



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1979号
学位記番号	第1390号
氏名	高原
授与年月日	令和5年9月25日
学位論文の題名	Presenilin 1 deficiency impairs A β 42-to-A β 40- and angiotensin-converting activities of ACE (プレセニリン1欠損がACEのA β 変換活性に及ぼす影響) Front Aging Neurosci. 2023; 15:1098034. doi: 10.3389/fnagi.2023.1098034.
論文審査担当者	主査： 齊藤 貴志 副査： 松川 則之, 飛田 秀樹

論文内容の要旨

Alzheimer's disease (AD) is associated with amyloid β -protein 1-42 ($A\beta_{42}$) accumulation in the brain. $A\beta_{42}$ and $A\beta_{40}$ are the major two species generated from amyloid precursor protein. We found that angiotensin-converting enzyme (ACE) converts neurotoxic $A\beta_{42}$ to neuroprotective $A\beta_{40}$ in an ACE domain- and glycosylation-dependent manner. Presenilin 1 (PS1) mutations account for most of cases of familial AD and lead to an increased $A\beta_{42}/40$ ratio. However, the mechanism by which *PSEN1* mutations induce a higher $A\beta_{42}/40$ ratio is unclear.

In the present study, we over expressed human ACE in mouse wild-type and PS1-deficient fibroblasts. The purified ACE protein was used to analysis the $A\beta_{42}$ -to- $A\beta_{40}$ - and angiotensin-converting activities. The distribution of ACE was determined by Immunofluorescence staining.

To determine whether PS1 regulates ACE maturation and its $A\beta_{42}$ -to- $A\beta_{40}$ -converting activity, we purified three different recombinant ACE proteins from WT and PS1-KO fibroblasts. The molecular weight of F-ACE and N-ACE from PS1-KO fibroblasts was slightly lower than that of the proteins from WT fibroblasts, suggesting that PS1 deficiency affects the maturation or glycosylation of F-ACE and N-ACE. To determine whether PS1 deficiency affects the $A\beta_{42}$ -to- $A\beta_{40}$ -converting activity of ACE, we incubated purified ACE proteins from WT or PS1-KO fibroblasts with $A\beta_{42}$ and examined the generation of $A\beta_{40}$ using anti- $A\beta_{40}$ and anti- $A\beta_{42}$ antibodies. As reported in our previous study, only the F-ACE and N-ACE domains exhibited $A\beta_{42}$ -to- $A\beta_{40}$ -converting activity. Interestingly, F-ACE and N-ACE purified from PS1-KO cells showed significantly lower $A\beta_{42}$ -to- $A\beta_{40}$ -converting activity compared to the domains purified from WT cells. These results suggest that PS1 deficiency affects the maturation/glycosylation of ACE and reduces the $A\beta_{42}$ -to- $A\beta_{40}$ -converting activity of F-ACE and N-ACE. We also examined the angiotensin-converting activity of F-ACE, N-ACE, and C-ACE purified from WT and PS1-KO fibroblasts. Surprisingly, the angiotensin-converting activity of F-ACE and C-ACE purified from PS1-KO cells was completely abolished. These results suggest that PS1 is essential for the angiotensin-converting activity ACE.

To determine whether *PSEN* mutations affect the $A\beta_{42}$ -to- $A\beta_{40}$ -converting activity of ACE, we transfected PS1WT, PS1L166P, PS1 Δ E9, or PS1G384A into PS1-KO fibroblasts. We then transfected F-ACE, N-ACE, or C-ACE into these fibroblasts and purified the ACE proteins from the respective transfectants. We then examined the $A\beta_{42}$ -to- $A\beta_{40}$ -converting activity of the ACE proteins by incubating them in the presence of $A\beta_{42}$. Interestingly, PS1WT and PS1 Δ E9 restored the $A\beta_{42}$ -to- $A\beta_{40}$ -converting activity of both F-ACE and N-ACE to levels similar to those of F-ACE and N-ACE from WT fibroblasts. However, PS1L166P and PS1G384A did not restore the $A\beta_{42}$ -to- $A\beta_{40}$ -converting activity of F-ACE and N-ACE compared with PS1WT. These results suggest that some *PSEN1* mutations increase the $A\beta_{42}/40$ ratio by reducing the $A\beta_{42}$ -to- $A\beta_{40}$ -converting activity of ACE. We also examined the angiotensin-converting activity of F-ACE, N-ACE, and C-ACE proteins purified from PS1-KO fibroblasts transfected with PS1WT, PS1L166P, PS1 Δ E9, or PS1G384A. In contrast to the $A\beta_{42}$ -to- $A\beta_{40}$ -converting activity, all of the PS1WT and PS1 mutants of F-ACE and C-ACE proteins exhibited angiotensin-converting activity. These results suggest that PS1 is essential for the angiotensin-converting activity of ACE and that FAD-linked PS1 mutants do not affect the angiotensin-converting activity.

To gain mechanistic insights into the decreased A β 42-to-A β 40- and angiotensin-converting activities of ACE protein in PS1-KO fibroblasts, we investigated whether the Golgi apparatus distribution of ACE changed in the cells. We found that the localization of F-ACE protein in Golgi apparatus decreased in PS1-KO fibroblasts. Transfection of PS1WT, PS Δ E9 and PS1G384A into PS1-KO fibroblasts restored the distribution of F-ACE in Golgi apparatus, however, PS1L166P did not restore the Golgi apparatus distribution of F-ACE. These results suggest that reduced distribution of ACE in Golgi apparatus can decrease ACE maturation and impair its activities.

To examine which glycosylation is necessary for A β 42-to-A β 40- and angiotensin-converting activities, F-ACE, N-ACE, and C-ACE were incubated with N-glycanase, O-glycanase, or sialidase A. We then incubated A β 42 with the de-glycosylated F-ACE and N-ACE proteins. After de-glycosylation by N-glycanase, O-glycanase, or sialidase A, neither F-ACE nor N-ACE exhibited A β 42-to-A β 40-converting activity. Similarly, the angiotensin-converting activity of F-ACE and C-ACE was also abolished by treatment with N-glycanase, O-glycanase, or sialidase A.

To determine whether changes in brain A β 42-to-A β 40-converting activity are development dependent, we incubated cortex lysate from 17-day-old embryos or 3-month-old mice with synthetic A β 42. The level of A β 40 converted from A β 42 in adult cortex was lower than that in embryonic cortex, indicating that embryonic cortex has higher A β 42-to-A β 40-converting activity than adult cortex. However, there was no difference in angiotensin-converting activity between the cortex lysates from 17-day-old embryos and 3-month-old mice. Interestingly, ACE protein in adult cortex showed two bands on Western blotting, whereas a single band corresponding to the upper band of ACE in adult brain was observed in the embryonic cortex. After de-glycosylation with N-glycanase, the molecular weight of both adult and embryonic brain ACE decreased to a single band of approximately 150 kDa, whereas O-glycanase did not significantly change the molecular weight of ACE. Notably, sialidase A slightly reduced the molecular weight of the upper band of ACE from adult brain and ACE from embryonic brain. These results suggest that the A β 42-to-A β 40-converting activity of ACE decreases with development in adult brain compared with embryonic brain and that glycosylation modulates the A β 42-to-A β 40-converting activity of ACE.

Collectively, our data indicate that deletion of PS1 results in a significant decrease in both the A β 42-to-A β 40-converting activity and angiotensin-converting activity of ACE. Moreover, some FAD-linked PSEN1 mutations were shown to impair the A β 42-to-A β 40-converting activity of ACE. Our results suggest that the increase in the A β 42/40 ratio associated with FAD-linked *PSEN1* mutations results from not only altered γ -secretase cleavage but also the decrease in the A β 42-to-A β 40-converting activity of ACE. In addition, the presence of the ACE I allele with decreased serum and tissue ACE levels appears to be strongly associated with AD onset. Thus, approaches that maintain or enhance the A β 42-to-A β 40-converting activity of ACE will be useful for reducing the A β 42/40 ratio and preventing the onset of AD. Taken together, our results suggest that enhancing PS-mediated trafficking and maturation of ACE may decrease A β 42/40 ratio and can be used as a strategy for developing novel therapeutic regimens for AD patients.

論文審査の結果の要旨

【背景・目的】 アルツハイマー病(AD)の発症を引き起こす原因分子はアミロイド β タンパク($A\beta$)であると理解されており、脳内 $A\beta$ レベルが上昇し $A\beta$ 沈着による老人斑の形成および $A\beta$ 増加に起因する神経細胞死がADの病態の基盤にあると考えられている(アミロイドカスケード仮説)。 $A\beta$ 産生を担うのは、アミロイド前駆体タンパク質(APP)から2か所の切断(β 切断、 γ 切断)によって $A\beta$ を切り出す β セクレターゼならびに γ セクレターゼである。家族性アルツハイマー病(FAD)患者の解析より γ セクレターゼの活性中心分子であるプレセニリン(PS)遺伝子の変異がこれまでに報告された。これらのPS1の遺伝子変異を導入した細胞では、 $A\beta 42$ あるいは $A\beta 42/A\beta 40$ 比の上昇が確認されている。 $A\beta 42$ は凝集性が強い分子であり神経毒性が強いことが知られていることから、 $A\beta 42$ あるいは $A\beta 42/A\beta 40$ 比の上昇がPS1の遺伝子変異によるFADの発症機序に深く関わっていると考えられる。

一方、単体で存在しうる $A\beta 40$ は遷移金属をキレートして活性酸素の発生を抑制し、活性酸素による神経細胞死を抑制する。また、単体 $A\beta 40$ は $A\beta 42$ と結合することにより、 $A\beta 42$ の β -sheet形成を阻害し、 $A\beta 42$ の重合体形成・線維化を抑制する。アンギオテンシン変換酵素(ACE)は、毒性の $A\beta 42$ を保護作用のもつ $A\beta 40$ に変換し、 $A\beta 42/A\beta 40$ 比を低下させる。以上のことから、PS1遺伝子変異が誘導する $A\beta 42/A\beta 40$ 比の上昇メカニズムには、ACEが関与する可能性を示している。本研究は、PS1欠損およびPS1変異がACE $A\beta$ 変換活性およびアンギオテンシン変換活性に与える影響を検討した。

【方法】 N末端活性ドメインとC末端活性ドメイン両方をもつF-ACE、N末端活性ドメインだけをもつN-ACEおよびC末端活性ドメインだけをもつC-ACEのHis-tag組み換えDNAを野生型とPS1欠損マウス胎児線維芽細胞に導入し、各種ACEタンパクを精製した。精製ACEタンパクと合成 $A\beta 42$ と混合し、 $A\beta$ 変換活性をWestern blot法で、ACEのアンギオテンシン変換活性を蛍光ACE活性キットでそれぞれ評価した。さらに、PS1欠損細胞に野生型PS1、あるいはFAD由来の変異型PS1を導入した後、同様の方法でACEタンパクを精製し、それぞれの活性を評価した。

【結果】 PS1欠損細胞から精製したACEは、 $A\beta 42$ から $A\beta 40$ への変換活性が野生型に比べて有意に低下していた。また、PS1欠損細胞由来のACEは、アンギオテンシン変換活性が完全に消失した。PS1欠損細胞に野生型PS1を遺伝子導入すると $A\beta 42$ から $A\beta 40$ への変換活性ならびにACE活性(アンギオテンシン変換活性)が完全に回復した。PS1欠損細胞に変異型PS1を導入すると、アンギオテンシン変換活性は完全回復を示したが、 $A\beta 42$ から $A\beta 40$ への変換活性の回復は不完全であった。また、マウスの大脳皮質の抽出物を用いた実験では、成体の $A\beta 42$ から $A\beta 40$ への変換活性は胎児と比較して低かった。興味深いことに、成体マウスの大脳皮質のACEの糖鎖修飾は、胎児脳と異なっていた。これらの結果は、PS遺伝子変異による $A\beta 42/A\beta 40$ 比の増加のメカニズムとして、 $A\beta$ 産生変化の他にACEの $A\beta 42$ から $A\beta 40$ への変換活性低下があると考えられる。

【考察】 本研究は、PS1欠損細胞から精製したACEの $A\beta 42$ から $A\beta 40$ への変換活性およびアンギオテンシン変換活性が野生型細胞のACEよりも顕著に低下していることを示した。一部のFAD関連PS1変異は、ACEの $A\beta 42$ から $A\beta 40$ への変換活性を低下させることも示した。これらの結果は、PS1変異が $A\beta$ 産生異常に加え、ACEの $A\beta 42$ から $A\beta 40$ への変換活性にも深く関わっていることを示唆した。本研究は、FAD発症の原因遺伝子PS1が血圧調節酵素であるACEの $A\beta$ 変換活性と深く関連することを示し、新たなFAD発症機序の解明と $A\beta 42/A\beta 40$ 比を低下させる治

療法開発に寄与すると考えられる。

【審査内容】はじめに英語で約 25 分のプレゼンテーションがあったのち、主査の斉藤、第一副査の松川教授、第二副査の飛田教授との間で質疑応答が約 35 分間行われた。斉藤からは、①脳内で ACE を発現する細胞と A β 変換を行う部位について、②ACE の糖鎖修飾部位について、③ACE の精製方法と純度について、④PS1 による ACE を含む他のタンパクの糖鎖修飾のメカニズムについて、⑤PS1 欠損マウスの血圧について、など 8 つの質問を行った。また第一副査の松川教授からは、①AD の臨床症状や診断について、②アミロイド仮説以外の AD の発症仮説について、③PS1 欠損細胞内の ACE 局在について、④O-glycanase および sialidase A が ACE の活性を阻害する理由について、など 5 つの質問があった。第二副査の飛田教授からは、①his-tag タンパクの作成と精製方法について、②アンギオテンシン変換活性の測定原理について、③ACE 遺伝子導入後線維芽細胞の増殖について、④PS1 L166 変異遺伝子の導入が ACE のゴルジ体局在を回復させなかった理由について、など 8 つの質問があった。これらの質問に対して、一部回答に窮することもあったが概ね満足できる返答をし、研究内容ならびにその背景等を十分に理解していると判断できた。よって、FAD と ACE の A β 42 から A β 40 への変換活性に関する新しい知見を報告している本論文の筆頭著者は博士（医学）の学位を授与するに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 斉藤 貴志 副査 松川 則之、 飛田 秀樹