

# 博士論文審査報告書

## 論 文 題 目

Arctic mutant amyloid  $\beta$  protein interferes the functions of CHRNA7 through specific binding

Arctic 変異型アミロイド  $\beta$  蛋白による  
CHRNA7 機能の抑制とその分子メカニズムの解析

申 請 者

Ye	JU
琚	曄

生命医科学専攻 生物物性科学研究

2017 年 2 月

## 1. 論文内容の要旨

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease; AD) は認識障害、記憶障害を生じる認知症の一種である。AD の病理学的特徴の一つとして神経細胞外に沈着する老人斑が挙げられる。老人斑の主成分はアミロイド  $\beta$  タンパク質 (Amyloid  $\beta$  protein; A $\beta$ ) である。A $\beta$  内アミノ酸配列の変異により家族性アルツハイマー病を発症することが知られている。その中で Arctic 変異型アルツハイマー病は、2001 年にその変異が報告され、主に Arctic mutant A $\beta$  の異常凝集に着目して研究が進められてきた。 $\alpha 7$  ニコチン性アセチルコリン受容体 (Cholinergic receptor, nicotinic, alpha 7; CHRNA7) は、中枢神経系において主にシナプスに存在する膜受容体であり、A $\beta$ 42 と特異的に結合することから、AD の病態に関係していると考えられている。

本論文では、Arctic 変異型アルツハイマー病の分子メカニズムの解明を目的として研究を行った。Arctic A $\beta$  のターゲットとして CHRNA7 に着目し、生化学的、細胞生物学的、分子生物学的な解析により Arctic A $\beta$ 40 と CHRNA7 の関係を調べた。これらの解析により、Arctic A $\beta$ 40 は wild-type A $\beta$ 40 や他の変異型 A $\beta$ 40 に比べて強く CHRNA7 と結合していること、相互作用に必要な部位が CHRNA7 の N 末端であることを明らかにした。また、Arctic A $\beta$ 40 と GST-CHRNA7 を溶液中でインキュベートすると、Arctic A $\beta$ 40 の凝集が起こることが明らかとなった。次に Arctic A $\beta$ 40 が CHRNA7 の機能に影響するのかを調べるため、カルシウムフラックス及びその下流シグナルである p44/42 MAPK (ERK1/2) の活性を調べた。その結果、Arctic A $\beta$ 40 自体の添加のみでは、CHRNA7 の機能に影響はなかった。Arctic A $\beta$ 40 を加えて 24 時間後にニコチンを添加すると、カルシウム反応の抑制や ERK1/2 活性の低下が起こることから、Arctic A $\beta$  が CHRNA7 の N 末端に結合、凝集することにより、ニコチンにより活性化される CHRNA7 の機能が抑制されることが示唆された。

次に神経細胞において Arctic A $\beta$ 40 が CHRNA7 の機能である神経細胞死への抵抗性に影響するのかを調べた。まず、神経芽細胞腫である SH-SY5Y 細胞は、酸化ストレスに対する CHRNA7 を介した抵抗性 (神経保護作用) を持つことを示した。そこで、CHRNA7 を過剰発現した SH-SY5Y 細胞に Arctic A $\beta$  を加えて、24 時間インキュベートすると、この CHRNA7 を介する神経保護作用が抑制されることが明らかとなった。さらに、その下流シグナルへの影響を調べるため、神経保護作用に関わるシグナルの活性を調べた。その結果、ERK1/2 のみがニコチンで活性化し、Arctic A $\beta$ 40 によりこの活性が抑制されることが明らかとなった。最後に、MAPK/ERK kinase (MEK) の選択的抑制剤 PD98059 の投与実験を行うことにより、ERK1/2 の活性化が酸化ストレスに対する CHRNA7 の神経保護作用に関与していることを明らかにした。本研究において、Arctic A $\beta$ 40 と CHRNA7 の相互作用、及び Arctic A $\beta$ 40 が CHRNA7 の機能へ及ぼす影響に関して見出された新たな知見は、今後、Arctic 変異型アルツハイマー病の分子メカニズムを神経化学的な観点で明らかにしてゆく

上でも重要な足がかりになると考えられる。

## 2. 論文審査結果

2017年1月20日に行われた公聴会では、論文内容の説明と質疑応答が行われた。その概要を以下に記載する。

- 1) A $\beta$  oligomer と A $\beta$  fibril は脳に及ぼす影響が異なるが、CHRNA7 の局在と関連性があるのかの問いに対し、先行研究の結果から、A $\beta$  oligomer は神経細胞に対して強い毒性を持ち、シナプス機能を抑制する性質があること、CHRNA7 は主にシナプスに発現していることから、A $\beta$  oligomer は CHRNA7 への結合を介してシナプス機能を抑制する可能性があるという説明があった。また、A $\beta$  fibril は主に老人斑で見られるという説明があった。さらに本研究では凝集の影響を取り除くために、40 アミノ酸残基から成る Arctic A $\beta$ 40 を用いて実験を行った。A $\beta$ 40 monomer は、インキュベーションすると A $\beta$ 40 oligomer が生成する。これらの A $\beta$ 40 monomer と oligomer はどちらも可溶性であるため、Arctic 変異型家族性アルツハイマー病の病理、*in vivo* モデルでのメカニズムやシナプス長期増強 (Long-term potentiation ;LTP) との関連性に着目して、可溶性の Arctic A $\beta$  (oligomer を含む) はシナプスへ影響があることも考えられるとの指摘があり、最終版の考察に追記した。
- 2) 未分化の SH-SY5Y 細胞は神経細胞のモデルと言えるのか、また未分化の SH-SY5Y 細胞及び CHO-K1 に対して、それぞれ ERK1/2 活性を着目しているがその違いは何かという問いに対し、先行研究では分化、未分化の SH-SY5Y 細胞両方とも神経細胞モデルとして神経細胞死の実験に用いられているという説明があった。また、ERK1/2 活性は同じ様な変化があったが、CHO-K1 細胞ではニコチンを投与した際の CHRNA7 を介したカルシウムフラックス及びその下流シグナルである ERK1/2 の活性化を調べたのに対し、SH-SY5Y 細胞では酸化ストレスに対するニコチンを介した CHRNA7 の神経保護作用に関わるシグナルとして ERK1/2 の活性化を調べたため、それぞれの細胞で異なるシグナル経路を見ている可能性があるという説明があった。以上の説明を最終版の考察に追記した。
- 3) A $\beta$ 42、Arctic A $\beta$ 42 と CHRNA7、CHRNA7-N-terminal の免疫沈降における結果の解釈はどのようなものかという問いに対し、Arctic A $\beta$ 42 は wild-type A $\beta$ 42 より強く CHRNA7 と結合していたこと、及び結合能を比較する際に全てのバンドの強度をトータルで比較したという説明があった。さらに、CHRNA7 の N 末端は A $\beta$ 42 の dimer に結合しやすいが、full-length の CHRNA7 は A $\beta$ 42 の dimer に結合しにくい可能性がある。また A $\beta$ 42 はそれ自身が高い凝集能を持つことから、相互作用に見えるものが、A $\beta$ 42 の自己凝集によるものである可能性もあるとの説明があった。
- 4) Mock と CHRNA7 過剰発現の ERK1/2 活性において、何故、ニコチン添加なしのリン酸化 ERK1/2 強度が違うのかという問いに対し、Western Blot

後のバンド検出時間（露光時間）が異なるためであるとの説明があった。

- 5) 先行研究でのモデルマウスにおける CHRNA7 とアルツハイマー症状の関連性について異なる見解がある理由は何かという問いに対し、それぞれのグループが実験に使用したマウスの年齢が異なることが理由である可能性があるとの説明した。これに対し、マウスの年齢と A $\beta$  の凝集体形式が表現型に関連し、若いマウスでは soluble A $\beta$  がシナプスに影響し、高齢のマウスでは insoluble の A $\beta$  凝集体による影響が起こった結果となり、これが異なる見解がある可能性の一つとして考えられるのではないかという指摘があり、最終版の考察に追記した。
- 6) 他の変異型 A $\beta$  は CHRNA7 と結合しないが、Arctic A $\beta$  だけが CHRNA7 と高い親和性で結合している理由は何故なのかという問いに対し、変異したアミノ酸の性質によって A $\beta$  の構造が変わり、CHRNA7 との相互作用に影響を及ぼす可能性があるとの説明があった。
- 7) A $\beta$  凝集において環境因子が重要であることを論文に記載しているが、具体的にどういうことなのかという問いに対し、*in vitro* での凝集を調べた先行研究から、金属イオンや脂質を A $\beta$  と同時に溶液に入れると A $\beta$  の凝集が促進するということが知られており、これらの因子が A $\beta$  の凝集に影響する環境因子であるとの説明があり、これらの内容を最終版の考察に追記した。

以上の研究内容の説明と質疑応答を通して、申請者が研究の意義と目的を理解し、本学問領域において十分な学識と考察力を備えていると判断した。また、公聴会後に提出された修正論文は、公聴会における審査員からの指摘を踏まえて十分な加筆・修正がなされていることを確認した。本研究成果は Arctic 変異型家族性アルツハイマー病の分子メカニズムを明らかにした初めての報告であり、神経化学、分子生物学及び他の学術領域に対する波及効果も大きいと期待される研究成果であるため、主査及び副査は博士（理学）の学位論文として相応しいと判断した。

2017年2月

審査員

(主査)	早稲田大学教授	博士（理学）早稲田大学	朝日 透
	早稲田大学教授	医学博士 山梨医科大学	大島 登志男
	早稲田大学教授	理学博士 東京大学	仙波 憲太郎
	早稲田大学主任研究員 (早稲田大学大学院准教授)	博士（医学）東京大学	澤村 直哉