

Title	FAD-linked presenilin-1 mutants impede translation regulation under ER stress
Author(s)	安田, 由華
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43980
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	安田由華
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 17654 号
学位授与年月日	平成 15 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科生体統合医学専攻
学位論文名	FAD-linked presenilin-1 mutants impede translation regulation under ER stress. (家族性アルツハイマー病に関連するプレセニン 1 変異の小胞体ストレス下でのタンパク翻訳制御阻害について)
論文審査委員	(主査) 教授 武田 雅俊 (副査) 教授 杉田 義郎 教授 遠山 正彌

論文内容の要旨

[目的]

家族性アルツハイマー病 (FAD) の原因遺伝子の 1 つであるプレセニン 1 (PS1) の変異は、小胞体ストレス (ER ストレス) 下で ER ストレスセンサー分子である IRE1 の機能を阻害し、ER シャペロンである GRP78/BiP の誘導を減弱させ ER ストレス脆弱性をもたらす。PERK は ER 膜キナーゼであり ER ストレスを感知し活性化されると、翻訳開始因子 eIF2 α をリン酸化し蛋白合成を抑制する。今回 FAD の原因となる変異 PS1 がもう 1 つの ER ストレスセンサーである PERK の活性化と eIF2 α のリン酸化にどのような影響をもたらすかを蛋白合成に至るまで検討し、EAD の病態と ER ストレス応答障害の関連性についてより詳細な解明を試みた。

[方法ならびに成績]

mock、野生型と変異型 PS1 ($\Delta E9$) をそれぞれマウスの Neuro2a (N2a) 細胞に導入した細胞系を樹立した。まず始めに、これらの細胞を蛍光染色することにより変異型 PS1 が PERK の局在に影響するか否かを検討した。PS1 は ER、Golgi、細胞膜に主に存在した。PERK は ER に局在し野生型、変異型 PS1 いずれにおいても両者は ER で共染し、変異型 PS1 が PERK の ER への分布には影響しないことが示唆された。次に、前述の細胞に ER ストレスをかけ、ウェスタンブロッティングにより PERK-eIF2 α シグナル伝達経路の反応をみた。各細胞は過成長による ER ストレスを避けるため、刺激 2 日前に 6 cm ディッシュに 3×10^5 個撒きさらに刺激 1~2 時間前に新鮮なメEDIUM と置換した。その後 1 μ M の Thapsigargin 刺激を加えた。コントロール、野生型 PS1 を導入した細胞では刺激後 30 分で PERK の完全なリン酸化がみられたのに対し、変異 PS1 細胞では PERK のリン酸化は不完全であった。また、同一の細胞における eIF2 α のリン酸化レベルをウェスタンブロッティングにより検討したところ、予想通り変異 PS1 細胞ではコントロール、野生型細胞と比較し、eIF2 α のリン酸化が刺激後 15 分より明らかに遅延していた。同様の結果は、異なる ER ストレッサーである DTT (1 mM) を用いた実験でも確認され、変異 PS1 が PERK の活性化を阻害し、その結果 eIF2 α のリン酸化が阻害されたと考えられた。これらの現象が変異 PS1 強制発現系における特異な反応であるか、あるいは $\Delta E9$ に限った現象であるのかを更に検討するため、PS1 I213T 遺伝子変異ノックイ

ンマウスの線維芽細胞を用いて実験を行った。ノックインホモマウスとヘテロマウスの線維芽細胞に DTT (0.5 mM) で ER ストレスを加えたところ、ホモマウスではヘテロマウスと比較し、刺激後 15 分、30 分における PERK のリン酸化が劣っていた。これらの結果より、 $\Delta E9$ だけでなく変異 PS1 における ER ストレス下での PERK の活性化阻害が起こることが確認された。最後に、PERK-eIF2 α 伝達経路の結果である蛋白合成抑制に変異 PS1 がどのような影響を与えるのかを検討した。野生型 PS1 を導入した N2a と変異型 PS1 ($\Delta E9$) を導入した N2a を前述のように ER ストレスのない状態に前処理した後、Thapsigargin (400 nM) 存在下と非存在下でそれぞれ 20 分間インキュベートし [³⁵S] メチオニン/システインで 10 分間パルスラベルした。その結果、Thapsigargin 刺激による [³⁵S] の取り込みの減少が野生型 PS1 細胞と比較し、変異型 PS1 細胞では劣っていた。以上の結果より、変異 PS1 は ER ストレス下において PERK-eIF2 α シグナル伝達経路を阻害し、その結果蛋白合成抑制の制御機構を障害することが示唆された。

[総括]

最近 PERK が翻訳制御に不可欠であり、ER ストレス応答における細胞の生存に非常に重要であるとの報告があった。今回の結果は変異 PS1 が PERK-eIF2 α シグナル伝達経路を介する蛋白合成制御を阻害し、細胞を ER ストレス脆弱にし細胞死をもたらす可能性を示した。また、ER ストレス脆弱性による A β の産生亢進のメカニズムの可能性も考えられ、孤発例を含めたアルツハイマー病全体の病態メカニズムの解明に寄与するものと考えられる。今後、変異 PS1 による PERK を含めた ER ストレス応答機構阻害との関与についての更なる詳細な解明が必要である。

論文審査の結果の要旨

本研究は、家族性アルツハイマー病 (FAD) の原因遺伝子の 1 つであるプレセニリン 1 (PS1) 変異が小胞体 (ER) ストレス応答機構 (UPR) のセンサー分子の 1 つである PERK のシグナル伝達経路を阻害し、その結果、ER の負荷軽減のための蛋白翻訳抑制をも障害することを証明した。ER はストレス感知オルガネラとしてその機能解析が進んでおり、既に変異 PS1 が IRE1、ATF6 といった他の 2 つの分子を介する UPR を障害する事が報告され、FAD の病態解明上、現在最も注目されている器官の 1 つである。今回、変異 PS1 が PERK シグナル伝達経路を阻害することを解明したことで、変異 PS1 が現在同定されている UPR を全て障害することが示されたことになり、これは FAD の病態と UPR 障害が密接に関連していることを示唆し、臨床的には UPR の阻害を止める薬剤の開発が FAD 治療薬の候補として考え得る。また、脳虚血が PERK を介した ER ストレス応答を惹起するという報告もあり、弧発性 AD の危険因子として議論されている血管性因子と ER ストレスの関連を解明する上でも重要といえ、AD と脳血管性痴呆の病態機作を結びつけるブレイクスルーになる可能性もある。以上より、本研究は博士の学位授与に値するものと考えられる。