

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460090

研究課題名(和文) APP代謝における糖鎖機能の解析

研究課題名(英文) Role of glycosylation in processing of APP

研究代表者

萬谷 博 (Manya, Hiroshi)

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・研究副部長

研究者番号：20321870

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：糖鎖はタンパク質の物理的性質や分子間の認識に影響する。老化などによる糖鎖変化はアミロイド前駆体タンパク質(APP)のプロセッシングに影響する可能性がある。そこで、APP代謝における糖鎖変化の影響を検討した。アルツハイマー病(AD)脳におけるO型糖鎖の合成酵素であるGALNTファミリー遺伝子の発現解析から、GALNT6などいくつかのアイソザイムがADで増加することが明らかとなった。また、GALNT6によるAPPの特定の部位のO型糖鎖修飾がA_βの産生を抑制することが明らかとなった。本研究により、糖鎖修飾がアルツハイマー病の病態に関わることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Alterations of the structure or amount of glycans on glycoproteins are associated with many diseases. We previously demonstrated that changes in N-glycans alter A_β production. Here, we focused on the relationship between Alzheimer's disease (AD) and O-glycan. The polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase (GALNT) family functions in the first step of mucin-type O-glycan synthesis. Analysis of the expression of GALNTs in the human brain using real-time PCR revealed that the expression of several GALNTs were altered with sporadic AD progression. The expression of GALNT6 increased in AD brain. Transfection of GALNT6 significantly reduced both A_β40 and A_β42 secretion. GALNT6 exhibited GalNAc transferase activity on amyloid precursor protein (APP). The activities of β-secretase and γ-secretase were not significantly altered in the transfected cells. These data suggest that excess O-glycosylation on APP by GALNT6 inhibits A_β production.

研究分野：生化学

キーワード：糖鎖 脳神経疾患 老化 アルツハイマー病 アミロイド前駆体タンパク質

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病の脳病理学的特徴は A が蓄積した老人斑とリン酸化タウが蓄積した神経原線維変化の出現である。その発症過程は 10 数年以上にも及ぶことから、発症の機構には複数の因子が関与した複雑なカスケードが存在すると考えられる。

生体のタンパク質の多くは糖鎖を有する糖タンパク質であり、APP や APP 代謝に関わるセクレターゼなども例外なく糖鎖を有している。このような糖鎖にはタンパク質の物性を変化させる作用や物質間の認識における重要な因子としての機能があることが明らかにされつつある。これらの知見から、APP やセクレターゼのアミノ酸変異により APP およびセクレターゼの糖鎖修飾が変化する可能性がある。また、孤発性アルツハイマー病においても老化等による細胞内代謝系の変化により APP やセクレターゼの糖鎖修飾が変化して APP のプロセッシング機構に影響する可能性が考えられる。

代表者は、家族性アルツハイマー病患者に見られる変異型 APP の N 型糖鎖には正常型に比較してバイセクティング型糖鎖が多いことや、アルツハイマー病患者の脳では、バイセクティング型糖鎖の合成酵素である *GnT-III* の mRNA が増加していることを明らかにするなど、糖鎖修飾が APP 代謝に関わることを示してきた。

2. 研究の目的

本研究では、APP 代謝に糖鎖が影響するメカニズムを明らかにすることで、糖鎖を利用した APP 代謝制御という新しいアルツハイマー病予防法の可能性を示すことを目的とした。

(1) アルツハイマー病脳におけるバイセクティング型糖鎖の生理的意義の解析

我々はこれまでに、家族性アルツハイマー型変異 APP の N 型糖鎖にはバイセクティング型糖鎖が多いこと、アルツハイマー病脳ではバイセクティング型糖鎖の合成酵素 *GnT-III* 遺伝子の発現が増加していることを報告してきた。そこで、アルツハイマー病モデルマウスと *GnT-III* 欠損マウスを用いてバイセクティング型糖鎖増加の生理的意義について調べた。

(2) アルツハイマー病における O 型糖鎖合成酵素の発現解析

これまで APP 代謝と N 型糖鎖の関連を示してきたが、糖鎖には N 型 (アスパラギン結合型) と O 型 (セリン/スレオニン結合型) が存在する。O 型糖鎖と APP 代謝との関係はあまり報告されていない。また、主要な O 型糖鎖であるムチン型糖鎖の合成開始酵素である N-アセチルガラクトサミン転移酵素 (GALNT) は約 20 種のアイソフォームが報告されているが、それらの機能や基質特異性の

違いはあまりわかっていない。そこで、アルツハイマー病脳における *GALNT* ファミリー遺伝子の発現解析を行い、アルツハイマー病と O 型糖鎖の関連を調べた。

(3) APP 代謝における O 型糖鎖変化の影響の解析

アルツハイマー病脳の遺伝子の発現解析から、アルツハイマー病の進行に伴い *GALNT6* mRNA の発現が有為に増加していたことから、*GALNT6* と APP 代謝との関連を調べた。

3. 研究の方法

(1) *GnT-III* 欠損マウス (*GnT-III* KO) とアルツハイマー病モデルマウス (APP Tg, APP Swedish mutant transgenic) を交配させ、脳におけるバイセクティング型糖鎖の発現と A の沈着を調べた。また、東京都健康長寿医療センター高齢者ブレインバンク検体 (対照群 (C)、早期アルツハイマー群 (eAD)、アルツハイマー群 (AD) の脳灰白質検体各 4 例) におけるバイセクティング型糖鎖の発現を調べた。糖鎖の発現はレクチンおよびウェスタンブロット、A の沈着は免疫染色などで確認した。

(2) 高齢者ブレインバンク検体 (対照群 (C)、早期アルツハイマー群 (eAD)、アルツハイマー群 (AD) の脳灰白質検体各 10 例) より RNA を抽出し、定量的リアルタイム PCR 法により *GALNT* ファミリーの約 20 種のアイソザイムの発現を解析し多群検定を行った。

(3) 培養細胞 (HEK293T) に *GALNT6* と APP を共に強制発現させ、sAPP および A の産生量をウェスタンブロット、ELISA 法により調べた。*GALNT6* による APP の O 型糖鎖修飾をレクチンブロット、質量分析法により調べた。

4. 研究成果

(1) 脳におけるバイセクティング型糖鎖の発現を調べた結果、APP を切断して A を産生する酵素である セクレターゼ (BACE1) がバイセクティング型糖鎖の修飾を受けることが分かった。さらに、アルツハイマー病脳ではバイセクティング型糖鎖を持つ BACE1 が増加することが明らかとなった。

APP Tg マウスと *GnT-III* KO マウスの交配実験から、*GnT-III* KO では、A 蓄積の減少が認められた。また、BACE1 はバイセクティング型糖鎖の量により細胞内局在が変化し、バイセクティング型糖鎖が多い場合に APP と共局在していた。このことから、*GnT-III* KO ではバイセクティング型糖鎖が合成できないため、BACE1 と APP が異なる画分に局在することで A 産生が減少したと考えられる。*GnT-III* による BACE1 のバイセクティング型糖鎖修飾がアルツハイマー病の発症に関与することが明らかとなった。

(2)リアルタイム PCR の結果、eAD から AD への病態の進行に伴って有為に発現が増加するアイソザイム (GALNT4,6,7,8,10) 発現に有為な変化が見られないアイソザイム (GALNT1,2,3,12,14,15,16) eAD でのみ有為に増加するアイソザイム (GALNT13) があることがわかった。

(3) GALNT6 と APP の共発現により A の産生量は減少した。このとき、sAPP の産生量は減少し、sAPP の産生量は増加していたことから、A 産生量の減少は、APP の切断の抑制と切断の促進によることが明らかとなった。一方、APP 代謝に関わる各セクレターゼの発現量や活性には有意な差は認められなかった。APP のアミノ酸配列に基づいて作成した合成ペプチドを基質に用いた GALNT6 の活性測定実験から、APP 切断部位近傍の特定の Thr に対する過剰な O 型糖鎖修飾が APP の代謝に影響することが示唆された。GALNT6 による APP の O 型糖鎖修飾は A 産生を抑制し、アルツハイマー病に対して防御的な役割を果たしている可能性が考えられた。

<引用文献>

- Akasaka-Manyu K. et al.: Increased bisecting and core-fucosylated N-glycans on mutant human amyloid precursor proteins. *Glycoconj. J.*, 25(8), 775-786, 2008
- Akasaka-Manyu K. et al.: Protective effect of N-glycan bisecting GlcNAc residues on β -amyloid production in Alzheimer's disease. *Glycobiology*, 20(1), 99-106, 2010
- Kizuka Y. et al.: An aberrant sugar modification of BACE1 blocks its lysosomal targeting in Alzheimer's disease. *EMBO Mol. Med.*, 7(2), 175-189, 2015
- Akasaka-Manyu, K. et al.: Excess APP O-glycosylation by GalNAc-T6 decreases A production. *J. Biochem.*, 161(1), 99-111, 2017

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

1. Akasaka-Manyu K., Kawamura M., Tsumoto H., Saitoh Y., Tachida Y., Kitazume S., Hatsuta H., Miura Y., Hisanaga S., Murayama S., Hashimoto Y., Manyu H., Endo T.: Excess APP O-glycosylation by GalNAc-T6 decreases A production. *J. Biochem.*, 161(1), 99-111, 2017, doi: 10.1093/jb/mvw056
2. Yaji S., Manyu H., Nakagawa N., Takematsu H., Endo T., Kannagi R., Yoshihara T., Asano M., Oka S.: Major glycan structure underlying

expression of the Lewis X epitope in the developing brain is O-mannose-linked glycans on phosphacan/RPTP. *Glycobiology*, 25(4), 376-385, 2015, doi: 201510.1093/glycob/cwu118

3. Kizuka Y., Kitazume S., Fujinawa R., Saito T., Iwata N., Saido TC., Nakano M., Yamaguchi Y., Hashimoto Y., Staufenbiel M., Hatsuta H., Murayama S., Manyu H., Endo T., Taniguchi N.: An aberrant sugar modification of BACE1 blocks its lysosomal targeting in Alzheimer's disease. *EMBO Mol. Med.*, 7(2), 175-189, 2015, doi: 10.15252/emmm.201404438

[学会発表](計 11 件)

1. 赤阪-萬谷啓子、萬谷博、遠藤玉夫：APP 代謝における O 型糖鎖修飾の影響。日本薬学会第 137 年会。仙台国際センター（宮城県仙台市），2017.3.24-27
2. 赤阪-萬谷啓子、川村方希、津元裕樹、萬谷博、遠藤玉夫：A 産生における O 型糖鎖修飾の影響。第 39 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市），2016.11.30-12.2
3. 赤阪-萬谷啓子、川村方希、津元裕樹、萬谷博、遠藤玉夫：APP 代謝における ppGalNAcT-6 の影響。第 89 回日本生化学会大会、仙台国際センター（宮城県仙台市），2016.9.25-27
4. 北爪しのぶ、立田由里子、木塚康彦、今牧理恵、加藤雅樹、山口芳樹、田中克典、中の三弥子、斎藤貴志、西道隆臣、萬谷博、遠藤玉夫、橋本康弘、谷口直之：アミロイド産生と脳アミロイドアンギオパチーを規定する血管内皮細胞の O-GalNAc 型糖鎖。第 34 回日本糖質学会年会、高知市文化プラザ かるぽーと（高知県高知市），2016.9.1-3
5. 赤阪-萬谷啓子、川村方希、萬谷博、遠藤玉夫：O 型糖鎖修飾による APP 代謝への影響。第 39 回日本基礎老化学会大会、伊勢原市民文化会館（神奈川県伊勢原市），2016.5.27-28
6. 生形亮介、赤阪啓子、萬谷博、遠藤玉夫：-Klotho の欠損による糖鎖異常。首都大バイオコンファレンス 2015、首都大学東京（東京都八王子市），2015.11.6
7. 赤阪-萬谷啓子、萬谷博、岡昌吾、遠藤玉夫：老化に伴って増加する非硫酸化グルクロン酸による CD13 の活性変化。第 34 回日本糖質学会年会、東京大学（東京都文京区），2015.7.31-8.2
8. 津元裕樹、萬谷博、遠藤玉夫、三浦ゆり：組換え糖転移酵素 POMGnT1 の O-結合型糖鎖解析。日本質量分析学会第 63 回質量分析総合討論会、つくば国際会議場（茨城県つくば市），2015.6.17-19

9. 川村方希、赤阪-萬谷啓子、萬谷博、櫻井洋子、遠藤玉夫: *O*型糖鎖修飾によるアミロイド 産生への影響. 首都大学東京バイオコンファレンス2014, 首都大学東京(東京都・八王子市), 2014.11.7
10. 木塚康彦、北爪しのぶ、藤縄玲子、斉藤貴志、岩田修永、西道隆臣、中の三弥子、山口芳樹、橋本康弘、Matthias Staufenbiel、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, 名古屋大学(愛知県・名古屋市), 2014.8.10-12
11. 萬谷博、赤阪-萬谷啓子、遠藤玉夫: アルツハイマー病患者の脳における糖転移酵素の発現解析. 第33回日本糖質学会年会ワークショップ「認知症と糖鎖」, 名古屋大学(愛知県・名古屋市), 2014.8.10-12

〔図書〕(計 2件)

1. Manya H., Endo T.: *O*-Mannosyl glycan and muscular dystrophy. Sugar chains (Suzuki, T., Ohtsubo, K., Taniguchi, N. eds.), Springer, 2015, 288
2. Manya, H., Endo, T.: Protein *O*-linked-mannose β -1,2-*N*-acetyl glucosaminyltransferase 1 (POMGNT1), Handbook of Glycosyl transferases and related genes. (Taniguchi N., Honke K., Fukuda M., Narimatsu H., Yamaguchi Y., Angata T. eds), Springer, 2014, 670

〔その他〕

ホームページ等

http://www.tmghig.jp/J_TMIG/kenkyu/team/bunshikikou.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

萬谷 博 (MANYA, Hiroshi)

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・研究副部長

研究者番号: 20321870