

学位論文題名

Alcadeinとその脳内APP代謝における機能の解析

学位論文内容の要旨

アルツハイマー病(以下 AD)は進行性の認知障害を伴う不可逆性の神経変性疾患である。その患者数は世界に 3000 万人とも言われ、超高齢社会を迎えつつある先進各国においてその対策は急務となっている。AD の原因因子の一つとして考えられているアミロイド β (以下 $A\beta$)は、I 型の膜タンパク質である APP から β -secretase (以下 BACE)による膜外の、またそれに続く γ -secretase による膜内の二段階の切断を受けて産生される。この $A\beta$ は高い凝集性を持っており、その凝集体は AD に特徴的な病理所見である老人斑の主要な構成成分となっている。また、 $A\beta$ のオリゴマーは神経細胞の機能低下をもたらし、神経細胞死を引き起こすというアミロイドカスケード仮説が AD 発症の機序として強く支持されており、 $A\beta$ の産生メカニズム・APP の代謝メカニズムの解析が進められている。しかしながら、その解析は、APP を大過剰に産生する培養細胞系やトランスジェニックマウスを用いたものが大多数であり、生理的な条件下において内在性 APP の $A\beta$ 産生的な代謝がどのように制御されているのかについては明らかになっていない点が多い。AD 患者の大多数を占める孤発性の患者においては、何らかの要因に伴い APP 代謝が $A\beta$ 産生側に傾斜することが発症の原因となっている事が考えられる。したがって、内在性の APP 代謝がどのような因子群により制御されているのかを明らかにすることは、孤発性 AD 発症機構の解明と AD 治療薬の開発を期する上で重要であると考えられる。

これまでに当研究室では、APP に結合する細胞内因子として X11L を単離・同定し、これが内在性 APP のアミロイド産生的代謝を抑制することを、ノックアウトマウスを用いた解析により明らかにしている。さらに X11L の APP 代謝制御における機能解析を進めるために、X11L の結合分子を探索し、I 型膜タンパク質である Alcadein (以下 Alc) を単離・同定した。Alc は哺乳類では $Alc\alpha$ 、 $Alc\beta$ 、 $Alc\gamma$ の 3 種類のファミリータンパク質が存在し、これまでの解析から、培養細胞系において $Alc\alpha$ は、X11L・APP と共に安定な複合体を形成することを明らかにしている。しかしながら、 $Alc\alpha$ が生体内において内在性 APP の代謝にどのように関わっているのかについては、明らかになっていなかった。

そこで私は、 $Alc\alpha$ の生体内における、APP 代謝制御機構に果たす役割を明らかにすることを目的として $Alc\alpha$ の KO マウスを作製し、その内在性 APP 代謝について野生型(以下 Wt)マウスと比較・解析を行った。

マウス脳切片の免疫染色の結果から APP・ $Alc\alpha$ ・X11L の三者の共局在が顕著に認められた大脳皮質および海馬をサンプルとして用い、Wt マウスと $Alc\alpha$ KO マウスの膜画分を調製して APP 全長および中間代謝産物(C 末端断片: APP-CTF)についてその存在量の比較を行った。その結果、APP 全長の量には有意な差は認められなかったが、BACE によって産生される 2 つの CTF 種子種(C99、C89: 以下、この 2 つの分子種を総称して CTF β)で有意な差が認められた。CTF β のうち特に C99 は $A\beta$ を産生する際の中間代謝産物であり、この結果から $Alc\alpha$ KO マウスにおいて APP の $A\beta$ 産生的な代謝が亢進している可能性が考えられた。

APP-CTF β 量増加の機序について、APP が BACE の活性が高い部位に集積し、積極的に切断を受けている可能性が考えられる。そこで、BACE の活性が高いとされている細胞

内微小領域である、DRM (detergent resistance membrane)および Endosome を生化学的に分離し、APP-CTF β について定量を行った。その結果、これらの領域において APP-CTF β 量の有意な増加が認められ、またその傾向は対照として用いた画分では有意ではなかった。このことから、Alc α の欠失により、BACE の活性の高い領域に、APP の局在が変化させられていることが考えられた。

一方、二段階目の切断を担う γ -secretase の活性に変化が生じていないか解析を行うことを目的として、*in vitro* γ -secretase assay により γ -secretase による切断効率を、最終代謝産物である AICD (APP 細胞内ドメイン)の産生効率を比較することで検証することにした。その結果、AICD の量自体には有意な差があるものの、産生効率としては大きな変化は認められず、 γ -secretase の活性は変化していないと考えられた。

以上の結果から、CTF β が γ -secretase により切断を受けることで産生される A β の産生も亢進している可能性が考えられた。そこで実際に A β の主要な分子種である A β 40、A β 42 の定量を、週齢を追って行ったところ、どの週齢においても Wt に比較して Alc α KO マウス脳内における A β 量の増加が認められた。A β 産生量増加により実際に生体で AD の病理所見である Amyloid plaque 産生が変化するか評価するために、家族性 AD 患者に見られるヒト APP の遺伝子変異体を導入したトランスジェニックマウスを用い、脳内に生じた Amyloid plaque の数を比較することとした。12 ヶ月齢のマウス脳における Amyloid plaque の数を算定したところ、Alc α の欠失に伴う A β 量の増加は、Amyloid plaque 数の有意な増加を伴うことが確認できた。

次に生体内において Alc α の欠失により APP・X11L 複合体にどのような影響がでるのか検証を行うために、Alc α 、X11L の各単独欠損マウスおよび二重欠損マウス(以下 DKO マウス)における APP 代謝について比較を行うことにした。

Alc α と X11L がそれぞれ独立に、また、並行して APP の代謝制御を担っているならば、それぞれの効果は加重されることが考えられる。しかし結果として、Alc α KO と Alc α /X11L の DKO マウスの A β 産生量に有意な差は認められず、内在性 APP の A β 産生的な代謝制御機構において、Alc α と X11L が協調的に機能することで APP の代謝を抑制していることが考えられた。

私は、Alc α は、X11L が APP を β -secretase の活性が高い領域に移行するのを抑制する機能を発揮するためのアンカーとして機能している可能性を考えた。そこで、Alc α の欠失により X11L の局在が変化する可能性について検討を行ったが、X11L の局在には大きな変化は認められなかった。

次に、X11L と APP の安定的な相互作用には Alc α が必要であり、Alc α の欠失により X11L と APP の結合割合が変化する可能性を考えた。そこで、X11L から共役免疫沈降法により共沈されてくる APP の量について比較を行った。その結果、Alc α の欠失により X11L から共沈されてくる APP 量には減少が認められ、結合割合の減少が示唆された。

以上のことから、Alc α と X11L は、APP と三者の安定な複合体を形成することで APP の代謝を制御している可能性が考えられた。

以上の結果から、Alc α ・APP・X11L の三者による安定的な複合体形成が、生体内における内在性 APP の A β 産生的な代謝機構に重要な役割を担っていることが示唆された。この結果は、孤発性 AD の発症メカニズムに、新たな可能性を提示するものである。

学位論文審査の要旨

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

学位論文題名

Alcadeinとその脳内APP代謝における機能の解析

博士学位論文審査等の結果について（報告）

アルツハイマー病（AD）は認知機能の失行を伴う進行性の神経変性疾患であり、60才以上の有病率は2%を超える。超高齢化社会を迎えている日本のみならず、社会状況・衛生環境の改善により平均寿命が急速に延びつつある人類社会全体にとって、克服すべき重要な疾患の一つである。家族性ADの解析からその病理の解明が進み、アミロイド前駆体タンパク質（APP）から生成され、高い凝集性と細胞毒性を持つA β ペプチドの増加がAD発症の引き金となる、というアミロイドカスケード仮説が提唱・支持されている。しかしながら、A β ペプチドを大量に産生する細胞系・モデルマウスを用いた解析が精力的になされている一方で、孤発性ADが発症する通常の脳組織において、その本来の基質である内在性APPのアミロイド産生的代謝がどのように制御されているのか、についての解析と知見は極めて乏しい。こうした中であって、APPとその細胞質領域を介して結合する足場タンパク質X11Lは、その欠失により内在性APPのアミロイド産生的代謝が昂進することから、この制御に重要な役割を果たしていると考えられている。しかしながら、X11LはAPPを含む複数の因子群と相互作用するとともに、ダイナミックな細胞内動態をとることから、どのようにAPPのアミロイド産生的代謝を制御するのかについては不明な点が多く残されていた。

本論文において、著者は、進化上高度に保存されたI型膜タンパク質Alcadeinファミリー分子群に着目した。これまでの解析からAlcadeinは、その細胞内ドメインを介してX11Lと直接結合すること、APP-X11L-Alcadeinの3者は複合体を形成すること、が示されていた。しかしながら、この3者複合体の形成が生体内におけるAPPのアミロイド産生的代謝制御においてどのような意義をもつのかは不明であった。そこで著者はAlcadeinの3種のファミリー分子のうち、神経系において強く発現しており、解析の進んでいるAlcadein α について、そのノックアウトマウスを用いて解析を進めた。APP, X11L, Alcadein α が同一の神経細胞に発現されていること、ノックアウトマウスにおいてAlcadein α のmRNAおよびタンパク質の発現が消失していることを確認後、遺伝的バックグラウンドをバッククロスによりC57BL6にそろえたcongenicマウスを用いて、脳内の内在性APPと、その代謝産物量を解析した。その結果、Alcadein α の欠失により内在性APPの代謝産物のうちCTF β の存在量とこれより産生されるA β ペプチド量とが選択的に増加していることを見出した。次いで、ここで見られたアミロイド産生的代謝の昂進が、ADの典型的な病理所見であるamyloid

plaque の産生増をもたらすか検証した。マウス APP より産生される A β ペプチドには amyloid plaque の形成能がないため、ヒト APP を適量発現するトランスジェニックマウスと交配させて解析をおこなったところ、Alcadein α の欠失により amyloid plaque 数が有意に増加することが明らかとなった。さらに、Alcadein α の欠失によるアミロイド産生的代謝の昂進が、X11L の欠失によるものとどのように連関しているのかを解析するために、X11L と Alcadein α の二重欠失マウスを作製し、そのアミロイド産生的代謝産物量を比較した。その結果、二重欠失マウスにおけるアミロイド産生的代謝の昂進程度は Alcadein α 単独変異と同等であり、その表現形に加重性は認められなかったことから、Alcadein α の欠失によるアミロイド産生的代謝の昂進は X11L の欠失による昂進と同じ経路で生じていることが強く示唆された。また、Alcadein α の欠失マウスにおいては X11L と免疫共沈される APP 量に有意な減少が認められることを見出した。著者のこれらの知見は APP-X11L-Alcadein の3者複合体の安定な形成が、生理的条件下における APP のアミロイド産生的代謝の抑制に重要な役割を果たしていることを示すものである。

このように、著者は、主としてマウス個体を用いた生化学的・遺伝学的解析により、APP-X11L-Alcadein の3者複合体形成が生理的条件下における脳内 APP のアミロイド産生的代謝の制御に重要な役割を担っていることを明らかにした。著者の論文は、孤発性アルツハイマー病の発症機構を明らかにしていく上において新たな洞察を与えるものであり、医薬科学分野における生命科学の進展に大きく貢献するものである。

よって、北海道大学大学院生命科学院医薬科学コース博士後期課程を修了する著者は、北海道大学博士（薬科学）の学位を授与される資格があるものと認める。