

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：32676

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18911

研究課題名(和文) 認知機能障害の発症機序におけるケトン体代謝異常の関与

研究課題名(英文) Participation of aberrant ketone body metabolism in pathogenic mechanism of cognitive dysfunction

研究代表者

長谷川 晋也 (Hasegawa, Shinya)

星薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：60386349

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ケトン体をコレステロールや脂肪酸合成に供給するアセトアセチルCoA合成酵素(AACS)が、アルツハイマー病患者の脳において活性化しているレグマイン(システインプロテアーゼ)によって切断され、その活性が調節されていることを示した。またAACSが、神経伝達物質の代謝や神経細胞の形態形成において重要な役割を果たしていることを明らかにした。以上の結果より、アルツハイマー病におけるAACSの活性変化がその発症機序に関わる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Acetoacetyl-CoA synthetase (AACS) is a ketone body-utilizing enzyme and is responsible for the synthesis of cholesterol and fatty acids. In this study, we showed that Asn547 is specific cleavage site of AACS by legumain, which is a lysosomal asparaginyl endopeptidase and is activated in the brain with Alzheimer's disease. The cleavage of AACS by legumain is critical for the regulation of enzymatic activity. Moreover, knockout of AACS caused a decrease in gene expression of dopamine-beta-hydroxylase; which catalyzes the conversion of dopamine to norepinephrine. These results suggest that AACS has an important role for neurotransmitter metabolism and neurogenesis. Taken together, changes of AACS activity may relate to pathogenic mechanism of Alzheimer's disease.

研究分野：衛生化学・分子生物学

キーワード：ケトン体 アセトアセチルCoA合成酵素 レグマイン 神経機能 神経伝達物質 ノルエピネフリン

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病を含む認知機能障害は高齢化が進む現代において克服すべき重要な課題である。しかし、認知機能障害は未だ原因が不明であり、その治療も対症療法を中心としている。近年、糖尿病と診断されていない血糖値が高めな状態においても認知症のリスクが増加することが報告された。また、脂質の運搬に関与するアポリポ蛋白質 E4 はアルツハイマー病の危険因子であり、弧発性を含めた患者全般でその発現が増加することがわかり、糖・脂質代謝異常が認知症の危険因子であることが明らかになってきた。

2. 研究の目的

糖尿病などのグルコースが利用できない状態においては、生命維持に重要な脳ではケトン体が代替エネルギーとして働く。このように、ケトン体は代替エネルギーと考えられてきたが、近年、ケトン体がコレステロールや脂肪酸合成に供給されること、そしてその反応をアセトアセチル CoA 合成酵素 (AACS) が触媒することが明らかになってきた。我々は、AACS が糖尿病モデル動物の脳で減少することや、初代培養神経細胞における AACS のノックダウンにより、神経マーカーである NeuN や MAP-2 が減少することを明らかにした。以上の結果から、AACS は高血糖時における記憶障害の発症に重要な役割を果たす可能性が考えられる。

そこで本研究では、AACS の神経機能における生理的意義、及びケトン体代謝異常と神経機能の関係を明らかにし、脳機能障害の予防及び治療に必要な知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 神経細胞における AACS の役割

神経芽細胞腫 Neuro-2a 細胞にレチノイン酸を処理し、神経突起伸長過程において、AACS に対する short-hairpin RNA (shAACS) をトランスフェクションした。48 時間後に RNA を抽出し、マイクロアレイ法及び real-time PCR 法により、変動する遺伝子を検討した。また、shAACS をレンチウイルスにより初代培養神経細胞に導入し、神経細胞の形態形成に関わる低分子量 G タンパク質の発現を Western blot 法により検討した。

(2) レグマインによる AACS の切断部位の同定

最近、我々は AACS がリソソームに存在する asparaginyl endopeptidase (レグマイン) によって分解されることを明らかにした。レグマインはアルツハイマー病患者の脳で、活性が増加することが明らかになっている。そこで、AACS に点変異を導入し、レグマインによる切断部位を検討した。

(3) AACS ノックアウトマウスの作製

CRISPR-Cas9 システムを用いて、AACS の翻訳開始点付近を欠損したノックアウトマウスを作製した。耳片より DNA を抽出し

て PCR 法により Genotyping を行った。野生型、ヘテロ型マウスから脳を摘出後、RNA やタンパク質を抽出し、real-time PCR 法や Western blot 法に供した。

4. 研究成果

(1) 神経細胞における AACS の役割

マイクロアレイおよび real-time PCR 法を用いて、AACS をノックダウンした際に変動する神経機能に関わる遺伝子の同定を試みた。その結果、ドパミンからノルエピネフリンを合成するドパミン-β-ヒドロキシラーゼ (Dbh) の発現が、AACS のノックダウンにより有意に減少した (図 1、左)。続いて、マウスの胎仔から初代培養神経細胞を単離・培養し、AACS をノックダウンして細胞骨格に関わるタンパク質を検討した。その結果、AACS の抑制により、細胞骨格を調節する低分子量 G タンパク質である Cdc42 や RhoC の発現量が顕著に減少した (図 1、右)。以上の結果から、AACS は神経伝達物質の代謝や形態形成に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

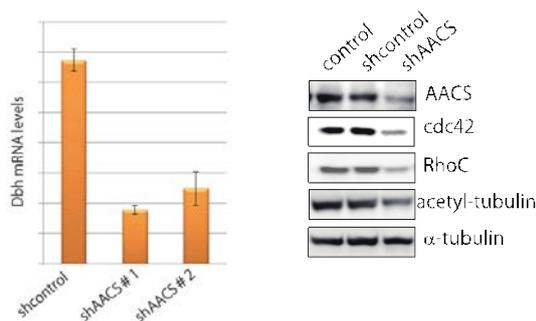


図 1 神経細胞の機能や形態に対する AACS の影響

(2) レグマインによる AACS の切断部位の同定

AACS のアミノ酸配列のアスパラギンをグルタミンに置換し、レグマイン (Legumain) の切断に対する影響を検討した。AACS の 500、503、545、547 番目のアミノ酸をグルタミンに置換した精製タンパク質とレグマインを反応させた結果、503 番目 (N503Q) と 547 番目 (N547Q) のアミノ酸に変異を導入した際に、AACS の切断が抑制されることが明らかになった (図 2、左)。そこで、503 と 547 番目の両方のアミノ酸に変異を導入し、レグマインと反応させると、AACS の切断が抑制された (図 2、右)。以上の結果より、*in vitro* では 503 と 547 番目のアスパラギンがレグマインの切断に重要な役割を果たすことが明らかになった。

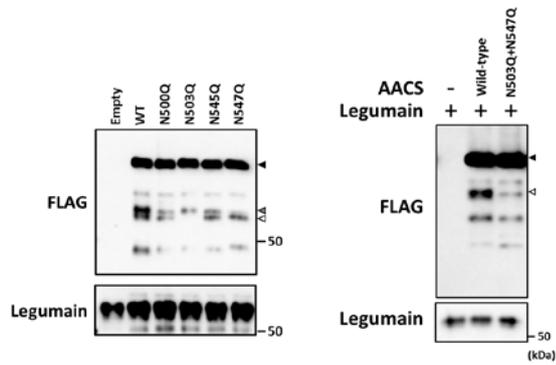


図2 レグマインによる AACS の切断部位の同定

*In vivo*における AACS の切断部位を同定するために、Hydrodynamics 法を用いてマウス個体に N 末端側に FLAG タグを挿入した野生型と変異型 AACS を導入し、切断に対する影響を検討した。野生型 AACS を導入すると、全長と切断型 AACS の 2 本のバンドが認められた (図 3)。503 番目のアミノ酸に変異を導入した際には、野生型と同じく切断型の AACS が観察されたが、547 番目や 503 と 547 番目のアミノ酸に変異を導入すると、切断が抑制されることが明らかになった。以上の結果、AACS の切断には 547 番目のアスパラギンが重要な役割を果たすことが明らかになった。

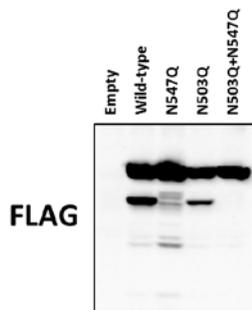


図3 *In vivo*における AACS の切断部位の同定

次に、AACS のケトン体利用活性に対する切断の影響を検討した。N 末端または C 末端に FLAG を付加した AACS の野生型と 1 から 547 番目 (1-547)、1 から 503 番目 (1-503) のアミノ酸を発現するベクターを作製し、HEK293 細胞に導入してタンパク質を抽出後、AACS の活性を測定した。野生型と比較して、1-547 や 1-503 では AACS の活性が著しく低下した。以上の結果から、レグマインの切断は AACS の活性調節に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

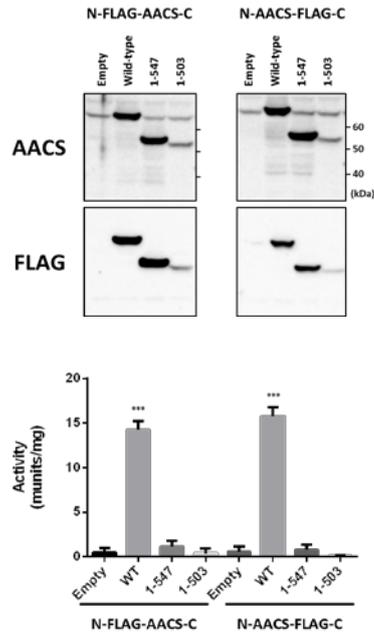


図4 AACS の活性に対する切断の影響

(3)AACS ノックアウトマウスの作製

脳神経系における AACS の役割を検討するために、CRISPR-Cas9 システムを用いて、AACS の翻訳開始点が欠損するようにガイド RNA を設計し、ノックアウトマウスの作製を試みた。野生型と (+/+) ヘテロ型 (+/-) の雄生マウス (6 週齢) から脳を摘出し、real-time PCR 法や Western blot 法を用いて AACS の発現を検討した結果、AACS の mRNA レベルは増加していたが、タンパク質は減少した (図 5)。

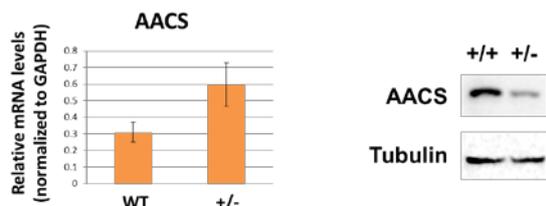


図5 野生型、ヘテロ型マウスにおける AACS の発現量の解析

そこで、脳神経機能に関わる遺伝子発現を野生型とヘテロ型 AACS ノックアウトマウスで比較した。その結果、神経伝達物質であるアセチルコリンを分解するアセチルコリンエステラーゼ (Ache) の発現量は変動しなかった (図 6)。しかし、ドパミンからノルエピネフリンを合成するドパミン- β -ヒドロキシラーゼ (Dbh) の発現量は、ヘテロ型マウスで減少した。以上の結果から、AACS は神経伝達物質の代謝に関わる可能性が示唆された。

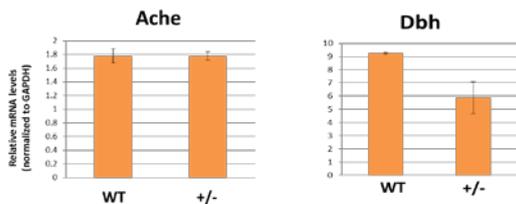


図 6 神経伝達物質の代謝経路に対する AACCS の影響

本結果より、AACCS はレグマインによって切断されその活性が調節されていること、また、脳神経系の機能や形態形成において重要な役割を果たす可能性が示唆された。レグマインはアルツハイマー病患者の脳で活性が増加すること、また、レグマインによるタウ切断は神経原繊維の病的変化を引き起こすことが明らかになっている。AACCS の活性はレグマインによる切断によって調節されることから、アルツハイマー病における AACCS の活性変化が、その発症機序に関わる可能性が示唆された。今後、AACCS のノックアウトマウスにおける表現系を詳細に解析し、神経機能や認知機能障害の発症機序に対するケトン体代謝の影響を検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Sakai A, Imai M, Takahashi K, Hasegawa S, Yamasaki M, Ohba T, Takahashi N, Protein kinase A activation by retinoic acid in the nuclei of HL60 cells, *Biochim Biophys Acta.*, 1861(2):276-285 (2017)
DOI: 10.1016/j.bbagen.2016.11.039.

Li C, Imai M, Yamasaki M, Hasegawa S, Takahashi N, Effects of Pre- and Post-Administration of Vitamin A on the Growth of Refractory Cancers in Xenograft Mice, *Biol Pharm Bull.*, 40(4):486-494 (2017)
DOI: 10.1248/bpb.b16-00933.

Li C, Imai M, Hasegawa S, Yamasaki M, Takahashi N, Growth Inhibition of Refractory Human Gallbladder Cancer Cells by Retinol, and Its Mechanism of Action, *Biol Pharm Bull.*, 40(4):495-503 (2017)
DOI: 10.1248/bpb.b16-00934.

Takahashi N, Ohba T, Imai M, Hasegawa S, Takahashi K, Yamasaki M, Kameoka Y, Retinoylation (covalent modification by retinoic acid) of Rho-GDI β in the human myeloid leukemia cell line HL60 and its

functional significance, *Biochim Biophys Acta.*, 1861(12PtA):2011-2019 (2016).
DOI: 10.1016/j.bbailip.2016.10.001.

Hasegawa S, Inoue D, Yamasaki M, Li C, Imai M, Takahashi N, Fukui T, Site-specific cleavage of acetoacetyl-CoA synthetase by legumain, *FEBS Lett.*, 590(11):1592-601 (2016)
DOI: 10.1002/1873-3468.12197.

Yamasaki M, Hasegawa S, Imai M, Takahashi N, Fukui T, High-fat diet-induced obesity stimulates ketone body utilization in osteoclasts of the mouse bone, *Biochem Biophys Res Commun.*, 473(2):654-61 (2016)
DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.03.115.

Li C, Imai M, Matsuura T, Hasegawa S, Yamasaki M, Takahashi N, Inhibitory Effects of Retinol Are Greater than Retinoic Acid on the Growth and Adhesion of Human Refractory Cancer Cells, *Biol Pharm Bull.*, 39(4):636-40 (2016)
DOI: 10.1248/bpb.b15-00794.

Yamasaki M, Hasegawa S, Takahashi H, Kobayashi Y, Sakai C, Ashizawa Y, Asai Y, Kanzaki M, Fukui T, Placental extracts induce the expression of antioxidant enzyme genes and suppress melanogenesis in B16 melanoma cells, *Nat Prod Res.*, 29(22):2103-6 (2015)
DOI: 10.1080/14786419.2014.986660.

〔学会発表〕(計 6 件)

長谷川晋也, 今井正彦, 山崎正博, 高橋典子, 脂肪細胞におけるケトン体利用酵素の役割, 日本薬学会 第 137 年会, 2017 年 3 月 25 日, 仙台国際センター (宮城県・仙台市)

柳下 衡平, 長谷川晋也, 山崎正博, 今井正彦, 福井哲也, 高橋典子, レグマインによるケトン体利用酵素の切断と生理的意義, 日本薬学会 第 137 年会, 2017 年 3 月 26 日, 仙台国際センター (宮城県・仙台市)

長谷川晋也, 今井正彦, 山崎正博, 福井哲也, 高橋典子, 神経細胞障害におけるケトン体利用酵素の役割, フォーラム 2016 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2016 年 9 月 11 日, 昭和大学旗の台キャンパス (東京都・品川区)

柳下 衡平, 長谷川晋也, 山崎正博, 今井正彦, 福井哲也, 高橋典子, リソソーム酵素によるケトン体代謝の調節, 日本薬学会 第 136 年会, 2016 年 3 月 29 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

長谷川 晋也, 山崎 正博, 今井 正彦, 福井 哲也, 高橋 典子, タンパク質のアセチル化におけるケトン体利用酵素の役割, 日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 29 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

長谷川晋也, 山崎正博, 福井哲也, 高橋典子, 神経突起伸長過程におけるケトン体利用経路の役割, フォーラム 2015 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2015 年 9 月 18 日, 神戸学院大学ポートアイランドキャンパス (兵庫県・神戸市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

長谷川 晋也 (HASEGAWA, Shinya)

星薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：60386349