

氏名	くず や あきら 葛 谷 聡
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 3094 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 脳 統 御 医 科 学 系 専 攻
学位論文題目	Presenilin 1 is involved in the maturation of β -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 (BACE1). (プレセニリン1は β 部位アミロイド前駆体蛋白切断酵素1 (BACE1)の成熟化に関わる。)
論文調査委員	(主 査) 教 授 金 子 武 嗣 教 授 橋 本 信 夫 教 授 渡 邊 正 己

論 文 内 容 の 要 旨

アルツハイマー病の病理学的特徴の一つに、老人斑における β -アミロイドペプチド(A β)の過剰沈着が挙げられる。アミロイド前駆体蛋白(APP)が異なる2種類のアスパラギン酸プロテアーゼ、 β -セクレターゼ、 γ -セクレターゼにより連続的な切断を受け、A β が産生されることが知られている。近年、脳における主要な β -セクレターゼとして、 β -site APP-cleaving enzyme 1 (BACE1)が同定された。BACE1はまず小胞体内でプロドメインを有する未成熟型蛋白として産生され、ゴルジ体へ輸送されプロドメインの切断および複雑な糖鎖修飾を受けて成熟型となり、トランスゴルジ網より細胞形質膜、エンドソームなどのオルガネラへと輸送される。一方、 γ -セクレターゼは酵素活性部位を有するプレセニリン1(PS1)あるいはホモログであるプレセニリン2(PS2)を主要構成成分とする高分子量複合体であると考えられている。またPS1は γ -セクレターゼ機能に加え、選択的膜蛋白の細胞内輸送を制御する機能を有することも以前より知られている。これらのA β 産生に関わる主要分子のうち、BACE1以外のPS1、PS2、APPの変異により家族性アルツハイマー病が引き起こされ、アルツハイマー病の病因としてのA β 産生機構が注目される。しかしながら生理的なA β 産生の調節機構や β -、 γ -セクレターゼの相互作用については依然不明な点が多い。本研究ではPS1の選択的膜蛋白輸送機能に着目し、PS1がBACE1の細胞内輸送および成熟化に及ぼす影響を検討した。

最初にPS1, 2をダブルノックアウトしたマウス胎児線維芽細胞(PS-/-MEF)を用いて、外因性、内因性に発現するBACE1量を比較した。Wild-type MEFと比較して、PS-/-MEFでは未成熟型BACE1量に比し、成熟型BACE1量が著明に減少していた。この結果はプレセニリン欠損細胞ではBACE1の成熟化が障害されていることを示しており、プレセニリンがBACE1の成熟化に関わっている可能性が示唆される。次に神経系細胞においてPS1がBACE1の成熟化に関わっているかどうかを調べるため、wild-type PS1(wt PS1)とPS1のドミナント・ネガティブ変異体(D385A PS1)を安定発現したヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞を用いて、内因性BACE1の蛋白およびmRNAの発現量を比較した。BACE1のmRNA量では有意な差はみられなかったが、成熟型BACE1量はwt PS1細胞では増加し、D385A PS1細胞では明らかに減少していた。またPS-/-MEF同様、D385A PS1細胞では成熟型BACE1量に比し小胞体に存在する未成熟型BACE1量は保たれていた。これらの結果はPS1の機能として、BACE1を小胞体からゴルジ体へ輸送し、その成熟化を調節する機能があることを示唆する。このPS1の輸送機能が直接的な作用によるものかどうかを明らかにするため、各培養細胞、マウス脳を用いて、免疫沈降法、蛍光免疫二重染色法によりPS1とBACE1の相互作用を検討した。免疫沈降法ではPS1は成熟型BACE1より未成熟型BACE1と優先的に共沈降することが示された。また共焦点顕微鏡を用いた蛍光免疫二重染色では、PS1とBACE1が主に核近傍で共局在することが観察された。

以上の結果より、PS1が小胞体内で未成熟型BACE1と結合し、小胞体からゴルジ体への輸送調節を介してBACE1の成熟化を制御していることを報告する。本研究は、PS1が γ -セクレターゼのみならず、BACE1の成熟化を介して β -セクレターゼの制御にも主導的に関わっており、A β 産生機構において中心的な役割を担っている機能分子である可能性を示して

いる。生理的な $A\beta$ 産生機構を解明することは、 $A\beta$ 代謝バランスの破綻が病態の一因と考えられているアルツハイマー病の原因究明および治療薬の開発に寄与するところが大いと思われる。

論文審査の結果の要旨

アルツハイマー病の脳では、 β アミロイドペプチド ($A\beta$) を主要成分とする老人斑が大脳皮質に広範に沈着する。 $A\beta$ はアミロイド前駆体蛋白 (APP) が β -セクレターゼ、 γ -セクレターゼにより連続的に切断され産生される。近年、脳における主要な β -セクレターゼとして β -site APP cleaving enzyme 1 (BACE1) が同定され、 γ -セクレターゼは家族性アルツハイマー病の原因遺伝子産物として知られるプレセニリン 1 (PS1) を主要構成成分とする高分子量複合体であることが明らかとなった。PS1 は γ -セクレターゼ機能に加え、特定の膜蛋白の細胞内輸送機能を有することが知られている。本研究では PS1 の輸送機能に着目し、PS1 が BACE1 の細胞内輸送および成熟化に及ぼす影響を検討した。

小胞体内の未成熟型 BACE1 はゴルジ体へ輸送され糖鎖修飾などを受けて成熟型となり、細胞内の後期コンパートメントへ輸送されていく。PS1 欠損細胞や PS1 ドミナント・ネガティブ変異体発現細胞では未成熟型 BACE1 量に比し、成熟型 BACE1 量が減少した。免疫沈降法では PS1 が小胞体に局在する未成熟型 BACE1 と共沈降し、蛍光免疫二重染色では PS1 と BACE1 が主に核近傍で共局在した。これらの結果より、PS1 が小胞体内で未成熟型 BACE1 と結合し、小胞体からゴルジ体への輸送を介して BACE1 の成熟化を制御していることが明らかとなった。

以上の研究は $A\beta$ 代謝バランスの破綻が病態の一因と考えられているアルツハイマー病の原因の解明に貢献し、その根本的治療・予防法の開発に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成19年2月6日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。