

京都大学	博士（医学）	氏 名	青柳 信寿
論文題目	PI3K inhibition causes the accumulation of ubiquitinated presenilin 1 without affecting the proteasome activity (PI3 キナーゼの抑制によりプロテアソーム活性への影響なしにユビキチン化されたプレセニリン1の蓄積が生じる)		
(論文内容の要旨)			
プレセニリン1（PS1）は家族性アルツハイマー病（FAD）の原因遺伝子であり、ニカストリン、Aph-1、PEN-2 とともに形成されるγセクレターゼ複合体の活性中心である。γセクレターゼの酵素活性によりアミロイド前駆体蛋白は膜内で切断され、老人斑の主構成成分であるアミロイドβ（Aβ）蛋白が産生される。アミロイド仮説では、Aβ 蛋白の細胞毒性が神経細胞でのタウ蛋白の過剰リン酸化と細胞死へのカスケードを引き起こし、AD 発症に至るとされている。しかし近年、PS1 は成長因子受容体など細胞生存のシグナル伝達に関連する PI3 キナーゼの活性化にも不可欠であり、FAD を引き起こす PS1 の変異は PI3 キナーゼを活性化できないことが報告されている。また PI3 キナーゼはその下流のキナーゼである AKT と GSK3β を介してタウのリン酸化の調節にも関わっているが、興味深いことに GSK3β は PS1 を直接リン酸化することが報告されている。一方、PI3 キナーゼ活性は AD の脳内において低下していることが示唆されているが、PI3 キナーゼの活性低下が PS1 の代謝、機能に与える影響については明らかにされていないため、本研究で検討した。 マウス胎児の初代培養神経細胞に PI3 キナーゼ阻害剤を添加したところ、PS1、NCT、Aph-1 などγセクレターゼ構成分子の蛋白量は増加した。AKT 阻害剤の添加でも同様の結果が得られた。この際、各分子の転写の増加はみられず、むしろ蛋白分解の抑制によりγセクレターゼ発現量が増加していることが示唆された。以前よりγセクレターゼの構成分子はプロテアソームにより分解されることが報告されている。しかし PI3 キナーゼ阻害時に細胞内で非特異的なプロテアソーム活性低下は見られなかったことから、PI3 キナーゼ阻害は特異的にγセクレターゼの分解を抑制しうる事が示唆された。 プロテアソームによる蛋白の分解にはユビキチン鎖の結合が必要であることから、HEK293 細胞を用い PI3 キナーゼ阻害下での PS1 のユビキチン化状態を免疫沈降法で検討した。PS1 のユビキチン化は NP40 可溶性画分でのみ増加し、プロテアソーム阻害では可溶性・不溶性両画分で増加するのと対照的であった。また、PI3 キナーゼ阻害下では細胞内全体のユビキチン化物は増加しておらず、PI3 キナーゼ阻害による特異的な PS1 ユビキチン化の変化が示唆された。プロテアソーム阻害下と PI3 キナーゼ阻害下における PS1 のユビキチン化の性質の違いを検討する目的で、HA タグ付きの野生型ユビキチン（WT）と、全てのリジン残基をアルギニンに置換しモノユビキチン鎖のみ形成可能なユビキチン（K0）それぞれのプラスミドを野生型 PS1 と一緒に HEK293 細胞に一過性に導入し、PI3 キナーゼ阻害下での PS1 のユビキチン化を免疫沈降法で検出した。PI3 キナーゼ阻害下では K0 によるユビキチン化が有意に増加しており、PS1 の内在性のリジン残基におのおの一つずつのユビキチンが結合するマルチモノユビキチン化の増加を反映しているものと考えられた。一般に、ポリユビキチン化はプロテアソー			

ムによるターゲット蛋白の分解シグナルとして知られているが、マルチモノユビキチン化はターゲット蛋白質の細胞内輸送やエンドサイトーシスへの関与が示唆されている。このため、PI3 キナーゼ阻害時の PS1 の神経細胞内での局在変化を免疫蛍光染色で検討した。PI3 キナーゼ阻害時の PS1 は細胞質内に広く分布しており、プロテアソーム阻害時に認められたγ チュブリンと共局在するアグレソームへの分布とは明らかに異なっていた。 以上から、PI3 キナーゼ阻害によって誘導されたマルチモノユビキチン化に伴う PS1 の局在変化は PS1 の代謝、機能面でも重要な変化をもたらす可能性が考えられ、AD における PS1 の役割に新たな知見をもたらすものと考えられた。			
（論文審査の結果の要旨） アルツハイマー病(AD)は老人斑と神経原線維変化を病理学的特徴とする。家族性 AD の原因遺伝子プレセニリン1（PS1）は、老人斑の主成分アミロイドβ (Aβ)を産生するγセクレターゼ複合体の活性中心を有する。神経原線維変化は過剰リン酸化タウ蛋白からなり、主に PI3K/Akt/GSK3β キナーゼ系によりリン酸化される。PS1 は PI3K を活性化させ、また GSK3β によるリン酸化を受ける。このキナーゼ系のγセクレターゼ複合体機能制御における役割について検討した。 PI3K/Akt 阻害剤下のマウス神経細胞で、γセクレターゼ複合体は増加した。この時γセクレターゼ複合体 mRNA の増加はなく、むしろ複合体の蛋白分解が低下していた。γセクレターゼ複合体は主にプロテアソームにより分解されるが、PI3K 阻害時のプロテアソーム活性に変化はなかった。そこで HEK293 細胞で検討したところ、PI3K 阻害時には PS1 がマルチモノユビキチン化されていた。この時 PS1 の局在も変化した。これらの結果より PI3K 阻害は PS1 のモノユビキチン化を介してその機能を制御していることが示唆された。 以上の研究は PS1 の生理的機能解明に貢献しアルツハイマー病の病態生理の理解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 22 年 1 月 28 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。			
要旨公開可能日： 年 月 日以降			