



Title	THE PRODUCTION RATIOS OF AICD $\epsilon$ 51 AND A $\beta$ 42 BY INTRAMEMBRANE PROTEOLYSIS OF $\beta$ APP DO NOT ALWAYS CHANGE IN PARALLEL
Author(s)	森, 康治
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/54116">https://hdl.handle.net/11094/54116</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名	もり こう じ 森 康 治
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 23660号
学位授与年月日	平成22年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科内科系臨床医学専攻
学位論文名	THE PRODUCTION RATIOS OF AICD $\epsilon$ 51 AND A $\beta$ 42 BY INTRAMEMBRANE PROTEOLYSIS OF $\beta$ APP DO NOT ALWAYS CHANGE IN PARALLEL ( $\beta$ APPの膜内蛋白分解によるAICD $\epsilon$ 51とA $\beta$ 42の産生比率は常に並行して変化するとは限らない)
論文審査委員	(主査) 教 授 武田 雅俊 (副査) 教 授 竹田 潤二 教 授 遠山 正彌

## 論文内容の要旨

## 〔 目 的 〕

プレセニリン/ $\gamma$ セクレターゼによるペータアミロイド前駆体蛋白( $\beta$ APP)の膜内蛋白分解においては、最初に細胞膜と細胞質の境界領域で $\epsilon$ 切断が生じ、引き続いて膜貫通領域の中央付近において $\gamma$ 切断がおこる。 $\epsilon$ 切断は細胞質側で $\beta$ APP intracellular domain (AICD)を産生する切断であり、 $\gamma$ 切断はアミロイドペータ(A $\beta$ )を産生する切断である。 $\epsilon$ 切断および $\gamma$ 切断においては、それぞれの切断部位に多様性があり、断端が異なるAICDおよびA $\beta$ が産生される。 $\epsilon$ 切断と $\gamma$ 切断の間には関連があり、アルツハイマー病の病因に重大な意味を持つ分子であるA $\beta$ 42、および量として最も多いA $\beta$ 40の産生割合は、それぞれ $\epsilon$ 48切断および $\epsilon$ 49切断と関連している可能性がある。多くの製薬企業により、A $\beta$ 42産生抑制を標的とした化合物が開発されているが、 $\epsilon$ 切断を標的とした化合物は、 $\gamma$ 切断よりも上流において、より効率的にA $\beta$ 42の相対的産生を抑制できるかもしれない。 $\epsilon$ 切断の産物であるAICD分子種の産生比率を治療薬開発の指標とすることが可能であるかを検討するため、本研究では、 $\epsilon$ 切断経路について、特にこれまで性質のはっきりしていなかった $\epsilon$ 51切断とA $\beta$ 42産生比の関連性に焦点を当てて解析した。

## 〔 方 法 〕

*de novo* AICD産生を観察するためセルフリー $\gamma$ セクレターゼアッセイを実施した。産生されたAICD分子種のミノ末端を免疫沈降-マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法を用いて同定した。A $\beta$ 分子種はELISA法とImmunoblotting法を用いて測定した。

## 〔 成 績 〕

$\beta$ APPにおけるアルツハイマー病の病原性変異のうち、 $\epsilon$ 切断部位周辺に存在するV642I変異、L648P変異、K649N変異それぞれが $\epsilon$ 切断に対して及ぼす影響を検討した。V642I変異およびL648P変異では、 $\epsilon$ 48切断の産物であるAICD $\epsilon$ 48の相対的産生比率が増加していた。ところがK649N変異 $\beta$ APPを発現した細胞においては、主要な切断として $\epsilon$ 51部位での切断が観察された。いずれの変異においてもA $\beta$ 42産生比率は増加していた。これらの結果は、 $\epsilon$ 51切断が $\epsilon$ 48切断と同様にA $\beta$ 42産生と関連することを示している。

一方で、セルフリーアッセイの酵素反応時の緩衝液のpHを6から7.4に上げることによりAICD  $\epsilon$  51産生比率は低下したが、興味深いことに、その際にA  $\beta$  42産生比率は変化しなかった。さらにセルフリーアッセイに用いる細胞膜分画をアルカリ緩衝液で前処理することにより膜分画から種々の因子を除いた場合にも、AICD  $\epsilon$  51産生比は顕著に低下する一方で、A  $\beta$  42産生比は変化しなかった。膜分画のアルカリ前処理によって、pHに依存したAICD  $\epsilon$  51産生比率の変化は失われた。対照的に、K649N変異における $\epsilon$  51切断の相対産生比率の増加は、セルフリーアッセイ時のpHの変化および膜のアルカリ前処理のいずれによっても相殺されなかった。これらの結果から、 $\beta$  APPの病原性変異において増強されるA  $\beta$  42産生と関連したAICD  $\epsilon$  51経路とは別に、膜分画のアルカリ前処理によって取り除かれる因子がAICD  $\epsilon$  51の産生比率を調節していることが示唆された。

#### [ 総 括 ]

本研究により、プレセニン/ $\gamma$ セクレターゼにおける $\epsilon$ 切断の正確さを決定する機構に、 $\beta$  APPの病原性変異により誘導される過程、およびアルカリ前処理により膜から除かれる未同定の因子により誘導される過程の少なくとも2つの過程が関与していることが明らかになった。前者はA  $\beta$  42産生比と関連するが、後者はそうではない。したがってAICDのアミノ末端の変化は必ずしも常に $\gamma$ 切断の並行的変化を伴うとはいえ、A  $\beta$  42と関連するAICD分子種の相対レベルを指標にして $\epsilon$ 切断を標的とするA  $\beta$  42産生抑制薬を開発することは現段階においては困難である。今後、今回の研究で存在が示唆されたAICD  $\epsilon$  51産生に関与する因子を同定し、その機構を明らかにすることで、A  $\beta$  42産生と関連する $\epsilon$ 切断をより選択的に評価できる系を構築していく必要がある。

### 論文審査の結果の要旨

A  $\beta$  42は、老人斑の主たる構成要素であり、その産生を抑制することでアルツハイマー病が予防および治療できる可能性がある。A  $\beta$  を産生する切断のうち、 $\epsilon$  48切断はA  $\beta$  42産生に、 $\epsilon$  49切断はA  $\beta$  40産生に関連している。本研究は、これまで特徴の明らかでなかった $\epsilon$  51切断とA  $\beta$  42産生との関連性を検討し、 $\epsilon$  51切断を反映するAICD  $\epsilon$  51産生は、「アミロイド前駆体蛋白の病原性変異により誘導される過程」と「アルカリ前処理により膜分画から除かれる因子により誘導される過程」の少なくとも2つの過程が関与していること、さらに前者はA  $\beta$  42産生と関連するが、後者はそれとは関連しないことを明らかにした。

本研究は、 $\epsilon$ 切断を標的としたA  $\beta$  42産生抑制薬という新しい観点からの薬剤開発を目指す上で基礎となる重要な知見を明らかにしたものであり、学位の授与に値するものと認める。