

学位論文題名

アルツハイマー病病因因子APPのリン酸化の機能解析

学位論文内容の要旨

<要旨>

アミロイド前駆体タンパク質 (APP) は I 型膜タンパク質であり、膜近傍の細胞外で一次切断を受けた後、さらに膜内で γ -secretase によって二次切断を受け、アルツハイマー病の発症に関わる A β を産生する。APP の代謝と機能の制御についての解析は数多くなされてきたが、詳細な分子機構は未解明の点が多い。当研究室では APP の機能又は代謝を制御しうる翻訳後修飾として、APP 細胞質ドメインの Thr668 のリン酸化を報告してきた。Thr668 を含む 667-VTPEER-612 配列は N-terminal helix capping box structure を形成しており、リン酸化を受けることで APP 細胞質ドメイン全体の二次構造が変化する。このため Thr668 のリン酸化は構造変換の分子スイッチとして機能していると考えられる。

当研究室では、これまで神経特異的に APP Thr668 がゴルジ体以降の後期分泌経路でリン酸化を受けること、PC12 細胞の分化時に神経突起の伸長に関わること、神経特異的なアダプタータンパク質 FE65 との結合を制御すること、細胞の高浸透圧ストレス刺激でリン酸化が亢進するなどを報告してきた。しかし、現在までに APP Thr668 を Ala668 に置換した変異マウスでは顕著な表現型は確認されず、*in vivo* での機能は明確ではない。

一般的に、タンパク質のリン酸化の機能解析には荷電状態を模したアミノ酸置換変異体を用いられる。しかし、Thr668 の場合、Asp、Glu といった酸性アミノ酸への置換では、APP 細胞質ドメインの Thr668 のリン酸化状態を完全には模倣できないことが構造解析から明らかになった。そこで本論文では APP のリン酸化の機能を解明するために、1) マウスの脳内で APP およびその代謝産物のリン酸化状態を正確に分析し、リン酸化が機能しうる APP 代謝過程を解明した。次に、2) *in vitro*、*in vivo* の解析から、新たな APP リン酸化の機能の解明を行った。

マウス脳の APP は、リン酸化レベルが全 APP の 10% 以下と低い。そこで、まだ明らかにされていない APP の 1 回目の切断により生成する膜貫通部位を含む C 末領域である APP CTF のリン酸化レベルを解析した。マウス脳組織抽出液を Thr668 リン酸化特異抗体 (Anti-pAPP) を用いた Western blot 法で解析した結果、APP CTF は 50% の高率でリン酸化されていることを明らかにした。そこで、私はマウス脳内でのリン酸化 CTF (pCTF) と非リン酸化 CTF (nCTF) の γ -secretase による膜内切断に注目した。マウス脳組織膜面分を調製し、インキュベーションを行うことで、 γ -secretase による pCTF と nCTF の切断を時間を追って比較・解析した。その結果、マウス脳組織には nCTF と pCTF がほぼ同等量存在

しており、かつ γ -secretase の基質として両者は等価であるにも関わらず、脳内では pCTF の γ -secretase 切断産物 pAICD が nAICD の生成に比較して、著しく少ない事を見いだした。これは、pCTF が nCTF と比較して、 γ -secretase による切断を受けにくい膜領域に存在している可能性を示唆している。

さらに、この仮説を実証し分子機構を解明するために、私は活性化型 γ -secretase に富む膜微小領域(ラフト)の生化学的単離を試みた。マウス脳組織の膜画分を 1% CHAPSO で処理し、Sucrose 密度勾配遠心法により調製した低密度不溶性画分を活性化型 γ -secretase に富む膜微小領域(ラフト)として単離した。単離した膜微小領域(ラフト)の CTF リン酸化状態を調べたところ、nCTF が多く、CTF のリン酸化状態は、非ラフト分画に比較して低いことが明らかとなった。これは、pCTF が nCTF と比較して、 γ -secretase による切断を受けにくい膜領域に存在していることを裏付ける結果であった。以上の結果より APP CTF はリン酸化によって特定の膜微小領域(ラフト)への移行が制御されている可能性が考えられた。

さらに APP-CTF のリン酸化による膜微小領域(ラフト)への移行制御機構を明らかにするために、初代培養神経細胞を調製し、ラフト構成を攪乱する薬物であるコレステロール結合薬物 M β CD を添加した。添加後、初代培養神経細胞から膜画分を調製し、*in vitro* γ -secretase assay を行い、nCTF と pCTF の切断によって生成する nAICD および pAICD 量を解析した。その結果、M β CD 処理した初代培養神経細胞から調製した膜画分では pAICD 生成が増加した。これは、膜微小領域(ラフト)へ局在していた γ -secretase が、膜内に一様に散在し、pCTFs を切断する機会が増加したことを示唆した。

APP-CTF のリン酸化による膜微小領域(ラフト)への移行制御の詳細な分子機構を明らかにするために、私は APP-CTF と脂質との結合性に注目した。最近の APP の構造解析より、APP の最 C 末端部位が脂質二重膜の脂質と直接結合している可能性が報告されている。Thr668 のリン酸化は APP 細胞質ドメインの構造全般を変化させることから、私は Thr668 のリン酸化によって APP CTF と脂質との結合性が変化する可能性を考えた。APP 細胞質ドメインの合成ペプチド APP⁶⁴⁸⁻⁶⁹⁵ とマウス脳組織膜画分から抽出・調製したリボソームを反応させた結果、APP⁶⁴⁸⁻⁶⁹⁵ ペプチドは、リボソームに強く結合したが、Thr668 をリン酸化したリン酸化合成ペプチド APP⁶⁴⁸⁻⁶⁹⁵[pThr668]は、リボソームとの結合が顕著に減少した。これは、C 末 8 残基を欠失したペプチド(C Δ 8)が、リボソームに結合出来ない事と同様な結果であった。この解析は、Thr668 のリン酸化が CTF の最 C 末と膜脂質との結合を解離するように CTF の構造変換をもたらした事を示唆する。さらに、脂質と結合することができない APP-C Δ 8 を発現する細胞は、A β 産生の減少が認められた。

以上の解析から、本論文では 1)リン酸化は APP 細胞質領域の構造を変化させ、2) CTF と脂質二重膜との結合を解離させることで、3) γ -secretase-enriched microdomain での CTF の局在を制限し、結果として、4)CTF の二次切断に抑制的に働く、すなわち A β の生成が抑制される可能性が明らかにされた。

学位論文審査の要旨

主査	教授	鈴木	利治
副査	教授	木原	章雄
副査	准教授	山本	融
副査	講師	佐々	貴之

学位論文題名

アルツハイマー病病因因子APPのリン酸化の機能解析

アミロイド前駆体タンパク質(APP)は、アルツハイマー病(AD)の特徴的病理であるアミロイド β タンパク質(A β)の前駆体タンパク質である。I型膜タンパク質APPは神経細胞内の細胞内輸送過程および細胞膜上で切断・代謝を受ける。ルーメン側の膜近傍近くで α セクレターゼもしくは β セクレターゼによる切断を受け、細胞外ドメイン(sAPP)を分泌し、細胞膜状に α CTFおよび β CTFを残す。このCTFは、 γ セクレターゼによる膜内切断を受け、 α CTFからp3ペプチド、 β CTFからA β を分泌し、同時に細胞質に細胞質断片(AICD)を遊離する。生成したA β はオリゴマーを形成し、神経毒性を示す事が報告されており、これがADの発症に強く関わっていると考えられている。しかしながら、A β 生成がどのような細胞内調節機構の下で制御されているのかは、未解明な点が多く、A β 生成制御機構の解明はAD発症機構を解明すると共に、新たな創薬標的を開発する上で重要である。APPの細胞質ドメインThr668(アミノ酸番号はAPP695アイソフォームによる)のリン酸化は、APPの細胞内輸送や代謝を制御する可能性が示唆されてきたが、APPのリン酸化レベルは5%程度と低く、その役割は未解明であった。

本論文では、マウス脳内の内在性CTFsの約50%がリン酸化状態で存在している事を見だし、リン酸化がAPPではなくAPPCTFで機能している可能性を見だし、実証を行った研究である。リン酸化CTF(pCTF)と非リン酸化CTF(nCTF)は、脳神経細胞で等量存在しているが、そこから γ セクレターゼで切断され、生成する脳内pAICD量は、nAICD量と比較して著しく少ないことを見出した。その原因を探るため、膜分画を用いたin vitro γ セクレターゼアッセイを構築し、pAICDとnAICDは酵素学的に γ セクレターゼの等価の基質になることを証明し、神経細胞では、pCTFが γ セクレターゼによる切断を受けない別の仕組みがある事を見出した。この仕組みを解明する目的で、松島は、生化学、細胞生物学的な解析を行い、pCTFが活性ある γ セクレターゼが存在する膜ラフト様マイクロドメインに少ない事を明らかにした。その分子機構として、CTFはC末端部分を利用して膜と相互作用を取っているが、リン酸化はCTF内の構造変換を引き起こし、脂質結合活性を失うことを生化学的に実証した。このため、pCTFは細胞膜における流動性に富み、膜ラフト様マイクロドメインに侵入後もそこにトラップされる時間が短く、 γ セクレターゼによる切断を受ける前にラフト外に移動するため、切断効率が落ちることを示した。さらに、細胞をmethyl- β -cyclodextrin (M β CD)処理し、膜ラフト様マイクロドメインを破壊し、 γ セクレターゼが細胞膜に均等に分散する条件下では、pAICDの γ セクレターゼによる切断が著しく増加することを実証した。さらにヒト型APPを発現しているカニクイザルは、加齢と共にA β の沈着物であるアミロイドプラークを形成するが、CTFのリン酸化レベルは、加齢と共に低下することを示した。これらの解析から、CTFのリン酸化は、膜脂質とCTFの相互作用を制御することで、CTFの膜局在を制御している事を明らかにした。老化に伴いCTFのリン酸化が低下する事実は、 γ セクレターゼに変化

が無くても、老化とともに CTF が γ セクレターゼの基質になりやすくなる事を示しており、CTF のリン酸化状態を保持することが、アルツハイマー病の発症に関わる A β 産生の抑制に結びつくことを初めて実証した、極めて独創的かつ先進的な研究であり、アルツハイマー病の創薬における新たな標的を示すと共に、予防法の開発に大きく貢献する、薬学領域の博士号に相当する価値の高い研究である。

これは、ようするに、著者は APP CTF のリン酸化の機能を生化学的および細胞生物学的に解明し、その特性・役割を明らかにした上で、霊長類で老化とともに生成量が増加する A β と CTF のリン酸化レベルの低下の相関性を示した研究であり、発症原因が不明であった孤発性 AD 患者の発症原因を示唆した。その成果は、これまで開発が進められてきたリン酸化抑制剤とはことなり、CTF のリン酸化状態を維持する、脱リン酸化抑制剤の創薬開発に貢献することが大いなるものがある。

よって著者は、薬学領域の大学院課程である医薬科学コース博士課程を修了し、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格があるものと認める。