

平成21年 5月29日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2006 ~ 2008

課題番号：18770119

研究課題名 (和文) ヘパラン硫酸 60-硫酸基転移酵素によるアルツハイマー病進行仮説の検証

研究課題名 (英文) Elucidation of the role of heparan sulfate 60-sulfotransferase to the progression of Alzheimer's disease

研究代表者 永井 尚子 (NAGAI NAOKO)

愛知医科大学 分子医科学研究所 助教

研究者番号：00367799

研究成果の概要：

アミロイド前駆体タンパク質からアミロイドβペプチドを切り出し、アルツハイマー病の進行に関与するとされる酵素であるβセクレターゼの活性が阻害された場合、ヘパラン硫酸 60-硫酸基転移酵素は小胞体に蓄積した。このとき、ヘパラン硫酸 60-硫酸基転移酵素とアミロイド前駆体タンパク質は共局在し、両者の相互作用が免疫沈降法により確認された。よってアミロイド前駆体タンパク質がヘパラン硫酸 60-硫酸基転移酵素の局在を調節する因子である可能性が示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,700,000	0	1,700,000
2007年度	900,000	0	900,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	270,000	3,770,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：糖鎖・ヘパラン硫酸・ヘパラン硫酸 60-硫酸基転移酵素・アルツハイマー病・βセクレターゼ

## 1. 研究開始当初の背景

細胞外に存在する多糖の一種であるヘパラン硫酸は、ウロン酸とグルコサミン残基が直鎖状に交互に繰り返す構造を持ち、硫酸化の修飾を受ける。硫酸化の修飾の種類として、N-硫酸化、20-硫酸化、60-硫酸化、30-硫酸化がある (図1)。

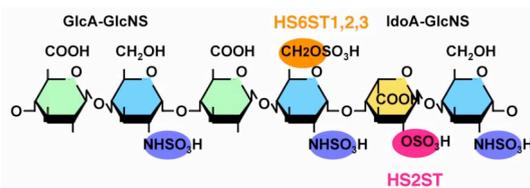


図1：ヘパラン硫酸糖鎖の構造 図中青がN-硫酸化、ピンクが20-硫酸化、オレンジが60-硫酸化を示す。

ヘパラン硫酸の硫酸化に関わる硫酸基転移酵素は細胞内のゴルジ体で働く酵素であるにもかかわらず、60-硫酸基転移酵素の活性は培養細胞の培養上清、血清中に見いだされ、細胞外への分泌が起こっていることが示されている（表1）。

		Sulfotransferase activity pmol/min/1.5 × 10 <sup>6</sup> cells	
		HS6ST	HS2ST
Cell extract		1.9 ± 0.2	3.8 ± 0.2
Culture medium		13.2 ± 0.3	1.7 ± 0.2

Habuchi et al., JBC 273 (15), 9208, 1998

表1：細胞内外のヘパラン硫酸 60-硫酸基転移酵素活性とヘパラン硫酸 20-硫酸基転移酵素活性

ヘパラン硫酸 60-硫酸基転移酵素のアイソフォームの一つ HS6ST-3 は、アミロイド前駆体蛋白質からアミロイドβペプチドを生成する切断酵素βセクレターゼの活性が阻害されたときに細胞内に蓄積することが発見された。このとき、ヘパラン硫酸の60-硫酸化も増加した。βセクレターゼはアルツハイマー病が発症・進行する上で重要な役割を果たすことが知られており、ヘパラン硫酸の60-硫酸化がアルツハイマー病の発症・進行に関わっている可能性が考えられた。

## 2. 研究の目的

1に述べたようにβセクレターゼの活性とヘパラン硫酸の60-硫酸化の間に関連性が観察されることから、ヘパラン硫酸の60-硫酸化がアルツハイマーの発症・進行に対して何らかの役割を果たしている可能性が考えられる。この可能性について検討するためには、βセクレターゼ活性がヘパラン硫酸60-硫酸基転移酵素の細胞外分泌を制御するメカニズムについての詳細な解明が必要である。βセクレターゼはアミロイド前駆体タンパク質、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質などを切断する活性を持つことからヘパラン硫酸60-硫酸基転移酵素もβセクレターゼの基質である可能性が考えられたが、*in vitro*の解析においては切断活性を示さなかった。このことよりβセクレターゼ依存的にヘパラン硫酸60-硫酸基転移酵素の細胞外への分泌を制御する因子の存在が示唆された（図2）。

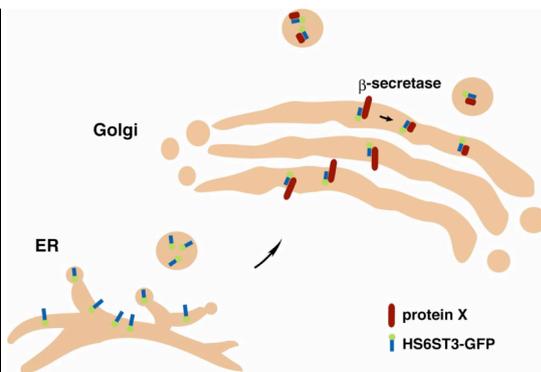


図2：ヘパラン硫酸 60-硫酸基転移酵素 HS6ST-3 の細胞外への分泌のモデル図。HS6ST-3 は細胞内ではβセクレターゼ依存性の未知の因子タンパク質 X (protein X) と相互作用しており、タンパク質 X がβセクレターゼによって切断されることにより細胞外へ分泌されるようになる。

そこで本研究では（1）ヘパラン硫酸60-硫酸基転移酵素の細胞外分泌を制御する機構の解明ならびに（2）ヘパラン硫酸60-硫酸基転移酵素の細胞外分泌を制御する制御因子の同定を目指し解析を行った。

## 3. 研究の方法

### （1）ヘパラン硫酸60-硫酸基転移酵素

（HS6ST）に緑色蛍光タンパク質（GFP）をタグとして繋いだGFP融合タンパク質をCHO-K1細胞に発現させた。βセクレターゼ阻害剤によりβセクレターゼ活性が阻害されたときにHS6STが蓄積する細胞内の部位を細胞内小器官マーカータンパク質との局在を比較して検討した。また、細胞を放射性同位体<sup>35</sup>S-メチオニンでパルスラベルし、エンドグリコシダーゼHに対する感受性を経時的に調べることで分泌が阻害されている、細胞内の部位について検討した。

（2）βセクレターゼの基質の一つであるアミロイド前駆体タンパク質（APP）はβセクレターゼに感受性を持つため、HS6ST3-GFPの細胞内局在調節因子として働く可能性が考えられる。そこで、βセクレターゼ阻害剤によりβセクレターゼ活性が阻害されたときのHS6ST-3とAPPの局在を比較して検討した。また、HS6ST-GFP発現細胞株の細胞抽出液を用いて抗GFP抗体による免疫沈降を行った後に抗APP抗体でウエスタンブロッティングを行い、両者の間の相互作用について検討した。

（3）さらに、HS6ST-GFP発現細胞株の細胞抽出液を用いて抗GFP抗体による免疫沈降を行った。共沈降した候補タンパク質についてペプチドマス・フィンガープリンティングを行い、HS6STに相互作用するタンパク質の同

定を試みた。

#### 4. 研究成果

(1) HS6ST3-GFP は定常状態ではゴルジ体のマーカータンパク質と共局在するが、 $\beta$ セクレターゼの阻害剤で細胞を処理した後は細胞内に広がった局在を示す。このときゴルジ体マーカー、小胞体マーカー、エンドソームマーカーとの局在を比較したところ、小胞体マーカーとの一致が観察された (図3)。

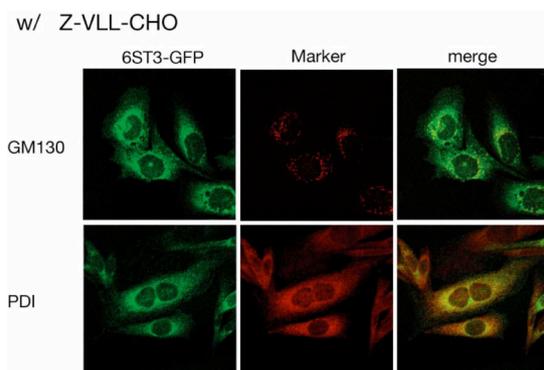


図3： $\beta$ セクレターゼ阻害剤 (Z-VLL-CHO) 存在下でHS6ST3-GFPは小胞体マーカーPDIと局在が一致する

確認のために 35S メチオニンを用いた Pulse-chase の実験を行ったところ、 $\beta$ セクレターゼ阻害剤を添加しない場合は 60 分経過するとエンドグリコシダーゼH抵抗性のバンドが現れるが、添加した場合はエンドグリコシダーゼH感受性のままであった。これらより、 $\beta$ セクレターゼの活性が阻害されるとHS6ST3-GFPは小胞体に留まると考えられる。

(2)  $\beta$ セクレターゼの基質の一つであるアミロイド前駆体タンパク質 (APP) は $\beta$ セクレターゼに感受性を持ったため、HS6ST3-GFPの細胞内局在調節因子として働く可能性が考えられた。HS6ST3-GFPとAPPの局在を比較したところ、 $\beta$ セクレターゼ阻害剤を添加しない場合は両者共にゴルジ体に、添加した場合は小胞体に局在が一致していた (図4)。

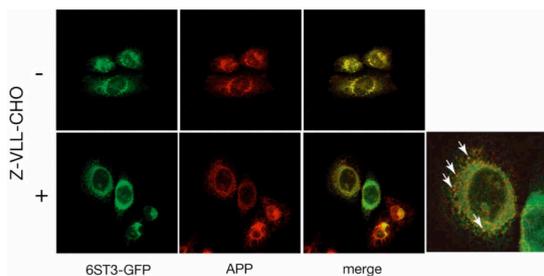


図4： $\beta$ セクレターゼ阻害剤 (Z-VLL-CHO) 未添加、添加時のHS6ST3-GFPとAPPの細胞

内局在

また、抗 GFP 抗体で免疫沈降を行い、抗 APP 抗体でウェスタンブロッティングを行うと、沈降物中に微量ではあるが APP の存在が確認された。

(3) APP の他に HS6ST3-GFP と相互作用する因子を同定するために HS6ST3-GFP 発現細胞株の細胞抽出液を抗 GFP 抗体で免疫沈降し、共に溶出してきたタンパク質についてペプチドマス・フィンガープリント法により同定を試みた。その結果、ミオシン並びに、アクチンの重合を形成するタンパク質など、細胞内輸送に関わると考えられるタンパク質が複数同定された。これらのタンパク質が HS6ST3-GFP の細胞内局在や細胞内輸送に対して果たす役割については今後詳細に検討する必要があると考えられる。

#### 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 Sugaya N, Habuchi H, Nagai N, Ashikari-Hada S, \*Kimata K.  
6-O-Sulfation of heparan sulfate differentially regulates various fibroblast growth factor-dependent signalings in culture.  
Journal of Biological Chemistry  
査読有 283(16):2008, pp10366-10376
- ② 永井尚子, 木全弘治  
ヘパラン硫酸による高分子リガンドの細胞内取り込み機構  
蛋白質核酸酵素 査読無  
9月号増刊:2008, pp1564-1569
- ③ Habuchi H, Nagai N, Sugaya N, Atsumi F, Stevens RL, \*Kimata K.  
Mice deficient in heparan sulfate 6-O-sulfotransferase-1 exhibit defective heparan sulfate biosynthesis, abnormal placentation, and late embryonic lethality.  
Journal of Biological Chemistry  
査読有 282(21):2007, pp15578-15588
- ④ Nagai N, Habuchi H, Kitazume S, Toyoda H, Hashimoto Y, \*Kimata K.  
Regulation of heparan sulfate 6-O-sulfation by beta-secretase activity.  
Journal of Biological Chemistry  
査読有 282(20):2007, pp14942-14951

[学会発表] (計2件)

① Nagai N

Regulation of heparan sulfate  
6-O-sulfation by b-secretase activity.  
Gordon Research Conference  
2008年7月6日 Procter academy, NH, USA

② 永井尚子

ヘパラン硫酸6-O-硫酸基転移酵素HS6ST3  
の細胞内局在調節機構  
第5回糖鎖科学コンソーシアムシンポジ  
ウム  
2007年11月27日 品川

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0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0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

永井 尚子 (NAGAI NAOKO)

愛知医科大学・分子医科学研究所・助教

研究者番号: 00367799

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: