

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25840043

研究課題名(和文)糖鎖に着目したアミロイド前駆体タンパク質の細胞内動態のリアルタイムイメージング解析

研究課題名(英文)O-GalNAz glycan imaging to understand amyloid beta generation

研究代表者

立田 由里子(TACHIDA, YURIKO)

国立研究開発法人理化学研究所・疾患糖鎖研究チーム・技師

研究者番号：70392024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：私たちは最近、血管内皮細胞には神経細胞とは異なるAPP770が特異的に発現していること、さらにシアリル化されたCore1型のO-結合型糖鎖修飾を受けたAPPのみが選択的に切断を受けていることを見いだした。そこで私たちはAPPの代謝とO-結合型糖鎖修飾の関係を明らかにするために、Clickケミストリーを用いてAPPのO型糖鎖を可視化した後、細胞内での動態を追うことに成功している。また、APPにO-結合型糖鎖修飾を行っている糖転移酵素の同定も行い、それら酵素の発現量を変化させることによって、A $\beta$ の産生量が増減することを確認できている。

研究成果の概要(英文)：Deposition of amyloid  $\beta$ -peptide (A $\beta$ ) in the brain parenchyma and cerebral vessels is closely associated with Alzheimer's disease (AD). A $\beta$  is generated from the amyloid precursor protein (APP) by multiple proteases. Our previous analysis of endothelial APP770 has shown that its O-glycosylated form is preferentially processed to generate A $\beta$ . In this study, we have visualized O-glycan with GalNAz and observed the intracellular trafficking of O-glycosylated APP770 by super-resolution microscopic analysis.

研究分野：糖鎖、アルツハイマー病

キーワード：糖鎖 アルツハイマー病 Clickケミストリー

## 1. 研究開始当初の背景

アミロイド ペプチド(A )の脳内蓄積は、アルツハイマー病の中心となる病態である。A はアミロイド前駆体タンパク質 (APP) より 部位および 部位が特異的なプロテアーゼで切断されることによって生じる。また、APP にはスプライシングのバリエーションによって主に3つのアイソフォームがあり、神経に発現している APP は 695 型であることが知られている。アルツハイマー病は脳実質に A が蓄積するという病理学的特徴から神経に発現する APP695 については数々の報告があるが、一方で APP770 についてはこれまで着目されてきていないのが現状である。また、A が蓄積することによって生じる疾患にはアルツハイマー病の他に、脳アミロイドアンギオパチー(CAA)が知られており、実に90%近くのアルツハイマー病患者脳において見いだされている。CAA は脳血管に A が沈着することにより血管壁が脆くなるため脳出血を起こすことから、脳血管障害の原因の一つとされている。しかし、これら脳血管に蓄積する A の由来や蓄積の原因、アルツハイマー病との関係はいまだよくわかっていない。最近では脳血管障害とアルツハイマー病との間に相関があることが言われているが、どのように関わりあっているのかの機構についても不明な点が多い。本申請者は最近、血管内皮細胞には神経細胞とは異なり、KPI domain と OX2 domain を含む APP770 が特異的に発現していること、さらに、O-結合型糖鎖が付加した APP のみが切断・分泌経路をたどることを明らかにした (\*Kitazume, S., \*Tachida, Y et al. J. Biol. Chem. (2010)286,31875-, \*both authors contributed equally to this work)。この結果は APP の A 産生経路と APP の O-結合型糖鎖修飾が密接に関係していることを示している。O-結合型糖鎖の研究は N-型糖鎖の研究に比べ解析の困難さもあり立ち遅れているが、O-結合型糖鎖が白血球の輸送などの免疫系に関わっているという報告 (Tenno, M. et al. Molecular and Cellular Biology. (2007)8783-8796) やフィブロネクチンの O-結合型糖鎖修飾が乳がんの進行に関与しているという報告も出てきている (Jae-Hyun Park et al. NEOPLASIA. (2011)320-326)。また、その後の実験結果から、血管内皮細胞型 APP770 のみならず、神経細胞型 APP695 にも O-結合型糖鎖が存在することもわかってきた。

## 2. 研究の目的

アルツハイマー病はアミロイド前駆体タンパク質 (APP) が 部位および 部位で切断されることによって生じるアミロイド ペ

チド(A )が脳実質に過剰に蓄積することが発症の引き金となっている。本申請者は最近、血管内皮細胞に APP770 が特異的に発現していること、しかも O-結合型糖鎖の付加した APP770 のみが A を産生する経路をたどることを明らかにした。そこで本研究では APP の O-結合型糖鎖の可視化イメージングを試み、APP の O-結合型糖鎖付加が A 産生経路とどのような時空間的關係にあるのか、糖鎖付加の改変により A 産生量の制御が可能なのかを明らかにすることを目的とし、タンパク質に対する O-結合型糖鎖修飾の役割について解明する。

## 3. 研究の方法

### 25年度計画

APP の切断経路と O-結合型糖鎖付加との関係の解明

#### (1) APP の細胞内局在の解析

細胞染色可能な細胞内コンパートメント (early endosome, late endosome, recycling endosome, Golgi) マーカータンパク質抗体の探索と細胞染色の条件検討。染色可能な抗体が見つからない場合は、各マーカータンパク質のコンストラクトやタグ付きコンストラクトを作製し、細胞に導入することで染色を試みる。

細胞染色可能な抗 APP 抗体の探索。様々な抗体との共染色を考え、ホストの異なる抗 APP 抗体を探索する。

#### (2) APP の細胞内動態のリアルタイムイメージング解析

APP を蛍光標識した抗 APP 抗体で可視化することにより、APP の細胞内での動態を観察する。APP を蛍光標識した抗 APP 抗体で観察するのが困難な場合、APP-GFP の導入細胞を用いることにより APP の可視化を行い顕微鏡下でリアルタイムに APP の動態を追跡する。

APP-GFP コンストラクトの作製。

抗体の反応性を損なわない、抗体の蛍光標識法を探索する。

APP を蛍光標識した抗 APP 抗体を用いて可視化するための観察条件の検討。リアルタイム(生きた細胞)での観察は困難が予

想されるため、まずは、固定化した細胞で検討し、その結果を元に生きた細胞での観察を行う。

### (3) O-結合型糖鎖付加と APP の細胞内動態のリアルタイムイメージング解析

これまでの予備的実験により、APP に付加している O-結合型糖鎖は根元が N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) であることがわかってきた。つまり、はじめの GalNAc が APP に付加されることにより APP の O-結合型糖鎖の伸長がおきていることになる。そこで、細胞内において、APP の GalNAc の付加を GalNAz や ManNAz を用いた Click-iT ケミストリーの手法を使い、リアルタイムイメージング解析する。GalNAz を用い APP への O-結合型糖鎖付加のリアルタイムイメージングを目指す。具体的な手法としては、細胞に GalNAz を取り込ませ後、GalNAz を蛍光標識してあるアルキン化合物とクリック反応によって O-結合型糖鎖付加を可視化する (図 5)。固定した細胞に関しては O-結合型糖鎖の可視化に成功しており、細胞内の特定部位に局在していることを見出しているため、生きた細胞でのリアルタイムイメージング観察を目指す。生きた細胞でのリアルタイムイメージングが難しい場合、まずは、細かくタイムコースをとることにより固定した細胞での解析を行う。

可視化の最終段階には APP-GFP と APP 上の GalNAz (click-iT によって蛍光標識した) の FRET 効果を観察することで APP 上の O-結合型糖鎖を可視化イメージングする。GFP 結合型糖タンパク質と ManNAz を用いた同一分子上での FRET 効果については、当研究グループによって報告されているので (Haga, Y., et al. Nat Commun. (2012) 19, 3:907) 手法などを参考にする。

### (4) APP の O-結合型糖鎖付加と A 産生への

影響

O-結合型糖鎖付加酵素の発現抑制を行い、APP の O-結合型糖鎖の付加を抑制した時、A の産生が減少するかどうかを観察する。

APP に GalNAc を付加している GalNAc 転移酵素の同定。O-結合型糖鎖の根元である GalNAc を転移する酵素は、現在わかっているだけで 20 種類程度ある。これらすべてが APP の O-結合型糖鎖付加を行っているとは考えにくく、またすべてを発現抑制することは現実的ではない。そこで、まずは、APP に GalNAz を付加している GalNAc 転移酵素の同定を行う。具体的な方法としては、APP 由来の合成ペプチドを基質とし、各種 GalNAc 転移酵素の組換えタンパク質を酵素源として反応を行う。その酵素反応産物は MS での解析を用いることにより、各 GalNAc 転移酵素の APP に対する GalNAc 転移活性を測定する。事前準備としての実験を行うための各 GalNAc 転移酵素のコンストラクト作製からタンパク質発現、精製まで行う。

の実験により絞り込まれた GalNAc 転移酵素の発現抑制を行い、A 産生量の減少をみる。発現抑制の手法としては、まず、RNAi を行い、A 産生量の測定は ELISA で行う。

GalNAc 転移酵素の発現を抑制した際の APP の細胞内での動態変化をイメージングにて解析。

## 26 年度以降計画

(1) の細胞内局在の解析については、25 年度中に結果をだす。

(2) の APP の細胞内動態のリアルタイムイメージング解析については、APP コンストラクト作製と抗体の蛍光標識法については 25 年度中に、APP を蛍光標識した抗 APP

抗体で観察するための条件検討については、生きた細胞でのリアルタイムイメージングを26年度に引き続き行う。

- (3)のAPPの細胞内動態とO-結合型糖鎖付加のリアルタイムイメージング解析については、GalNAZを用いたAPPへのO-結合型糖鎖付加のリアルタイムイメージングにおいては、少なくとも細かくタイムコースをとった固定細胞での解析は25年度中に終了させ、26年以降は生きた細胞での解析に移る。
- FRETによる解析については、26年度以降を中心に行う。

- (4)のAPPのO-結合型糖鎖付加とA産生への影響については、25年度中にGalNAc転移酵素の同定は終了させ、26年度以降絞り込まれたGalNAc転移酵素の発現抑制によるA産生量の減少やGalNAc転移酵素発現の抑制時でのAPPの細胞内動態の解析を中心に実験を行う。

#### 4. 研究成果

これまでの研究結果から、APPのO-結合型糖鎖付加がアルツハイマー病発症原因の一つであるA産生を左右していることがわかってきた。そこで、APPのO-結合型糖鎖付加が細胞内において、いつ・どこで起きているのか、さらに糖鎖修飾の有無とA産生経路がどのような関係を持つのかを明らかにするため、可視化イメージング観察を目的とした、細胞染色ツールの作製と条件検討を行っている。25年度では、APPのO-結合型糖鎖修飾の機序をClickケミストリーの手法を用い生化学的に証明することに成功した。26年度はそこからさらに発展し、超解像顕微鏡(STED)とHaloシステムという新しい技術を取り入れ

ることにより、細胞膜移行後のAPPを可視化標識し、細胞内での動態を追うことに成功している。また、APPの代謝とO-結合型糖鎖付加に深い関わりがあることがわかってきたので、25年度ではAPPにO-結合型糖鎖を付加する糖転移酵素の探索を行い絞り込むところまで進んでいたが、26年度はその結果を元にそれら糖転移酵素の改変を行うことによりAPP代謝への影響を追い、結果を得ている。27年度では25年度、26年度の結果を進展させ、ClickケミストリーとHaloを用いた手法ではO-結合型糖鎖修飾されたAPPのみを可視化することに成功しており、O-結合型糖鎖修飾されたAPPとされていないAPPでは細胞内での挙動が異なっていることを視覚的に観察することに成功している。また、糖転移酵素の改変を行うことによりAの産生量が変化することも確認できている。

#### 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 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

(立田由里子)「アミロイド 産生量を規定するAPPのO-結合型糖鎖修飾」第88回日本生化学会 2015年12月03日 ポートアイランド(兵庫県・神戸)

(立田由里子)「Click chemistryを用いたO-結合型糖鎖の可視化とアミロイド 前駆体タンパク質(APP)の細胞内動態

イメージング」GlycoTokyo2015 2015年10月24日 慶応義塾大学(神奈川県・日吉)

(立田由里子)「O-結合型糖鎖に着目したアミロイド 前駆体タンパク質の細胞内動態のイメージング解析」第34回日本糖質学会 2015年08月02日 東京大学(東京都・文京区)

(立田由里子)「脳血管内皮細胞が発現するアミロイド 前駆体タンパク質(APP)770の解析とイメージング」Glyco Tokyo 2013 2013年10月19日 成城大学(東京都・武蔵野市)

(立田由里子)「糖鎖クリック標識実験の実際と糖鎖の細胞イメージング -アミロイド 前駆体タンパク質(APP)のO-結合型糖鎖の可視化を目指して-」第32回日本

糖質学会 2013年8月6日 大阪国際フォーラム(大阪府・大阪市)

(立田由里子)「Brain endothelial cells produce amyloid from amyloid precursor protein 770 and preferentially secrete the O-glycosylated form」 第2回システムズケミカルバイオロジー合同シンポジウム 2013年4月17日 理化学研究所(埼玉県・和光市)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 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 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:立田由里子(Tachida Yuriko)  
・国立研究開発法人理化学研究所・疾患糖鎖研究チーム・技師

研究者番号:70392024

(2)研究分担者  
( )

研究者番号:

(3)連携研究者  
( )

研究者番号: