

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670148

研究課題名(和文)アルツハイマー病促進因子「バイセクト糖鎖」により制御される新規輸送メカニズム

研究課題名(英文)A novel trafficking mechanism regulated by bisecting GlcNAc, an Alzheimer's disease accelerator

研究代表者

木塚 康彦(Kizuka, Yasuhiko)

国立研究開発法人理化学研究所・疾患糖鎖研究チーム・研究員

研究者番号：20564743

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、バイセクト糖鎖と呼ばれる神経系の糖鎖に着目し、未だ謎が多いアルツハイマー病(AD)の発症メカニズムの解明を目的とした。

本研究により、ADの発症に関わるBACE1と呼ばれる酵素と相互作用する新しい分子Clec4gを同定した。また、AD脳で蓄積した酸化ストレスによってBACE1上のバイセクト糖鎖が増加し、それがAD発症に寄与している可能性が示唆された。これらはADの発症機構を理解する上で重要な知見と考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to clarify the mechanisms of Alzheimer's disease (AD) development, focusing on a neural glycan bisecting GlcNAc.

We focused on AD-related protein BACE1 and identified its new interacting partner Clec4g. Furthermore, our data suggest that oxidative stress induced in AD brain upregulates the level of bisecting GlcNAc on BACE1, which could lead to AD development. These findings will be useful to better understand the mechanisms of AD development.

研究分野：糖鎖生物学、生化学、分子生物学

キーワード：糖鎖 アルツハイマー病 BACE1 バイセクト糖鎖 GnT-III

1. 研究開始当初の背景

高齢化は加速の一途をたどり、付随して認知症患者も増加を続けている。アルツハイマー病 (AD) は認知症の 6 割を占めるが、有効な治療薬が開発されていないことから、その対策は地球規模の医療課題である。

AD は、脳内に凝集性の高いアミロイド β ($A\beta$) ペプチドが蓄積することを引き金とし、神経細胞を死滅させ、認知記憶障害を引き起こす。ところが $A\beta$ が蓄積していくメカニズムは十分にわかっておらず、 $A\beta$ を標的としたこれまでの多くの臨床試験も成功を収めていない。これらのことから、 $A\beta$ を中心とした AD の発症・進行のメカニズムの理解をさらに深め、新たな切り口からの新規創薬標的を探索することが望ましい。

研究代表者は神経系における糖鎖の研究を続けており、その過程で、バイセクト糖鎖と呼ばれる脳に豊富に発現する糖鎖が AD 患者で増加していることを見出した。さらに、バイセクト糖鎖を欠損させたマウスでは $A\beta$ の蓄積が激減し、短期記憶能力の低下が改善された (Kizuka et al., *EMBO Mol. Med.*, 2015, 7, 175-189)。これらの事実は、バイセクト糖鎖が AD の発症・進行に関わる因子であり、新規薬剤標的となることを示している。

2. 研究の目的

上述の背景をふまえ、本研究ではいまだ不明な点が多い AD 発症の分子メカニズムをこれまでに見えていない糖鎖の視点から探ることを目的とした。具体的には、バイセクト糖鎖欠損マウスが $A\beta$ 蓄積を激減させるという知見を発展させ、バイセクト糖鎖が細胞内でどのように認識され、機能しているのか、その分子機構の解明を第一の目的とした。特に、AD 発症における最も重要な分子の一つ、BACE1 の細胞内分布がバイセクト糖鎖の欠損によって大きく損なわれることから、BACE1 糖タンパク質の細胞内トラフィックに焦点を当て、AD 発症に関わる新たな分子メカニズムを明らかにすることを目指した。これにより、これまで不明であったバイセクト糖鎖のトラフィックシグナルとしての新しい機能とその作動機構の解明が期待できる。

さらに、AD 患者でバイセクト糖鎖の発現が上昇することに着目し、その発現制御メカニズムの解明を第二の目的とした。これにより、AD の発症へと至る過程の中でバイセクト糖鎖の発現がどのように制御され、そのメカニズムの破綻がどのように疾患へと至るのか、疾患へと至るパスウェイを明らかにすることを目指した。

以上の解析により、糖鎖が関与する AD の新たな発症メカニズムの解明が期待できる。

3. 研究の方法

バイセクト糖鎖による BACE1 の細胞内局在制御機構を明らかにするため、野生型マウスとバイセクト糖鎖生合成酵素 GnT-III の欠

損マウス脳から BACE1 を免疫沈降し、共沈するタンパク質の同定を質量分析により行った。これにより糖鎖結合能を持つ分子 Clec4g を同定した。次に細胞系を用い、Clec4g と BACE1 の相互作用が $A\beta$ 産生にもたらす役割について解析し、Clec4g が $A\beta$ 産生を負に制御していることを明らかにした。

また、AD におけるバイセクト糖鎖の発現上昇メカニズムを明らかにするため、酸化ストレスに着目した研究を行った。 $A\beta$ が蓄積する AD モデルマウスの脳を調べたところ、酸化ストレスが蓄積し、それにより BACE1 のタンパク質レベルでの発現およびそこに付加されているバイセクト糖鎖の量が増加していることが示された。さらに細胞に酸化ストレス負荷をかけ、BACE1 上の糖鎖をグライコミクス解析したところ、バイセクト糖鎖の発現が上昇していることがわかった。一方でバイセクト糖鎖を欠損する細胞では、酸化ストレス下で BACE1 がリソソームへと移行し、容易に分解されることもわかった。これらの結果により、バイセクト糖鎖の発現と BACE1 の局在およびタンパク質量は、細胞にかかる酸化ストレスにより正に制御されていることがわかった。

さらに、正常のマウス脳から単離したニューロン、アストロサイトおよび皮膚から単離した線維芽細胞の糖転移酵素トランスクリプトーム解析を行った。また、これらの細胞にエピゲノム変化を誘発させる薬剤 (5-アザデオキシシチジン、トリコスタチン A) を添加し、GnT-III を含む糖転移酵素の発現変動メカニズムをエピゲノムの観点から解析した。その結果、バイセクト糖鎖およびその生合成酵素 GnT-III は神経細胞に圧倒的に強く発現していること、その神経細胞における mRNA 発現はエピゲノム試薬によっては変動しにくいことがわかった。

また、バイセクト糖鎖修飾のタンパク質選択性の原理を明らかにするため、正常マウス脳および GnT-III 欠損マウス脳よりタンパク質を抽出し、レクチンによってバイセクト糖鎖含有糖タンパク質を精製したのちプロテオミクスにより同定した。これにより、バイセクト糖鎖を持つ主要な糖タンパク質群の同定に成功した。

4. 研究成果

(1) バイセクト糖鎖による BACE1 の局在制御機構

本研究により、Clec4g という新規の BACE1 相互作用タンパク質の同定に成功した。また細胞を用いた実験により、Clec4g が $A\beta$ 産生を抑制すること、それは BACE1 の局在変化によることがわかった (Kizuka et al., *FEBS Lett.*, 2015, 589, 1418-1422)。これは、Clec4g が AD 発症におけるバイセクト糖鎖の機能発揮に関与することを示唆するものであるが、より詳細な機構を明らかにするためにはマウス等を用いたさらなる解析が必要である。

Clec4g と AD との関連性を示す論文は他にないことから、本研究により得られた成果は A β 産生を軸とする AD 発症メカニズムを理解する上で重要な知見であると考えられる。

(2)生理的条件下でのバイセクト糖鎖の発現機構

本研究により、バイセクト糖鎖は脳の中でも特にニューロンに非常に強く発現することが明らかになった(Kizuka et al., *Proteomics*, 16, 2854-2863)。そしてそれは生合成酵素 GnT-III の転写レベルの制御であることもわかった。さらに、生化学およびプロテオミクス解析により、バイセクト糖鎖を有する脳の糖タンパク質の網羅的同定に成功している(論文準備中)。これまで、バイセクト糖鎖含有糖タンパク質を網羅的に同定した試みは世界を見ても報告がない。このことから本研究の成果は、バイセクト糖鎖のタンパク質選択的な発現メカニズムを知る上で重要な知見である。

(3)病的条件下でのバイセクト糖鎖の発現機構

本研究により、AD 脳において蓄積する酸化ストレスによってバイセクト糖鎖の発現が亢進することがわかった。バイセクト糖鎖欠損細胞では BACE1 がリソソームへ移行して分解されることから、酸化ストレス-バイセクト糖鎖-BACE1 発現-A β 産生-酸化ストレス、という病的なサイクルが AD 脳で発生していることを示唆する。これは、AD の発症メカニズムを理解する上で重要な知見であると考えられる。

一方、酸化ストレスによってどのようにバイセクト糖鎖の発現が上昇するのか、その詳細な分子メカニズムはまだ明らかになっていない。糖鎖付加は、糖転移酵素の転写、翻訳、細胞内局在を初め様々な因子により制御されている。今後、GnT-III の転写や活性、局在などがどのように酸化ストレスで制御されているのか、その詳細を明らかにしていくことが基礎・臨床の糖鎖科学の発展に重要であると考えられる。

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 8 件)

全て査読有り

1. Kizuka Y. (2017) Expression of neural glycans and their role in disease. *Trends Glycosci. Glycotech.*, 29, E11-E18. doi: 10.4052/tigg.1613.2E
2. Kizuka Y., Funayama S., Shogomori H., Nakano M., Nakajima K., Oka R., Kitazume S., Yamaguchi Y., Sano M., Korekane H., Hsu TL., Lee HY., Wong CH., Taniguchi N. (2016). High sensitivity and low toxicity fucose probe for glycan imaging and biomarker discovery. *Cell Chem. Biol.*, 23,

782-792. doi: 10.1016/j.chembiol.2016.06.010

3. Kizuka Y., Nakano M., Miura Y., Taniguchi N. (2016) Epigenetic regulation of neural N-glycomics. *Proteomics*, 16, 2854-2863. doi: 10.1002/pmic.201600053
4. Takahashi M., Kizuka Y., Ohtsubo K., Gu J., Taniguchi N. (2016) Disease-associated glycans on cell surface proteins. *Mol. Aspects of Med.*, 51, 56-70. doi: 10.1016/j.mam.2016.04.008
5. Kizuka Y., Taniguchi N. (2016) Enzymes for N-Glycan Branching and Their Genetic and Nongenetic Regulation in Cancer. *Biomolecules*, 6, E25
6. Kizuka Y., Nakano M., Kitazume S., Saito T., Saido T. C., Taniguchi N. (2016) Bisecting GlcNAc modification stabilizes BACE1 protein under oxidative stress conditions. *Biochem. J.*, 473, 21-30. doi: 10.1042/BJ20150607
7. Kizuka Y., Kitazume S., Sato K., Taniguchi N. (2015) Clec4g (LSECtin) interacts with BACE1 and suppresses A β generation. *FEBS Letters*, 589, 1418-1422. doi: 10.1016/j.febslet.2015.04.060
8. Taniguchi N., Kizuka Y. (2015) Glycans and Cancer: Role of N-glycans in cancer biomarker, progression and metastasis and therapeutics. *Adv. Cancer. Res.*, 126, 11-51. doi: 10.1016/bs.acr.2014.11.001

[学会発表](計 15 件)

1. 木塚慶彦、“神経系における糖鎖修飾とアルツハイマー病”。第 13 回レドックス・ライフイノベーションシンポジウム。2017. 3/16-17. 奈良女子大学(奈良)
2. 木塚慶彦、“アルツハイマー病における bisecting GlcNAc 糖鎖の役割について”。新学術領域「神経糖鎖生物学」最終シンポジウム。2017. 3/3-4. JP タワー(名古屋)
3. 木塚慶彦、北爪しのぶ、谷口直之、“Bisecting GlcNAc 糖鎖修飾とアルツハイマー病に関する研究”。第 57 回日本生化学会 中国・四国支部例会。2016. 5/27-28. 高知大学(南国市)
4. Kizuka Y., Chienwichai P., Taniguchi N. “Glyco-redox, a link of glycobiology and redox balance, is implicated in Alzheimer’s disease” The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, The 16th Annual Scientific Meeting of the Nitric Oxide Society of Japan. 2016. 5/20-22. 仙台国際センター(仙台)
5. Kizuka Y., Nakano M., Kitazume S., Taniguchi N. “Physiological and pathological roles of bisecting GlcNAc” RIKEN-Max Planck Joint Research Center

- for Systems Chemical Biology, The fifth symposium. 2016. 4/17-20. Berlin (Germany)
6. **木塚康彦**、北爪しのぶ、谷口直之、“アルツハイマー病を促進させるバイセクト糖鎖”. 第 89 回日本薬理学会年会. 2016. 3/9-11. パシフィコ横浜 (横浜)
 7. **木塚康彦**、北爪しのぶ、中の三弥子、西道隆臣、橋本康弘、遠藤玉夫、谷口直之.“BACE1 の bisecting GlcNAc 修飾によるアルツハイマー病の発症メカニズム”. 第88回日本生化学会大会 第38回日本分子生物学会年会 合同大会. 2015. 12/1-4. 神戸ポートアイランド (神戸)
 8. **Kizuka Y.**, Kitazume S., Nakano M., Saido T., Hashimoto Y., Endo T., Taniguchi N. “Bisecting GlcNAc on BACE1 is a Novel Therapeutic Target for Alzheimer’s Disease”. XXIII International Symposium on Glycoconjugates. 2015. 9/15-20. Split (Croatia)
 9. **Kizuka Y.**, Kitazume S., Nakano M., Saido T., Yamaguchi Y., Yoshida M., Hashimoto Y., Endo T., Taniguchi N. “Bisecting GlcNAc regulates Alzheimer’s Disease development”. 4th Austria-Japan Seminar for Comparative and Developmental Glycobiology. 2015. 9/15. Split (Croatia)
 10. **木塚康彦** “神経系糖鎖の発現制御と認知症病態形成における役割についての研究” 第 34 回日本糖質学会年会. 2015. 7/31-8/2. 東京大学(東京)
 11. **Kizuka Y.**, Kitazume S., Sato K., Ohnuki T., Kukimoto-Niino M., Shirouzu M., Yoshida M., Engel L., Zegzouti H., Taniguchi N. “High-throughput screening of GnT-III inhibitors using UDP-Glo system to develop a novel drug candidate for Alzheimer’s disease”. SFG & JSCR 2014 Joint Annual Meeting. 2014. 11/16-11/19. Honolulu (USA)
 12. **木塚康彦**、北爪しのぶ、藤縄玲子、齋藤貴志、岩田修永、西道隆臣、中の三弥子、山口芳樹、橋本康弘、Matthias Staufienbiel、初田裕幸、村山繁雄、萬谷博、遠藤玉夫、谷口直之.“Bisecting GlcNAc 欠損によるアルツハイマー病抑制に関する研究” 第33回日本糖質学会年会. 2014. 8/10-8/12. 名古屋大学 (名古屋)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

研究室ホームページ

http://www.riken.jp/research/labs/grc/svs_glycobiol/dis_glycomics/

6. 研究組織

(1)研究代表者

木塚 康彦 (KIZUKA, Yasuhiko)

国立研究開発法人理化学研究所・疾患糖鎖研究チーム・研究員

研究者番号：20564743

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

佐藤 敬子 (SATO, Keiko)

国立研究開発法人理化学研究所・疾患糖鎖研究チーム・パートタイマー

北爪 しのぶ (KITAZUME, Shinobu)

国立研究開発法人理化学研究所・疾患糖鎖研究チーム・副チームリーダー

研究者番号：80301753

谷口 直之 (TANIGUCHI, Naoyuki)

国立研究開発法人理化学研究所・システム糖鎖生物学研究グループ・グループディレクター

研究者番号：90002188

中の 三弥子 (NAKANO, Miyako)

広島大学・先端物質科学研究科・准教授

研究者番号：40397724

中嶋 和紀 (NAKAJIMA, Kazuki)

藤田保健衛生大学・研究支援推進センター・講師

研究者番号：10442998