

機関番号：34310
 研究種目：研究活動スタート支援
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21800075
 研究課題名（和文） アミロイド前駆体タンパク質細胞内輸送に対する脂質代謝の関与メカニズムの解明
 研究課題名（英文） Study for the mechanism linking intracellular amyloid precursor protein transport and lipid metabolism
 研究代表者
 浦野 泰臣 (URANO YASUOMI)
 同志社大学・生命医科学部・助教
 研究者番号：00546674

研究成果の概要（和文）：アルツハイマー病における老人斑の主要構成成分であるアミロイドβ (Aβ) は、アミロイド前駆体タンパク質 (APP) から産生される。本研究ではコレステロールの脳特異的酸化物である 24S-酸化ステロールで細胞を処理すると、APP の細胞内輸送が阻害され、小胞体に留まることを見出した。また Aβ 産生量が減少することも見出した。さらに 24S-酸化ステロール存在時に APP との結合が増加するタンパク質を複数同定した。

研究成果の概要（英文）：A major pathological hallmark of Alzheimer's disease is the accumulation of Amyloid β (Aβ) in senile plaques. Aβ is generated from Amyloid precursor protein (APP). In this study, I found that the treatment with 24S-hydroxycholesterol, which is the brain-specific oxysterol, caused the inhibition of intracellular APP trafficking from endoplasmic reticulum to Golgi, resulting the reduction of Aβ production. In addition, several candidate proteins, which were associated with APP in the presence of 24S-hydroxycholesterol, were indentified.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2010年度	970,000	291,000	1,261,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,040,000	612,000	2,652,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：脳神経科学 神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経科学、脂質、痴呆

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease, AD) において老人斑の主要構成成分であるアミロイドβ (amyloid-β peptide, Aβ) の蓄積は AD 患者脳の初期の病変である。Aβ の凝集と蓄積が引き金となって神経原線維変化を起こし、痴呆の原因となる神経細胞死が起こるとするアミロイド仮説は最も有力な病態仮説として考えられている。Aβ はアミロイ

ド前駆体タンパク質 (amyloid precursor protein, APP) からβセクレターゼおよびγセクレターゼと呼ばれるプロテアーゼ群による切断により産生される。APP は各種セクレターゼによる切断を受ける前に、小胞体及びゴルジ体において N 型と O 型の糖鎖修飾を受ける。糖鎖修飾を受け未成熟型から成熟型となった APP はαセクレターゼまたはβセクレターゼによる切断後、トランスゴルジネ

ットワークやエンドソーム等において γ セクレターゼによる切断を受ける。すなわち細胞内における APP や各プロテアーゼの局在や輸送は、APP の代謝経路において重要な役割を果たしている。

近年 AD の発症とコレステロール代謝の関連を示唆する多くの論文が報告されている。高脂血症の治療薬である HMG-CoA 還元酵素阻害剤のスタチンは、コレステロールの合成を抑制するが、スタチン投与により $A\beta$ 産生が抑制されることが知られている。コレステロールの増加は γ セクレターゼ活性を増強し、コレステロールとそのエステル体の比は $A\beta$ の産生に影響を与える。さらに Dartmouth 大学の TY Chang 教授らは、コレステロールのエステル化酵素である Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase 1 (ACAT1) のノックアウトマウスは、記憶力の改善や $A\beta$ の産生が減少することを報告している。これはコレステロールのエステル化が抑制されたことで酸化コレステロールである 24S-hydroxycholesterol (24S-OHC) の産生が促され、APP の初期輸送を変化させたためと考えているが、その詳しいメカニズムは明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究は、 $A\beta$ の前駆体タンパク質である APP の細胞内輸送と脂質代謝の關係に着目し、APP の小胞体からゴルジ体までの細胞内輸送に対する脂質代謝の影響について明らかにするための *in vitro vesicle transport assay* の構築を目的とする。またこの系を用いて、APP の細胞内輸送におけるコレステロールおよび酸化型コレステロールの影響を解析することで、コレステロール代謝の変化が $A\beta$ の産生に及ぼすメカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) APP の細胞内輸送の再構築系である *in vitro vesicle transport assay* は、ヒト APP が安定的に発現している CHO 細胞株を用いて行った。細胞をジギトニンで処理を行うことにより、細胞膜に穴のあいたセミインタクトな状態にした。この状態の細胞にラット肝細胞質や ATP 再構成系/GTP などに加え、37°C で 15 分から 1 時間インキュベートし、小胞輸送の再構成を行った。反応後、超遠心により出芽した小胞を回収し Immunoblot 法により評価した。

(2) $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{42}$ の定量は、Human Amyloid β Assay Kit (IBL) によるサンドイッチ ELISA により定量した。

(3) APP と結合するタンパク質を単離する

方法として、共免疫沈降法を行った。APP に対する抗体と磁気ビーズ (Dynabeads) を用いて、全タンパク質溶出画分から免疫沈降を行い APP の精製を行った。SDS-PAGE による分離後、銀染色法によりゲルを染色し、抗 APP 抗体と共沈したタンパク質について、検出されたバンドを LC-MS 質量分析法により同定した。

4. 研究成果

(1) 小胞体からゴルジ体への順行輸送は、主に COP-II と呼ばれる輸送小胞を介して行われる。APP においても新生 APP は COP-II を介して小胞体からゴルジ体に輸送されることが報告されている。そこで APP の小胞体からゴルジ体までの細胞内輸送について *in vitro vesicle transport assay* を立ち上げ、再構築を試みた (図 1)。界面活性剤であるジギトニンを用いて、セミインタクト細胞を調整し、ラット肝細胞質や ATP 再構成系を加え、1 時間まで反応を行うと COP-II によって輸送されることが知られている ERGIC-53 や SNARE タンパク質である sec22b は、時間依存的に小胞画分に回収されていた。一方で、小胞体局在膜タンパク質である Ribophorin I は小胞画分には観察されず、反応中に小胞体の分解は起きていないことを確認した。この結果から、本条件下において小胞体からの COP-II 小胞の出芽が再構成されていることが確認された。この条件下で APP の小胞への移行を解析したところ、小胞体に存在していたと考えられる未成熟な APP が時間依存的に小胞画分に回収されることが確認された。また APP や ERGIC-53、sec22b を含む小胞の出芽は ATP および細胞質に含まれる可溶性タンパク質依存的であった。

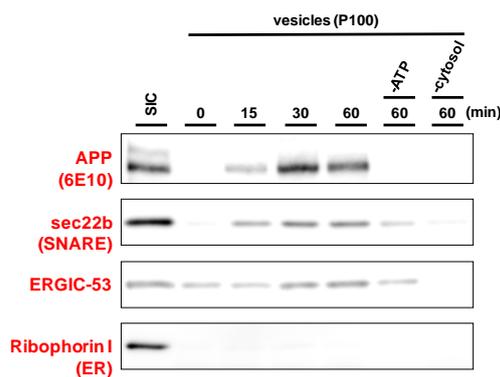


図 1. APP の *in vitro vesicle transport assay* の再構築

次にこの構築した *in vitro vesicle transport assay* を用いて、脳特異的に産生されるオキシステロールである 24S-hydroxycholesterol (24S-OHC) の効果

を検討した。24S-OHC は主に神経細胞で cholesterol 24-hydroxylase (CYP46) によってコレステロールが酸化されて産生される。血液脳関門によって末梢と隔てられた脳からのコレステロール排出において、血液脳関門を通過できる 24S-OHC は脳内のコレステロール代謝に重要な役割を果たしているが、CYP46 の多型や活性と AD の発症との関係も示唆されている。そこで APP の初期輸送における 24S-OHC の影響を検討するために、細胞を各濃度の 24S-OHC で 24 時間処理した後、セミインタクト細胞を調製し、反応を行った。その結果、ERGIC-53 や sec22b は 24S-OHC 処理後の細胞でも小胞画分にシグナルが観察された (図 2)。一方、COP-II 小胞への APP の移行は 24S-OHC 濃度依存的に阻害された。また別のオキシステロールである 25-OHC や 27-OHC でも同様の阻害効果が確認された。24S-OHC は核内受容体である Liver X Receptor (LXR) のリガンドであることが知られているが、LXR 合成リガンドである T0901317 は APP の小胞への移行を阻害しなかった。

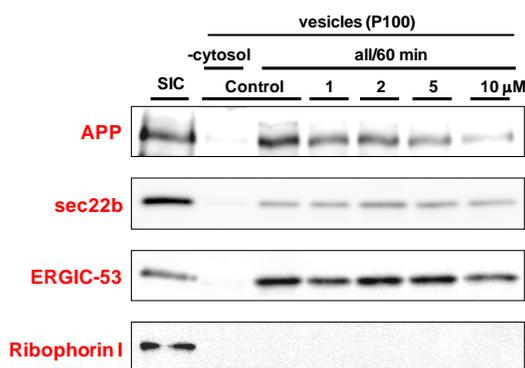


図 2. 24S-OHC 処理による APP の COP-II 小胞への移行阻害

(2) そこで 24S-OHC 処理後、細胞から培地中に分泌された Aβ₄₀、₄₂ 量を ELISA 法により測定したところ、24S-OHC 濃度依存的に Aβ₄₀、₄₂ 産生量が減少することが確認された (図 3)。また 25-OHC や 27-OHC で処理した細胞でも Aβ₄₀、₄₂ は減少していたが、T0901317 では減少していなかった。一方、全長 APP は 24S-OHC 濃度依存的に増加していた。以上の結果から 24S-OHC などのオキシステロールは、APP の COP-II 小胞を介した小胞体からゴルジ体への輸送を阻害した結果、Aβ 産生酵素が存在するゴルジ体以降のオルガネラに APP が到達せず、Aβ 産生量が減少する可能性が示唆された。また、その効果は 24S-OHC が持つ LXR のリガンドとしての作用以外の効果によると考えられた。

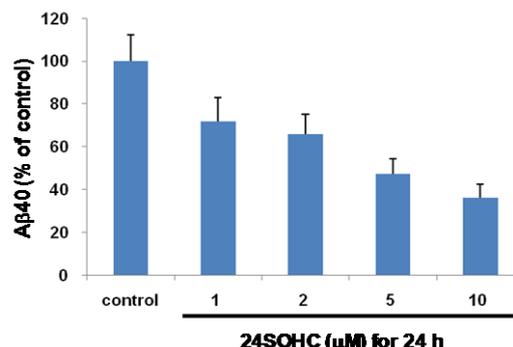


図 3. 24S-OHC 濃度依存的な Aβ₄₀ 産生量の減少

(3) 24S-OHC 処理時に APP と直接結合する、または結合が外れるタンパク質を同定することを目的として、抗 APP 抗体を用いた免疫沈降法を行った。24S-OHC で 24 時間処理した細胞または未処理の細胞から NP-40 を含む溶解液により全タンパク質画分を調製し、抗 APP 抗体と磁気ビーズを用いた免疫沈降により全長 APP が回収されていることを確認した。さらに抗 APP 抗体と共沈したタンパク質を SDS-PAGE および銀染色法によりバンドを確認した。24S-OHC 処理により変化の見られたタンパク質について LC-MS 質量分析法により同定した。その結果 24S-OHC 存在下で APP との結合が増加するタンパク質を複数同定した。今後これらの候補タンパク質について解析を進めていく予定である。

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 6 件)

- ① Yamanaka K., Saito Y., Yamamori T., Urano Y., Noguchi N.
24(S)-Hydroxycholesterol induces neuronal cell death through necroptosis, a form of programmed necrosis
J. Biol. Chem., 2011 in press, 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① 山中一哲、斎藤芳郎、浦野泰臣、野口範子
24(S)-Hydroxycholesterol induces SH-SY5Y cell death via necroptosis.
Society for Free Radical Biology and Medicine
2010 年 11 月 19 日、Orland, FL (USA)
- ② 伊藤早陽子、斎藤芳郎、浦野泰臣、野口範子
24S-hydroxycholesterol による適応反応を介したストレス耐性の誘導
第 32 回日本分子生物学会年会

2009年12月12日、パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浦野 泰臣 (URANO YASUOMI)
同志社大学・生命医科学部・助教
研究者番号：00546674

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし