

機関番号：82674

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390031

研究課題名（和文）老化に伴う糖鎖の機能的変化と老化関連疾患に関する研究

研究課題名（英文）Research on aging-related diseases and functional alterations of glycans during aging

研究代表者

遠藤玉夫（TAMA O ENDO）

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）
・東京都健康長寿医療センター研究所・研究部長

研究者番号：30168827

研究成果の概要（和文）：老化に伴う糖鎖変化および変化のメカニズムを解析し、機能障害や疾患との関連を解明することを目的とした。老化脳に見られる異所性の異常糖タンパク質蓄積機構には、酸化ストレスとプロテアソームが関与することを明らかにした。長寿高齢者の血中タンパク質の網羅分析を行い、酸化ストレス関連タンパク質の変動を発見し、健康長寿に酸化ストレスに対する適応応答の関与を示唆した。アルツハイマー病脳で糖転移酵素 GnT-III が増加することを見だし、GnT-III に A β 産生抑制作用があることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We aimed to clarify the relation between aging-related diseases and the glycan functions by researching the aging-associated glycan alterations and its regulatory mechanisms. At first, we demonstrated that the oxidative stresses and the proteasome functions influenced the accumulation of the ectopic abnormal glycoproteins in the aging brain. Secondary, we observed that the adaptive responses to the oxidative stresses took part in a healthy long life by analyzing the oxidative stress-associated blood proteins in the long life senior citizen (centenarian). Finally, we found that the glycosyltransferase, GnT-III expression was increased in Alzheimer's brains and the secretion of β -amyloid peptides from neuronal cells was inhibited by GnT-III.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2009年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：老化、糖鎖、アルツハイマー

1. 研究開始当初の背景

生体で作られるタンパク質の半数以上が糖鎖修飾を受けていることが明らかになっている。細胞の分化やがん化、免疫反応、発生など非常に広範な研究から、糖鎖の変化が細胞の生理状態を的確に反映していること、糖鎖が細胞や分子間の認識における重要な因子であることなど、糖鎖に関する多くの事

実が明らかになってきた。しかし、糖鎖は核酸(DNA、RNA)やタンパク質とは異なり鋳型から作られるのではなく、多数の糖転移酵素や糖分解酵素による複雑な連携によって形成される。そのため、細胞の状態のわずかな変化でも糖鎖修飾は影響を受ける可能性がある。その一方で、糖鎖は複雑な構造（構成糖の種類、多様な結合様式、複数の分岐構造）

で不均一な集団として存在することから、糖鎖研究は極めて困難な分野であった。我々は、これまでに独自の高感度糖鎖解析技術を基に、多くの糖鎖構造や様々な疾患における糖鎖変化、糖タンパク質および関連酵素の発現変化を明らかにしてきた。

2. 研究の目的

老化に伴う糖鎖変化および変化のメカニズムを解析し、老化のプロセスで起こる機能障害や老化疾患との関連を明らかにすることを目的として、以下の研究を行った。

(1) 老化組織に異常蓄積する糖タンパク質の蓄積メカニズムの解明

これまでに、老化に伴って細胞内に異常蓄積する糖タンパク質を見だし、老化により糖タンパク質の代謝異常が起こることを示してきた。そこで、その蓄積メカニズムを明らかにするために、糖タンパク質の品質管理機構と糖鎖の関与について検討した。

(2) アルツハイマー病脳における糖鎖変化とアミロイド前駆体タンパク質 (APP) 代謝との関連の解析

これまでに、A β 産生におけるシアル酸転移酵素の関与や老化脳に伴うシアル酸量や局在の変化を見だし、老化による脳の機能低下や認知症に糖鎖が深く関与することを示してきた。そこで、アルツハイマー病と糖鎖の関係について検討した。

(3) α -klotho 遺伝子欠損による異常糖鎖の蓄積機構および糖鎖に関連する α -klotho タンパク質の機能解明

これまでに、個体老化のモデルと考えられている α -klotho 遺伝子変異マウスの解析から、 α -klotho 遺伝子の欠損はタンパク質分解酵素カルパインの異常な活性化を腎臓と肺で引き起こすことを見だし、肺気腫や腎症など組織特異的な障害の要因となる可能性を示した。 α -klotho タンパク質が糖分解酵素に高い相同性を示すことから、糖鎖や糖タンパク質との関連について検討した。

3. 研究の方法

(1)① 老化に伴いカテプシン D が細胞質に蓄積するメカニズムについて、神経細胞とアストロサイトを用いて検討した。両細胞に様々なストレスの負荷や薬物的な代謝阻害を行なうことにより、どのような経路が糖タンパク質の細胞質への蓄積に関与するか検討した。

② ヒト長寿モデルと考えられる 105 歳以上の高齢者の血液タンパク質について若年群とプロテオーム解析法により比較検討した。

(2)① 正常型と 2 種類の変異型 APP をマウス神経芽細胞株 Neuro2a 細胞に発現させそれぞれ APP を精製後、ヒドラジン分解法により N 結合型糖鎖を遊離させ、得た遊離糖鎖を各種カラムクロマトグラフィーと酵素逐次分解法を組み合わせ分析した。

② アルツハイマー病患者脳における *GnT-III* mRNA の発現量を定量 RT-PCR 法により解析した。Neuro2a 細胞に *GnT-III* を強制発現させ A β 産生量の変化、APP 分解酵素 (TACE, BACE) への影響について調べた。

③ Neuro2a 細胞に食品成分などの天然化合物を添加し、*GnT-III* mRNA の発現量を定量 RT-PCR 法により調べた。

(3) α -klotho 遺伝子変異マウスの各臓器のタンパク質を分画し、レクチンおよびウエスタンブロットにより糖鎖および糖タンパク質の変化について野生型マウスと比較解析した。

4. 研究成果

(1)① 老化脳でリソソーム酵素であるカテプシン D が細胞質に蓄積する現象は、神経細胞とアストロサイトに対する酸化ストレスの暴露、並びにプロテアソーム阻害剤処理により細胞レベルで再現された。この結果、細胞質へのカテプシン D の蓄積は、酸化ストレスとプロテアソームが関与することが明らかになった。今後、細胞質に蓄積したカテプシン D がタンパク質分解酵素として働き、老化に伴う細胞の機能低下と関連しているかが重要な課題である。

② ヒト長寿モデルと考えられる 105 歳以上の高齢者の血液タンパク質のプロテオーム解析を行った。その結果、酸化ストレスに関連するタンパク質群が変動していることが明らかになった。ヒト長寿モデルにおいて酸化ストレスタンパク質の変動が初めて明らかになった。これまで酸化ストレスは、動物実験などで寿命に影響を与える一つの因子であると考えられているが、実際ヒト健康長寿者で酸化ストレスへの適応応答が重要であることが示唆された意義は非常に大きい。

(2)① 正常型および変異型 APP 由来糖鎖は、2 本鎖及び 3 本鎖複合型が主要糖鎖であった。正常型と比較して変異型には bisecting GlcNAc 及び Fucose を有する糖鎖の存在比が高かった。この糖鎖変化は 2 つの変異型に共通しており、糖鎖が APP 代謝に影響を及ぼす可能性が強く示唆された。疾患の大部分を占める弧発性アルツハイマー病においても APP の糖鎖変化により APP の代謝異常が引き起こされている可能性が考えられた。

② アルツハイマー病脳では健常脳と比較して *GnT-III* mRNA の量が症状の進行に伴って

有為に増加していた。GnT-III は bisecting GlcNAc 構造を合成する糖転移酵素である。①の結果からも変異型 APP で bisecting GlcNAc が増加しており、GnT-III あるいは bisecting GlcNAc がアルツハイマー病の病態に深く関与する可能性がある。そこで、Neuro2a 細胞を用いて GnT-III を強制発現させた結果、コントロール細胞に比べ A β 40 と A β 42 の産生量が約 4 割減少した。また、A β ペプチドを添加して細胞を培養したところ、GnT-III mRNA の発現が増加した。これらの結果から、GnT-III には A β の産生を抑制する作用があり、アルツハイマー病脳で見られる GnT-III mRNA の増加は、A β の産生を抑えるための防御反応である可能性が考えられた。

さらに、APP の代謝関連酵素に対する GnT-III の影響を調べた。その結果、GnT-III は TACE と BACE の糖鎖を変化させること、BACE の発現量を減少させること、BACE の酵素活性を減少させること、を明らかにした。以上の結果、細胞における糖鎖の発現変化が A β の産生を抑えるというメカニズムを新たに提唱した。

③ GnT-III による A β 産生抑制作用はアルツハイマー病の新たな予防および治療法開発に応用できる可能性がある。そこで、GnT-III の発現を誘導する食品成分などの化合物の探索を行った。これまでに、ある種のポリフェノール類が神経細胞において GnT-III の発現を誘導するという興味深い知見を得ている。現在、より強力な GnT-III 誘導作用を有する分子の探索を進めている。

(3) α -klotho 遺伝子変異マウスでは肺と腎臓特異的に蓄積する糖鎖(糖タンパク質)が観察される。これらの臓器では細胞内タンパク質分解酵素であるカルパインの異常活性化も見られることから、糖鎖異常との関連も考えられる。異常糖鎖の組織内分布について詳細に検討した結果、異常糖鎖は組織全体に一樣に蓄積しているのではなく、ある細胞画分に特異的に蓄積していることが明らかになった。現在、異常糖鎖の構造解析が進行中である。

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 7 件)

Keiko Akasaka-Many, Hiroshi Many, Yoko Sakurai, Boguslaw S. Wojczyk, Steven L. Spitalnik, Tamao Endo: Increased bisecting and core-fucosylated N-glycans on mutant human amyloid precursor proteins. Glycoconj. J., 25(8), 775-786, 2008

Yuri Miura, Yoko Sakurai, Masato Hayakawa, Yukiko Shimada, Hans Zempel, Yuji Sato, Shin-ichi Hisanaga, Tamao Endo: Translocation of Lysosomal Cathepsin D Caused by Oxidative Stress or Proteasome Inhibition in Primary Cultured Neurons and Astrocytes. Biol. Pharm. Bull., 33(1), 22-28, 2010

Keiko Akasaka-Many, Hiroshi Many, Yoko Sakurai, Boguslaw S. Wojczyk, Yasunori Kozutsumi, Yuko Saito, Naoyuki Taniguchi, Shigeo Murayama, Steven L. Spitalnik, Tamao Endo: Protective effect of N-glycan bisecting GlcNAc residues on β -amyloid production in Alzheimer's disease. Glycobiology, 20(1), 99-106, 2010

Hiroshi Many, Keiko Akasaka-Many, Tamao Endo: Klotho protein deficiency and aging. Geriatr. Gerontol. Int., 10(Suppl.1), S80-S87, 2010

Yuri Miura, Tamao Endo: Survival responses to oxidative stress and aging. Geriatr. Gerontol. Int., 10(Suppl.1), S1-S10, 2010

Yuji Sato, Tamao Endo: Alteration of brain glycoproteins during aging. Geriatr. Gerontol. Int., 10(Suppl.1), S32-S40, 2010

Yuri Miura, Yuji Sato, Yasumichi Arai, Yukiko Abe, Michiyo Takayama, Tosifusa Toda, Nobuyoshi Hirose, Tamao Endo: Proteomic analysis of plasma proteins in Japanese semisuper centenarians. Exp. Gerontol., 46, 81-85, 2011

[学会発表] (計 13 件)

赤阪-萬谷啓子、萬谷博、櫻井洋子、小堤保則、齊藤祐子、谷口直之、村山繁雄、遠藤玉夫: Bisecting GlcNAc による β -amyloid 産生の抑制。第 81 回日本生化学会大会、神戸、2008.12.9-12

Tamao Endo, Hiroshi Many, Keiko Akasaka-Many: Increased bisecting and core fucosylated N-glycans on mutant human amyloid precursor proteins. 9th International conference AD/PD 2009, Prague, Czech Republic, 2009.3.11-15

萬谷博、赤阪-萬谷啓子、遠藤玉夫: klotho マウスを用いた抗老化研究。日本薬学会第 129 年会、京都、2009.3.26-28

萬谷博、赤阪-萬谷啓子、櫻井洋子、齊藤祐子、村山繁雄、遠藤玉夫: N-アセチルグルコサミン転移酵素 III による β アミロイド産生の抑

制. 第 32 回日本基礎老化学会, 横浜, 2009.6.19-20

萬谷博、赤阪-萬谷啓子、櫻井洋子、齊藤祐子、村山繁雄、遠藤玉夫: N-アセチルグルコサミン転移酵素 III の β アミロイド産生抑制作用. 第 29 回日本糖質学会年会, 高山, 2009.9.9-11

赤阪-萬谷啓子、萬谷博、櫻井洋子、齊藤祐子、村山繁雄、遠藤玉夫: 糖転移酵素による β アミロイド産生抑制作用. 第 82 回日本生化学会大会, 神戸, 2009.10.21-24

赤阪-萬谷啓子、萬谷博、櫻井洋子、齊藤祐子、村山繁雄、遠藤玉夫: Inhibitory effect of N-acetylglucosaminyltransferase III on β -amyloid production. 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009.12.9-12

三浦ゆり、遠藤玉夫: 老化に伴う糖タンパク質の細胞質蓄積に及ぼす酸化ストレス及びプロテアソーム阻害の関与. 第 33 回基礎老化学会, 名古屋, 2010.7.27-30

Hiroshi Manya, Keiko Akasaka-Manya, Yoko Sakurai, Tamao Endo: Protective effect of N-glycan bisecting GlcNAc residues on β -amyloid production in Alzheimer's disease. The 28th Naito Conference Glycan Expression and Regulation [I], Hayama, Japan, 2010.7.27-30

Keiko Akasaka-Manya, Hiroshi Manya, Yoko Sakurai, Yuko Saito, Shigeo Murayama, Tamao Endo: Structural alteration of N-glycan on APP and β -amyloid production. The 7th GlycoT, Tokyo, 2010.7.30-8.1

Tamao Endo: Age-associated translocation of glycoproteins caused by oxidative stress and proteasome inhibition. XXV International Carbohydrate Symposium, Chiba, 2010.8.6-10

Hiroshi Manya, Keiko Akasaka-Manya, Tamao Endo: Inhibitory effect of N-acetylglucosaminyltransferase III on β -amyloid production in Alzheimer's disease. Neuroscience 2010, San Diego, CA, USA, 2010.11.13-17

Tamao Endo: Regulation of beta-amyloid production in Alzheimer's disease by N-glycan processing. 10th International Conference AD/PD 2011, Barcelona, Spain, 2011.3.9-13

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠藤玉夫 (TAMA O ENDO)

地独東京都健康長寿医療センター・東京都健康長寿医療センター研究所・研究部長
研究者番号:30168827

(2) 連携研究者

櫻井洋子 (YOKO SAKURAI)

地独東京都健康長寿医療センター・東京都健康長寿医療センター研究所・シニアスタッフ

研究者番号:50344065