

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：34310
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23700428
 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へのコレステロール代謝の関与機構の解明
 研究課題名（英文） Study for the mechanism linking intracellular amyloid precursor protein transport and cholesterol 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-hydroxycholesterol が、小胞体ストレス応答を介して小胞体シャペロンである GRP78 の発現を誘導し、APP と GRP78 の複合体形成促進による APP の細胞内輸送の抑制によって Aβ産生を抑制することを明らかにした。

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, induced the expression of GRP78, an ER chaperone, through unfolded protein response pathways, and enhanced the formation of the APP/GRP78 complex. Thereby, 24S-hydroxycholesterol downregulates intracellular APP trafficking, resulting in the reduction of Aβ production.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

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：アルツハイマー病、脂質代謝、酸化コレステロール、細胞内輸送

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 β 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 β 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 β 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。24S-OHC は cholesterol 24-hydroxylase (CYP46A1) による酵素的な酸化でコレステロールから生成される酸化ステロールであり、CYP46A1 は主に神経細胞に発現している。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 は生理的に重要な役割を果たしているが、CYP46A1 の多型や活性、脳内や血漿での 24S-OHC 量と AD の発症との関係も示唆されている。また以前より A β がコレステロールと結合することは報告されていたが、APP 自身もコレステロールや酸化ステロールと直接結合する可能性が示唆されている。しかし 24S-OHC と A β 産生の関係や意義、APP の酸化ステロール結合部位などは明らかにされていない。

これまで我々はヒト野生型 APP を発現する細胞株において、24S-OHC 処理は濃度依存的に A β の産生を減少させることを既に見出している。また semi-intact 細胞を用いた独自の APP の初期輸送の再構築系を立ち上げることに成功し (未発表)、この系を用いて、24S-OHC 処理は APP の COP-II 依存的細胞内輸送を減少させることを見出していた。これらの結果から、24S-OHC 処理により APP 結合タンパク質が APP から外れる、もしくは結合することにより APP の COP-II 小胞への取り込みが抑制され、APP 細胞内輸送が阻害された結果、A β 産生が減少するという仮説を考えていた。

2. 研究の目的

本研究は、A β 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、I) プロテオーム解析により 24S-OHC 存在下で APP の細胞内輸送に影響を与えるタ

ンパク質を同定し、APP の小胞体からゴルジ体への細胞内輸送との關係を明らかにすること、II) APP のステロール結合部位を同定し、APP の細胞内輸送および A β 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) 細胞としてヒト神経芽細胞腫である SH-SY5Y 細胞、ヒト野生型 APP が安定的に発現している CHO 細胞株 (CHO-APP) を用いた。

(2) A β 40、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。抗 APP 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) RNA 発現量は real-time PCR 法により定量した。タンパク質発現は Immunoblot 法により解析した。

(5) ヒト APP 変異体の作製は point-mutagenesis 法により CRAC モチーフに存在するアミノ酸を置換した。リポフェクション法により野生型 CHO 細胞に発現させ解析を行った。

4. 研究成果

(1) 目的 I について、抗 APP 抗体を用いた共免疫沈降法と質量分析法を組み合わせ、24S-OHC 存在下で APP への結合が増加するタンパク質の同定を試みた。CHO-APP 細胞を用いて解析した結果、LC-MALDI-TOF-MS 法により複数のタンパク質が同定され、中でも小胞体シャペロンである Glucose-regulated protein 78 (GRP78) に着目し以後の解析を行った。異なる種類の APP に対する抗体を用いた免疫沈降法から GRP78 は APP に直接結合し、24S-OHC 処理により APP/GRP78 複合体が増加することが確認された (図 1)。また 24S-OHC 処理下の細胞において GRP78 の発現量自身が増加することが real-time PCR 法やウエスタンブロット法により明らかとなった (図 2)。GRP78 は小胞体ストレス応答 (UPR) により発現が誘導されることが知られていることから、UPR マーカーについて解析した。その結果 24S-OHC 処理した細胞では IRE1 α のリン酸化や Xbp-1 mRNA のスプライシング変化などが観察された。さらに 24S-OHC 処理は小胞体からのカルシウム放出の促進が

確認されたことから、24S-OHC 処理は小胞体でのカルシウム枯渇に伴う UPR の誘導により、GRP78 の発現が亢進することが明らかとなった。

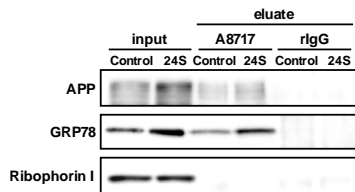


図 1. 共免疫沈降法による APP/GRP78 複合体の形成確認。

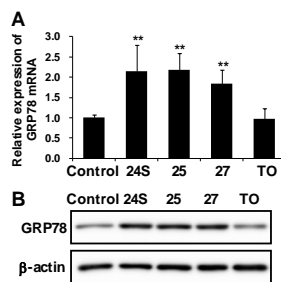


図 2. 24S-OHC 処理による GRP78 の発現誘導。(A) Real-time PCR (B) Immunoblotting

(2) 内在性に APP を発現するヒト神経細胞株である SH-SY5Y 細胞を用いて 24S-OHC 処理後、細胞から培地中に分泌された A β 40 量を ELISA 法により測定したところ、CHO-APP 細胞と同様に 24S-OHC 処理により A β 40 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 A β 40 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 の中でも特に未成熟型 APP が 24S-OHC など酸化ステロール処理細胞において増加していた。APP mRNA の発現量は 24S-OHC 処理によって増加していないことから、未成熟型 APP の増加は転写後に起きた変化であると考えられた。また 24S-OHC 処理は α -、 β -、 γ -セクレターゼ活性を阻害するような効果は認められなかった。

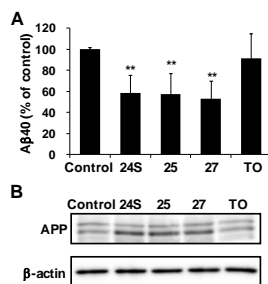


図 3. SH-SY5Y 細胞における 24S-OHC 処理による A β 40 産生減少(A)と未成熟型 APP の増加 (B)。

(3) そこで 24S-OHC による APP 代謝抑制における GRP78 の役割について解析するために、siRNA 法を用いて SH-SY5Y 細胞に内在性に発現する GRP78 のノックダウンを行った。GRP78 siRNA により 24S-OHC 誘導性の GRP78 発現上昇を抑えたところ、未成熟型 APP の蓄積や A β 産生抑制効果は減少した(図 4)。以上の結果から 24S-OHC などの酸化ステロールは、UPR による GRP78 の発現誘導および APP/GRP78 複合体の形成亢進を起こすことで、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、A β 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、A β 産生量が減少する可能性が示唆された。

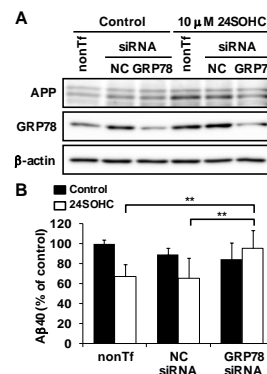


図 4. APP 代謝に対する GRP78 ノックダウンの効果。(A) 未成熟型 APP 蓄積の減少 (B) A β 40 産生抑制の緩和

(4) 目的 II について、APP の予想ステロール結合部位と推定される VGSNK 配列のうち、ヒト野生型 APP を鋳型として point-mutagenesis 法によりバリン、セリン、リジンそれぞれアラニンに置換した変異体を作製した。リポフェクション法により野生型 CHO 細胞に遺伝子導入し、ネオマイシン耐性遺伝子を利用した選別法により、各変異体を安定的に発現する細胞株を樹立した。ウエスタンブロット法を用いた APP タンパク質量の確認および ELISA 法を用いた A β の定量により VGSNK 配列のうちセリン、リジンが 24S-OHC による A β 産生メカニズムにおいて重要な役割を果たす可能性が示された。

(5) また計画以上の発見として脳内に存在する 24S-OHC 量に比べて、過剰量の 24S-OHC は神経細胞に Necroptosis という新規の細胞死形態を引き起こすことを明らかにした。

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1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 vol. 268, p24666-24673,
査読有
10.1074/jbc.M111.236273

〔学会発表〕(計4件)

(1) 浦野泰臣, 野口範子
アミロイド前駆体タンパク質細胞内輸送へ
のオキシステロールの関与機構の解明
第54回日本脂質生化学会
2012年6月7日、福岡
(2) 浦野泰臣
Suppression of amyloid- β production by
24S-hydroxycholesterol via inhibition of
intracellular
amyloid precursor protein trafficking.
第84回日本生化学会大会 (招待講演)
2011年9月23日、京都
(3) 山中一哲、齋藤芳郎、山盛徹、浦野泰
臣、野口範子
24(S)-Hydroxycholesterol により誘導され
る Necroptosis (プログラムネクロシス)
を介する神経細胞死
第84回日本生化学会
2011年9月23日、京都
(4) 浦野泰臣
Suppression of amyloid- β production by
24S-hydroxycholesterol via inhibition of
intracellular
amyloid precursor protein trafficking.
第30回内藤コンファレンス
2011年6月30日、北海道

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：細胞死抑制剤
発明者：浦野泰臣 他
権利者：学校法人同志社
種類：特許
番号：特願 2012-242950
出願年月日：平成 24 年 11 月 2 日
国内外の別：国内

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 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：