

Title	Identification of essential amino acids in Humanin, a neuroprotective factor against Alzheimer's disease-relevant insults.
Sub Title	アルツハイマー病関連侵害刺激による神経細胞死を抑制するHumaninにおける必須なアミノ酸の同定
Author	山岸, 洋一
Publisher	慶應医学会
Publication year	2004
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.81, No.1 (2004. 3) ,p.7-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20040302-0007

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Identification of essential amino acids in Humanin, a neuroprotective factor against Alzheimer's disease-relevant insults.

(アルツハイマー病関連侵害刺激による神経細胞死を抑制するHumaninにおける必須なアミノ酸の同定)

山 岸 洋 一

内容の要旨

Humanin (HN) は24アミノ酸残基からなる分泌ペプチドで、全種類の家族性アルツハイマー病原因遺伝子、抗アミロイド前駆体蛋白質 (APP) 抗体および細胞障害性Aβペプチドによる神経細胞死を抑制する。私達はこれまでにLeu9をArgに置換すると細胞外へ分泌されなくなることを明らかにした。今回、私達はHNの分泌および神経細胞死抑制活性における構造上の必要条件を完全長のHNを用いて調べた。N末にHNを融合したEGFP (HN-EGFP) を細胞内に発現させるとEGFPあるいはHNの一部が欠如したHN-EGFPとして細胞外に分泌された。一方、EGFPおよび(L9R) HN-EGFPは分泌されなかった。したがって、HNは一次構造依存的にC末に融合させたEGFPを分泌させることがわかった。これらのことは、C端側に結合したEGFP程度に大きな分子に対し、N端側のHN配列はシグナルペプチドとして機能することを示し、他方、C端側に結合した分子がFLAG程度に小さい場合は、HN配列をN端側に持つ分子の全長が切断されずに分泌されるということを示している。すなわち、HNは、C端側に結合する分子によって、シグナルペプチドとして機能したり、HN自身を分泌させる機能を発揮したりする。後者の場合が起こるのは、C端側に結合する分子がないか、FLAG程度に小さい場合と考えられる。

次に、このようにして明らかとなったHN自身の分泌に及ぼす各アミノ酸残基の役割を明らかにするために、HNの各残基を置換した変異体の分泌能を調査した。HNの各アミノ酸をAlaに置換してもHN自身の分泌には影響をおよぼさなかった。Arg置換したHN変異体のうち、L9R、L10R、L11R、P19RおよびV20R変異体は分泌されなかった。これらの結果から、2つのドメイン、すなわちLeu9-Leu11およびPro19-Val20がHN自身の分泌において重要であることがわかった。さらに、これらのアミノ酸のうち、Leu9およびLeu11をAspに置換したHN変異体は分泌されたが、Leu10をAspに置換したHN変異体は分泌されなかった。したがって、Leu10はHN自身の分泌において中心的な役割を担っていると考えられた。次に、Ala-scanningしたHNを利用して、完全長HNの神経細胞死抑制活性における構造活性相関を調べた。その結果、P3A、S7A、C8A、L9A、L12A、T13A、S14AおよびP19A変異体はV642I APPによって誘導される細胞死を抑制できなかった。したがって、Pro3、Ser7、Cys8、Leu9、Leu12、Thr13、Ser14およびPro19はHNの神経細胞死抑制活性に重要であることが明らかとなった。さらに、S7A、および、L9A変異体は2量体化できなかったことから、Ser7、および、Leu9はHNの2量体化に重要であることが明らかとなった。また、細胞死抑制活性はあるが2量体化できない変異体は存在しなかった。

以上のことから、HNはシグナルペプチド様の活性があり、この活性にはドメインLeu9-Leu11が重要で、特にLeu10が中心的な役割を担っていることが示された。さらに、HNの2量体化はHNが神経細胞死抑制活性を発現する上で必須な過程であることが示唆された。また、Leu9は分泌、2量体化および神経細胞死抑制活性に重要であることが明らかとなった。

論文審査の要旨

Humanin (HN) は24アミノ酸残基からなる分泌性のポリペプチドで、その遺伝子を細胞に導入すると細胞から分泌され細胞外から作用し、Aβをはじめとするアルツハイマー病に関連する全ての因子が誘導する細胞死に特異的に拮抗する事が知られている。本研究では、HNの特徴を明らかにするために、分泌および神経細胞死抑制活性における構造上の必要条件を完全長のHNを用いて調べた。その結果、1) HNにはシグナルペプチド様の活性があり、この活性にはドメインLeu9-Leu11とドメインPro19、Val20の2つのドメインが重要であり、特にLeu10が中心的な役割を担っていること、2) HNの神経細胞死抑制活性には2量体化が必須であること、3) Leu9は分泌、2量体化および細胞死抑制活性に重要であることが明らかにされた。

審査では、まずHNに関する研究における本研究の位置づけについて質問がなされた。アルツハイマー病の根治療法を確立することを目的に、HNの作用機序の解明とともに早期の臨床応用を実現すべく、より安定で活性の高いHN誘導体の探索を行っており、その一環として本研究が行われ、また、臨床で応用されるためには様々な薬理試験、安全性試験など検討すべき点は多い、HNの生体内での生理的な存在意義についても検討する必要があるとその為の基礎的な研究としての意義があるとの回答がなされた。次に、神経細胞死抑制活性について、細胞に導入された神経細胞死誘導因子の発現は細胞集団としては確認しているが、その細胞と生存している細胞が同一の細胞であることを確認すべきであったとの指摘がなされた。さらに、HNの2量体形成の様式について、Ser7-Leu12における各アミノ酸の役割の推察とその解析方法についての助言があった。また、生体におけるHNの遺伝子発現の調節機構について質問があり、今後の検討課題であると回答された。最後に、分泌に関する結果で、複数のバンドが観察された理由を質問され、HN-EGFPにおけるEGFPの検出は使用した抗体の特性によるものである、また、HN-FLAGにおけるFLAGの検出はHNの凝集しやすいという物性を反映している可能性が考えられるが、詳細は不明であるとの回答された。

以上のように、本研究には今後の課題が残されてはいるものの、HNの様々な機能におけるアミノ酸の必要条件が明らかにされたことは、HNの活性や代謝の機構を明らかとすることにつながるものであるのみならず、臨床において最も有効なHN誘導体を開発するための重要な知見となり得るものであると考えられた点で、有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 解剖学 相磯 貞和
解剖学 仲嶋 一範 生理学 岡野 栄之
外科学 河瀬 斌
学力確認担当者：
審査委員長：仲嶋 一範

試問日：平成15年12月1日