

Alcadein α 切断産物による脳内 APP の代謝制御機構

学位論文内容の要旨

Alcadein (Alc) は中枢神経系に強く発現する I 型膜タンパク質であり、3 つの独立した遺伝子がコードする Alc α , Alc β , Alc γ の三種の相同分子として存在する。Alc は細胞質タンパク質である X11L を介してアルツハイマー病 (AD) 発症の原因因子の一つであるアミロイド前駆体タンパク質 (APP) と複合体を形成する分子として、当研究室で単離・同定された。APP と Alc は X11L が解離することで協調的に代謝を受け、APP は α -secretase あるいは β -secretase により、Alc α は α -secretase により、一次切断を受け、それぞれ sAPP α/β , sAlc を分泌する。さらにそれぞれのカルボキシル基末端断片 (CTF) は γ -secretase による膜内切断を受け、APP CTF からは A β および p3、Alc CTF からは p3-Alc が産生、分泌する。A β (A β 40、A β 42) は AD の脳病理学的特徴である老人斑の主要構成成分であり、A β 生成の量的・質的变化に伴う Oligomer 形成が AD 発症の初期要因と考えられている。p3-Alc α は、AD 患者脳脊髄液 (CSF) 中において A β 生成の量的・質的变化を反映して変動することが明らかになっており、Alc α の代謝産物が AD のサロゲートマーカーとして利用できる可能性が示唆されている。

Alc と APP は発現と代謝様式が相同・相似であることに加え、*in vitro* の解析から、細胞内小胞輸送に関与する kinesin-1 のカーゴ分子として機能すること、Alc α ICD が APP の順行性輸送を阻害し、A β 産生を亢進することが明らかになっている。しかし、生体内における Alc およびその代謝産物が APP 代謝を制御する仕組みは明らかになっていない。

本研究では、Alc α 切断産物による APP 代謝制御機構を *in vivo* で解明する事を目的とし、kinesin-1 との結合ドメインを有し、 γ -secretase の基質となる Alc α 一次切断産物 Alc α CTF を脳神経細胞特異的に発現するトランスジェニックマウス (Tg マウス) を作製し、Alc α CTF の APP 代謝への影響、Alc α CTF およびその切断産物 p3-Alc α と Alc α ICD の機能を解析した。

まず、Tg マウス作製に用いる construct として、神経細胞で特異的に機能する血小板由来増殖因子 β (PDGF β) プロモーター下流に、ヒト Alc α CTF cDNA, SV40 polyA を配置した。初めに、signal peptidase による切断を受け、正常な N 末端を有する Alc α CTF を発現する construct を作製する為に、APP CTF における報告を元に、3 種の construct 作製し、細胞に発現させた。発現した Alc α CTF および切断産物 p3-Alc α を Western Blot 法とマスマスペクトロメトリーにより解析した。その結果、正しい代謝産物を生成した全長 Alc α 由来の signal peptide に Alc α CTF を直接付加した construct を用いて Tg マウスを作製し、6Line の founder を得た。Western Blot 法により、全脳で Alc α CTF の発現量を定量した結果、wild type (WT) マウスに比べ、3Line で約 1.4 倍から 1.7 倍程度の増加が認められた。そこで、最も発現の高い 54L を用いて、脳における発現部位を解析した結果、大脳皮質および海馬に

において約 4 倍の顕著な Alca CTF の発現量増加が認められた。また、Alca CTF の代謝産物である p3-Alca の産生量を定量した結果、約 8 倍の産生増加が認められた。以上の結果から、Alca CTF を過剰発現し、かつ内在性 Alca と同じ切断を受け p3-Alca を産生する Alca CTF Tg マウスを樹立した。

そこで、APP の一次切断産物である APP CTF の定量を WT マウスおよび Tg マウスの脳組織(大脳皮質および海馬)を用いた Western Blot 法により行った。APP CTF には α -secretase で切断され生じる CTF α (C83)、 β -secretase で切断され生じる CTF β (C99, C89) が存在する。結果、Tg マウスにおいて全ての APP CTF 分子種で有意な減少を認め、その減少は加齢に伴い増加する傾向が認められた。次に、 γ -secretase による切断により、APP CTF から産生される A β 40、A β 42 を sELISA 法で定量した。その結果、A β 40、A β 42 ともに Tg マウスで有意な増加を認めた。全長 APP (APP FL) および sAPP 量に変化は認められていない。以上の結果から、Alca CTF の過剰発現は APP 代謝における APP CTF の γ -secretase による切断を亢進することが考えられた。

次に、Alca CTF Tg マウスにおける APP 代謝変化の分子機構を解明する為に、まず他の γ -secretase 基質で APP と同様の変化が認められるか、APLP1, Alc β , N-Cadherin それぞれの CTF 量を定量することで検証した。その結果、これらタンパクの CTF 量に、変化は認められなかった。この結果より Alca CTF の発現による APP 代謝変化は APP CTF に特異的な事象であると考えられた。次に、本事象が p3-Alca および Alca ICD のいずれの機能によるものかを神経細胞株である CAD cell を用い検討した。その結果、p3-Alca を添加した群では A β 産生に変化は認められないのに対し、Alca ICD を発現した群では A β 産生の有意な亢進を認めた。よって、Alca による APP の代謝変化は Alca CTF と代謝産物 Alca ICD の作用によるものと考えられた。そこで、kinesin-1 との結合領域を有する Alca CTF が、APP 代謝に影響する可能性を考え、CAD cell に Alca CTF および kinesin-1 との結合を阻害する変異 Alca CTF AWAA を導入し、A β 産生量を sELISA 法により定量した。結果、Alca CTF では A β 産生が亢進したのに対し、Alca CTF AWAA では A β の産生亢進は認められなかった。以上の結果より、Alca CTF Tg マウスにおける APP 代謝変化は Alca CTF の過剰発現により APP と kinesin-1 の結合が阻害され、APP の輸送に変化が生じた結果であると考え、APP CTF の細胞内局在を生化学的な分画により検証した。APP のアミロイド生成的代謝はラフトで起こることが報告されている。そこで、Alca CTF Tg マウスで APP CTF の γ -secretase による切断が亢進していることから、ラフトへの APP または APP CTF の局在が増加している可能性を考え、大脳皮質および海馬より調製した膜画分をショ糖密度勾配遠心法により分画し、生化学的にラフトに相当する界面活性剤不溶性の膜領域 (DRM) を調製し、DRM 画分、non-DRM 画分における APP CTF 量を WB 法により解析した。その結果、Tg マウスの DRM 画分において APP CTF の有意な増加が、non-DRM 画分では有意な減少が認められた。このことから、Alca CTF の過剰発現により、DRM への APP CTF の局在が増加することで γ -secretase による APP CTF の切断が亢進し、A β 産生が増加する可能性が示唆された。

以上の結果より、脳内における Alca 代謝産物の APP 代謝に及ぼす影響が明らかになり、協調的な代謝を受ける Alca と APP において、Alc の代謝変化が APP の代謝に影響を与え、A β 産生の亢進を介して、AD 発症につながる可能性を *in vivo* で示した。

学位論文審査の要旨

主査	教授	鈴木	利治
副査	教授	南	雅文
副査	准教授	山本	融
副査	特任准教授	森島	真帆

学位論文題名

Alcadein α 切断産物による脳内 APP の代謝制御機構

Alcadein は、神経で強く発現する I 型膜タンパク質ファミリーであり、3つの独立する遺伝子がコードする Alcadein α (Alc α)、Alcadein β (Alc β) および Alcadein γ (Alc γ) からなる。同様な I 型膜タンパク質である家族性アルツハイマー病の原因遺伝子産物、アミロイド β タンパク質前駆体 (APP) と脳内局在、代謝様式、細胞内機能が相同・相似であることが明らかになっている。これまでに、神経細胞内で細胞質 X11L タンパク質を介して Alc は APP と複合体を形成しているが、別々のカーゴで同じキネシン-1 による順行輸送を受ける事が明らかになっている。特に Alc は直接キネシン-1 と高親和性結合を行うカーゴ受容体であることから、Alc の代謝を含む細胞内動態は APP の輸送に影響を与え、結果として APP の代謝を変えることで神経毒性を示す A β の産生にも影響を与えることが細胞を用いた *in vitro* の解析から明らかになっていた。しかしながら、このような Alcadein 代謝および代謝産物が APP の代謝に影響を与える事は脳内 *in vivo* では証明されていなかった。

本研究は、ヒト型 Alc α の一次切断産物 (APP α セクレターゼにより切断を受けた C 末膜結合断片) である Alc α CTF をコードする cDNA を脳神経細胞特異的に発現させるトランスジェニック (Tg) マウスを作製し、*In vivo* (脳) における Alc α CTF 代謝産物 (γ セクレターゼによる膜内切断により、Alc α から分泌性 p3-Alc α と細胞質に遊離した AlcICD を構成的に生成する) による APP 代謝を解析したものである。解析結果から、APPCTF (APP α および β セクレターゼ切断を受けた C 末膜結合断片) は減少しているが、A β (APPCTF の γ セクレターゼによる切断産物) 生成は増加していることを明らかにした。Alc α CTF の代謝産物 p3-Alc α もしくは Alc α ICD のどちらが APP 代謝に影響しているのかを解析し、A β 生成を増加させるのは p3-Alc α ではなく Alc α ICD であることを見いだした。 γ セクレターゼの活性は膜ラフト分画で高いことから、Alc α ICD が APPICD の膜局在を変化させる可能性を解析したところ Tg マウスでは APPCTF がラフト分画に多く回収されることを見いだした。本研究は、AlcICD が非ラフト分画の APP-X11L-Alc (または AlcCTF) 複合体に作用し、APP を複合体から放出することで APP を β および γ セクレターゼ活性が活性化しているラフト領域に搬入させる分子機構を示唆する先端的な研究であるといえる。

これは、ようするに、著者は Alcadein の新たな機能を脳 *in vivo* で証明し、A β の生成制御機構に新たな知見を見いだしたもので、発症原因が不明な孤発性アルツハイマー病の発症機構の解明に貢献し、新たな創薬ターゲットの創出に貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士 (生命科学) の学位を授与される資格があるものと認める。