



|                     |                                                                                                                           |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | γセクレターゼによるAlcadeinの切断機構の解明と膜脂質組成が基質切断に及ぼす影響の解析 [論文内容及び審査の要旨]                                                              |
| Author(s)           | 朴, 懿                                                                                                                      |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                                                     |
| Degree Name         | 博士(薬科学)                                                                                                                   |
| Dissertation Number | 甲第11850号                                                                                                                  |
| Issue Date          | 2015-03-25                                                                                                                |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/59270">https://hdl.handle.net/2115/59270</a>                                         |
| Rights(URL)         | <a href="https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/">https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/</a> |
| Type                | doctoral thesis                                                                                                           |
| File Information    | Piao_Yi_abstract.pdf, 論文内容の要旨                                                                                             |



## 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士 （薬科学）氏名 朴 懿

### 学 位 論 文 題 名

#### $\gamma$ セクレターゼによる Alcadein の切断機構の解明と膜脂質組成が基質切断に及ぼす影響の解析

本研究では、孤発性アルツハイマー病の発症機構の一つとして、膜内環境が $\gamma$ -secretase の切断を変化させる可能性を証明する目的として、膜内脂質組成の変化による $\gamma$ -secretase の切断変化に着目し解析を行った。

孤発性 AD の発症機構は家族性 AD と異なり、非常に複雑である。孤発性 AD と家族性 AD の発症年齢は異なるが、症状や病理的所見は同じである。孤発性 AD 患者で A $\beta$ 42 の産生が変化している報告がある。したがって、本来発症原因分子である A $\beta$  を用いて $\gamma$ -secretase の切断変化を解析するのが理想的であるが、A $\beta$ 42 の凝集性の高さや A $\beta$  の代謝機構などのため、A $\beta$  の解析では $\gamma$ -secretase の切断変化だけ解析することが困難である。そこで、当研究室の Alcadein (Alc) を用いた解析により、孤発性 AD 患者の中で $\gamma$ -secretase の切断が変化しているものがあることがわかった。Alc は APP と協調的代謝を受け、APP と AD 患者脳で共局在し、APP と同様に複数の $\gamma$ -secretase 切断サイトを持ち、PS1 変異体によってその切断比率が変化することから、Alc は $\gamma$ -secretase の切断変化を解析するのに最適な分子であると考えた。

膜内脂質組成が $\gamma$ -secretase の基質切断に与える影響を検証するために、まずは M $\beta$ CD 処理によるコレステロールの引き抜き実験と Cholesterol-M $\beta$ CD 添加によるコレステロール添加実験を行った。その結果、APP は膜内コレステロール含量によって $\epsilon$ 切断も $\gamma$ 切断も変化しなかったが、Alc $\alpha$ は $\epsilon$ 切断も $\gamma$ 切断も変化した。これまでの報告は APP のみを持ってコレステロールと $\gamma$ -secretase の切断の関係性を検証し、コレステロールは $\gamma$ -secretase の切断に影響しないと結論付けたが、この検証によって、 $\gamma$ -secretase の基質切断はコレステロールによって変化することがわかった。さらに、スフィンゴ脂質異常細胞を用いて同様な解析を行った。その結果、スフィンゴ脂質減少細胞では、50%減少した LY-B でのみ APP の $\gamma$ 切断が変化した。Alc $\alpha$ はスフィンゴ脂質 17%減少した LY-A と 50%減少の LY-B 両方で $\gamma$ 切断も $\epsilon$ 切断も変化したことから、Alc $\alpha$ の $\gamma$ -secretase による切断は APP よりも環境の変化により敏感である可能性が示唆された。以上の実験結果によって、 $\gamma$ -secretase の基質切断は PS1 の遺伝子変異以外にもコレステロールやスフィンゴ脂質の含量によって変化することが証明できた。

$\gamma$ -secretase はどこでも基質を切断するのではなく、Lipid raft と呼ばれる特定の場所で主に基質を切断することから、膜内脂質環境の変化による切断変化は Lipid raft で起こる現象であるか検証した。そのためにまず、Lipid raft (DRM) と non-lipid raft (non-DRM) で APP および Alc $\alpha$ はどのように $\gamma$ -secretase によって切断されるか検証した。その結果、APP と Alc $\alpha$ は主に DRM で $\gamma$ -secretase によって切断されるが、non-DRM でも切断が起こることがわかった。特に、APP では A $\beta$   $\gamma$ 2 の主な産生場所が non-DRM であることがわかった。また Alc $\alpha$ でも non-DRM では p3-Alc $\alpha$   $\gamma$ 2 が major の産生物であることがわかった。このことから、DRM と non-DRM は膜脂質組成が異なることが予想できるので、 $\gamma$ -secretase による切断は起こるものの、major となる切断サイトが異なることから、膜脂質組成が異なることによって $\gamma$ -secretase の切断が異なる可能性が示唆されました。さらに、DRM と non-DRM 両方で切断が起こることから、今後の膜内コレステロール含量が切断に及ぼす影響を解析するためには DRM と non-DRM 両方で切断変化を見る必要があると考えた。

膜内コレステロール含量の変化が DRM と non-DRM における  $\gamma$ -secretase の基質切断におよぼす影響を検証した結果、APP では、膜内コレステロール含量の変化による切断の変化は、細胞全体で検証したときと DRM で検証した時、異なる結果となった。すなわち、DRM に見られる変化が細胞全体では見られない可能性がある。 $\gamma$ -secretase は DRM で主に活性を示すので、細胞全体では APP の切断変化を検出できないが、DRM でより詳細の解析を行うと APP が膜内コレステロール含量の変化によって  $\gamma$ -secretase による切断が変化することがわかった。また、Alca では、細胞全体でみた膜内コレステロール含量の変化が切断に及ぼす影響はほぼ DRM での切断変化と一致することがわかった。膜内コレステロール含量の変化が non-DRM で APP と Alca の  $\gamma$ -secretase による切断に及ぼす影響として、APP の  $\gamma$ 切断は変化しなかったが、APP の  $\epsilon$ 切断と Alca の  $\gamma$ 切断と  $\epsilon$ 切断は膜内コレステロール含量が減少したときに DRM 様な切断になり、膜内コレステロール含量が増加した時に切断が検出されなかった。この結果をうけて、膜内コレステロール含量の変化によって DRM と non-DRM での  $\gamma$ -secretase の切断に与える影響として、 $\gamma$ -secretase の局在が変化した可能性があると考えた。

そこで、膜内コレステロール含量の減少と増加のときの  $\gamma$ -secretase の分布を調べた。その結果、膜内コレステロール含量が減少した時に Flotillin1 は non-DRM への移行が認められた。さらに膜内コレステロール含量が増加した時に、Flotillin1 は DRM での集積が促進された。このことから、 $\gamma$ -secretase の切断環境が膜内コレステロール含量の増減によって変化している可能性が考えられた。また、活性型  $\gamma$ -secretase の指標となる PS1NTF は本来 DRM にほとんど局在を示すが、コレステロール含量が減少した時に、non-DRM への移行が認められた。そして、膜内コレステロール含量が増加した時でも、PS1NTF は non-DRM への移行が見られた。以上のことから、活性型  $\gamma$ -secretase が正常に機構するためには、正常の膜内脂質環境が必要である可能性が示唆された。

孤発性 AD 患者では膜内脂質環境の異常が起こりうるか検証するために、健常人と AD 患者脳における Flotillin 1 と PS1 NTF の分布を調べた。その結果、一部の AD 患者では Flotillin 1 と PS1 NTF の局在異常が見られた。その分布パターンは先ほど細胞系で行ったコレステロール含量が増加した時と同じものだった。このことから、一部の AD 患者では  $\gamma$ -secretase の切断異常が起こっている可能性が示唆された。

本研究によって、1) 原因遺伝子である  $\gamma$ -secretase の触媒ユニット PS 遺伝子に発症性の変異がなくても、膜脂質組成が変化することによって、 $\gamma$ -secretase による基質の切断が変化した。2) 原因遺伝子の変異に起因しない  $\gamma$ -secretase の切断変化が SAD の発症機構の一つであることが示された。3) 約 40% の AD 患者において膜脂質環境の変化と  $\gamma$ -secretase の切断変化が起きている可能性が示唆された。