

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07883

研究課題名（和文）O型糖鎖修飾によるAPP代謝制御機構の解明

研究課題名（英文）Regulatory Mechanism of APP Metabolism by O-Glycosylation

研究代表者

萬谷 啓子（MANYA, KEIKO）

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・研究員

研究者番号：70415496

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：これまでの研究からアルツハイマー病（AD）の発症・進行に伴って糖転移酵素の発現が変化すること、アミロイド前駆体タンパク質（APP）上のO型糖鎖修飾の変化がAPP代謝に影響し、アミロイド（A_β）産生を変動させることを明らかにしている。本研究ではそのメカニズムの解明を目的とし、A_β産生に最も影響を及ぼした糖転移酵素の過剰発現によりO型糖鎖修飾を変化させたAPPの細胞内局在について解析した。その結果、部分的なO型糖鎖変化によってはAPPの細胞内局在が変化しないことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖鎖はタンパク質の性質や機能に影響することから、その異常は様々な疾患の発症に関わることが知られている。AD発症におけるAPP代謝についても糖鎖の関与が示唆されているが、そのメカニズムは不明であり解明が求められている。本研究は、糖転移酵素の発現によりO型糖鎖修飾を変化させたAPPの挙動を解析したものであり、今後の研究の進展により、ADの病態の理解や糖鎖修飾の制御によるAD予防・治療へつながることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Our previous studies have shown that the expression of glycosyltransferases changes with the onset and progression of Alzheimer's disease (AD), and that changes in O-glycosylation on amyloid precursor protein (APP) affect APP metabolism and alter amyloid- (A_β) production. In this study, to elucidate the mechanism, we analyzed the subcellular localization of APP with altered O-glycosylation by overexpression of glycosyltransferases that most affected A_β production. We found that partial O-glycosylation did not alter the subcellular localization of APP.

研究分野：生化学

キーワード：アルツハイマー病 APP 糖鎖

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) は進行性の認知症を呈する脳神経疾患であり、日本では認知症の6割以上をADが占めている。ADでは記憶障害や理解・判断力の低下などにより患者の生活の質は著しく低下する。今後高齢化が進むにつれ、ADの患者数が増加していくことが予想されるが、詳細な発症メカニズムや根本的な治療法・予防法は未だ明らかにされていない。

ADの病理学的特徴である老人斑は、アミロイド前駆体タンパク質 (APP) が β 、 γ -セクレターゼによって切断されて生じるアミロイド β ($A\beta$) の蓄積により形成される。この $A\beta$ 産生にAPP上の糖鎖が関与することが示唆されている。APPと糖鎖に関するこれまでの研究では、脳脊髄液や血液などから回収された、セクレターゼによる切断後のAPP断片を用いた解析が行われ、糖鎖構造や糖鎖修飾部位が明らかになってきた。しかしセクレターゼによる切断前の全長APPの糖鎖修飾の状況や、それらの糖鎖がAPP代謝に及ぼす影響およびそのメカニズムについてはごく限られた知見しか得られていない。

2. 研究の目的

申請者はこれまでに、APP上のO型糖鎖の増加に伴って、 β -セクレターゼによる切断が減少し大部分のAPPが α -セクレターゼによる切断を受けようになることを報告している。さらに、リアルタイムPCRによる発現解析から、O型糖鎖合成開始酵素ppGalNAcTファミリーにADの進行に伴い発現が変化するアイソフォームが存在することを明らかにしている。また、 α -セクレターゼ活性を持つADAM17は、基質の糖鎖修飾によって親和性が変化することが報告されている。

本研究では、O型糖鎖修飾によるAPP代謝制御メカニズムの解明とO型糖鎖修飾制御によるAD予防の可能性を示すことを目的とする。上述のように、申請者はこれまでに糖鎖の変化によってAPP代謝が変動することを見いだしている。APPのO型糖鎖修飾については質量分析を用いた解析技術の発展により糖鎖修飾部位や糖鎖構造について知見が得られるようになってきたが、修飾のメカニズムやAPP代謝における糖鎖機能の詳細は不明である。これらのメカニズムを明らかにすれば、APP代謝にはセクレターゼ等の多くのプロテアーゼが関与していることから、タンパク質の相互作用におけるO型糖鎖機能を解析する有効なモデルになると考えられる。また、これによりADの病態の理解に繋がるだけでなく、糖鎖修飾の制御によるAD予防・治療の可能性を示すことができ、糖鎖を利用した新たなADの予防・治療薬の開発への応用が期待される。

3. 研究の方法

糖鎖はタンパク質の性質や機能、特に相互作用や細胞内局在に影響するため、本研究では、各ppGalNAcTの過剰発現細胞、あるいはCRISPRなどによる各ppGalNAcT欠損細胞でAPPを発現させ、O型糖鎖修飾変化がAPPやセクレターゼの局在変化、ひいては $A\beta$ 産生変化をもたらすのか明らかにするために、細胞免疫染色により細胞内局在を検討した。また、全長APPのO型糖鎖修飾部位の同定やセクレターゼ感受性の解析を目的として、APPの大量発現系を構築し、リコンビナントAPPの大量産生および精製を行なった。さらに、Icelandic変異と呼ばれる新規変異型APPについて解析を行った。この変異型APPは、既知のAPP変異とは異なり $A\beta$ 産生量を半減させることが報告されている。Icelandic変異ではAlaがThrに置換されることから、このThrが新たなO型糖鎖修飾部位となっている可能性が考えられたため、上述の実験と同様にppGalNAcTの過剰発現細胞などで発現させ免疫染色により細胞内局在を解析したほか、大量発現系を構築し、リコンビナントタンパク質を精製した。

4 . 研究成果

(1)これまでの研究成果から、 $A\beta$ 産生を抑制する効果の高かった ppGalNAcT-6 について実験を行った。マウス小脳神経幹細胞 (C17.2 細胞) および ppGalNAcT-6 を過剰発現させた C17.2 細胞に野生型 APP を遺伝子導入し、APP や各セクレターゼの局在を比較した。その結果、ppGalNAcT-6 の過剰発現の有無によって APP の局在に差は認められなかった。また、Icelandic 変異型 APP についても同様の実験を行い、Icelandic 変異や Icelandic 変異と ppGalNAcT-6 過剰発現の組み合わせによっても APP の局在は変化しなかった。以上のことから O 型糖鎖修飾変化や Icelandic 変異による $A\beta$ 産生量の変動は APP の局在変化に依らない可能性が示唆された。

(2)APP の N 末端に HA タグ配列と 3C プロテアーゼ配列を融合させたものを培養細胞に遺伝子導入し APP の大量発現系を構築した。タンパク質発現に多用されるヒト胚性腎臓細胞 (HEK293T 細胞) を用いて APP の大量発現系の構築を試みたが、ppGalNAcT の発現が安定しなかったため、浮遊系細胞である HEK293F を用いて大量発現系を構築した。発現したリコンビナント APP を抗 HA 抗体カラムで精製後、プロテアーゼ処理することによりタグを取り除いた。Icelandic 変異型 APP についても同様に精製し、現在得られた各リコンビナント APP について糖鎖修飾を解析中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Akasaka-Manyu Keiko, Manyu Hiroshi	4. 巻 10
2. 論文標題 The Role of APP O-Glycosylation in Alzheimer ' s Disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 1569 ~ 1569
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom10111569	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Furukawa Jun-ichi, Hanamatsu Hisatoshi, Nishikaze Takashi, Manyu Hiroshi, Miura Nobuaki, Yagi Hirokazu, Yokota Ikuko, Akasaka-Manyu Keiko, Endo Tamao, Kanagawa Motoi, Iwasaki Norimasa, Tanaka Koichi	4. 巻 92
2. 論文標題 Lactone-Driven Ester-to-Amide Derivatization for Sialic Acid Linkage-Specific Alkylamidation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 14383 ~ 14392
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.0c02209	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Akasaka-Manyu Keiko, Manyu Hiroshi, Nadanaka Satomi, Kitagawa Hiroshi, Kondo Yoshitaka, Ishigami Akihito, Endo Tamao	4. 巻 167
2. 論文標題 Decreased ADAM17 expression in the lungs of -Klotho reduced mouse	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 483 ~ 493
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvz113	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 赤阪 (萬谷) 啓子, Porparn Kongpracha, 萬谷博, 永森収志, 遠藤玉夫
2. 発表標題 肺の老化にともなうppGalNAc-Tの発現変化
3. 学会等名 第43回日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 赤阪(萬谷)啓子、Pornparn Kongpracha、萬谷博、永森收志、遠藤玉夫
2. 発表標題 肺の老化にともなう糖転移酵素ppGalNAc-Tの発現変化
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 赤阪(萬谷)啓子、Pornparn Kongpracha、萬谷博、永森收志、遠藤玉夫
2. 発表標題 マウス老化肺における糖転移酵素ppGalNAc-T7 の発現変化
3. 学会等名 第39回日本糖質学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Keiko Akasaka-Manyu, Hiroshi Manyu, Satomi Nadanaka, Hiroshi Kitagawa, Yoshitaka Kondo, Akihito Ishigami, Tamao Endo
2. 発表標題 Reduction of α -Klotho and pulmonary emphysema in aging
3. 学会等名 Proteoglycans 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 日本食品免疫学会(赤阪啓子、萬谷 博ほか)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 492
3. 書名 食品免疫学事典	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------