や、BACE1 の減少が膜脂質環境の変化に起因するものなのか否かについても、今後の検討が必要である。興味深いことに、ごく最近、AD 患者のゲノムワイド関連解析から、LPP3 遺伝子の SNPs と海馬の萎縮に関連が見られることが報告された。LPP3 に関する検討をさらに発展させることにより、AD の発症メカニズムにおけるその役割の解明や、LPP3 活性の制御や脂質組成の変化を介した治療、予防法の開発に繋がることが期待される。以上の通り、本研究は AD の治療薬開発に大きく資するものであり、博士(薬学)の学位に相応しいものと考えられる。