

機関番号：32629

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21710238

研究課題名 (和文) 糖鎖プロファイルによるアルツハイマー病の理解と診断

研究課題名 (英文) Understanding and Evaluation of Alzheimer's Disease Using Glycan Profiles

研究代表者

戸谷 希一郎 (TOTANI KIICHIRO)

成蹊大学理工学部・准教授

研究者番号：80360593

研究成果の概要 (和文)：アルツハイマー病、認知症、骨粗鬆症を糖タンパク質品質管理に係る糖鎖プロセッシング変化で理解すべく、合成糖鎖基質と疾患モデル動物由来の小胞体画分を反応させ、再構成した糖鎖プロファイルの比較を行った。その結果、構造異性体によってシグナル機能が異なるM8型糖鎖の生成比率が疾患によって大きく変化することを見出した。これらの糖鎖はそれぞれ糖タンパク質の分泌および廃棄を司るシグナルであり、疾患によってタンパク質品質管理機構が有意に影響を受けることが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：Synthetic glycan substrates were treated with endoplasmic reticulum fractions extracted from model animals of Alzheimer's disease, dementia and osteoporosis. The resulting reconstructed glycan profiles were compared each other to understand these diseases by glycan processing change concerning with glycoprotein quality control. The results show that each glycan profile gives specific glycan rates for M8 glycan derivatives that have a different signal function for the each structural isomer. Since the each isomer means a signal of glycoprotein secretion and degradation, glycoprotein quality control were found to correlate with the candidate diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：糖鎖、ストレス、小胞体、アルツハイマー、合成化学

1. 研究開始当初の背景

我々は合成糖鎖基質を用いた糖タンパク質品質管理機構の解析過程で、タンパク質折り畳みセンサー酵素 UGGT に認識される初の合成基質の開発に成功した [Angew. Chem. Int. Ed. **44**, 7950-7954 (2005)]。従来 UGGT は折り畳み不全糖タンパク質のみを基質認識すると考えられており、小胞体糖鎖プロセシ

ング解析の妨げになっていた。本ツールの開発はこの障害を取り除くものであり、これを契機に糖鎖プロセッシングと細胞機能をマクロに結び付けることに興味を抱いた。ところで異常タンパク質の蓄積による小胞体ストレスがアルツハイマーやパーキンソン病の原因となることが報告され、ストレス応答物質の発現に注目した疾患研究が精力的に行

われている。しかしながら小胞体ストレスの上流で恒常的に稼働している糖タンパク質品質管理とストレス関連疾患を結び付けた研究は報告されていない。そこで我々は健常およびアルツハイマーモデルマウスの脳から小胞体画分を抽出し、これらと独自の合成糖鎖基質を反応させ、糖タンパク質品質管理に係る糖鎖プロセッシングを比較したところ、両者に明確な違いがあるという予備的なデータを得た。

このような背景のもと、糖鎖プロセッシング状況によってアルツハイマー病をはじめとした老化関連疾患を評価できる確信を深め、糖鎖プロファイル変化を本疾患の理解や診断に応用する本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、アルツハイマー病に代表される老化関連疾患をタンパク質品質管理にまつわる糖鎖構造多様性パターン「糖鎖プロファイル」の変化で理解することにある。そこで独自のデザインの蛍光糖鎖基質（図1）と健常およびアルツハイマーモデル動物由来の小胞体画分を反応させ、細胞内糖鎖プロセッシングを再現したのち、反応液の分析によって得られる「再構成糖鎖プロファイル」の比較を行う。既に脳組織において糖鎖プロファイルの変化を確認しているので、この知見をもとに本研究では対象組織やアルツハイマー重篤度の違いが糖鎖プロファイルに与える影響を詳細に検討する。これらの結果をアルツハイマー病の診断および新たな治療法の創発に応用する。

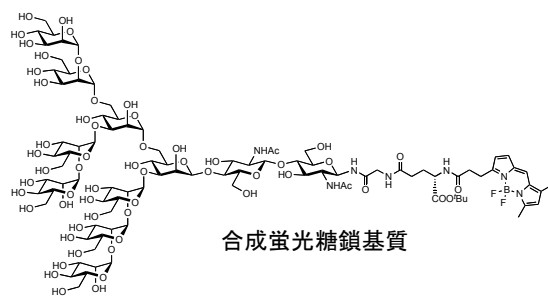


図1 本研究で用いた合成糖鎖基質の一例

3. 研究の方法

新生糖タンパク質の糖鎖構造をもつ人工糖鎖基質を、健常およびアルツハイマー病、認知症、骨粗鬆症モデルマウスに由来する小胞体画分と反応させ、小胞体内の糖鎖プロセッシング過程を試験管内で再現する。反応生成物の HPLC（高速液体クロマトグラフィー）分析によって得られる人工糖鎖由来のクロマトグラムを、その細胞固有の小胞体ストレス状態を反映した糖鎖プロファイルと捉え、これらを指標として健常状態と老化関連疾患を比較することによって、疾患の評価、理

解、診断を試みる。具体的には下記の3項目について検討を行った。

(1) 人工糖鎖基質の合成

我々はこれまでに、小胞体内の全ての糖鎖プロセッシング酵素に認識され得るアグリコン構造をもつ人工糖鎖基質の開発に成功している [Angew. Chem. Int. Ed. **44**, 7950-7954 (2005)]。本研究計画では、微量生体サンプルを用いた糖鎖プロセッシング解析を想定しているため、検出感度の向上を計り、アグリコン部に蛍光タグが導入された第二世代の人工糖鎖基質の合成を行う。この課題に対して図1に示した蛍光標識糖鎖基質の少量合成を完了し、有効に機能することを見出していたため、これを充分量供給する体制を整えることから研究を開始した。

(2) 糖鎖プロファイルの試験管内再構成

合成した人工糖鎖基質を健常およびアルツハイマーモデルマウスの脳や肝臓から遠心画分して得る小胞体画分と反応させ、試験管内で人工基質に対する一連の糖鎖プロセッシング反応を進行させる。一定時間反応後、生成した糖鎖混合物を HPLC で分析し、多様な糖鎖の存在比率を示すクロマトグラム、すなわち「再構成糖鎖プロファイル」の獲得を行い、その特徴を比較する。

(3) 再構成糖鎖プロファイルの検証

得られた糖鎖プロファイルを糖鎖プロセッシング酵素の個別の活性や、それらのタンパク質発現レベルで検証する。具体的には小胞体画分や組織に対して、阻害剤や基質を工夫することで個別の糖鎖プロセッシング酵素活性を検証するとともに、糖鎖プロファイル再構成に係るタンパク質や酵素群の発現量を Western blotting 法で調べる。これらを相当する各再構成糖鎖プロファイルと比較し、老化関連疾患が糖鎖プロセッシングに残す痕跡を、階層横断的に評価する。

4. 研究成果

(1) 人工糖鎖基質の合成

図1に示す基質を充分量確保すべく、化学合成に取り組み、生化学アッセイに充分な数十 mg スケールでの合成を達成した。またこれと並行して、糖鎖を大量に供給するために糖鎖合成ルートの見直しを図り、一連の糖鎖を2つのユニバーサルな単糖ユニットから合成する新ルートでの合成についても検討を行った。現段階では、ユニバーサルな各単糖ユニットの kg スケールでの供給体制の実現と、これらを用いた6糖部分構造の合成を達成している。今後、継続的な検討を行う事で、将来的に本研究を広範に展開する上で必要となる、糖鎖基質の大量供給に備える足掛かりを構築することができたものと考えている。

(2) 糖鎖プロファイルの試験管内再構成

糖鎖プロファイルを試験管内で再構成するにあたり、まず糖鎖プロセッシング酵素源となる高純度の小胞体画分の抽出を検討した。組織の破碎法ならびに界面活性剤を工夫することで、ゴルジ体や細胞質の混入が無い、純度の高い小胞体画分の抽出法を確立した。この方法で正常老化 (SAMR1) および骨粗鬆症 (SAMP6)、アルツハイマー (SAMP8)、認知症 (SAMP10) モデルマウスの肝臓より得た小胞体画分に、それぞれ合成糖鎖基質を添加し、糖タンパク質品質管理に係る糖鎖プロセッシングを再現したところ、疾患に特徴的な糖鎖プロファイルを得ることができた (図2)。全体の糖鎖プロセッシング進行度に関して各疾患由来の糖鎖プロファイル間に若干の差が認められたが、Man8GlcNAc2 (M8) 型糖鎖に存在する構造異性体の生成比に注目すると、各プロファイルの特徴が明確になった。すなわち骨粗鬆症モデルとアルツハイマーモデルにおいて、コントロールである正常老化モデルや認知症モデルと比較してM8AおよびM8Cの生成比が増加していることが明らかとなった。ここでM8B型糖鎖は糖タンパク質の分泌に関わるシグナルであるのに対し、M8A型およびM8C型糖鎖は糖タンパク質の分解を司るシグナルとして機能することが知られている。糖タンパク質の運命を決定づけるM8構造における分岐点において疾患に由来してタンパク質生合成シグナルに変化が現れるのは興味深い結果である。このことはこれらの疾患に対してタンパク質生合成からの治療を目指す場合に有益な知見となるものと思われる。

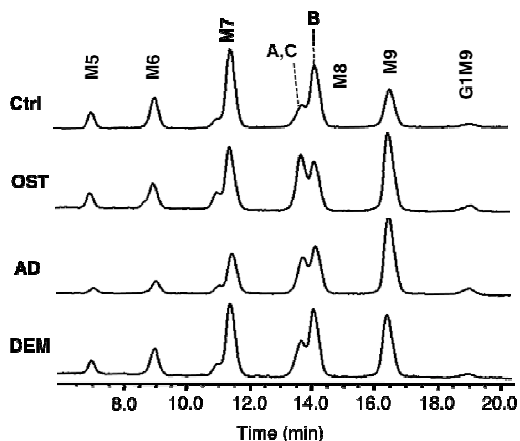


図2 疾患特異的な再構成糖鎖プロファイル。Ctrl: 対象、OST: 骨粗鬆症、AD: アルツハイマー、DEM: 認知症。

(3) 再構成糖鎖プロファイルの検証

図2で得られた再構成糖鎖プロファイルを与えた細胞状態を理解すべく、糖鎖プロセッシングを司る酵素群の個別の活性について検討した。その結果、糖鎖プロファイルに顕

著な変化のあった疾患モデルにおいては、糖鎖プロセッシング酵素活性に有意の変化が認められた。例えば骨粗鬆症モデルにおいてはグルコース切断を司る glucosidase II やグルコース転移を司る UGGT の活性が低下し、マンノース切断を司る mannosidase I および EDEM1/3 の活性が向上することが分かった。またこれらの現象は各酵素のタンパク質発現解析によってもよく説明された。

以上の(1)-(3)項目の検討により、老化関連疾患をタンパク質生合成の上流で恒常的に稼働している糖タンパク質品質管理の稼働状況タグである糖鎖プロファイルによって評価する方法を確立することができた。各糖鎖プロファイルは、疾患特異的であり、本法が表現力豊かな疾患評価法となり得る可能性を示唆している。

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. Kiichiro Totani, Haruka Miyazawa, Shino Kurata, Yukishige Ito, Magnetic Beads-Assisted Mild Enrichment Procedure for Weak-Binding Lectins, *Analytical Biochemistry*, **411**, 50-7 (2011).

2. Kiichiro Totani, Chemistry of Glycoprotein Quality Control, *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, **22**, 296-307 (2010).

3. Atsushi Miyagawa, Kiichiro Totani, Ichiro Matsuo, Yukishige Ito, Promiscuous Activity of ER Glucosidase II Discovered Through Donor Specificity Analysis of UGGT, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **403**, 322-328 (2010).

4. Yoichi Takeda, Kiichiro Totani, Ichiro Matsuo, Yukishige Ito, The action of bromoconduritol on ER glucosidase II, *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, **20**, 5357-5359 (2010).

5. Hu Dan, Yukiko Kamiya, Kiichiro Totani, Daiki Kamiya, Norihito Kawasaki, Daisuke Yamaguchi, Ichiro Matsuo, Naoki Matsumoto, Yukishige Ito, Koichi Kato, Kazuo Yamamoto, Sugar-binding activity of the MRH domain in the ER α -glucosidase II β subunit is important for efficient glucose trimming, *Glycobiology*, **19**, 1127-1135 (2009).

6. Yoichi Takeda, Kiichiro Totani, Ichiro Matsuo, Yukishige Ito, Chemical approaches toward understanding glycan-mediated protein quality

control, *Current Opinion in Chemical Biology*, **13**, 582-591 (2009).

7. Yoshimi Haga, Kiichiro Totani, Yukishige Ito, Tadashi Suzuki, Establishment of a real-time analytical method for free oligosaccharide transport from the ER to the cytosol, *Glycobiology*, **19**, 987-994 (2009).

8. Taisuke Watanabe, Kiichiro Totani, Ichiro Matsuo, Jun-ichi Maruyama, Katsuhiko Kitamoto, Yukishige Ito, Genetic analysis of glucosidase II β -Subunit in trimming of high-mannose-type glycans, *Glycobiology*, **19**, 834-840 (2009).

9. Kiichiro Totani, Yoshito Ihara, Takashi Tsujimoto, Ichiro Matsuo, Yukishige Ito, The Recognition motif of the glycoprotein-folding sensor enzyme, UDP-Glc: glycoprotein glucosyltransferase, *Biochemistry*, **48**, 2933-2940 (2009).

〔学会発表〕(計 23 件)

1. 岩本将吾, 伊藤幸成, 戸谷希一郎, II 型糖尿病における小胞体糖鎖プロセッシングの再構成とその応用, *日本化学会 第 91 春季年会* 於: 神奈川大学 (神奈川) 2011. 3.26 (土)~ 3. 29 (火)

2. 多田美穂, 伊藤幸成, 戸谷希一郎, N 結合型糖鎖プロファイルによる老人病の評価, *日本化学会 第 91 春季年会* 於: 神奈川大学 (神奈川) 2011. 3.26 (土)~ 3. 29 (火)

3. 篠田佑樹, 岩本将吾, 松島光, 三郎丸みゆき, 太田尚志, 松崎佑二, 戸谷希一郎, 共通単糖ユニットを用いた小胞体型オリゴ糖プローブの合成研究, *日本化学会 第 91 春季年会* 於: 神奈川大学 (神奈川) 2011. 3.26 (土)~ 3. 29 (火)

4. 岩田昂大, 岩本将吾, 三郎丸みゆき, 松崎佑二, 戸谷希一郎, グルコース C-2 水酸基の立体反転を用いた N-結合型オリゴ糖の合成研究, *日本化学会 第 91 春季年会* 於: 神奈川大学 (神奈川) 2011. 3.26 (土)~ 3. 29 (火)

5. 宮澤栄夏, 伊藤幸成, 戸谷希一郎, 弱い結合のレクチンに対する磁気ビーズによるマイルドエンリッチ法, *日本化学会 第 91 春季年会* 於: 神奈川大学 (神奈川) 2011. 3.26 (土)~ 3. 29 (火)

6. 足立優花, 伊藤幸成, 戸谷希一郎, サーマルシフトアッセイによるレクチン様分子シャペロンカルレティキュリンの相互作用解析, *日本化学会 第 91 春季年会* 於: 神奈川

大学 (神奈川) 2011. 3.26 (土)~ 3. 29 (火)

7. Kiichiro Totani, Shogo Iwamoto, Hikaru Matsushima, Miho Isoyama, Yukishige Ito, Top-down and bottom-up approaches to understanding glycan processing in the ER, *The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM2010)* at Hawaiian Convention Center, Honolulu, Hawaii (USA) 2010. 12. 15 (Wed) ~ 12.20 (Mon)

8. Shogo Iwamoto, Yukishige Ito, Kiichiro Totani, N-glycan profiles are new viewpoint of type II diabetes or not, *The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM2010)* at Hawaiian Convention Center, Honolulu, Hawaii (USA) 2010. 12. 15 (Wed) ~ 12.20 (Mon)

9. Yuki Shinoda, Shogo Iwamoto, Miyuki Saboroumaru, Yuji Matsuzaki, Kiichiro Totani, Practical application of a selectively deprotectable common monosaccharide unit in N-glycan synthesis, *The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM2010)* at Hawaiian Convention Center, Honolulu, Hawaii (USA) 2010. 12. 15 (Wed) ~ 12.20 (Mon)

10. Haruka Miyazawa, Yukishige Ito, Kiichiro Totani, Magnetic beads-assisted mild enrichment procedure for weak-binding lectins, *The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM2010)* at Hawaiian Convention Center, Honolulu, Hawaii (USA) 2010. 12. 15 (Wed) ~ 12.20 (Mon)

11. Miho Tada, Hikaru Matsushima, Kiichiro Totani, Evaluation of aging-related diseases by N-linked glycans under molecular crowding conditions, *4th International Symposium "Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions"* at Piazza Omi, Shiga (Japan) 2010. 11. 30 (Tue) ~ 12. 1 (Wed)

12. 戸谷希一郎, 糖タンパク質糖鎖機能解析に向けた合成化学的アプローチ, *有機合成化学協会関東支部ミニシンポジウム* 於: (独) 理化学研究所 (埼玉) 2010. 11. 26. (金)

13. Kiichiro Totani, Haruka Miyazawa, Yukishige Ito, Magnetic beads-assisted mild enrichment procedure for weak binding lectins, *25th International Carbohydrate Symposium* at Makuhari Messe International Convention Complex, Chiba (Japan) 2010. 8. 1 (Sun) ~ 8. 6 (Fri)

14. Shogo Iwamoto, Yukishige Ito, Kiichiro Totani, Correlation between type II diabetes and N-linked glycan profiles, 25th *International Carbohydrate Symposium* at Makuhari Messe International Convention Complex, Chiba (Japan) 2010. 8. 1 (Sun)~8. 6 (Fri)

15. 岩本将吾, 伊藤幸成, 戸谷希一郎, 合成蛍光糖鎖を用いた小胞体糖鎖プロファイルの再構成と疾患評価への応用, 第5回日本ケミカルバイオロジー学会年会 於: 慶應義塾大学日吉キャンパス(神奈川) 2010. 5.18(火)~5.19日(水)

16. 篠田佑樹, 岩本将吾, 三郎丸みゆき, 松崎祐二, 戸谷希一郎, 小胞体型高マンノース糖鎖合成における選択的脱保護可能な共通単糖ユニットの活用, 第59回有機合成化学協会関東支部シンポジウム 於: 東京農工大学小金井キャンパス(東京) 2010. 5.22(土)

17. 宮澤栄夏, 佐藤真貴子, 伊藤幸成, 戸谷希一郎, 糖鎖磁気ビーズを用いたマイルドレクチンエンリッチ法の開発, 日本化学会 第90春季年会 於: 近畿大学本部キャンパス(大阪) 2010. 3.26(日)~3. 29(月)

18. 篠田佑樹, 岩本将吾, 三郎丸みゆき, 松崎祐二, 戸谷希一郎, オリゴ糖合成における選択的脱保護可能な単糖ユニットの活用, 日本化学会 第90春季年会 於: 近畿大学本部キャンパス(大阪) 2010. 3.26(日)~3. 29(月)
戸谷希一郎, 小胞体糖鎖プロセッシングの理解と応用に向けた化学的研究, 第7回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム 於: 千里ランフサイエンスセンター(大阪) 2009. 12. 7.(月)

19. 多田美穂, 伊藤幸成, 戸谷希一郎, N結合型糖鎖プロファイルによるアルツハイマー病の理解, 第29回日本糖質学会年会 於: 飛騨・世界生活文化センター(岐阜) 2009. 9. 9(水)~9. 11(金)

20. 岩本将吾, 伊藤幸成, 戸谷希一郎, II型糖尿病におけるER糖タンパク質品質管理の活性変化, 第29回日本糖質学会年会 於: 飛騨・世界生活文化センター(岐阜) 2009. 9. 9(水)~9. 11(金)

21. 佐藤真貴子, 藏田紫乃, 宮澤栄夏, 伊藤幸成, 戸谷希一郎, 糖鎖磁気ビーズを用いたマイルドレクチンエンリッチ法の開発, 第29回日本糖質学会年会 於: 飛騨・世界生活文化センター(岐阜) 2009. 9. 9(水)~9. 11(金)

22. 戸谷希一郎, 小胞体糖鎖プロセッシングに関する化学的研究, 第29回日本糖質学会年会 於: 飛騨・世界生活文化センター(岐阜) 2009. 9. 9.(水)

23. 戸谷希一郎・岩本将吾・多田美穂・伊藤幸成, 合成と蛍光糖鎖プローブを用いた小胞体糖鎖プロセッシング解析, 第一回光塾 於: (独)情報通信研究機構 神戸研究所(神戸) 2009. 8. 15(土)~8. 16(日)

[図書] (計1件)

①戸谷希一郎, N-結合型糖鎖プローブの合成とタンパク質品質管理機構解析への応用, 複合糖質の化学と最新応用技術, 正田晋一郎/稲津敏行 監修; シーエムシー出版: 東京, 2009; pp144-153.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸谷 希一郎 (TOTANI KIICHIRO)
成蹊大学理工学部・准教授
研究者番号: 80360593