

氏 名	なか や よし ふみ 中 谷 嘉 文
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 3145 号
学位授与の日付	平 成 19 年 7 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	Random mutagenesis of presenilin-1 identifies novel mutants exclusively generating long amyloid β peptides (プレセニリン1のランダム変異導入により長いアミロイド β ペプチドを選択的に産生する新規の変異体を同定した)
論文調査委員	(主 査) 教 授 金 子 武 嗣 教 授 福 山 秀 直 教 授 渡 邊 大

論 文 内 容 の 要 旨

アルツハイマー病の病態にアミロイド β ($A\beta$) ペプチドの脳内蓄積が深く関わる。なかでも長鎖の分子種 $A\beta$ 42/43 は病原性が強い。 $A\beta$ は前駆体蛋白質から連続的の切断を受け生成されるが、そのアミノ酸鎖長の差は γ セクレターゼ切断部位の多様性による。 γ セクレターゼは家族性アルツハイマー病 (FAD) の原因遺伝子である presenilin (PS; PS1 and PS2) が複数の膜蛋白質と構成する複合体であり、PS の FAD 変異は $A\beta$ 42/43 生成を増加させる。PS は多数回膜を貫通する蛋白質で、活性残基である膜内アスパラギン酸を2つの膜貫通部位にもつ。100種類以上の PS の FAD 変異が長鎖 $A\beta$ 42/43 の生成を選択的に増加させるが、詳細な機序は不明であり、この解明が分子病態に基づいた治療法開発のための重要な課題である。このような背景から、PS1 に変異を導入し γ セクレターゼ活性との関連を検索した。PS は翻訳後に自己切断を受けこれも γ セクレターゼ活性によると考えられることから、ランダム変異 PS1 cDNA ライブラリーを作成後、PS 欠損細胞に発現させ、PS1 自己切断が障害された変異体のスクリーニング及び解析を行った。得られた単一アミノ酸置換変異のうち、S141R、T245I、R278I、A434T、L435H の5種類は、長鎖分子種 $A\beta$ のみを産生し、他の活性を欠損した従来記載のない特異な変異体であった。すなわち、a) 野生型と同様の分子量の複合体を形成し、分泌経路により小胞体からゴルジ装置に輸送される。b) $A\beta$ 40、 $A\beta$ 42 生成活性、 ϵ 切断活性をもたず、 $A\beta$ 43 のみ多量に生成する。c) γ セクレターゼ阻害剤 DFK による逆説的 $A\beta$ 42/43 増加を受けない。d) $A\beta$ 42/43 選択的阻害剤である非ステロイド系消炎剤 (NSAIDs) による障害を受けにくい、といった特性を示した。これらの変異は全て活性部位の近傍になく、PS1 分子中の互いに離れた場所に存在し、変異効果は γ セクレターゼの構成や細胞内局在の変化を介さなかった。DKF167 処理による $A\beta$ 42/43 生成亢進は $A\beta$ 42/43 生成活性の強い変異ほど弱く、DKF167 処理と変異の効果が単純に相加的でないことなどから、これらによる長鎖 $A\beta$ 生成亢進が共通の機序を介する可能性が示唆された。最近の研究では、 γ セクレターゼが複数の活性部位を有し、薬理学的研究から活性部位と基質結合部位が独立しているとされる。我々の結果から、阻害剤による逆説的 $A\beta$ 42/43 分泌亢進は PS 結合によるアロステリック効果によるものであり、阻害剤や PS 変異が切断点特異性を変化させる機序はともに複合体のコンフォメーション変化であるという仮説が成り立つ。この複合体コンフォメーション変化が活性部位に対する基質の位置関係を変化させ、切断点を C 末端側に移動させて $A\beta$ 42/43 生成を増加させると推測される。本研究では、PS1 切断が障害された変異体のスクリーニングで、 $A\beta$ 42/43 生成活性のみを持ち、他の活性のない特異な変異体が同定された。これらは複合体の構成や細胞内局在を変化させず、その変異効果が阻害剤の逆説的 $A\beta$ 42/43 増加効果と互いに相殺することから、PS1 変異と阻害剤はともに複合体のコンフォメーション変化という共通の機序を介して、 $A\beta$ 42/43 を増加させると推測された。 γ セクレターゼの基質として、生物学的に重要なシグナル伝達に関与する蛋白質が報告されており、単純な活性阻害物質は重大な副作用が懸念され、治療への応用が困難であろう。副作用の少ない治療薬として、 $A\beta$ 42/43 を選択的に抑制する γ セクレターゼ切断点修飾薬の開発が期待される。

論文審査の結果の要旨

アミロイド β (A β) ペプチドの中で、 γ セクレターゼ切断点の多様性によって生じるアミノ酸鎖長の長い A β 42/43 は Alzheimer 病の病態を惹起することが知られる。 γ セクレターゼは家族性 Alzheimer 病 (FAD) の原因遺伝子産物プレセニリン (PS) 1 または PS2 が構成する蛋白質複合体であり、PS の FAD 変異は A β 42/43 生成比を増加させるが、その機序は不明である。本研究においては、PS1 と γ セクレターゼ活性との関連を検討する目的から、PCR によってランダム変異を導入した PS1 cDNA ライブラリーのスクリーニングを通し活性と変異との関連を解析するというアプローチが取られた。この結果、長鎖 A β 43 の産生活性のみを有し A β 40 産生や PS1 切断活性をほぼ欠損するという従来記載のなかったユニークなミスセンス変異 (R2781, L435H) が同定された。解析結果は、PS1 変異が一部の γ セクレターゼ阻害薬によるアロステリック効果と同様、 γ セクレターゼ複合体のコンフォメーション変化を介し切断点に直接影響して A β 42/43 生成を増加せるとする説を支持するものであった。

以上の研究は、 γ セクレターゼによる A β 40 と A β 42/43 生成の切り分けのメカニズム解明に貢献し、治療薬としての γ セクレターゼ切断点修飾剤の開発応用に示唆を与え、この分野に寄与するところが大きいと考えられた。

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みとめる。

なお、本学位授与申請者は、平成 19 年 6 月 7 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めである。