

博士学位論文審査要旨

2018年8月29日

論文題目：Regulation of Amyloid- β Production: Studies of γ -Secretase Activity on

Nicastrin Glycosylation and Tetraspanin-7

アルツハイマー病原因物質アミロイド β 産生制御に関する研究：
Nicastrin 糖鎖修飾と Tetraspanin-7 による γ セクレターゼ活性変化

学位申請者：Moniruzzaman Mohammad

審査委員：

主査：生命医科学研究科 准教授 舟本 聡

副査：生命医科学研究科 教授 市川 寛

副査：生命医科学部 准教授 浦野 泰臣

要 旨：

アミロイド β ($A\beta$) は、アミロイド前駆体タンパク質断片 (C99) の γ セクレターゼによる切断で生じるペプチドで、アルツハイマー病 (AD) の原因物質と考えられている。AD 予防のためには、副作用のない $A\beta$ 産生阻害法の確立が期待されており、そのためには γ セクレターゼによる $A\beta$ 産生機序の理解が不可欠である。本論文では、 γ セクレターゼによる $A\beta$ 産生機序を理解する目的で、1) γ セクレターゼ構成因子 Nicastrin の糖鎖修飾と、2) 膜タンパク質 Tetraspanin-7 による $A\beta$ 産生への影響について検討した。1) Nicastrin は γ セクレターゼ構成因子の中で唯一糖鎖修飾を受けるタンパク質であるが、糖鎖修飾による γ セクレターゼの活性への影響についての理解は進んでいない。申請者は CHO 細胞由来の糖鎖修飾変異細胞 (Lec-1 と Lec-2) を利用して、 γ セクレターゼの活性変化や基質選択性について検討した。その結果、変異導入前細胞 (Pro-5) と比較して、いずれの糖鎖修飾変異細胞で $A\beta$ 産生量が低下していた。また、 γ セクレターゼの基質として知られる Notch については、いずれの変異細胞においても切断が低下するものの、C99 切断の場合と比較すると Notch 切断阻害の程度が緩和されていた。2) ある種の Tetraspanin タンパク質は、脂質ラフトで γ セクレターゼと共局在することが知られ、 γ セクレターゼの活性制御に関与している。 γ セクレターゼは、脂質ラフト分画に集積するが、それ以外の分画にも広く分布する。申請者は非ラフト分画に存在する Tetraspanin を同定し、そのうちの Tetraspanin-7 を HEK293 細胞に過剰発現させると、 $A\beta$ 産生量や Notch 切断を低下することを見いだした。以上、本論文では、 γ セクレターゼ活性には糖鎖修飾や Tetraspanin-7 が関与することを初めて示すこととなった。よって、本論文は、博士 (理学) (同志社大学) の学位論文として十分な価値を有すると認められる。

総合試験結果の要旨

2018年8月29日

論文題目：Regulation of Amyloid- β Production: Studies of γ -Secretase Activity on

Nicastrin Glycosylation and Tetraspanin-7

アルツハイマー病原因物質アミロイド β 産生制御に関する研究：
Nicastrin 糖鎖修飾と Tetraspanin-7 による γ セクレターゼ活性変化

学位申請者：Moniruzzaman Mohammad

審査委員：

主査：生命医科学研究科 准教授 舟本 聡

副査：生命医科学研究科 教授 市川 寛

副査：生命医科学部 准教授 浦野 泰臣

要 旨：

2018年8月7日（火）13時から14時10分にかけて、申請者の学位申請論文に関する公聴会を実施した。口頭発表は50分、質疑応答は20分であった。その後、主査と副査のみによる非公開の口頭試問を20分行った。

質疑応答や口頭試問では、実験手法の細部について質問等がなされた。申請者はこれらに対して適切に回答し、研究内容や研究手法等について十分な理解を示すとともに、研究背景についても十分な専門知識を有していた。また、研究成果については、昨年神戸で開催された CONBIO2017 でポスター発表を行い、米国学術雑誌 Biochemical and Biophysical Research Communications (BBRC 誌) に筆頭著者で論文が掲載された。特に BBRC 誌については、査読時に改訂指示を受けることなく、投稿からわずか6日で掲載が受理された。このことは、研究内容の重要性を反映していると考えられる。

申請者は、本研究科修了に必要な所定の単位を修得しており、語学（英語）については、入学時の小論文や面接を英語で実施しており、十分な英語力を持っていると判断できる。

よって、総合試験の結果は合格であると認める。

博士學位論文要旨

論文題目 : Regulation of Amyloid- β Production: Studies of γ -Secretase Activity on Nicastrin Glycosylation and Tetraspanin-7

アルツハイマー病原因物質アミロイド β 産生制御に関する研究 :
Nicastrin 糖鎖修飾と Tetraspanin-7 による γ セクレターゼ活性変化

氏 名 : Moniruzzaman Mohammad

要 旨 : **Background:** γ -Secretase complex, the assembly of nicastrin (NCT), Presenilin (PS), Presenilin Enhancer-2 (PEN-2) and Anterior pharynx defective 1 (Aph-1), catalyzes the cleavage of amyloid precursor protein (APP) to generate amyloid- β protein (A β), the main culprit of Alzheimer's disease (AD). Thus, in the AD research field much of the attention has been focused on developing modulator that can specifically reduce A β production while sparing inhibition of Notch and other substrates cleavages. NCT becomes matured through complex glycosylation and play important role in γ -secretase activity by interacting with catalytic subunit PS. However, the role of NCT glycosylation on γ -secretase activity and substrate specificity is still unknown. Another appealing topic is Tetraspanin enriched microdomains (TEMs) and detergent resistant membrane (DRM) play important role in the regulation of A β generating protease α - and γ -secretases. Recently it is reported that γ -secretase associated with tetraspanin-enriched microdomains (raft) and that a subset of tetraspains are involved in A β production. However, data regarding the effect of non-raft tetraspanins on A β production is still missing.

Objectives: One of the purpose of this study was to examine the effect of NCT glycosylation on γ -secretase activity and substrate specificity in a group of glycosylation mutant lectin resistant CHO (Lec) cells. CHO Lec-1 cells lack glycosyltransferase-I, GnT-I, thus *N*-glycan on NCT are all oligomannose type, whereas CHO Lec-2 cells synthesize NCT containing sialic acid deficient oligosaccharides due to the impairment of cytidine

5'-monophosphate-sialic acid transporter. Another purpose was to search for non-raft tetraspanins by proteomics analysis; and then examined effect of the identified tetraspanins on A β production.

Methods: Generated proteins were analyzed by Western blotting. Sucrose density gradient analysis was performed to study subcellular distribution of tetraspanins and γ -secretase subunits. Levels of functional γ -secretase complex and interaction between γ -secretase and substrate were examined by blue native polyacrylamide electrophoresis and coimmunoprecipitation, respectively. I searched for non-raft tetraspanins in the CHAPSO-soluble membrane fractions of PS1/2 dKO MEF cells by proteomics analysis, and examined the effect of Tetraspanin-7 on A β generation by making TSPAN7 overexpression in HEK (K269) cells.

Results: I have found that mutant CHO Lec-1 and Lec-2 reduced γ -secretase activity in both cell-based and biochemical assays, and that CHO Lec-1 preferentially reduced A β generation. Endogenous level of γ -secretase complex, subcellular distribution of γ -secretase subunits and the level of functional γ -secretase complex remained unchanged in mutants. Interestingly, coimmunoprecipitation study revealed that mutant γ -secretase could recognize substrate as well as parental γ -secretase. Proteomics analysis identified Tetraspanin-7 (TSPAN7), Tetraspanin-8 (TSPAN8), CD63, and CD82 in the CHAPSO-soluble membrane fraction of PS1/2 dKO MEF cells. TSPAN7 overexpression in HEK (K269) cells causes reduction of A β production. However, the level of γ -secretase components, and generation of sAPP β were not changed upon TSPAN7 overexpression.

Conclusion: My data suggests that thorough glycosylation of NCT is critical for enzymatic activity and substrate preference of γ -secretase, and TSPAN7 is a potent modulator of A β production.