

博士学位論文審査要旨

2018年7月19日

論文題目： Roles of the GXXXG Motif in Amyloid Precursor Protein for Its Dimerization and Amyloid β Production

アミロイド前駆体タンパク質の二量体化ならびにアミロイド β 産生における GXXXG モチーフの役割

学位申請者： 東出 英和

審査委員：

主査： 脳科学研究科 教授 御園生 裕明

副査： 脳科学研究科 教授 高森 茂雄

副査： 脳科学研究科 教授 藤山 文乃

要 旨：

この学位論文は、アルツハイマー病の主たる病変である老人斑を構成する、 β アミロイド ($A\beta$) の産生メカニズムの一端を明らかにすることを主眼としている。 $A\beta$ は、基質前駆体であるアミロイド前駆体タンパク質 (APP) の C 末端断片 C99 が、酵素 γ セクレターゼにより切断されることにより生成されるが、この C99 が二量体を形成することが切断に重要であることが先行研究により示唆されている。特に、C99 内に存在する複数のグリシン — X — X — X — グリシン (GXXXG) モチーフが、この二量体形成に重要であると考えられている。東出氏は、このモチーフ配列が本当に C99 の二量体形成に重要なのか、また C99 からの $A\beta$ の産生に重要であるかを検討した。

実験的には、GXXXG モチーフのグリシン残基を他のアミノ酸に置換し、C99 の二量体形成と $A\beta$ 産生に影響があるかどうかを生化学的に検討している。その結果、二量体形成は GXXXG モチーフの有無にかかわらず起こること、すなわち、このモチーフが二量体形成には必須ではないことを示唆する結果を得た。また、 $A\beta$ 産生に対する影響を培養細胞と試験管内再構成系で調べている。 $A\beta$ の生成は C99 が C 末端から段階的に切断されることよって起こることが示されているが、東出氏は、GXXXG モチーフ変異体においてこの段階的切断が変化していることを見出した。これらの結果から、GXXXG モチーフが C99 の二量体化ではなく、むしろ $A\beta$ の段階的切断を制御する役割を担っており、 $A\beta$ 産生に重要な配列であると結論している。

口頭試問では、英語による適切な研究発表を行った。質疑応答では論文についての問題点がいくつか指摘されたが、それに対して満足のできる回答・討論を行い、学位論文の defense を行うことができたと判断できる。

よって、本論文は、博士 (理学) (同志社大学) の学位を授与するにふさわしいものであると認める。

総合試験結果の要旨

2018年7月19日

論文題目： Roles of the GXXXG Motif in Amyloid Precursor Protein for Its Dimerization and Amyloid β Production

アミロイド前駆体タンパク質の二量体化ならびにアミロイド β 産生における GXXXG モチーフの役割

学位申請者： 東出 英和

審査委員：

主査： 脳科学研究科 教授 御園生 裕明

副査： 脳科学研究科 教授 高森 茂雄

副査： 脳科学研究科 教授 藤山 文乃

要 旨：

博士学位候補者の東出氏に対して、2018年7月18日午後2時半より総合試験を行った。

東出氏の学位研究は、神経変性疾患アルツハイマー病の原因因子の一つである A β が、前駆体タンパク質から産生される分子メカニズムの解明である。そこで総合試験では主に、生化学、分子生物学、神経病理学の基礎および専門的な知識についての試問をおこなった。なお、語学試験については、総合試験の前に行った公開口頭試問を英語で行ったため、試験では免除とした。

東出氏は、審査委員の質問について適切に答え、不明な点に関しては十分に論理的な考察を行った。関連分野の基礎知識は十分に備わっていると判断した。専門的な知識については、まだまだ不十分な点も認められるが、概して満足のできるレベルにあると判断した。

以上を踏まえて、審査員一同の協議の結果、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：Roles of the GXXXG Motif in Amyloid Precursor Protein for Its Dimerization and Amyloid β Production

アミロイド前駆体タンパク質の二量体化ならびにアミロイド β 産生における GXXXG モチーフの役割

氏名：東出 英和

要旨：

アルツハイマー病 (AD) は 1906 年にアロイス・アルツハイマー博士により最初に報告され、現在では本邦をはじめとする先進諸国で急速に患者数が増加している。初期症状としては短期記憶消失が最も多く、症状が進行すると言語障害や日常生活の支障などが生じる。AD には根本的治療法がなく、その開発が急務となっている。

AD では Amyloid β ($A\beta$) が脳に沈着することにより老人斑が形成され、さらにタウタンパクが蓄積して生じる神経原線維変化により、神経細胞の脱落が起こって発症すると考えられている (Hardy and Higgins, 1992)。故に $A\beta$ 沈着の減少がアルツハイマー病発症予防の最適な手段になると考えられている。特に、毒性が強く脳内で凝集性が高い 42 個のアミノ酸からなる $A\beta$ 42 の産生の減少が重要視されている。

$A\beta$ は I 型膜タンパク質である Amyloid precursor protein (APP) がアスパラギン酸プロテアーゼである β セクレターゼの切断によって C99 となり、さらに別のアスパラギン酸プロテアーゼである γ セクレターゼによって C99 が切断されることにより生じる。この反応では、まず 48 あるいは 49 アミノ酸からなる長い $A\beta$ 分子種が産生され、これらが 3~4 残基ずつ段階的に切断されることにより、40 あるいは 42 アミノ酸からなる $A\beta$ 40 と $A\beta$ 42 が主要な産物として生じることが明らかとなっている (Qi-Takahara *et al*, 2005; Takami *et al*, 2009)。また、これらの主要 $A\beta$ がさらに切断された短い $A\beta$ ($A\beta$ 38 など) も生成される。この 3~4 残基ごとの段階的切断に関しては、切断部分の α ヘリックス構造 (3.6 残基/周) に起因するものと考えられている (Lichtenthaler *et al*, 1999; Qi-Takahara *et al*, 2005)。これにより $A\beta$ 48 が $A\beta$ 45、 $A\beta$ 42 となるものと、 $A\beta$ 49 が $A\beta$ 46、 $A\beta$ 43、 $A\beta$ 40 に切断される 2 つの産生ラインが生じる。

一方、 $A\beta$ の基質である C99 には 3 つの GXXXG モチーフ (X は任意のアミノ酸) が連続して存在し、このモチーフは E-cadherin や Notch といった他のタンパク質において、二量体化に関与していることが知られている (Trojanovsky *et al*, 2003; De Strooper *et al*, 1999; Russ and Engelman, 2000)。そのため、このモチーフが基質の二量体形成に関与していることならびに二量体化が $A\beta$ 産生に影響を与えることが示唆されている (Munter *et al*, 2007; Kienlen-Campard *et al*, 2008)。Munter らは、APP の GXXXG モチーフにアミノ酸置換を施すと $A\beta$ 42 の産生が減少し APP の膜貫通領域の二量体形成が抑制すると報告したが、一方で Kienlen-Campard らは $A\beta$ 42 の産生は減少するものの二量体形成は促進すると報告した。さらに、 $A\beta$ 40 の産生に関しては、Munter らはアミノ酸置換を施しても変化は見られないと報告したが、Kienlen-Campard らは減少すると報告している。従って、APP の GXXXG モチーフと $A\beta$ 産生の関係について統一した見解がなされていない。

そこで、本研究ではアミノ酸置換により GXXXG モチーフのない C99 を調製し、その二量体形成と $A\beta$ 産生への影響を詳細に検討した。4 つある GXXXG モチーフの G をそれぞれアラニン (A) に置換し、各種基質をコードする Bacmid DNA を作製した。作製した Bacmid DNA は Sf9 細胞に発現させることにより各種組換バキュロウイルスを産生させ、さらに Sf9 細胞に感染させることにより細胞膜に存在する基質を精製した (Kakuda *et al*, 2006)。

まず二量体形成の検証であるが、精製した基質を、タンパク質複合体を壊さずに検出できるBlue Native PAGE (BN-PAGE)—Western blottingにより検証した。その結果、GXXXGモチーフのGをAに置換しても、このモチーフを正常にもつC99と同程度に二量体化が見られた。しかし、この結果はGとAの分子構造や大きさが類似していることから生じている可能性が考えられる。この可能性を検証するため、さらにGをロイシン(L)ならびにフェニルアラニン(F)に置換し、同様に組換え基質を精製した。その結果、Aに置換した場合と同様にGXXXGモチーフのGをLやFに置換しても、このモチーフを正常にもつC99と同程度に二量体化が見られた。これらの結果から、GXXXGモチーフは、基質であるC99の二量体形成には必要でないことが明らかとなった。

そこで次にA β の産生について検討した。精製した基質を神経芽細胞(Neuro2a)より、 γ セクレターゼ活性を含む膜画分と反応させ、産生されたA β をWestern blottingにより検出・定量した。その結果、産生されたA β 量(主要なA β 種をすべて含む)は、GXXXGモチーフ中のGをAに置換すればするほど減少が見られた。また、Lに置換した場合のA β 産生量は野生型と同程度、Fに置換した場合には約2倍の増加が見られた。そして、各種C99基質と γ セクレターゼの共免疫沈降により酵素と基質の結合度合いを検証した。その結果、野生型と各変異体で酵素と基質の結合度合いに変化は見られなかった。これらの結果は、GXXXGモチーフが、 γ セクレターゼによる切断に関与することを示唆している。

さらに、 γ セクレターゼによる基質の切断をより詳細に検討するためにマトリクス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法(MALDI-TOF-MS)を用いて、短いA β 34からA β 43の種々のA β 分子種の定量を行った。その結果、GXXXGモチーフ中のGの置換を増やすほどにA β 42やA β 43などの長いA β 分子種の産生比率が減少し、A β 38やA β 34などの短いA β 分子種の産生比率の増加が見られた。 γ セクレターゼによる段階的な切断様式を考えると、この結果は、長いA β の切断が亢進していることを示唆していると考えた。この点を検証するために、それぞれの短いA β と、そのもととなる長いA β の比(A β 42/A β 38ならびにA β 43/A β 40)を算出し比較した。その結果、GXXXGモチーフ中のGの置換を増やすほどに、A β 42/A β 38ならびにA β 43/A β 40の比の減少が見られた。これらの結果からGXXXGモチーフが、 γ セクレターゼの切断を制御する可能性が示唆された。

上記の結果が生細胞系でも再現可能かどうか確かめるため、GXXXGモチーフのA置換体をChinese Hamster Ovary (CHO)細胞に発現させ、48時間後に培養上清中のA β を検出・定量した。結果として、GXXXGモチーフ中のGの置換を増やすほどに、A β 42やA β 43などの長いA β 分子種の産生比率が減少し、A β 34などの短いA β 分子種の産生比率の増加が見られた。また、精製基質と γ セクレターゼ活性を含む膜画分を反応させた系と同様に、A β の前駆体/産生物の比を検証したところ、全ての変異体で比の減少が見られた。すなわち、生細胞系でもGXXXGモチーフのGを他のアミノ酸に置換すると、 γ セクレターゼの切断がさらにN末端側に亢進している可能性が示唆された。

以上の結果より、GXXXGモチーフは従来いわれていたC99の二量体化よりも、A β 分子種産生に強く影響を与えていることが示唆される。近年、ADならびに軽度認知障害の患者の脳脊髄液中におけるA β 38/A β 42ならびにA β 40/A β 43(それぞれ産生物/前駆体の比をあらわす)の比を調べたところ健常者に比べて高くなっていることが報告されている(Kakuda *et al*, 2012, 2013)。すなわち、 γ セクレターゼによる段階的切断の制御が、ADの発症や重症化に関与する可能性がある。本学位研究で得られた結果は、この段階的切断のメカニズムの理解に大きく貢献するものであり、今後、さらなるメカニズムの解明と、それを治療的に制御する方法の開発が望まれる。