OUKA
Osaka University Knowledge Archive

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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	安田由華（やすだゆか）
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リン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つであるプレセニリン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eIF2α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eIF2α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（ΔE9）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-eIF2α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時間前に新鮮なメディウムと置換した。その後1 μM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eIF2α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、eIF2α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eIF2α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ΔE9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、ΔE9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-eIF2α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（ΔE9）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［^{35}S］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［^{35}S］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-eIF2α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-eIF2α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Aβ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る。