HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	BACE1によるAPP切断部位選択機構の解析［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	木村, 彩乃
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第12275号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/62159
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Ayano_Kimura_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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　　木村　彩乃

学　位　論　文　題　名

BACE1 による APP 切断部位選択機構の解析

【序論】

アルツハイマー病 (AD)は認知記憶障害を主症状とする不可逆的な進行性の神経変性疾患である。AD に特徴的な病理的所見として老人斑の形成が挙げられ、その主要構成成分は、約 40 アミノ酸から成るアミロイドβ (Aβ)である。Aβは、アミロイドβ前駆体タンパク質(APP)が BACE1 による切断を受けた後、γ-secretase による膜内切断を受け産生される。また、BACE1 による APP の切断部位として Asp1(Aβ配列内の N 末端アミノ酸を 1 と表記)と Glu11 の 2 か所が同定されている。Asp1 切断からは Aβ1-40 を、Glu11 切断からは Aβ11-40 が産生される。AD 患者脳内では、何らかの要因により Asp1 の切断が増加し、Aβ1-40、及び、凝集性の高い Aβ1-42 が増加することが AD 発症の原因の一つであると考えられている。

近年、若年性 AD 患者において切断部位である Glu11 の変異が発見された。この変異体では、Glu11 の切断が抑制され、Asp1 における切断の増加、それに伴い Aβ1-40 の増加が認められた。さらに、軽度認知障害患者において、Aβ11-40 が健常人に比べ有意に減少していることが報告されている。これらのことから、BACE1 による Glu11 と Asp1 の切断部位の変化は AD 発症機構の一因である可能性が考えられる。しかし、Asp1 と Glu11 の切断がどのように決定されるのかは明らかになっていない。

そこで私は、BACE1 による APP 切断部位の選択機構の解明を目的に研究を行った。

【結果・考察】

家族性 AD (FAD)変異体における APP 切断変化の解析

FAD 変異である E682K 変異では、Glu11 切断が抑制されることで、Asp1 切断が増加し、Aβ1-40/42 の増加が引き起こされる。しかし、Aβ1-40/42 量を変化させる他の FAD 変異体において、Asp1 切断のみが変化しているのか、Asp1 切断変化に伴い Glu11 切断も変化しているのかは明らかとなっていない。そこで各種 FAD 変異体において産生される Aβ分子種の解析を行った。結果、pathogenic 変異(APP_{swe}、APP_{A673V})では、Asp1 切断が増加し、Glu11 切断が減少していること、一方、protective 変異(APP_{A673T})では、Asp1 切断が減少し、Glu11 切断が増加していることを明らかとした。これは切断サイトの二者択一的選択が AD 発症に関与していることを示す結果である。

APP 変異による切断部位変化の解析

human APP (hAPP)と mouse APP (mAPP)から産生される Aβ分子種のパターンは異なっている。hAPP では、Aβ1-40 が主要分子種であるのに対し、mAPP で

は Aβ11-40 が主要分子種として産生される。この結果から、種間の APP の配列の違いが、BACE1 による切断部位を変化させている可能性が考えられた。これを実証するため、ヒト Aβ配列内においてマウスとアミノ酸配列が異なる 3 ヵ所の各アミノ酸、及び 3 ヵ所全てのアミノ酸をヒト配列からマウス配列に置換した hAPP 変異体を作製し、各変異体から産生される Aβ分子種を解析した。その結果、種間の APP の切断部位の違いは 676、684 番目のアミノ酸の違いに起因することを明らかとした。

pH 変化による APP 切断部位変化の解析

BACE1 は低 pH (pH4-5)で強い活性を持ち、pH 変化により立体構造が変化する。また、オルガネラごとに pH は pH4.7-7.4 と大きく異なることから、pH 変化により、BACE1 が APP 切断部位を変化させる可能性が考えられた。これを検証するため、pH4.5-7.0 の環境下で *in vitro* BACE1 assay を行い、切断産物を MALDI-TOF/MS により解析した。結果、酸性環境下では、Asp1 切断が優位であるのに対し、pH の上昇に伴い Glu11 切断が増加し、中性付近では Glu11 切断が優位になることを見出した。

APP-CTFs 局在解析

切断部位選択の違いの原因として、局所的に BACE1 の活性が異なる可能性が考えられた。そこで、マウス脳をサンプルとして BACE1 の活性が高いとされている lipid raft を DRM (detergent-resistant membrane)分画法により分取し、各 APP-CTFs の局在を解析した。その結果、Asp1 の切断産物である C99 は DRM、non-DRM 画分どちらにおいても検出されたのに対し、Glu11 の切断産物である C89 は DRM 画分においてのみ検出された。この結果から、BACE1 による Glu11 切断は DRM で行われている可能性が示唆された。

次に、Glu11 切断が行われている場を同定するため、DRM にどのようなオルガネラが集積するのかを、各種オルガネラマーカータンパク質の局在解析を行い確認した。結果、DRM には、細胞膜マーカーである N-Cadherin、TGN マーカーである Syntaxin6 が集積していることが明らかとなった。このことから、Glu11 切断は TGN、細胞膜のどちらか、又は両部位において行われている可能性が示唆された。また、TGN や細胞膜は、pH6、pH7.4 と中性付近であり、pH 変化による APP 切断部位選択の解析結果と合致しており、Glu11 切断がこれらの場で行われている可能性を強く指示している。

【まとめ】

本研究により、Asp1 切断の変化のみではなく、Glu11 切断の変化も AD 発症に関与することが示された。また、BACE1 による APP の切断部位選択は、APP、BACE1 が局在する場、および pH によって決定されている可能性が示唆された。