

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461745

研究課題名(和文) -セクレターゼ非依存的な APP膜内切断機構の解析

研究課題名(英文) Intramembrane proteolysis of beta-APP in a gamma-secretase independent mechanism

研究代表者

柳田 寛太 (Yanagida, Kanta)

大阪大学・医学系研究科・特任研究員(常勤)

研究者番号：70467596

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：-セクレターゼ非依存的なアミロイド前駆タンパク(APP)の膜内切断機構を調べるため、CRISPR/Cas9法でプレセニリン1と2をダブルノックアウトした細胞を作製した。この細胞に様々なプロテアーゼ阻害剤を作用させ、APPが膜内で分解されたときに生成すると考えられるオリゴペプチドを質量分析装置で定量した。その結果、リソソーム酵素阻害剤のクロロキンで8種類の3アミノ酸のペプチドが減少していた。これらのペプチドはリソソームの主要なプロテアーゼであるカテプシンの阻害剤では減少しないことから、タンパクを3アミノ酸ずつ切断するトリペプチジルペプチダーゼ1によって生成していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To investigate the -secretase independent intramembrane cleavage mechanism of amyloid precursor protein (APP), we generated presenilin 1 and presenilin 2 double knockout (PSDKO) cells by CRISPR/Cas9 system. PSDKO cells were treated with various protease inhibitors and intracellular oligopeptides derived from transmembrane domain of APP were quantified by LC-MS/MS. As a result, eight tripeptides were decreased by treatment of lysosomal enzyme inhibitor chloroquine. Since these peptides were not decreased by inhibition of cathepsins, the major lysosomal proteases, it was suggested that intramembrane domain of APP was degraded by tripeptidyl peptidase 1, which releases tripeptides from N-termini of proteins.

研究分野：アルツハイマー病

キーワード：アルツハイマー病 -セクレターゼ CRISPR/CAS9

1. 研究開始当初の背景

アミロイド (A) はアルツハイマー病 (AD) の原因物質の一つと考えられている。A はアミロイド前駆体タンパク (APP) が γ -セクレターゼで細胞外ドメインが切断された後に、 γ -セクレターゼ複合体によって膜貫通ドメインが切断されて生成する。 γ -セクレターゼを阻害すると細胞外に分泌される A が減少する事から、 γ -セクレターゼ阻害剤が AD の治療薬として研究されている。しかし、Notch 等他の基質の切断も止めてしまうので副作用が大きく、実用化には至っていない。また γ -セクレターゼを阻害することにより増加する、APP が γ -セクレターゼで切断された断片 (γ -CTF) の方が A よりも毒性が強く、マウスの認知機能を低下させるという報告もある (Oster-Granite ら 1996, Mitani ら 2012)。 γ -セクレターゼ阻害剤により γ -CTF は増加するが、ある程度まで増えるとそれ以上は増加しない事から、我々は γ -セクレターゼ以外にも APP の膜貫通ドメインを切断し、分解するメカニズムがあるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

APP は γ -セクレターゼ複合体によって膜貫通部位の膜内で 3-5 アミノ酸ずつ切断されて A を産生する (図 1)。

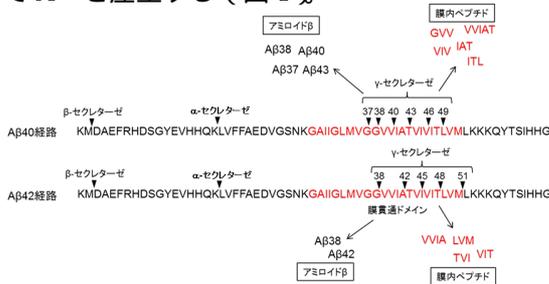


図1 γ -セクレターゼによる β APPの膜内切断

我々は APP が細胞膜内で切断された時に生成する 3-5 アミノ酸の膜内ペプチドを LC-MS/MS で定量する方法を確立した (大河内ら 2013)。この方法で γ -セクレターゼの主要な構成タンパクであるプレセニリン (PS) 1 と PS2 を欠損したマウス由来の細胞の膜内ペプチドを定量すると、 γ -セクレターゼによって切断されて生成した膜内ペプチドはほぼ検出されず、他の酵素で切断されて生成したと考えられる膜内ペプチドが検出された。 γ -セクレターゼと同様に、シグナルペプチドペプチダーゼやロンボイドプロテアーゼが膜内でタンパクを切断する事が知られているが、これらは APP を切断しない。このことから未知の膜内分解経路が存在する事が考えられる。本研究では PS1 と PS2 を欠損したヒト由来の細胞を、新しく開発されたゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 法を用いて作製し、 γ -セクレターゼ非依存的な膜内切断のメカニズムを解明することを目的とする。 γ -セクレ

ターゼ非依存的な膜内分解に關与するタンパクを同定し、活性化させることにより、A を産生せずに APP を分解する新しい AD の治療法につながる事が期待される。

3. 研究の方法

(1) CRISPR/Cas9 法による PS1/PS2 ダブルノックアウト細胞の作製
PS1 と PS2 の Exon3 または Exon4 の中で Cas9 が認識する PAM モチーフを含む 23 塩基をそれぞれ 4 力所選んだ。この DNA 配列に相補的な RNA と Cas9 タンパクを同時に発現させるプラスミドと、ターゲット配列が Cas9 で切断されると GFP が発現するプラスミドを作成した (Mashiko ら 2013)。これらのプラスミドをスウェーデン変異型 APP を恒常的に発現させた HEK293 細胞 (swAPP/HEK 細胞) にトランスフェクションし、最も GFP の発現が多いプラスミドを選択した。このプラスミドをトランスフェクションした細胞の中から GFP が発現している細胞を FACS で分取した。希釈して 6 ウェルディッシュに播種し、増殖した細胞のコロニーから 48 個のクローンを選択した。ターゲット配列をシーケンスして DNA の二本鎖切断が見られ、フレームシフトが起こっている細胞を選ぶ。この細胞で PS1 が発現していないことをウェスタンブロット法で確認した (swAPP/HEK PS1KO 細胞)。swAPP/HEK PS1KO 細胞の PS2 を同様の方法でノックアウトし、培養上清中の A を ELISA で定量して A の産生が無い事を確認した (swAPP/HEK PSDKO 細胞)。

(2) 薬剤処理

swAPP/HEK PSDKO 細胞にプロテアソーム、オートファジー、メタロプロテアーゼ等の様々なプロテアーゼを阻害する薬剤を 8 時間作用させ、細胞と培養上清を回収した。細胞を RIPA バッファーで可溶化し、 γ -CTF をウェスタンブロット法で定量した。

(3) 膜内ペプチドの定量

薬剤処理した細胞を 500 μ L の PBS に懸濁し、100、2 分加熱する。5 秒間、3 回超音波破碎し、100,000g、45 分超遠心する。上清に 1/10 量のトリクロロ酢酸を加え、15 分氷上で静置する。100,000g、45 分超遠心し、上清を 0.2 μ m のフィルターに通す。さらに逆相 HPLC (C18 カラム) で精製し、LC-MS/MS で膜内ペプチドを定量した。

4. 研究成果

(1) CRISPR/Cas9 法による PS1/PS2 ダブルノックアウト細胞の作製
CRISPR/Cas9 法で swAPP/HEK 細胞の PS1 をノックアウトし、DNA シーケンス及びウェスタンブロット法で PS1 の発現を確認したところ、48 クローン中 21 クローンでノックアウトが確認された。完全に PS1 が検出

Cell Rep. 2017 Oct 3, 21(1), 259–273
DOI: 10.1016/j.celrep.2017.09.032. 査読有

(2) Identification of Small Peptides in Human Cerebrospinal Fluid upon Amyloid- β Degradation.
Mizuta N, Yanagida K, Kodama TS, Tomonaga T, Takami M, Oyama H, Kudo T, Ikeda M, Takeda M, Tagami S, Okochi M
Neurodegener Dis. 2017 Jan 20;17 (2-3): 103-109. DOI: 10.1159/000453358. 査読有

〔学会発表〕(計 2件)

(1) γ -secretase modulator は AD 患者由来の iPSC 細胞にも効果がある
柳田 寛太 大山 洋 大河内 正康 田上 真次
児玉 高志 水田 直樹 阪口 岳 武田 雅俊
第 33 回日本認知症学会学術集会
2014.11.29-12.1

(2)CRISPR/CAS9 法による Presenilin1/
Presenilin2 ダブルノックアウト細胞の作製
柳田 寛太 田上 真次 児玉 高志 岡本 徹
松浦 善治 武田 雅俊 大河内 正康
第 34 回日本認知症学会学術集会
2015.10.2-10.4

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

6. 研究組織

(1)研究代表者

柳田 寛太 (YANAGIDA, Kanta)
大阪大学・医学系研究科・特任研究員
研究者番号：70467596

(2)研究分担者

大河内 正康 (OKOCHI, Masayasu)
大阪大学・医学系研究科・講師
研究者番号：90335357

田上 真次 (TAGAMI, Shinji)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：40362735

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()