様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成２３年　３月３１日現在

機関番号：１３７０１
研究種目：基盤研究（Ｂ）
研究期間：2008　～　2010
課題番号：20300245
研究課題名（和文）　脳内アミノ酸バランス異常による認知症発症機構の解明
研究課題名（英文）　Analysis of amino acid imbalance underlying Alzheimer’s disease

研究代表者
中川　敏幸（NAKAGAWA　TOSHIYUKI）
岐阜大学・医学系研究科・教授
研究者番号：00271502

研究成果の概要（和文）：
本研究は、アミロイド-β 産生亢進に関与する分子機構を解明し、アルツハイマー病の新規治療薬および予防法開発の基盤となる知見を得ることを目的に実施し、以下の成果を得た。
(1) マウス加齢脳におけるオートファジー関連タンパク質の発現の変化をウェスタンブロット法にて明らかにした。
(2) アミロイド-β 産生亢進の分子機構として、オートファジー機能低下に伴う細胞内アミノ酸バランス異常とアミノ酸センサーシグナルの活性化の関与を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：
To explore novel therapeutic and preventive interventions for Alzheimer’s disease, I investigated the molecular mechanism of amyloid-β production. I found that (1) the expression of proteins related to signaling molecules for autophagy was dynamically changed in the mouse brain during ageing, (2) GCN2-eIF2α phosphorylation-ATF4 cascade was a molecular mechanism for the upregulation of amyloid-β production through affecting γ-secretase activity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2008 年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2009 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2010 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総　計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：総合領域
科研費の分科・細目：生活科学・生活科学一般
キーワード：アルツハイマー病、ガンマ-セクレターゼ、プレセニリン、小胞体ストレス、オートファジー、ATF4、アミノ酸

１．研究開始当初の背景

高齢化社会の現代において、認知症の発症率は高く、日本における発症者は約 160 万人と推定されている。その中で、アルツハイマー病は 120 万人を超え、急速に増加している。しかし、治療法や予防法が確立していないため、介護による経済的および人的負担が増大し、社会問題になっている。

食物から摂取されたアミノ酸はタンパク質合成に使われ、残りは貯蔵されずに代謝されると考えられていた。しかし、American Society for Nutritional Sciences 主催による、“Leucine as a Nutritional Signal”のシンポジウムが 2000 年に開催され、分枝ア

ミノ酸であるロイシンがシグナル分子として注目されるようになった。すなわち、ロイシンの生理的役割として、

(1) 脳の梨状葉皮質において、ロイシン欠乏時にuncharged tRNAが細胞内に存在し、アミノ酸センサーとして食物の選択に関与する（Hao et al., *Science* 2005)。
(2) 視床下部において、ロイシンは mTOR を刺激し、食物摂取を調節する（Cota et al., *Science* 2006)。
(3) 膵臓・細胞において、ロイシンは、アロステリックエフェクターとして、グルタミン酸デヒドロゲナーゼを活性化し、インスリンの分泌を促す（Haigis et al., *Cell* 2006)。

である。

研究代表者らは、(4) ロイシン欠乏に伴い特異的に翻訳された転写因子 ATF4 がプレセニリン遺伝子のプロモーター領域に結合し、(5) プレセニリン遺伝子の発現が増加すること、(6) それによりアミロイド-β産生が亢進することを明らかにした（Mitsuda et al., *BBRC* 2007)。本研究は、この先行研究を発展させるものである。

２．研究の目的

アルツハイマー病の病態として、アミロイド説が有力であり、アミロイド-βは神経毒性を示す。しかし、明らかな遺伝子変異を伴わないアルツハイマー病が 90%以上であることから、アミロイド-β産生亢進に関与する分子機構の解明を目指した研究が、世界中で進められている。そこで、

研究代表者らは、必須アミノ酸バランスの乱れにより、ストレス応答シグナルが活性化され、アミロイド-βの産生が亢進することを明らかにした（*BBRC* 2007)。

本研究では、これら学術的背景と新知見を踏まえ、細胞内アミノ酸バランスに関与するオートファジー機能とアミロイド-β産生との関連性を解明し、新規の治療薬および予防法開発の基盤となる知見を得ることを目的とする。

３．研究の方法

(1) 加齢によるアミノ酸センサーシグナル分子の発現解析－生後０日から２年までのマウス脳におけるオートファジー関連タンパク質（atg5、LC3, p62）の発現を解析する。
  ① 免疫染色による解析：マウス脳における発現解析を行う。
  ② ウェスタンブロットによる解析：正常餌で飼育したマウスの加齢によるタンパク質の変化を梨状葉皮質において解析する。
(2) アミノ酸センサーとオートファジー関連分子のノックダウン細胞の樹立－アミロイド前駆体タンパク質の膜貫通領域よりＣ末領域を安定に発現する HEK293 細胞（SC100/HEK293 細胞）に、siRNA/pSuper プラスミドを遺伝子導入することにより、目的の遺伝子発現を抑制する。さらに、ELISA 法にてアミロイド-β産生への影響を解析する。
  ① オートファジーの抑制：オートファゴゾーム形成に関与し、オートファジーの進行に重要な atg5 のノックダウン細胞を樹立する（atg5KD-SC100/HEK293 細胞)。
  ② アミノ酸センサーシグナル経路の抑制：翻訳開始因子 eIF2αのリン酸化酵素である GCN2 に対する siRNA/pSuper プラスミドを SC100/HEK293 細胞に遺伝子導入し、GCN2 ノックダウン細胞を樹立する（GCN2KD-SC100/HEK293 細胞)。
  ③ ノックダウン細胞によるアミロイド-β産生の解析：アミノ酸センサーシグナル経路におけるオートファジーの役割を解析する。
  ④ 正常培養条件下およびオートファジーを活性化する食品成分（レスベラトロール）投与におけるアミロイド-β産生の変化を解析する。
    ◆ atg5KD-SC100/HEK293 および GCN2KD-SC100/HEK293 細胞において、プレセニリンの発現誘導とアミロイド-β産生の変化について解析する。

４．研究成果

(1)-① 生後 28 日齢のマウス脳において、梨状葉皮質および海馬における GCN2 の発現を確認した。
-② 海馬（生後０日から２年まで）では、オートファジー関連タンパク質 atg-5 の発現と活性の指標である LC3-II の有意な減少（p<0.02）を認め、アミノ酸センサーの指標である ATF4 の増加を認めた。

(2) atg5 ノックダウン細胞では、正常培養条件下においてアミノ酸飢餓と同様にプレセニリンの発現が増加した。この増加は非必須アミノ酸を培養液に添加することにより消失した（図１）。また、正常細胞において、オートファジー-リソゾーム経路を阻害するクロロキン処理により、atg5 ノックダウン細胞と同様にプレセニリンの発現増加を認めた（図２）。一方、GCN2（eIF2αリン酸化酵素）ノックダウン細胞ではプレセニリンの発現増加を認め

なかった（図２）。以上のことから、オートファジーが細胞内アミノ酸レベルを介して間接的に GCN2 の活性を制御していることが明らかとなった。さらに、atg5 ノックダウン細胞では、アミロイド-β産生の亢進（図３）と Notch シグナルの活性化（図４）を認めた。興味あることに、レスベラトロール処理によりオートファジーの活性化を認め、atg5 ノックダウン細胞において観察されたアミロイド-β産生亢進と Notch シグナルの活性化が抑制された。以上のことから、γ-セクレターゼの活性は、オートファジー機能により制御されると結論した（図５）。

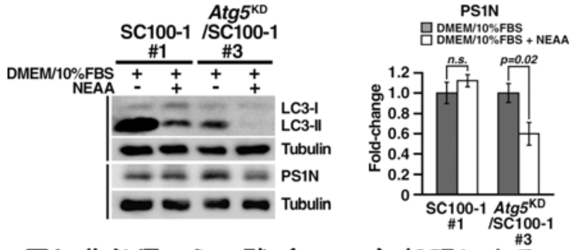

図1 非必須アミノ酸（NEAA）処理によるプレセニリン-1（PS1N）発現の抑制
左：ウエスタンブロット、右：発現の変化
$Atg5^{KD}$：Atg5ノックダウン細胞
NEAA：非必須アミノ酸

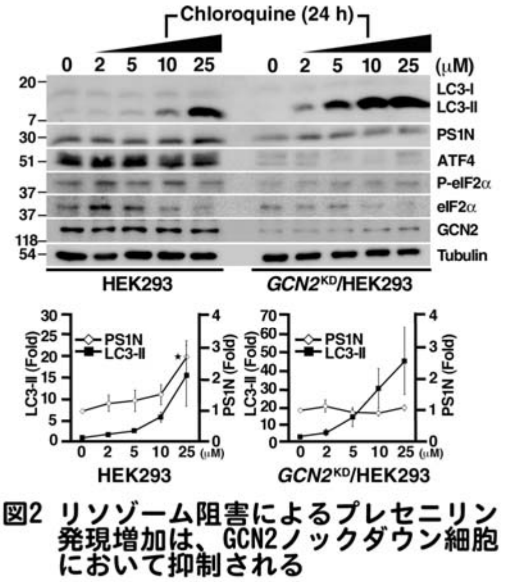

図2 リソゾーム阻害によるプレセニリン発現増加は、GCN2ノックダウン細胞において抑制される
上段：ウエスタンブロット、下段：発現の変化
$GCN2^{KD}$：GCN2ノックダウン細胞
LC3-II：オートファジー関連タンパク質

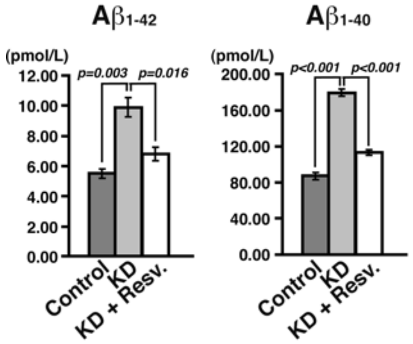

図3 Atg5ノックダウン細胞においてアミロイド-β産生が亢進する
レスベラトロールは、アミロイド-β産生を抑制する
KD：Atg5ノックダウン細胞
Resv.：レスベラトロール処理

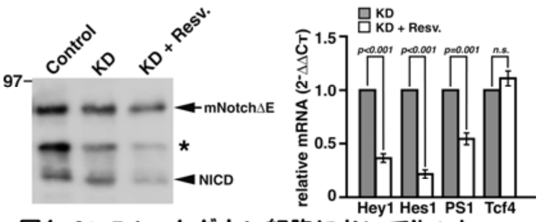

図4 Atg5ノックダウン細胞においてNotchシグナルが活性化する
レスベラトロールは、Notchシグナルを抑制する
KD：Atg5ノックダウン細胞
Resv.：レスベラトロール処理

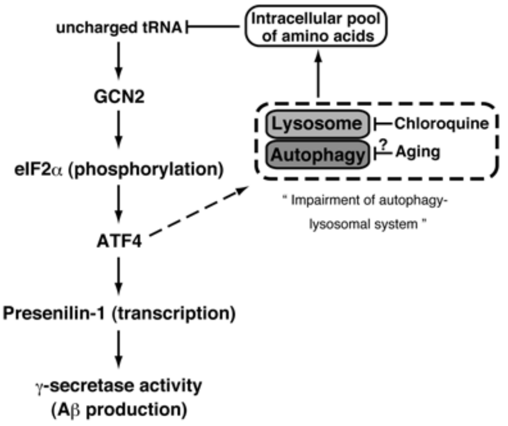

図5 オートファジー-リソソーム経路におけるアミロイド-β産生制御機構を示す

〔国内外における位置づけとインパクト〕

本研究成果を発表[発表論文（２）]後、家族

性アルツハイマー病におけるプレセニリンの遺伝子変異がリソゾームとオートファジー機能を阻害し、病態と深く関与することが報告された（Lee JH et al., Cell 141, 1-13, 2010）。オートファジー-リソゾーム経路とアルツハイマー病との関連性を示唆する本研究成果は、家族性アルツハイマー病発症および予防法開発の基盤的知見となり得ると示唆される。

一方、我々は、既にアミロイド-β産生の主要酵素γ-セクレターゼの活性中心であるヒトプレセニリン-1 遺伝子のプロモーター領域において、転写因子 ATF4 の結合領域を同定し、ストレス状況下において、ATF4 がプレセニリン-1 遺伝子の発現増加とγ-セクレターゼの活性化に関与することを明らかにした（Mitsuda T, Hayakawa Y, Itoh M, Ohta K, Nakagawa T. ATF4 regulates gamma-secretase activity during amino acid imbalance. *Biochem Biophys Res Commun.* 352:722-727, 2007）。転写因子 ATF4 は、小胞体ストレスなどのストレス刺激による eIF2αのリン酸化により、特異的に翻訳後活性化する。eIF2αのリン酸化酵素として、GCN2 を含め４つの酵素（PERK, PKR, HRI）が存在する。すなわち、様々なストレス刺激が eIF2αのリン酸化-転写因子 ATF4 シグナルを活性化する。小胞体ストレスは研究代表者らの報告（Nakagawa T et al., Nature 403, 98-103, 2000）以来、アルツハイマー病などの神経変性疾患や糖尿病、肥満などのメタボリック症候群の病態として注目されるようになっている（Hotamisligil GS, Cell 140, 900-917, 2010）。加齢と糖尿病はアルツハイマー病の危険因子である。オートファジー機能は加齢と共に低下すること、また糖尿病において小胞体ストレスの活性化が存在することから、今後、eIF2αのリン酸化-転写因子 ATF4 シグナルとアルツハイマー病の病態との関連性を明らかにすることは遺伝子変異を認めないアルツハイマー病において、危険因子のアミロイド-β産生に対する分子機構解明に繋がり、さらに予防法開発の知見を得ることができると考えられる。

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４件）

(1) Itoh M, Li S, Ohta K, Yamada A, Hayakawa-Yano Y, Ueda M, Hida Y, Suzuki Y, Ohta E, Mizuno A, Banno Y, Nakagawa T. Cayman Ataxia-Related Protein is a Presynapse-Specific Caspase-3 Substrate. *Neurochemical Research.* DOI 10.1007/s11064-011-0430-5, 2011. 査読有
(2) Ohta K, Mizuno A, Ueda M, Li S, Suzuki Y, Hida Y, Hayakawa-Yano Y, Itoh M, Ohta E, Kobori M, Nakagawa T. Autophagy impairment stimulates PS1 expression and β-secretase activity. *Autophagy.* 6:345-352, 2010. 査読有
(3) Suzuki Y, Ohta K, Itoh M, Sakoh-Sumitomo Y, Mitsuda T, Ueda M, Hayakawa-Yano Y, Li S, Hida Y, Inuzuka T, Jung YK, Nakagawa T. An alternative spliced mouse presenilin-2 mRNA encodes a novel ・-secretase inhibitor. *FEBS letters.* 583:1403-1408, 2009. 査読有
(4) Song S, Lee H, Kam TI, Tai ML, Lee JY, Noh JY, Shim SM, Seo SJ, Kong YY, Nakagawa T, Chung CW, Choi DY, Oubrahim H, Jung YK. E2-25K/Hip-2 regulates caspase-12 in ER stress-mediated Aβ neurotoxicity. *J Cell Biol.* 182:675-684, 2008. 査読有

〔学会発表〕（計８件）

(1) OHTA K, MIZUNO A, UEDA M, LI S, SUZUKI Y, HIDA Y, HAYAKAWA-YANO Y, ITOH M, OHTA E, NAKAGAWA T. Autophagy impairment leads to activation of gamma secretase through GCN2, 米国神経科学学会, 2010 年 11 月 17 日, San Diego, USA
(2) 太田和徳, 水野彰人, 上田昌史, 李詩沫, 鈴木欣宏, 樋田陽子, 早川-矢野佳芳, 伊藤正徳, 太田瑛里, 小堀真珠子, 中川敏幸. オートファジーの機能低下がもたらす GCN2 を介したガンマセクレターゼ活性亢進機構の解明 Neuro2010. 2010 年 9 月 2 日、神戸コンベンションセンター
(3) Ueda M, Li S, Itoh M, Hida Y, Hayakawa-Yano Y, Suzuki Y, Ohta K, Ohta E, Mizuno A, Nakagawa T. Disruption of the endoplasmic reticulum by polyglutamine expansion induces Apaf-1-dependent, activation of caspase-7. 米国神経科

学学会, 2009年10月20日, Chicago, USA

(4) Ueda M, Li S, Hayakawa-Yano Y, Ohta K, Itoh M, Hida Y, Ohta E, Mizuno A, Nakagawa T. Disruption of the endoplasmic reticulum leads to Bax- and Apaf-1-dependent activation of caspase-7. CELL DEATH Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, 2009年10月8日, New York, USA
(5) Suzuki Y, Ohta K, Itoh M, Ueda M, Li S, Hida Y, Sakoh-Sumitomo Y, Mitsuda T, Hayakawa-Yano Y, Inuzuka T, Nakagawa T. The novel splicing isoform of mouse presenilin-2 interrupts γ-secretase complex, inhibiting its activity. 米国神経科学学会, 2008年11月17日, Washington DC, USA
(6) 伊藤正徳, 李詩沫, 上田昌史, 太田和徳, 鈴木欣宏, 樋田陽子, 中川敏幸. 前シナプスに局在するCayman運動失調症原因タンパク質(Caytaxin)の機能発現におけるCaspase-3の役割. BMB2008, 2008年11月、神戸
(7) 太田和徳, 鈴木欣宏, 伊藤正徳, 李詩沫, 上田昌史, 樋田陽子, 中川敏幸. プレセニリン発現制御におけるオートファジーの役割の解明. BMB2008, 2008年11月、神戸
(8) 鈴木欣宏, 太田和徳, 伊藤正徳, 上田昌史, 李詩沫, 樋田陽子, 酒向ゆかり, 光田輝彦, 犬塚貴, 中川敏幸. ガンマ-セクレターゼ活性を制御する新規プレセニリン2アイソフォームの解析. BMB2008, 2008年11月、神戸

〔その他〕
ホームページ等
http://www1.gifu-u.ac.jp/~neurobio/

6. 研究組織
(1)研究代表者
中川 敏幸 (NAKAGAWA TOSHIYUKI)
岐阜大学・医学系研究科・教授
研究者番号:00271502

(2)研究分担者
( )

研究者番号:

(3)連携研究者
( )

研究者番号: