

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23760758

研究課題名(和文)ケミカルバイオロジーによる糖脂質誘導型アミロイドーシスの解明

研究課題名(英文)Chemical biology approach to ganglioside-induced amyloidosis

研究代表者

迫野 昌文(SAKONO, MASAFUMI)

独立行政法人理化学研究所・伊藤細胞制御化学研究室・客員研究員

研究者番号：50391959

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病の原因物質であるアミロイドベータは、細胞膜上の糖脂質GM1と結合することで凝集核を形成し、アミロイド凝集を促進していると考えられている。本研究では、糖脂質-アミロイドベータ相互作用を明らかにするために、GM1構造をベースにした様々な非天然糖脂質の合成を目的とした。クリック反応による化合物の導入が可能なGM1の糖鎖部位の合成経路の検討を行い、糖脂質の合成指針を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Amyloid beta which is causative agent of Alzheimer's disease is widely known to form aggregate nucleation by binding with ganglioside GM1, and this nucleation is suggested to enhance aggregation of amyloid beta in vivo. In this study, the synthesis of non-native form ganglioside based on GM1 structure was investigated to clarify the interaction between ganglioside and amyloid beta. We examined synthesis pathway of GM1-type glycan which possess reactive site by click chemistry, and obtained optimal synthesis method.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学、生物機能・バイオプロセス

キーワード：ガングリオシド アミロイド アミロイドベータ 糖鎖生物学 脂質ラフト

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病は老人性認知症の約半分を占める主要な神経変性疾患である。その発症機序として最も有力なのがアミロイドベータカスケード仮説である。40前後のアミノ酸からなるアミロイドベータペプチドがベータシート構造を分子間で形成しながら、ペプチド間で超分子的に規則的凝集構造を形成する。その凝集体が脳神経細胞へ沈着、機能死に至らしめる。前駆体からのアミロイドベータの生成を遺伝子工学的手法で抑制すると、アポトーシスによる個体死を招くことから、アミロイドベータの生成を抑制することはアルツハイマー病の治療につながると思われている。したがって、アルツハイマー病の予防および治療には、アミロイドベータの凝集化の抑制にあるという考えが、現在は主流である。

ペプチド濃度が高い条件において、アミロイドベータの凝集化は試験管中で自発的に達せられることがよく知られている。しかし、生体内におけるアミロイドベータ濃度ははるかに低く、なぜ低い濃度でアミロイド凝集を生じるのか長い間不明であった。近年、細胞膜上に存在する糖脂質 GM1 がアミロイドベータと複合体を形成し、この複合体がアミロイド凝集体の凝集核として機能している可能性が出てきた。GM1 は、スフィンゴミエリンやコレステロールなどととも脂質ラフトと呼ばれるドメインを細胞膜上で形成し、細胞間の情報伝達など重要な役割を果たしている。アルツハイマー病患者において、ラフトに形成された GM1 にアミロイドベータが結合していることが明らかになった。また、リン脂質に GM1 とコレステロールを添加し人工的にラフト様クラスターをもつリポソームを作製し、低濃度のアミロイドベータと共存したところ、GM1 とアミロイドベータは結合し、さらにアミロイド凝集化が確認された。したがって、アミロイドベータは GM1 と極めて強く相互作用し、ベータシートを形成しやすい形にストレスを受け、アミロイド化の凝集核として機能していると考えられる。

2. 研究の目的

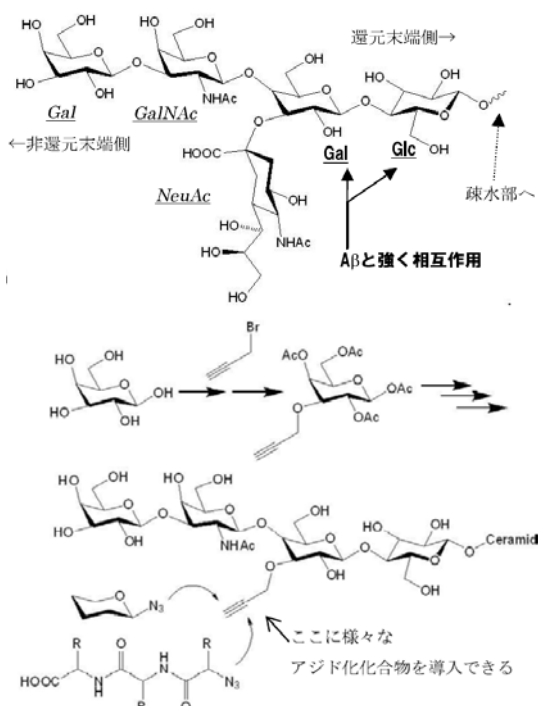
GM1 は親水部として働く糖鎖と疎水部として働く二本のアルキル鎖で構成される。GM1 とアミロイドベータの複合体を NMR を用いて構造解析したところ、特に糖鎖部位の還元末端に位置する Glucose (Glc) と Galactose (Gal) がアミロイドベータと強く相互作用していることが示された。したがって、この 2 つの糖はアミロイドベータのアミロイド凝集化に極めて重要な役割を持つと考えられる。これまでの先行研究より明らかになっていることは、①患者の組織においてアミロイ

ドベータと GM1 は複合体を形成し、この複合体はアミロイド凝集を促進する、②GM1 に含まれる Glc および Gal の 2 糖はアミロイドベータと強く相互作用する、という大きく 2 点である。しかし、これまでの研究では、天然の糖脂質を用いた研究がほとんどであるため、得られる知見に限界があった。したがって、より詳細に GM1 とアミロイドベータの相互作用を調べるためには、天然に存在しない構造の GM1 類似型糖脂質を用いることが重要であると考えられる。

本研究では GM1 構造を基盤とした非天然型糖脂質の化学合成を行い、アミロイドベータとの複合化における糖鎖の構造による影響を解明することを目的とする。GM1 以外の、Glc, Gal を有する別の糖脂質においても、アミロイドベータとの複合化およびアミロイド凝集促進が実験的に確認されている。その際、凝集速度が GM1 と異なることが明らかになっている。このことは、Glc および Gal 以外の、非還元末端側の糖の構造が、ベータシート化を含むアミロイドベータの構造転移に積極的に関わっていることを示唆している。よって、GM1 の非還元末端側に位置する Gal, N-acetyl-galactosamine (GalNAc), N-acetylneuraminic acid (NeuAc) はそれぞれベータシート構造転移への役割を有していると推察される。特に、NMR を用いた構造解析において、NeuAc は、アミロイドベータとの弱い相互作用が確認されている。シアル酸である NeuAc は、他の糖に比べて分子内に多くの水酸基やカルボン酸を有しており、アミロイドベータとの水素結合の作用点としてベータシート転移へ大きく関わっているのではないかと推察される。本研究では、この非還元末端の糖 NeuAc を他の糖に置換した GM1 類似型非天然糖脂質を作製し、アミロイド凝集実験、ならびに非天然糖脂質とアミロイドベータの相互作用に関わる物理的パラメータの計測等を行う。

3. 研究の方法

クリック反応をベースにした非天然型糖脂質の合成を行う。還元末端側に位置する Gal と NeuAc の結合箇所にアルキンを提示することで、元の NeuAc の位置に様々なアジド化合物を結合することが可能となる。本研究では、NeuAc よりも水酸基が少なく位置の異なる糖およびペプチドを結合する。作製した非天然型糖脂質を、リン脂質リポソームに組み込むことで糖脂質を有する細胞膜モデルを作製する。GM1 糖鎖部位の NeuAc の位置に異なる糖および化合物を結合する手段としてクリック反応を用いることとする。選択性が高く、他の官能基と反応しないため本研究のような糖鎖への導入には最適であると言える。本研究では還元末端側の Gal の 3 位の位置で導入を行う。図に示すようにプロパ



ルギルブロミドを用いて3位の水酸基にアルキンを導入し、他の水酸基をすべてアセチル化する。このGalに、Gal, GalNAc, Glcをそれぞれ結合し直鎖4糖を調製する。Glcの1位にセラミドを結合することで、親水部のGalにクリック反応部位を提示したGM1類似非天然型糖脂質の骨格が形成されると期待される。

4. 研究成果

(1)4-Methoxyphenyl4-*O*-(2,6-Di-*O*-benzyl-β-D-galactopyranosyl)-2,3,6-tri-*O*-benzyl-β-D-glucopyranosideのGal3位水酸基をTBDMSで保護しグリコシルアクセプターを調製した。次に、4-Methoxyphenyl3-*O*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranosyl)-2-azido-4,6-*O*-benzylidene-2-deoxy-β-D-galactopyranosideの還元末端水酸基を保護するメトキシフェニル基を脱保護したのち、同箇所にイミデートを導入した。これをグリコシルドナーとして、先に調製したグリコシルアクセプターとのグリコシル反応を行った。反応温度を-40°Cから室温まで様々に変えて反応を行ったが反応の進行は確認されなかった。

(2)4-Methoxyphenyl4-*O*-(2,6-Di-*O*-benzyl-β-D-galactopyranosyl)-2,3,6-tri-*O*-benzyl-β-D-glucopyranosideのGal3位水酸基の保護をTBDMSからアリルに変更した。臭化アリルとの反応においてスズを用いることで選択的にGal3位水酸基を保護することに成功した。先に調製したグリコシルドナーを用いてグリコシル化を行った。反応温度を-40°Cから室温まで様々に変えて反応を行った。生成物の存在が確認されたが反応効率は非常に低かった。

(3)4-Methoxyphenyl3-*O*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranosyl)-2-azido-4,6-*O*-benzylidene-2-deoxy-β-D-galactopyranosideのGalNAc2位のアジドがグリコシル化反応の反応効率低下を招いていると考えられる。そこで、アジドを還元しNHTrocの形に変換した化合物を調製した。新しいグリコシルドナーを用いて、グリコシル反応の最適化を検討している。

(4)今後合成した4糖の還元末端に脂肪酸を結合し脂質ミミックな化合物を調製する。リン脂質およびコレステロールで構成するリポソームを調製し、合成脂質を混合することで、生体膜を模倣する。ラフトを有する生体膜とアミロイドベータの相互作用研究を行っていく予定である。

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9件)

① Masafumi Sakono, Konomi Motomura, Tatsuo Maruyama, Noriho Kamiya, Masahiro Goto:

Alpha casein micelles show not only molecular chaperone-like aggregation inhibition properties but also protein refolding activity from the denatured state.

Biochemical and Biophysical Research Communications, 404 (2011) 494-497. 査読付き
doi: 10.1016/j.bbrc.2010.12.009.

② Masafumi Sakono, Shigenori Akiyama, Tamotsu Zako, Shujiro Sakaki, Tomonori Waku, Naoki Tanaka, Mizuo Maeda:

Application of two morphologically different fibrillar and filamentous insulin amyloids as a biomaterial for cell culture surfaces.

Reactive and Functional Polymers, 71 (2011) 324-328. 査読付き
doi: 10.1016/j.reactfunctpolym.2010.10.012

③ Masafumi Sakono, Shigenori Akiyama, Tamotsu Zako, Shujiro Sakaki, Tomonori Waku, Naoki Tanaka, Mizuo Maeda:

Immobilized insulin amyloid enhances cell adhesion and proliferation due to interaction with fibronectin.

Chemistry Letters, 40 (2011) 315-317. 査読付き
doi: 10.1246/cl.2011.315

④ Masafumi Sakono, Tamotsu Zako, and Mizuo Maeda:

Naked-eye detection of amyloid aggregates by gold nanoparticles conjugated with amyloid beta antibody.

Analytical Sciences, 28 (2012) 73-76. 査読付き
doi: 10.2116/analsci.28.73

⑤ Masafumi Sakono, Tamotsu Zako, Masafumi Yohda and Mizuo Maeda:

Amyloid oligomer detection by immobilized molecular chaperone.

Biochemical Engineering Journal, 61 (2012) 28-33. 査読付き

doi: 10.1016/j.bej.2011.12.005

⑥ Tomohiro Hiraishi, Koichi Yamashita, Masafumi Sakono, Jun Nakanishi, Tan Liu Tzea, Kumar Sudesh, Hideki Abe, and Mizuo Maeda:

Display of Functionally Active PHB Depolymerase on Escherichia coli Cell Surface.

Macromolecular Bioscience, 12 (2012) 218-224. 査読付き

doi: 10.1002/mabi.201100273

⑦ Tamotsu Zako, Masafumi Sakono, Takahiro Kobayashi, Karin Sörgjerd, K. Peter R. Nilsson, Per Hammarström, Mikael Lindgren, and Mizuo Maeda:

Cell interaction study of amyloid using luminescent conjugated polythiophene: Implication that amyloid cytotoxicity is correlated with prolonged cellular binding.

ChemBioChem, 13 (2012) 358-363. 査読付き

doi: 10.1002/cbic.201100467.

⑧ Masafumi Sakono, Arata Utsumi, Tamotsu Zako, Tetsuya Abe, Masafumi Yohda and Mizuo Maeda:

Formation of non-toxic A β fibrils by small heat shock protein under heat-stress conditions.

Biochemical and Biophysical Research Communications, 430 (2013) 1259-1264. 査読付き

doi: 10.1016/j.bbrc.2012.12.059

⑨ Karin Margareta Sörgjerd, Tamotsu Zako, Masafumi Sakono, Peter C. Stirling, Michel R. Leroux, Takashi Saito, Per Nilsson, Misaki Sekimoto, Takaomi C. Saido, and Mizuo Maeda:

Human Prefoldin Inhibits Amyloid- β (A β) Fibrillation and Contributes to Formation of Nontoxic A β Aggregates.

Biochemistry, 52 (2013) 3532-3542. 査読付き

doi: 10.1021/bi301705c.

[学会発表] (計 11 件)

① 迫野 昌文、小林 隆宏、座古 保、Lindgren Mikael、Nilsson Peter、Hammarstrom Per、前田 瑞夫、低毒性アミロイド様インスリン凝集体の構造特性、化学工学会第 76 年会、東京 2011 年 3 月 22 日

② 迫野昌文、武田陽一、八須匡和、瀬古玲、伊藤幸成、“フォールディングセンサー” UDP-Glc:Glycoprotein Glucosyltransferase

(UGGT) の基質認識に伴う構造変化に関する検討、GlycoTOKYO2011、東京 2011 年 11 月 9 日

③ Masafumi Sakono, Yoichi Takeda, Masakazu Hachisu, Akira Seko, Yukishige Ito

Conformational Change of Folding Sensor Enzyme

UDP-Glc:Glycoprotein Glucosyltransferase (UGGT) by Interaction with Carbohydrate Substrates, The 3rd Asian Communication for Glycobiology and Glycotechnology, Shnghai, 2011 年 11 月 27 日

④ 迫野 昌文、座古 保、養王田 正文、前田 瑞夫、分子シャペロンによるアミロイドベータオリゴマーの検出、化学工学会第 77 年会、東京 2012 年 3 月 15 日

⑤ 迫野昌文、武田陽一、八須匡和、瀬古玲、伊藤幸成、糖基質との相互作用に伴う“フォールディングセンサー” UDP-Glc:Glycoprotein Glucosyltransferase (UGGT) の構造変化に関する検討、農芸化学会 2012 年度大会、京都 2012 年 3 月 23 日

⑥ 迫野昌文、瀬古玲、武田陽一、八須匡和、小泉 晶彦、藤川 紘樹、伊藤幸成、カルネキシンおよびカルメギンのレクチン様分子シャペロン活性の相同性に関する検討、第 31 回日本糖質学会年会、鹿児島 2012 年 9 月 17 日

⑦ 迫野昌文、瀬古玲、武田陽一、八須匡和、小泉晶彦、藤川紘樹、伊藤幸成、カルネキシンおよびカルメギンのレクチン様分子シャペロン活性の比較、GlycoTOKYO2012、東京 2012 年 11 月 17 日

⑧ 迫野昌文、瀬古玲、武田陽一、八須匡和、小泉 晶彦、藤川 紘樹、伊藤幸成、合成糖鎖基質を用いたカルネキシンおよびカルメギンのシャペロン活性の比較、農芸化学会 2013 年度大会、仙台 2013 年 3 月

⑨ 迫野昌文、瀬古玲、武田陽一、八須匡和、小泉 晶彦、藤川 紘樹、伊藤幸成、合成基質を用いた糖タンパク質品質管理機構の解明、化学工学会第 78 年会、大阪 2013 年 3 月 25 日

⑩ Tatsuo Kiuchi, Yutaka Makimura, Ryo Okamoto, Masayuki Izumi, Akira Seko, Masafumi Sakono, Akiko Kanamori, Yukishige Ito, Yasuhiro Kajihara, Synthesis of Erythropoietin bearing high-mannose type oligosaccharide, The 3rd Austria/Japan Seminar on Comparative and Developmental Glycobiology, Wako, 2013 年 7 月 1 日

⑪ Masakazu Hachisu, Akira Seko, Shusaku

Daikoku, Yoichi Takeda, Akihiko Koizumi, Kohki Fujikawa, Masafumi Sakono, Yukishige Ito, Analysis of UGGT by using misfolded glycoprotein mimics, The 3rd Austria/Japan Seminar on Comparative and Developmental Glycobiology, Wako, 2013 年 7 月 1 日

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

6. 研究組織

(1)研究代表者

迫野昌文 (SAKONO MASAFUMI)

独立行政法人理化学研究所・伊藤細胞制御

化学研究室・客員研究員

研究者番号：50391959