

平成 30 年 5 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14690

研究課題名(和文)大規模シーケンスを用いたApoE4とX11Lによるアルツハイマー病発症機構の解明

研究課題名(英文)Understanding for Alzheimer's disease pathogenesis involved in ApoE4 and X11L genes by large scale of expression analysis of genes

研究代表者

鈴木 利治 (SUZUKI, Toshiharu)

北海道大学・薬学研究院・教授

研究者番号：80179233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ApoE4はアルツハイマー病(AD)の発症危険因子として知られている。近年の研究から、ApoE4キャリアのAD患者では遺伝子発現の変化が認められ、その制御因子として我々が以前に同定したX11Lが報告された。本研究では、ApoE4-KI/X11L-KO等の遺伝子改変マウスの遺伝子発現解析を網羅的に行い、AD発症に寄与する遺伝子の下流に共通して見出される核内受容体FXR結合モチーフを見いだした。X11LがApoEの発現を制御している事を見だし、その下流でFXRにより発現が制御される遺伝子がAD発症に関わる可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：ApoE4 is largest risk factor of Alzheimer's disease (AD) except for aging. Recent researches report a alternative gene expression in AD subjects of ApoE4 carriers compared to non-carriers. One of strong candidate to regulate ApoE gene expression is X11L gene that we identified previously. In this research using ApoE4-KI/X11L-KO mice, we analyzed gene-expression profiles, and we identified FXR-binding motif on genes involving in AD onset. Furthermore, we found that X11L regulates ApoE gene expression, which further regulates genes possessing FXR-binding motif, some of them may involve the pathogenesis of AD.

研究分野：神経生化学

キーワード：アルツハイマー病 アポリポタンパク質 遺伝子発現制御

1. 研究開始当初の背景

AD は老化に伴う進行性の神経変性疾患であり、高齢化社会における患者数の増大が社会的な問題となっている。このため、AD 発症メカニズムの解明とそれに基づく根本治療法の開発が求められている。これまでの研究から、AD 発症の分子機構は進展してきたが、未だ根治的治療法は開発されていない。AD の原因因子として知られるアミロイド前駆体タンパク質 (Amyloid β ($A\beta$)-protein precursor, APP) は、神経毒性を示す $A\beta$ 配列を含み、APP 代謝の変化が AD 発症に深く関わっている。研究代表者は、APP 代謝を制御する細胞内タンパク質 X11L を世界に先駆けて単離・同定してきた (*J. Biol. Chem.* [1999] 274, 2243)、X11L 遺伝子ノックアウトマウスを用いた解析から、X11L が脳内 APP 代謝の主要な制御因子であることを実証してきた (*J. Biol. Chem.* [2006] 281, 37853; *J. Biol. Chem.* [2008] 283, 35763; *Mol. Neurodegener.* [2010] 5, 35)。

一方、疫学調査から AD 発症危険因子として、アポリポタンパク質 E (ApoE) が同定され、3 種のアイソフォーム ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$) の中、 $\epsilon 4$ (ApoE4) キャリアの人は AD 発症頻度が飛躍的に増加することが知られていた。しかしながら、AD 発症に関わる ApoE4 の分子機構は明らかにされていない。

近年、ApoE が遺伝子発現を制御することが大規模な遺伝子発現解析から明らかとされ、ApoE の下流分子として X11L が同定された (*Nature* [2013] 500, 45)。同報告は後に取り下げられたものの、著者らは遺伝子発現解析には問題が無いことを表明しており (*Nature* [2015] 523, 626)、解析の正しさも他の研究室で検証された (<http://www.alzforum.org/news/research-news/apoe4-paper-retracted-nature>)。従って、ApoE の機能の一つとして遺伝子発現の制御があり、X11L によってその発現が制御されていること、及びその発現変化が AD 発症に密接に関与していることが考えられた。

2. 研究の目的

AD 発症に関わる、X11L を介した ApoE による遺伝子発現機構の存在は示唆されたが、その下流遺伝子群等の詳細は明らかとされていない。本申請研究では、研究室に既存の X11L-KO マウス及び、ヒト型 ApoE4 (および ApoE3) を発現するマウスを用いて、発現遺伝子を野生型等と網羅的に比較することで同機構により制御を受ける遺伝子群を明らかにすると共に、同機構の破綻によって生じる AD 発症に関わる分子メカニズムの解明に取り組んだ。

3. 研究の方法

(1) RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析

①シーケンシング

ApoE4 及び X11L が関与する発現遺伝子を同

定するため、以下に示すマウスを用いた。野生型 (WT)、X11L ノックアウト (KO)、ApoE3 ノックイン (E3)、ApoE4 ノックイン (E4)、ApoE3 ノックイン/X11L ノックアウト (E3KO)、ApoE4 ノックイン/X11L ノックアウト (E4KO) 各マウス生後 7 日目の♀2 匹づつから全脳を摘出し、Trizol (Thermo) を用いて total RNA を抽出した。得られた RNA を用いた品質検査、ライブラリ作成及びシーケンシングは北海道システムサイエンス社に委託した。シーケンスは illumina 社 HiSeq により、101nt、paired-end で行い、1 サンプル辺り 4~5Gb のデータを得た。

②シーケンスデータの解析

得られたリードを tophat2 を用いて、マウスゲノムにマッピングした。マッピング結果を用いて、HTseq-count により各遺伝子発現量のカウントデータを得た後、edgeR を用いて発現変動遺伝子を抽出した。WT と KO、E3 と E3KO では発現変動せず、E4 と E4KO で発現変動が認められた遺伝子群を目的候補遺伝子群とした。また、本項目及び以下の項目において、Gene Ontology 解析は GOrilla (<http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il/>) を用いて行った。

③RT-PCR によるデータ検証

得られた遺伝子群の妥当性を評価するため、ランダムに 8 遺伝子を抽出し、その発現を RT-PCR により検証した。

(2) ApoE4 と X11L により発現制御される遺伝子群の同定

①ヒト脳組織における遺伝子発現データの解析と ApoE4 及び X11L が関与するアルツハイマー病関連遺伝子の単離

NCBI GEO GSE15222 からマイクロアレイ解析データをダウンロードし、ApoE のアイソフォーム別に発現変動を解析し、E4 特異的且つ遅発性アルツハイマー病患者特異的な遺伝子群を得た。更に、(1) -②で得られた遺伝子群と共通する遺伝子群を単離した。

②目的遺伝子群のプロモーター解析

得られた遺伝子群のプロモーターに特徴的に認められる DNA モチーフの探索を Homer (<http://homer.ucsd.edu/homer/>) を用いて行った。検索範囲は転写開始点の上流 1kb、下流 100b である。

(3) ApoE 及び X11L 発現細胞の樹立

①遺伝子発現用レンチウイルスコンストラクトの作成

ヒト ApoE3、ApoE4、X11L、及び FXR の cDNA を pEN ベクターに組み込み、更に pSLIK ベクターにリコンビナーゼを用いて導入した。得られたベクターと psPAX2、pMD2G を HEK293T 細胞に導入し、培養上清を濃縮してウイルス溶液を得た。

②マウス ES 細胞由来神経細胞を用いた上記コンストラクトの発現細胞作成

マウス ES 細胞を定法により神経細胞に分化させ、ウイルスを感染させた後、1 μ g/mL ドキシンサイクリンによる発現誘導を行った。各

遺伝子の発現は、免疫染色及び western blot 法により検証した。

4. 研究成果

(1) マウス脳を用いた RNA-seq 解析

ApoE 及び X11L が最も高い発現を示すマウス齢を検証した結果、生後 7 日目であることを western blot により明らかとした(図 1)。

RNA-seq で得られたリードをゲノムにマッピングした結果、約 80~90%のリードがゲノム上にマッピングされた(表 1)。

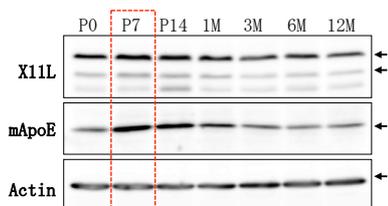


図1. X11L及びApoEの各齢における発現。赤枠で示す生後7日目の脳において ApoE、X11Lの発現が最も高いことが分かった。

	Mapped reads	% of mapped
WT	36,285,162	81.1
	35,188,726	79.6
KO	38,989,386	81.8
	38,363,234	81.3
E3	41,199,292	87.6
	41,005,027	87.6
E4	39,061,624	87.9
	38,590,556	87.9
E3KO	40,763,111	88.1
	40,165,976	87.7
E4KO	41,667,000	88
	41,102,742	87.7

表1. RNA-seqにより得られた解析リード数、及び元のリード数に対する割合。

更に、遺伝子発現解析の為、各サンプルから各遺伝子の発現量を測定し、以下の組み合わせにおける発現変動遺伝子の単離を行った。

WT vs KO, E3 vs E3KO, E4 vs E4KO

本研究では、ApoE4 が特異的に発現変動させ、且つ X11L がその変動を修飾する遺伝子を探るため、WT vs KO, E3 vs E3KO で変化が認められず、E4 vs E4KO のみで発現変動する遺伝子を抽出した。その結果、1,628 の候補下流遺伝子を得た。RT-PCR による検証実験から、得られたデータが妥当であると考えられた(図 2)。これら遺伝子群の GO 解析を行ったところ、グリア細胞、及びタンパク質輸送に関わる遺伝子群が濃縮されていることが分かった。

(2) ヒト脳組織から得られたデータ解析

GSE15222 のデータを用い、健常者で ApoE4 特異的に発現変動する遺伝子群、及び、ApoE3 のみを有する健常者とアルツハイマー病発症者で発現変動する遺伝子群を単離し、共通

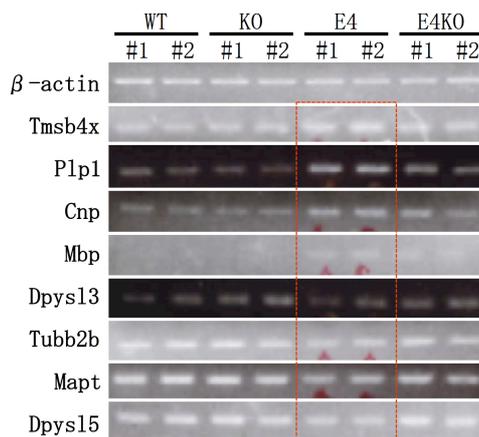


図2. RT-PCRによるデータ検証。RNA-seqと整合性を持つ、E4でのみ高い変動(赤枠)が確認できた。

の遺伝子群を探索した。その結果、204 遺伝子を得た。GO 解析を行ったところ、ミトコンドリア機能に関わる遺伝子群が濃縮されていることが明らかとなった。

(3) (1) と (2) で共通の遺伝子群を遺伝子名から探索した。その結果、37 遺伝子を得た。

(4) 共通する転写因子結合配列の探索

上記 37 遺伝子の発現が ApoE4 及び X11L の存在、非存在によって変化していたことから、これら遺伝子に共通する転写因子の存在が考えられた。そこで、これら遺伝子のプロモーター配列の解析から、共通転写因子の同定を試みた。その結果、12 遺伝子において、核内受容体である Farnesoid X receptor (FXR) の結合配列を持つことが明らかとなった。FXR は肝臓及び小腸に高発現する分子であり、胆汁酸に応答して核内移行し、下流遺伝子の転写を制御することが知られている。特に肝臓では ApoE の発現を制御することが報告されている(*J. Lipid Res.* 2002 **43**, 2037-41)。脳組織における発現は極めて少ないながら、存在が確認されている(<http://www.informatics.jax.org/marker/MGI:1352464>)。

これらの解析から、ApoE4 と X11L は FXR を介して遺伝子発現に寄与することが考えられた。そこで、次にこれら分子が関与する分子経路を探索する為、細胞系の樹立を試みた。

(5) ヒト ApoE、X11L 及びマウス FXR の発現系樹立

ヒト ApoE2、ApoE3、ApoE4、X11L の cDNA を組み込んだレンチウイルス系を構築し、目的のウイルス溶液を得た。FXR の cDNA はマウス肝臓から抽出した total RNA から得て、同様のウイルス溶液を得た。今後これらを用いて細胞を用いた検証実験を進める予定としている。

(6) E3、E4、E3KO、E4KO マウス脳における ApoE 及び X11L の発現解析

これまでの結果から、ApoE4 及び X11L により発現制御を受ける遺伝子群の存在が示唆されたが、同分子経路における ApoE4 及び

X11L の機能関連性については明らかではなかった。そこで、これらを明らかにするため、E3、E4、E3KO、E4KO マウス脳における ApoE 及び X11L 発現を western blot 法により検証した。その結果、E3 と E4 マウスの比較により、ApoE4 の発現が ApoE3 よりも高いこと、また、X11L の KO により ApoE4 の発現量が増加することを見出した(図 3)。このことから、X11L は ApoE4 選択的にその発現を制御していることが示唆された。

以上の研究から、ApoE4、X11L 及び FXR によって発現制御される遺伝子群が存在し、アルツハイマー病発症に寄与する可能性が明らかとなった。今後本研究成果を基に、更に検証を重ねることで新規アルツハイマー病発症機構を明らかにしたい。

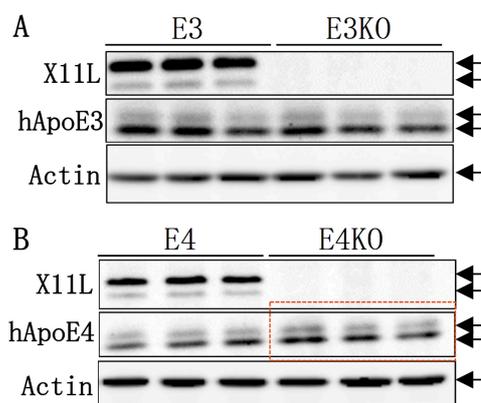


図3. Western blotを用いたX11L及びhApoEの発現検証。A. E3及びE3KO各3サンプルにおける検証。これらに発現変化は認められない。B. E4及びE4KO各3サンプルにおける発現検証。E4に比較して、E4KOでhApoE4の発現が増加していた(赤枠)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Cam M, Durieu E, Bodin M, Manousopoulou A, Vasylyeva N, Barnych B, Hammock BD, McMahan RL, Strynar MJ, Bohl B, Koch P, Omori C, Yamamoto K, Hata S, Suzuki T, Karg F, Gizzi P, Erakovic-Haber V, Mihaljevic VB, Tavcar B, Portelius E, Pannee J, Blennow K, Zetterberg H, Garbis SD, Gerber H, Fraering J, Fraering PC, Meijer L. (2018) Induction of amyloid- β 42 production by fipronil and other pyrazole insecticides. *J. Alzheimers. Dis.* 62, 1663-1681. 査読有り doi: 10.3233/JAD-170875.
- ② Chiba K, Chien K-Y, Sobu Y, Hata S, Shun Kato, Tadashi Nakaya, Okada Y, Nairn AC, Kinjyo M, Taru H, Wang R, Suzuki T. (2017) Phosphorylation of KLC1 modifies

interaction with JIP1 and abolishes the enhanced fast velocity of APP transport by kinesin-1. *Mol. Biol. Cell* 28, 3857-3869. 査読有り doi:10.1091/mbc.E17-05-0303

- ③ Sobu Y, Furukori K, Chiba K, Nairn AC, Kinjyo M, Hata S, Suzuki T. (2017) Phosphorylation of multiple sites within an acidic region of Alcadein α is required for kinesin-1 association and Golgi exit of Alcadein α cargo. *Mol. Biol. Cell* 28, 3844-3856. 査読有り doi:10.1091/mbc.E17-05-0301
- ④ Omori C, Motodate R, Shiraki Y, Chiba K, Sobu Y, Kimura A, Nakaya T, Kondo H, Kurumiya S, Tanaka T, Yamamoto K, Nakajima M, Suzuki T, Hata S. (2017) Facilitation of brain mitochondrial activity by 5-aminolevulinic acid in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nutr. Neurosci* 20, 538-546. 査読有り doi: 10.1080/1028415X.2016.1199114.
- ⑤ Kimura A, Hata S, Suzuki T. (2016) Alternative selection of β -site APP-cleaving enzyme 1 (BACE1) cleavage sites in amyloid β -protein precursor (APP) harboring protective and pathogenic mutations within the A β sequence. *J. Biol. Chem.* 291, 24041-24053 査読有り doi:10.1074/jbc.M116.744722
- ⑥ Connor SA, Ammendrup-Johnsen I, Chan AW, Kishimoto Y, Murayama C, Kurinbara N, Tada A, Ge Y, Yan R, LeDue JM, Matsumoto H, Kiyonari H, Kirino Y, Matsuzaki F, Suzuki T, Murphy TH, Wang YT, Yamamoto T, Craig AM. (2016) Altered Cortical Dynamics and Cognitive Function upon Haploinsufficiency of the Autism Linked Excitatory Synaptic Suppressor MDGA2. *Neuron* 91,1052-1068. 査読有り doi: 10.1016/j.neuron.2016.08.016.
- ⑦ Portelius E, Durieu E, Bodin M, Cam M, Pannee J, Leuxe C, Mabondzo A, Oumata N, Galons H, Lee J-Y, Chang Y-T, Stuber K, Koch P, Fontanine G, Potier M, Manousopoulou A, Garbis S, Covaci A, VanDam D, De Deyn P, Karg F, Flajolet M, Omori C, Hata S, Suzuki T, Blennow K, Zetterberg H, Meijer L. (2016) Specific triazine herbicides induce amyloid β 42 production. *J. Alzheimers. Dis.* 54, 1593-1605. 査読有り doi:10.3233/JAD-160310
- ⑧ Motodate R, Saito Y, Hata S, Suzuki T. (2016) Expression and localization of X11 family proteins in neurons. *Brain Res.* 1646, 227-234. 査読有り doi: 10.1016/j.brainres.2016.05.054
- ⑨ Hata S, Kimura A, Shiraki Y, Suzuki T.

(2016) How APP gene mutation protects against Alzheimer's disease? *Trends in Cell & Molecular Biology* 11, 67-75. 査読有り ISSN: 0972-8449.

[学会発表] (計 19 件)

- ① Kato S, Chiba K, Sobu Y, Chien K-y, Wang R, Nairn AC, Kinjo M, Hata S, Suzuki T. Enhanced fast velocity of APP transport by kinesin-1 is regulated by KLC1 phosphorylation. ASCB/EMBO 2017 meeting. 2017.
- ② Sobu Y, Nairn AC, Kinjo M, Hata S, Suzuki T. Phosphorylation of multiple sites of Alcadin α is required for kinesin-1 association and Golgi exit of Alcadin α . ASCB/EMBO 2017 meeting. 2017.
- ③ Omori C, Waragai M, Suzuki T, Yamamoto K. A novel biomarker p3-Alc α , peptides produced by γ -secretase cleavage, altered in Alzheimer's patients. Alzheimer's Association International Conference 2017. 2017.
- ④ Hata S, Kimura Y, Waragai M, Ikeuchi T, Martins RN, Kimura N, Nishimura M, Suzuki T. Level of p3-Alc β peptides alter in CSF of Alzheimer's patients. Alzheimer's Association International Conference 2017. 2017.
- ⑤ Saitoh H, Omori C, Kimura Y, Waragai M, Maeda M, Hata S, Suzuki T. Protective property of p3-Alc β against a neurotoxicity induced by A β oligomer. Alzheimer's Association International Conference 2017. 2017.
- ⑥ Suzuki T, Chiba K, Shiraki Y, Sobu Y, Hata S. Regulation and function of APP as a cargo receptor of kinesin-1 in neuron. Alzheimer's Association International Conference 2017. 2017.
- ⑦ Toyoda M, Nakaya T, Michikawa M, Suzuki T. Identification of ApoE4-X11L Regulated Down Stream Genes Related to the Late-Onset AD. Alzheimer's Association International Conference 2017. 2017.
- ⑧ Suzuki T. Function of Alcadin in neurons and the utilization of its γ -secretase product peptide p3-Alc in diagnosis and therapy of Alzheimer's disease. The 7th BRI International Symposium 2017. 2017. Invited Speaker.
- ⑨ Shiraki Y, Chiba K, Hata S, Suzuki T. Different cargo receptors, APP and Alc α , transport the same cargos cooperatively through the identical vesicular transport pathway. ASCB 2016. 2016.
- ⑩ Sobu Y, Hata S, Suzuki T. Multiple phosphorylations of Alcadin α

regulates interaction with kinesin-1. ASCB 2016. 2016.

- ⑪ Chiba K, Chien K-y, Davis R., Okada Y, Nairn AC, Kinjo M, Wang R, Suzuki T. Phosphorylation of KLC1 regulates the velocity of APP transport through JIP1 interaction. ASCB 2016. 2016.
- ⑫ Suzuki T, Kimura A, Hata S. Mechanism that BACE1 alternates the cleaving sites of human APP. Neuroscience 2016. 2016.
- ⑬ Sato T, Motodate R, Sano Y, Kamada S, Uchida S, Suzuki T. Adaptor protein, X11 and X11L have distinct roles in exploratory activity. Neuroscience 2016. 2016.
- ⑭ Motodate R, Saito Y, Suzuki T. X11 and X11L regulate the non-synaptic NMDA receptor localization. Neuroscience 2016. 2016.
- ⑮ Hu A, Piao Y, Hata S, Suzuki T. Aberrant micro-membrane localization of γ -secretase components by changes in cellular cholesterol level alters ϵ - and/or γ -cleavage of APP and Alcadin α . Alzheimer's Association International Conference 2016. 2016.
- ⑯ Omori C, Hata S, Waragai M, Yamamoto K, Suzuki T. Increase of p3-Alc α 38 to p3-Alc α 35, products of alcadin α by γ -secretase cleavage, in CSF of AD patients. Alzheimer's Association International Conference 2016. 2016.
- ⑰ Suzuki T, Kimura A, Hata S. Alternative cleavage mechanism of human BACE1. Alzheimer's Association International Conference 2016. 2016.
- ⑱ Chiba K, Araseki M, Nozawa K, Davis R, Kinjo M, Suzuki T. Enhanced fast axonal transport of APP mediated by JIP1 interaction. The 4th International Conference on Molecular Neurodegeneration. 2016.
- ⑲ Hata S, Piao Y, Nishimura M, Suzuki T. Alteration of membrane microlocalization and γ -secretase cleavages in sporadic Alzheimer's disease. The 4th International Conference on Molecular Neurodegeneration., 2016.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.pharm.hokudai.ac.jp/shinkei/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
鈴木 利治 (SUZUKI, Toshiharu)
北海道大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号：80179233

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者
()

研究者番号：

(4) 研究協力者
()