

# DHHC ファミリータンパク質 AID による

## APP 代謝抑制機構の解明

### 学位論文内容の要旨

#### 【はじめに】

アルツハイマー病 (AD) は認知機能障害を伴う神経変性疾患であり、一度発症すると持続的に進行して、確実に死亡にいたる予後不良の疾患である。急速な高齢化が進む日本において、アルツハイマー病の予防および治療法の確立は重要な課題であり、その発症機構の解明と治療法の開発が望まれている。AD 患者の脳には特徴的な病理的所見として老人斑が認められる。老人斑の主成分  $A\beta$  は一回膜貫通型タンパク質であるアミロイド前駆体タンパク質 (APP) が細胞内で二段階の切断を受けることで生じる。 $A\beta$  の産生と蓄積は、アルツハイマー病発症に深く関与していることから、 $A\beta$  産生機構の解明はアルツハイマー病発症機構の解明とその治療法開発に重要である。

当研究室で独自に単離・同定した四回膜貫通型タンパク質 AID は、DHHC-Cysteine Rich Domain をもつ DHHC ファミリー分子の一つである。DHHC ファミリー分子はタンパク質のパルミトイル化 (C16 脂肪酸の付加) を担う酵素であり、タンパク質の細胞内局在制御に関与することが報告されている。

これまでに私は、培養細胞に APP と AID を共発現すると APP の代謝が抑制され、 $A\beta$  産生量が減少することを示してきた。私はさらに、AID による APP 代謝抑制機構の詳細なメカニズムを解明する研究を行った。

#### 【結果・考察】

##### 1. AID による APP 細胞内輸送の抑制

APP は 1 回膜貫通型のタンパク質であり、小胞体で N 型糖鎖修飾を受けた後、early-Golgi、late-Golgi を経る過程でさらに O 型糖鎖修飾を受けて細胞膜へと輸送される。APP はこの糖鎖修飾の違いにより immature APP (imAPP) と mature APP (mAPP) が存在する。APP は細胞膜上で ADAM に、TGN 輸送過程やエンドソームで BACE による一段階目の切断を受けるが、これらの酵素による切断を受けて  $A\beta$  を産生するのは mAPP である。これまでに、培養細胞において AID 共発現により APP の代謝が抑制されると同時に、mAPP が減少して imAPP が増加する傾向があることを見出していた。そこで、AID が APP の細胞内輸送に影響を与えている可能性を考え、AID 共発現時の APP の細胞内局在を観察した結果、ゴルジ体以降の TGN などに局在する APP が観察されなくなった。これらの結果から、AID は APP の後期分泌経路への輸送を抑制してお

り、その結果 APP の切断が抑制され、 $A\beta$  を含む代謝産物の産生量が減少していることを示した。

## 2. AID と APP の相互作用部位および AID の機能領域の同定

APP と AID の相互作用部位を検証するために、APP の細胞質ドメインを欠失した APP $\Delta$ cyt および AID の各種欠失変異体を用いて共役免疫沈降を行った。その結果、APP と AID の結合には、APP 側は細胞質ドメインが必要であることを明らかにした。一方、AID 側は $\Delta$ DHHC を除くいずれの欠失変異体においても APP との結合が確認され、詳細な結合部位の同定には至らなかった。AID は複数回膜貫通型タンパク質であることから、膜貫通部位を含めた複数の部位で APP と相互作用している可能性が考えられた。また、AID による APP 代謝抑制に必要な部位の検証するために各種 AID 欠失変異体共発現時の APP 代謝産物産生量の変化を検証したが、APP との結合と同様に詳細な部位の同定には至らなかった。

## 3. APP 切断酵素である BACE および ADAM への AID の影響

APP の一段階目の切断酵素である ADAM および BACE はともに APP 同様の I 回膜貫通型タンパク質であることから、AID によって APP 同様に輸送制御を受けている可能性が考えられたので、これを検証した。まず、BACE ( $\beta$ -site amyloid precursor protein cleaving enzyme) について AID との結合や AID による細胞内局在変化、APP 切断への影響を検証した結果、AID は BACE の局在に影響を与えているものの、BACE による APP の切断自体には影響を与えていないことが示された。

ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) ファミリーは disintegrin ドメインと metalloproteinase ドメインを持つ膜タンパク質の総称で、APP の切断を担う $\alpha$ -セクレターゼは主に ADAM10 および ADAM17 である。そこで、ADAM17 に対する AID の影響を検証した。ADAM17 は proADAM17 として合成され、pro ドメインが切断を受けて mature ADAM17 となって細胞膜上で切断活性をもつことが知られている。AID WT 共発現時には ADAM17 の細胞内局在に変化は認められなかったが、これまでに APP と AID AAHS 変異体を共発現させると、sAPP $\alpha$  の増加が認められていたことから AID AAHS 変異体共発現により細胞膜上の ADAM17 が増加している可能性を考え、ピオチンラベルにより AID 共発現時の細胞膜上の ADAM17 を検出した。その結果、AID AAHS 変異体共発現時には細胞膜上の mature ADAM17 が増加していることが示された。AID WT 共発現時にはこのような現象はほとんど認められないことから、AID は酵素活性依存的に ADAM17 の細胞内局在を制御している可能性が示唆された。

### 【まとめ】

以上、本研究をまとめると、AID WT は、APP の後期分泌経路への輸送を抑制しており、結果として APP 代謝が抑制されていることを明らかにした。また、この機能に AID のパルミトイル化酵素活性は関与しておらず、AID はパルミトイル化転移酵素でありながら APP の輸送に制御に関しては酵素活性非依存的に機能していることを示した。一方、AID は酵素活性依存的に ADMA17 の maturation を制御している可能性を示した。これまで、ADMA17 は数多くの基質を切断することが報告されているが、ADAM17 自身の活性化機構については未だ不明な点が多く残されており、AID が ADAM17 の活性を制御する分子である可能性を見出した。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 鈴 木 利 治  
副 査 教 授 有 賀 寛 芳  
副 査 教 授 木 原 章 雄  
副 査 准教授 山 本 融

学 位 論 文 題 名

## DHHC ファミリータンパク質 AID による APP 代謝抑制機構の解明

アルツハイマー病(AD)の発症因子であるアミロイドβタンパク質(Aβ)は、I型膜タンパク質 APP が細胞外でβ-セクレターゼ、膜内でγ-セクレターゼで切断を受ける際に生成・分泌する。APP の切断は APP の細胞内輸送系と密接に関わっており、Aβ生成機構を明らかにし AD 発症機構を理解するためには APP の細胞内輸送・分泌経路を制御する仕組みの理解が重要である。著者は、APP の細胞内輸送・代謝を制御するタンパク質として DHHC ドメインを含む新規膜タンパク質 AID を単離し、その機能解析を行った。DHHC ドメインを持つタンパク質はタンパク質パルミトイル化酵素であることが判明し、AID は DHHC12 と分類されたが、APP の輸送・代謝制御機構において AID は酵素活性中心である DHHC ドメイン依存的、非依存的な異なる作用を表すことを明らかにし、DHHC タンパク質がパルミトイル化酵素以外の機能を持つことを初めて示した。AID は Aβ の生成を含む APP の細胞内代謝全般を抑制するが、そのメカニズムとして DHHC ドメイン非依存的にゴルジ体からの APP 膜小胞の形成を制御していることを明らかにした。これは APP が切断を受ける TGN 以降の後期分泌経路に APP 小胞がどのように送り込まれているかを解明した成果であり、AD 発症機構を分子レベルで理解する上で重要な知見をもたらした。さらに、著者は AID が DHHC ドメイン依存的に APP を非アミロイド生成的に切断する活性(α-セクレターゼの活性化)を示すことを見いだした。主要なαセクレターゼは ADAM17 であることが知られているが、ADAM17 の活性制御機構はほとんど解明されていない。著者は、ADAM17 の活性化がタンパク質パルミトイル化を介する可能性があることを初めて示し、ADAM17 の活性化制御機構解明への道を拓いた。

本論文の成果は、(1) APP をゴルジ体から TGN など後期分泌経路に搬入する機構に AID が酵素反応非依存的に関わっていることを見だし、(2) さらに AID が酵素反応依存的に APP αセクレターゼである ADAM17 の活性化を制御していることを示した。本研究は、アルツハイマー病の原因分子である Aβ の前駆体タンパク質 APP の輸送と代謝制御にかかわる新たな分子の関与を実証した先端的な研究で、AD の発症機構の解明と新しい創薬ターゲットの開発に大きく貢献するものである。よって著者は、北海道大学博士(生命科学/薬学)の学位を授与される資格があるものと認める。