

糖転移酵素の働きと疾患との関わり

岐阜大学

生命の鎖統合研究センター (G-CHAIN)

木塚 康彦

Contents

1. 糖鎖(複合糖質)と糖転移酵素とは
2. アルツハイマー病と糖転移酵素の話
3. がんと糖転移酵素の話

Contents

1. 糖鎖(複合糖質)と糖転移酵素とは
2. アルツハイマー病と糖転移酵素の話
3. がんと糖転移酵素の話

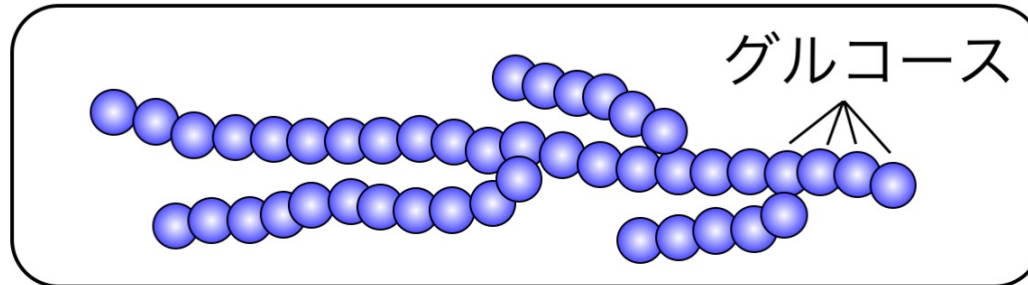
糖鎖の基礎

糖鎖 = 「糖」の「鎖」

糖鎖の基礎

単純多糖 (糖だけ) : エネルギー、構造体

デンプン、グリコーゲン

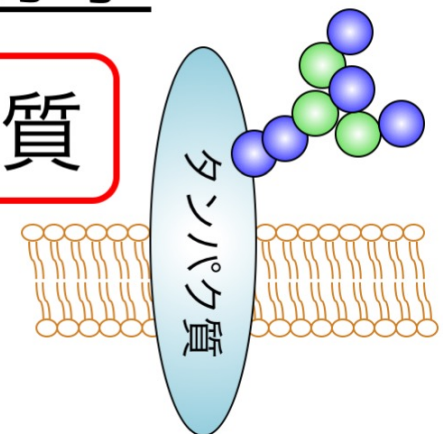


— エネルギー

セルロース、キチン ——— 繊維、構造体

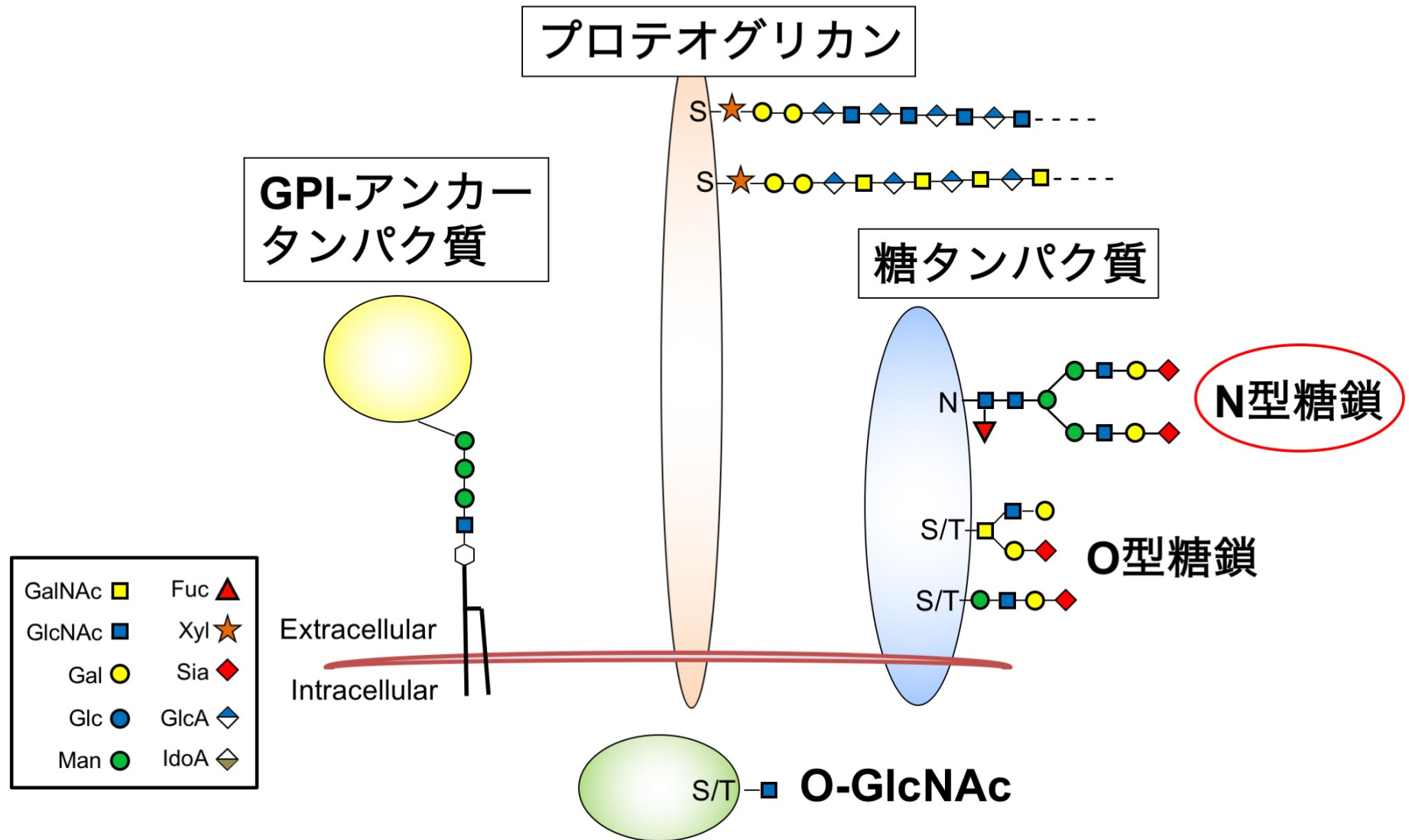
複合糖質(糖+他の高分子) : 機能性分子

- ・ 糖タンパク質 : 糖鎖+タンパク質
- ・ 糖脂質 : 糖鎖+セラミド



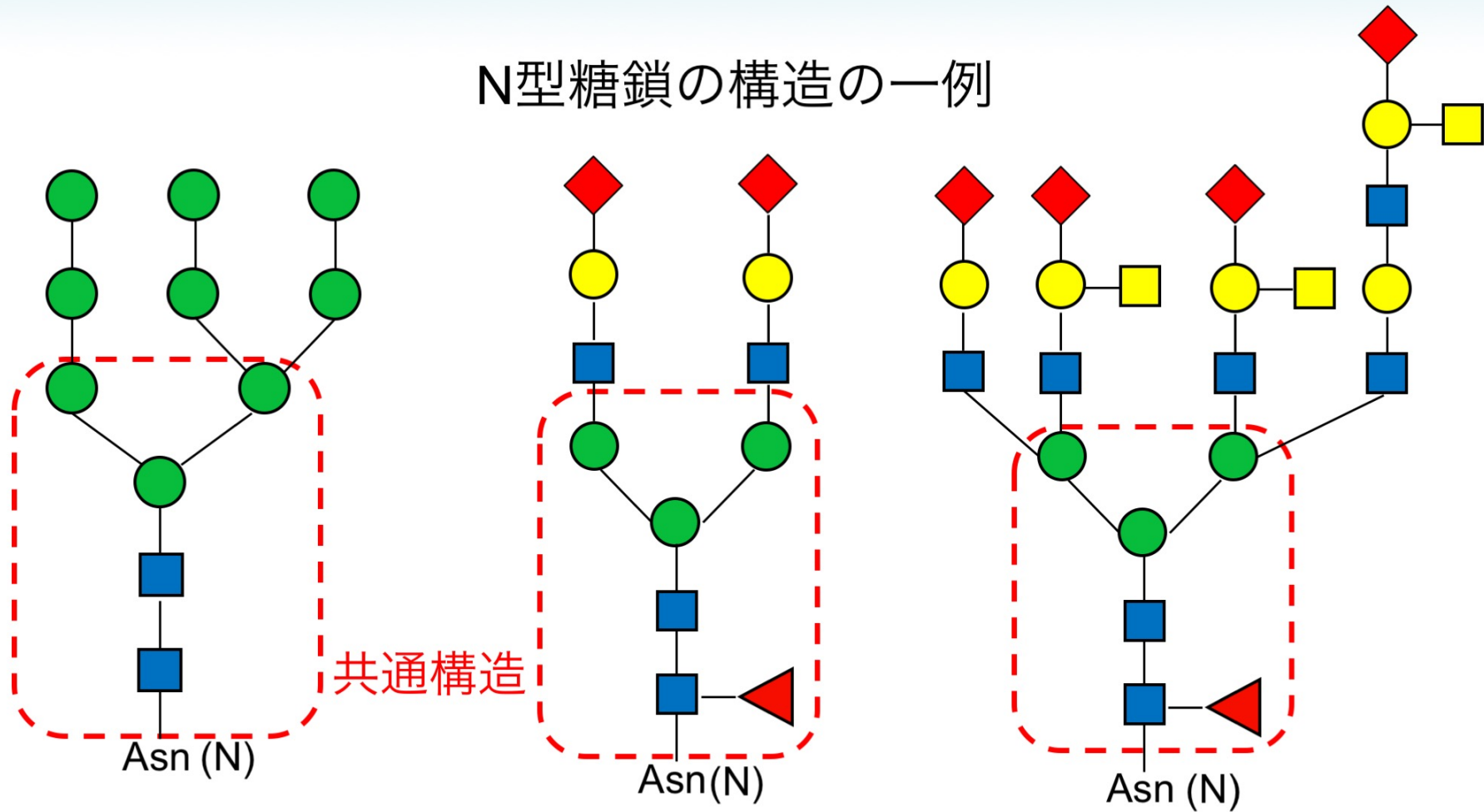
哺乳類の糖タンパク質糖鎖







哺乳類では5割以上のタンパク質に糖(鎖)がついている



N型糖鎖

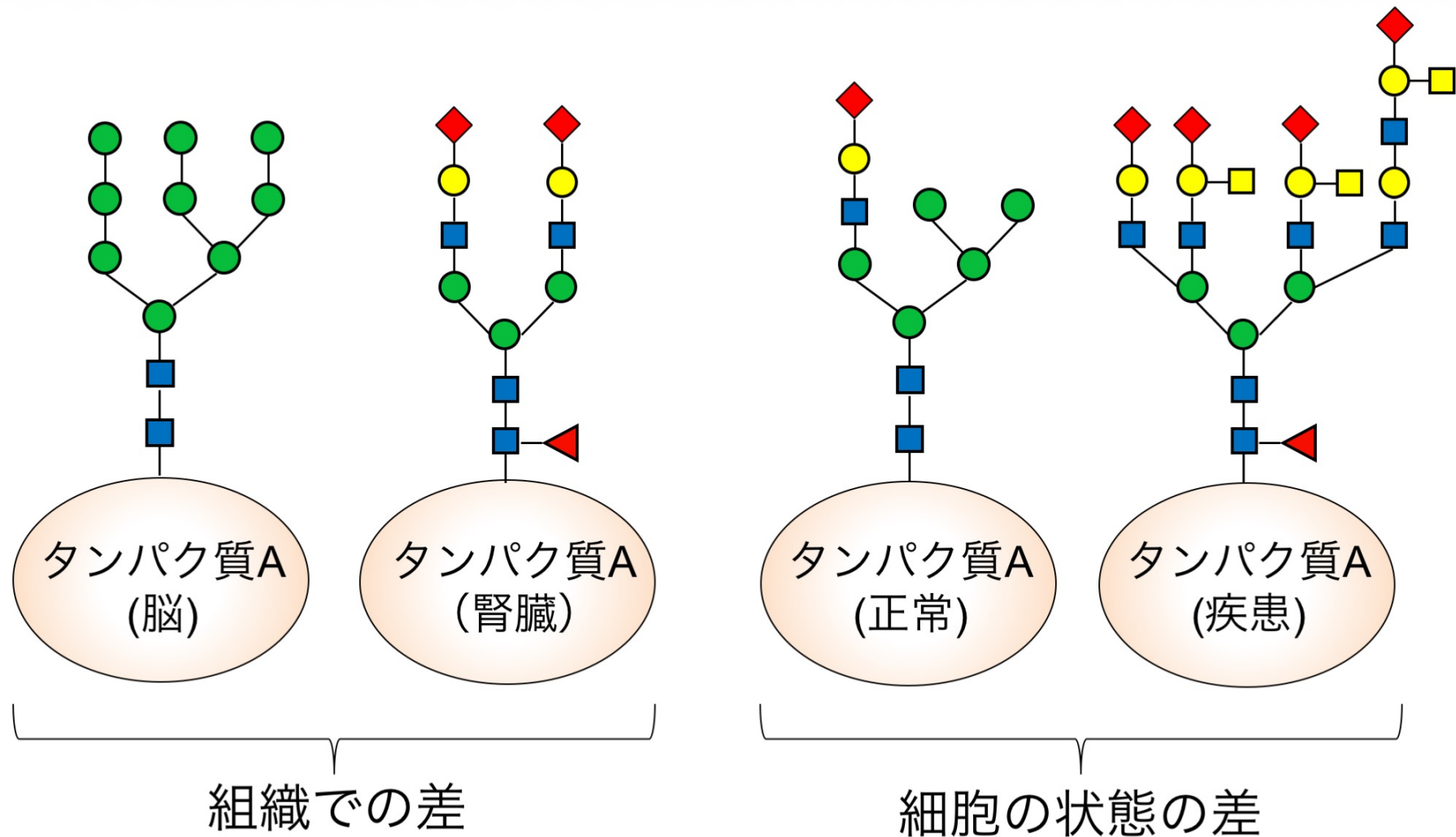
N型糖鎖の構造の一例



 GlcNAc	 GalNAc
 マンノース	 ガラクトース
 フコース	 シアル酸

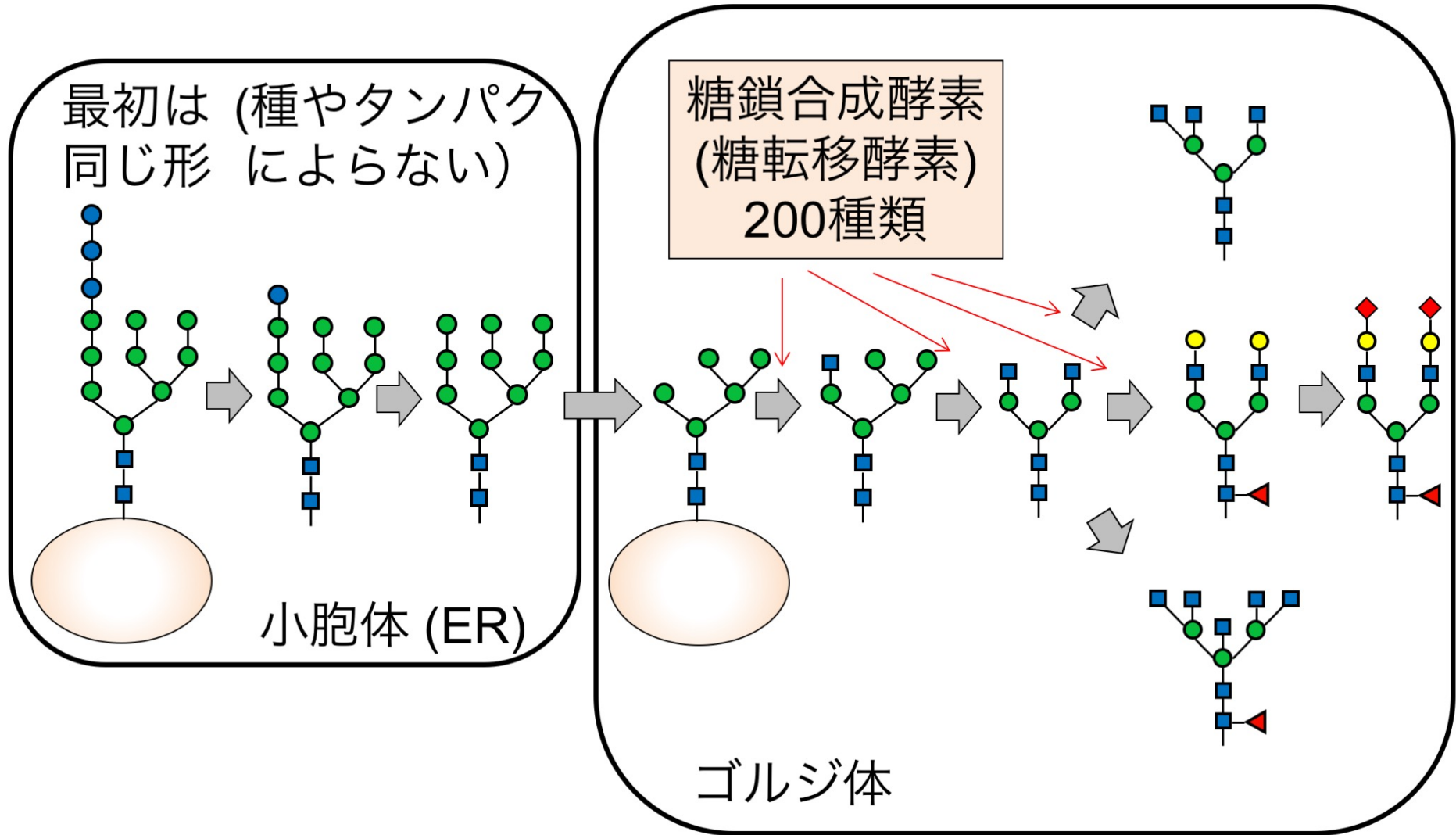
N型糖鎖の構造は非常に複雑である

糖鎖の意義の一つ：多様性



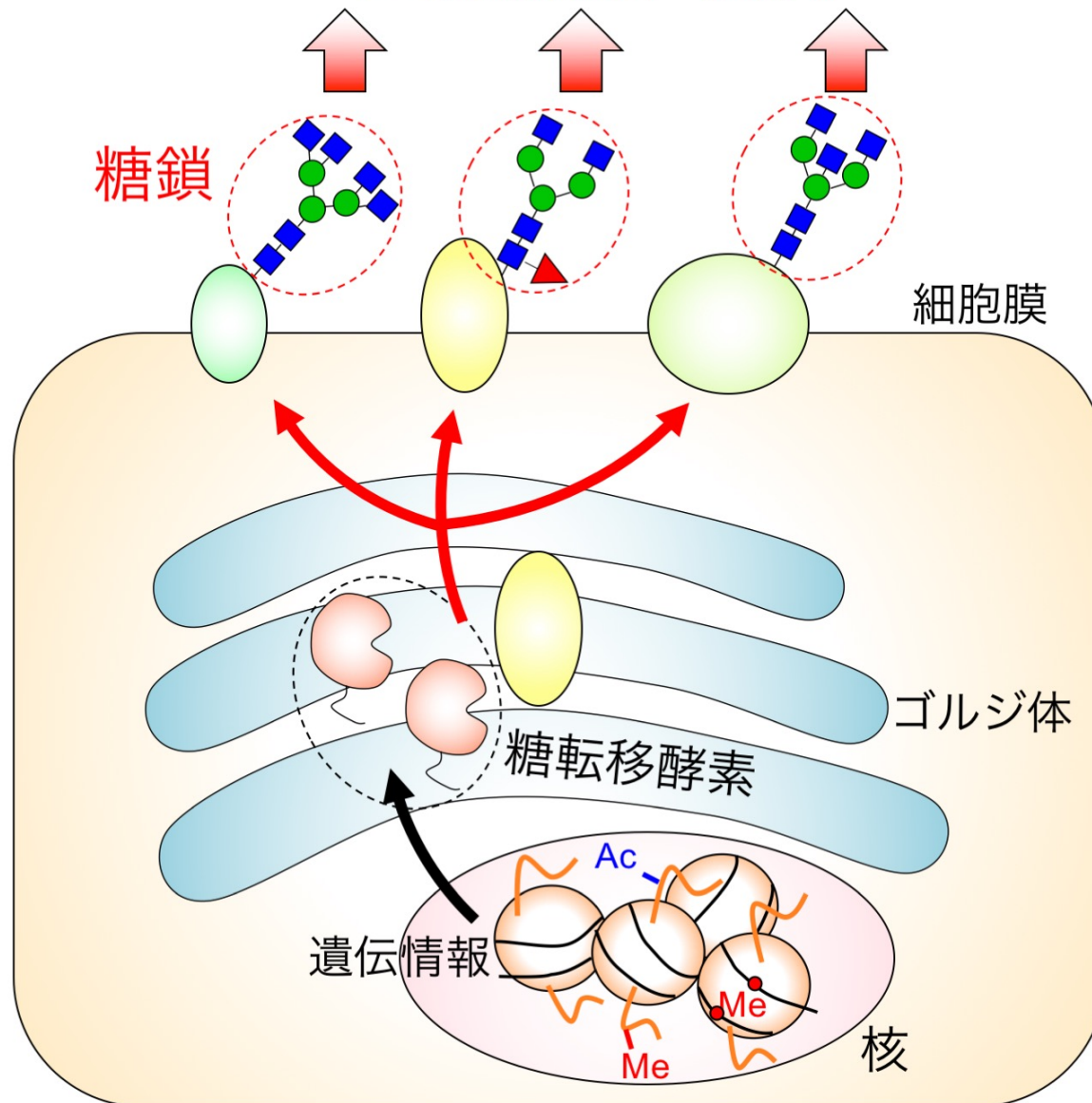
同一のタンパク質に爆発的な多様性をもたらす
(限られた遺伝子数から大量のバリエーションをうむ)

N型糖鎖はどのように作られるか？

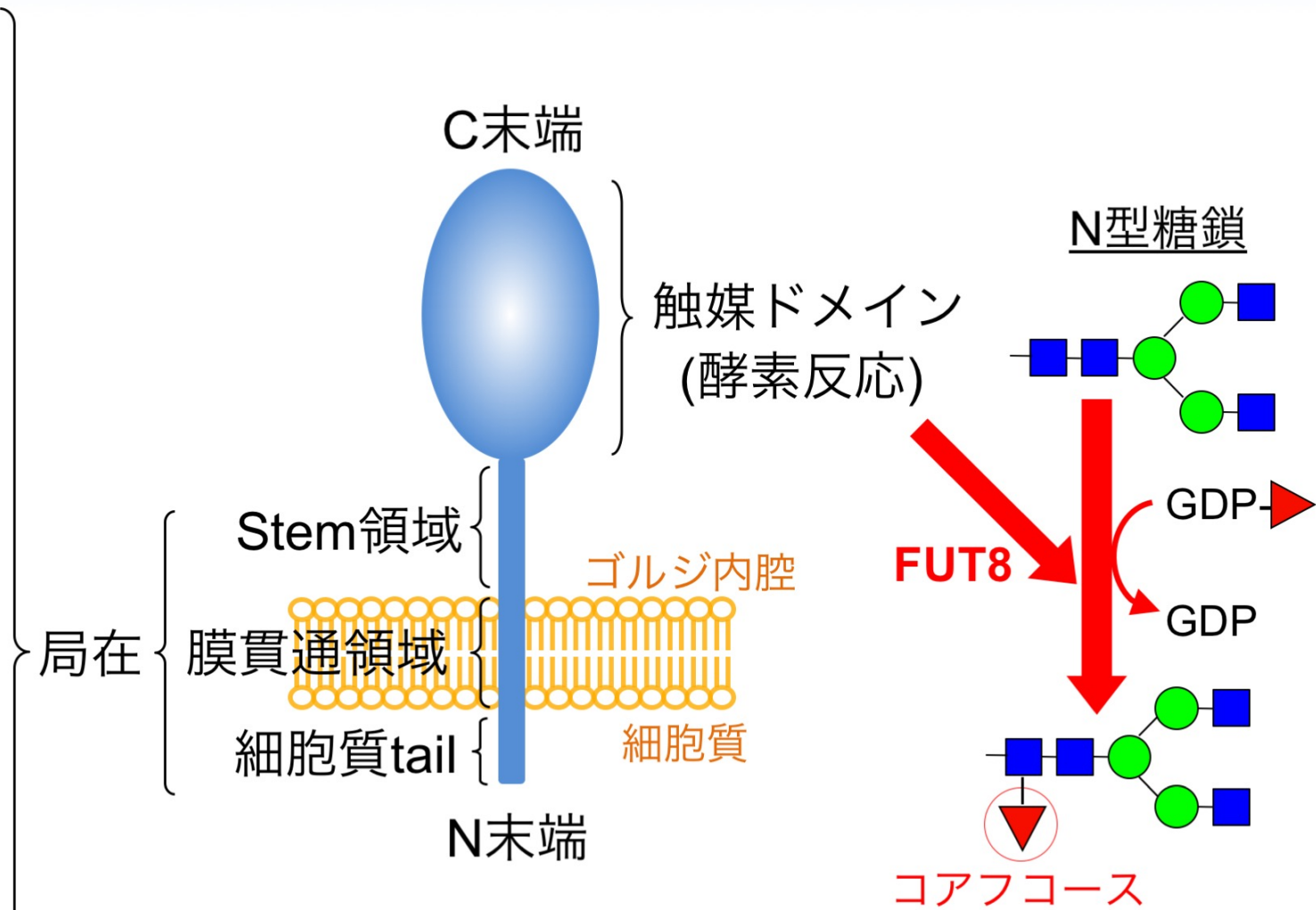
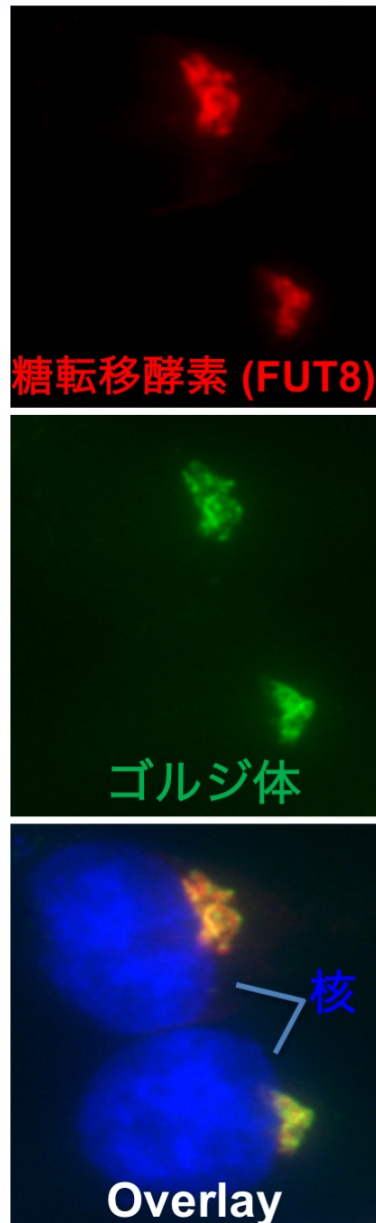


糖転移酵素による糖鎖生合成

生物機能、疾病



ゴルジ体の糖転移酵素の一般構造

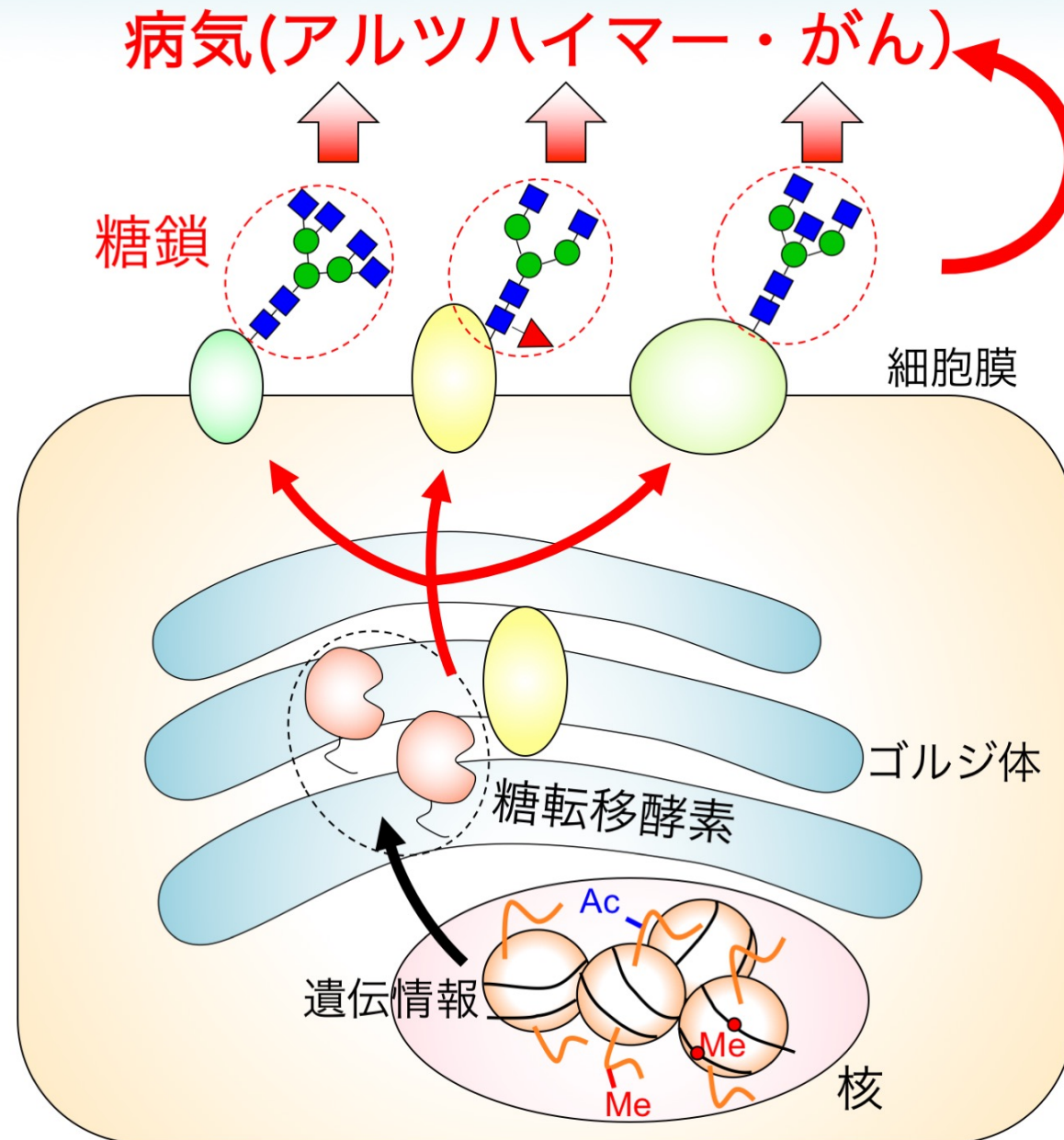


酵素反応については比較的多くの知見があるが、局在の仕組みはまだあまりよくわかっていない

Contents

1. 糖鎖(複合糖質)と糖転移酵素とは
2. アルツハイマー病と糖転移酵素の話
3. がんと糖転移酵素の話

研究の目標



病気(アルツハイマー・がん)

糖鎖

細胞膜

ゴルジ体

糖転移酵素

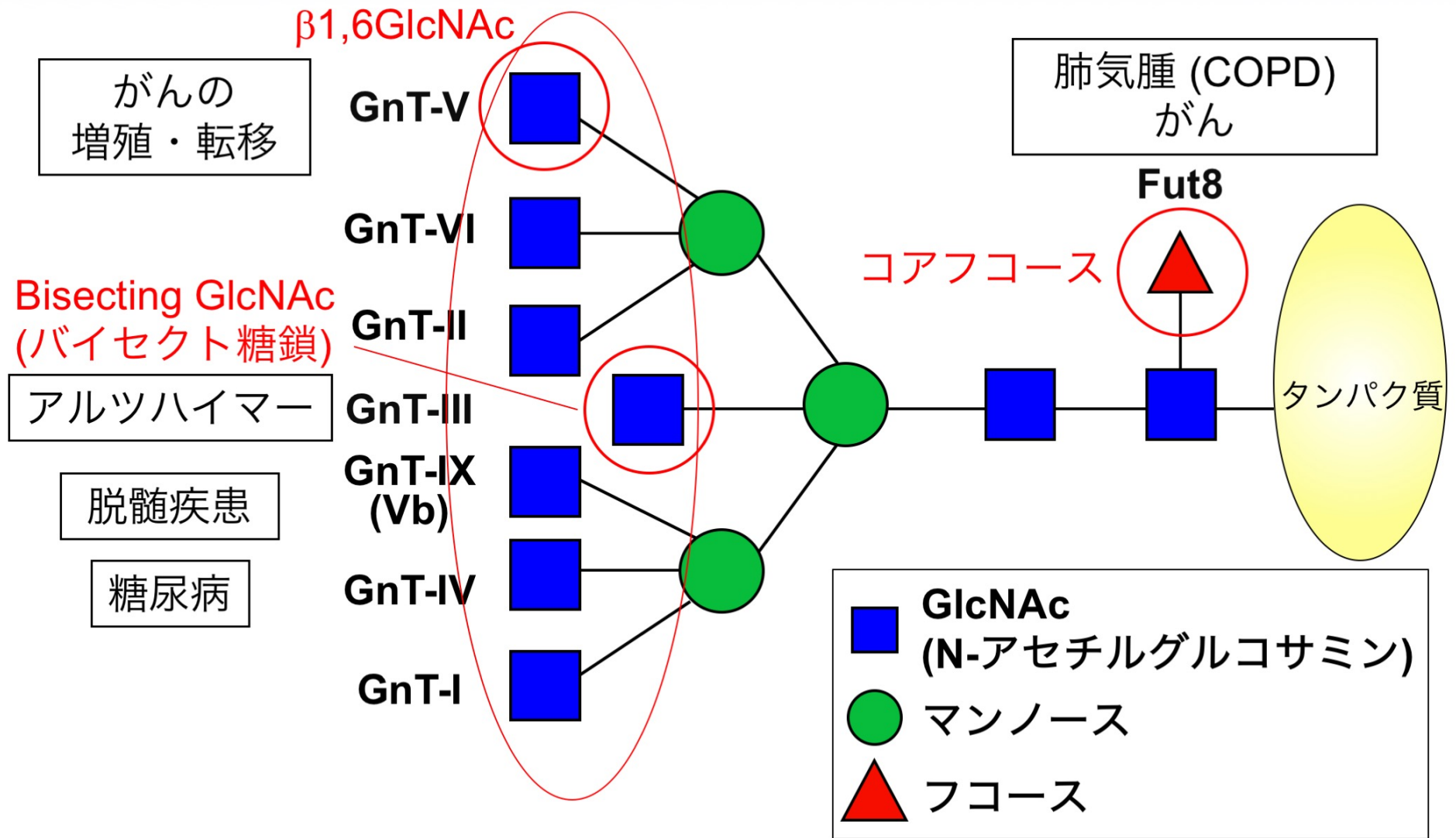
遺伝情報

核

糖鎖の観点から
診断・治療
を目標

糖鎖の基礎知識
診断・治療
に活かす

N型糖鎖の枝分かれ構造



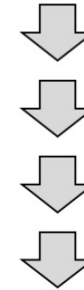
それぞれの分岐鎖は固有の機能を持つ

アルツハイマー病(Alzheimer's Disease, AD)

アルツハイマー病(AD)

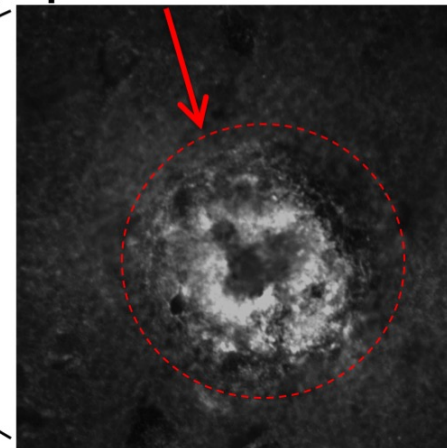
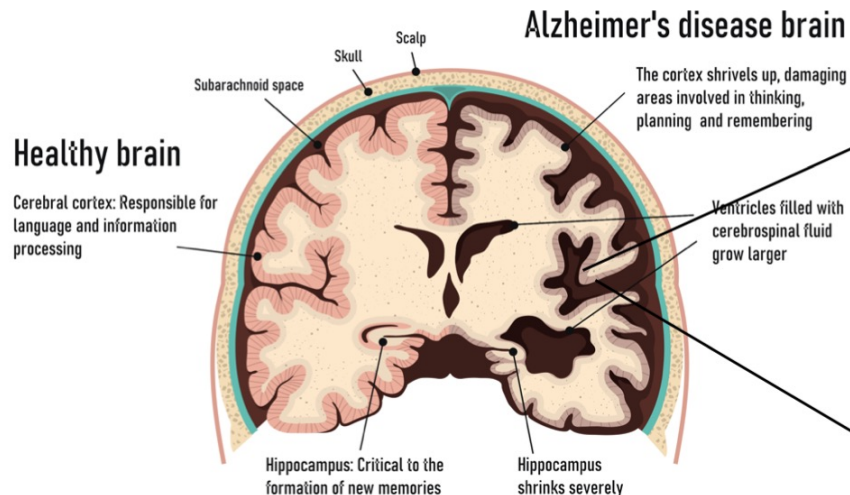
- ・最も主要な認知症 (認知症の6割)
日本では100万から200万人
- ・脳の萎縮
記憶・認知障害
- ・有効な治療薬はない

A β 蓄積

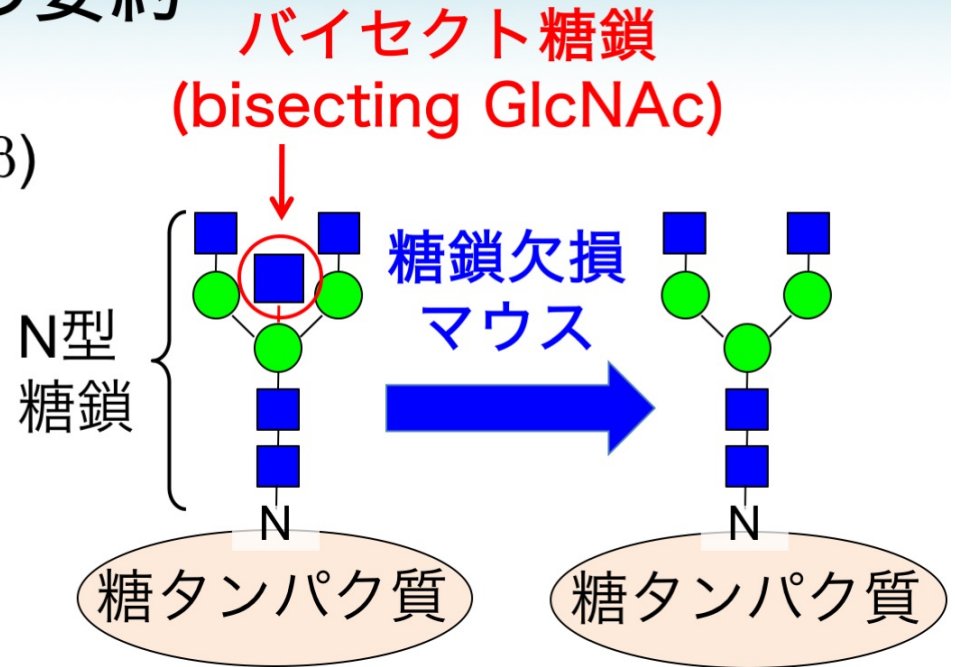
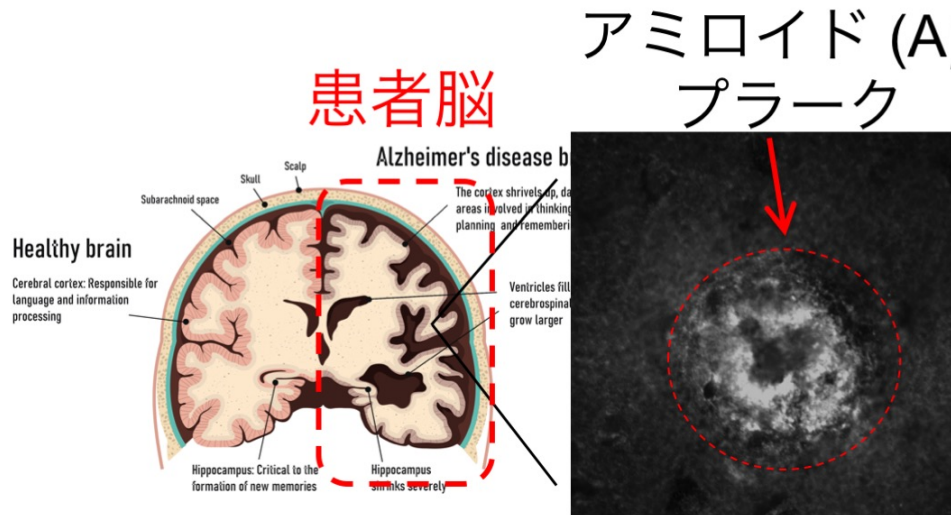


神経細胞死

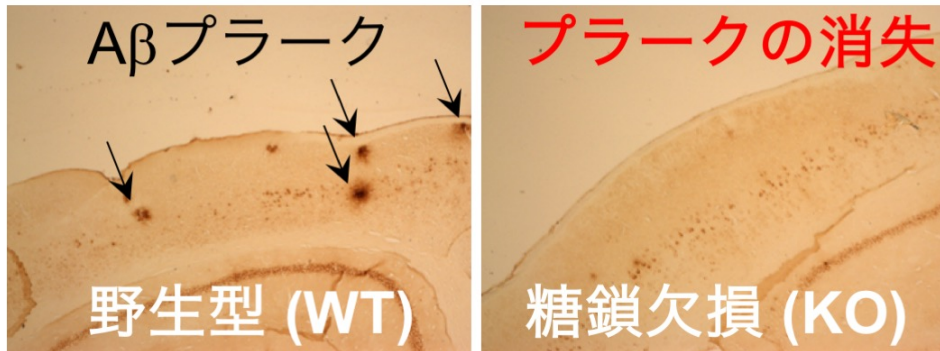
病理変化：アミロイド (A β) プラーク
(A β ペプチドの凝集体)



結果の要約

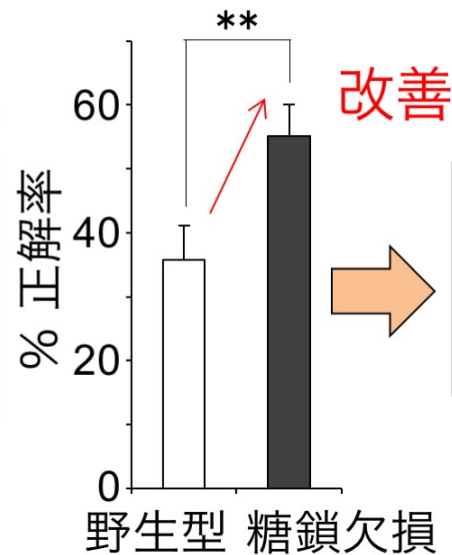


マウスの脳の染色



(Kizuka et al., *EMBO Mol. Med.*, 2015, 7, 175)

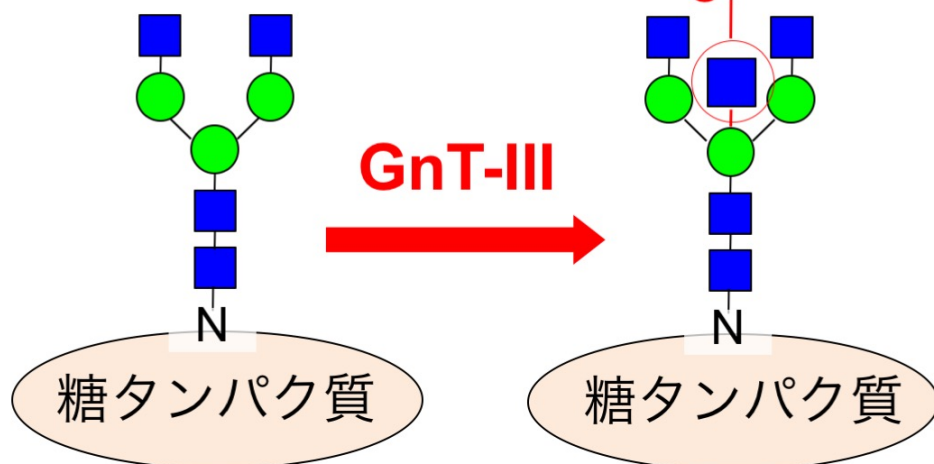
短期記憶能力



バイセクト糖鎖は
新規治療
ターゲット

GnT-IIIとアルツハイマーとの関係

バイセクト糖鎖
Bisecting GlcNAc



(Nishikawa, Taniguchi et al. *J. Biol. Chem.* 1992, 267, 18199)

AD患者脳

**GnT-III mRNA はAD患者
脳で発現増加している**

(Akasaka-Manyu et al.
Glycobiology 2010, 20, 99)

ADの病態との関わりは不明

組織分布

**GnT-III mRNAは脳で最も
発現が高い**

(Miyoshi et al. *Int. J. Cancer* 1997, 72, 1117)

→ 脳での機能は分かっていない

研究の目的

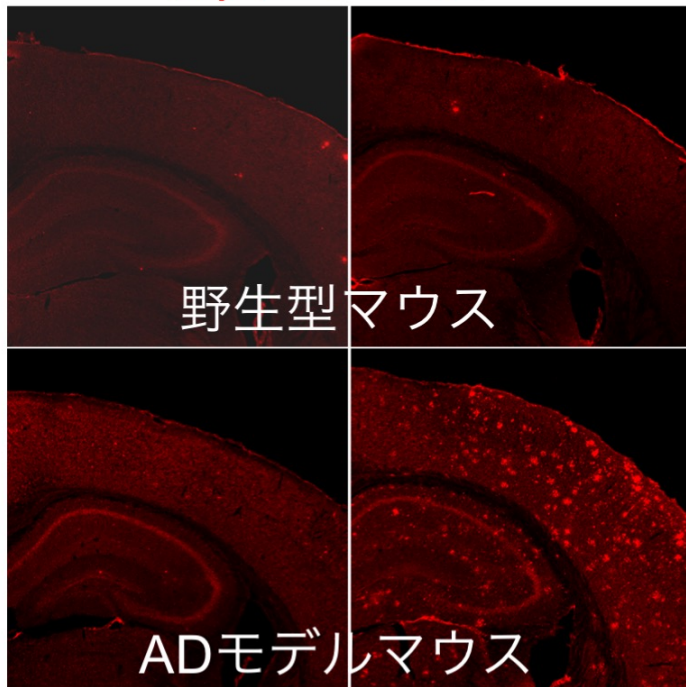
バイセクト糖鎖がAD病態
において果たす役割の解明

→ **GnT-III KOマウスの解析**

アルツハイマーモデルマウス

マウスはA β 配列の変異やヒトより短寿命のためADを発症しない
→ ADモデルマウスを使用

A β プラーク

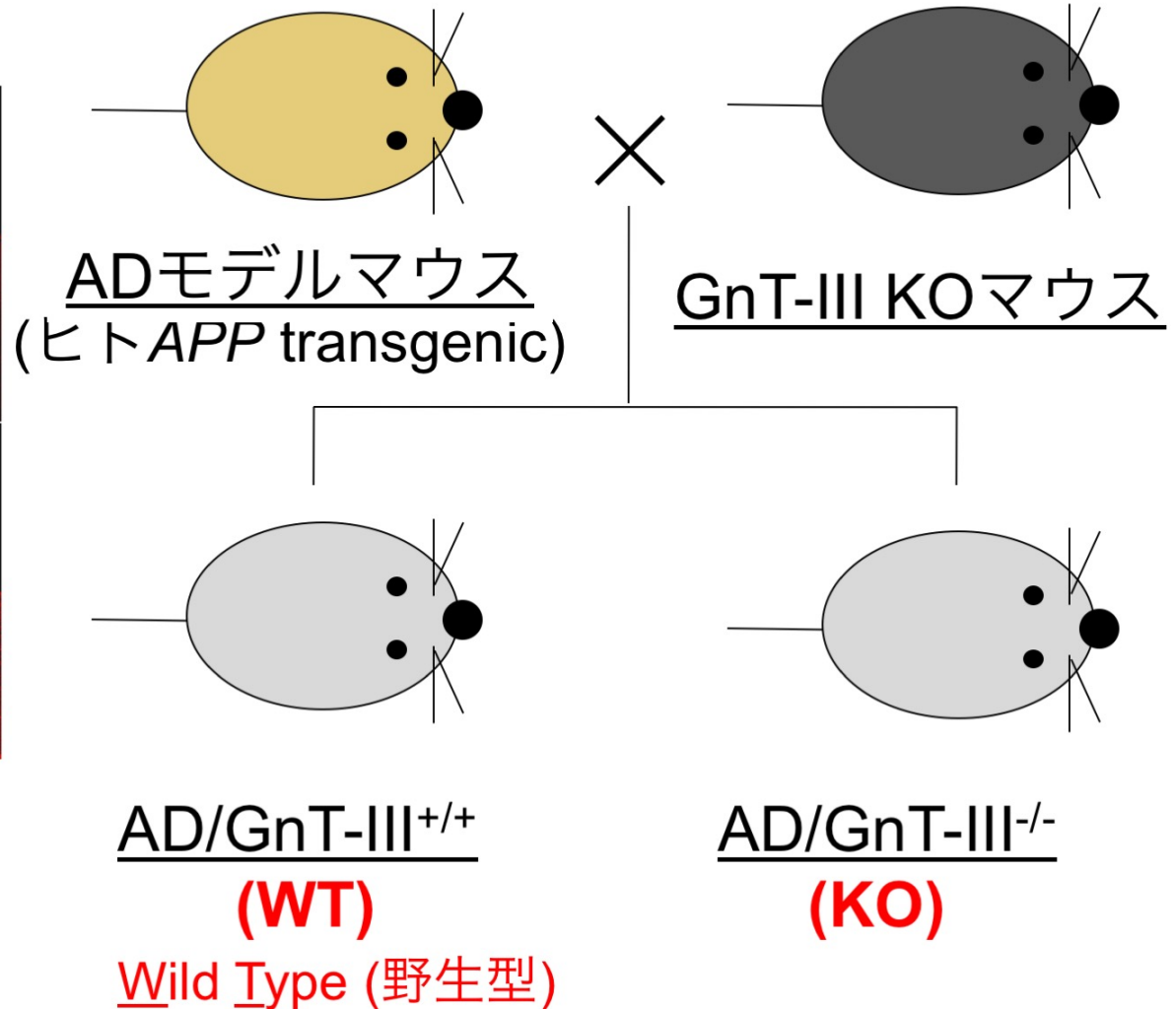


野生型マウス

ADモデルマウス

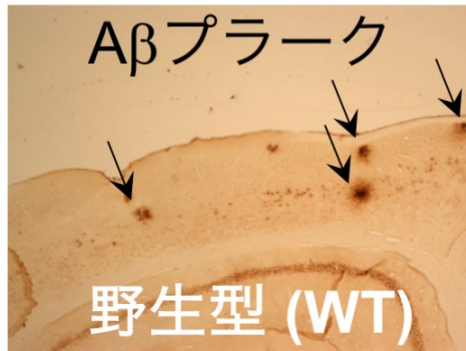
加齢

加齢とともにA β が蓄積し、
記憶力が低下する



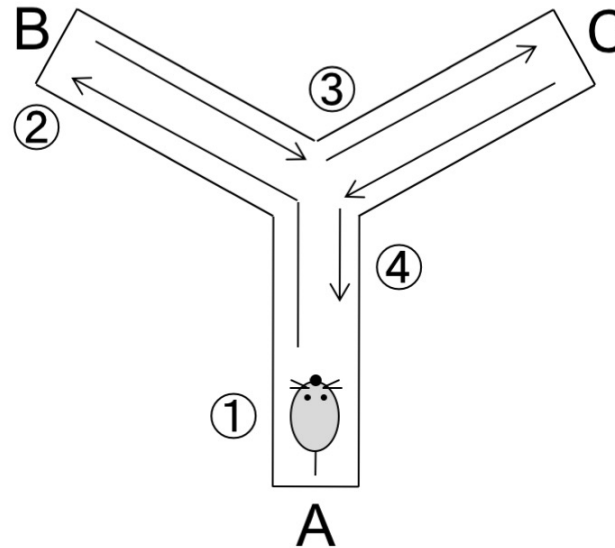
GnT-III欠損マウスではA β が蓄積しない

マウスの脳の染色



(Kizuka et al., *EMBO Mol. Med.*, 2015, 7, 175)

Y-迷路試験



直前に探索した道を記憶

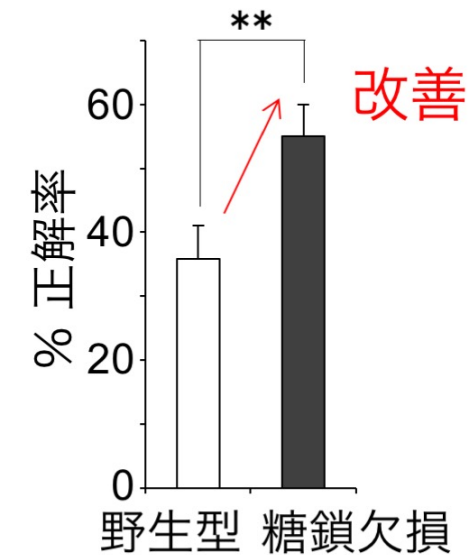
正常マウスの通る道は

A→B→C→A→B→C

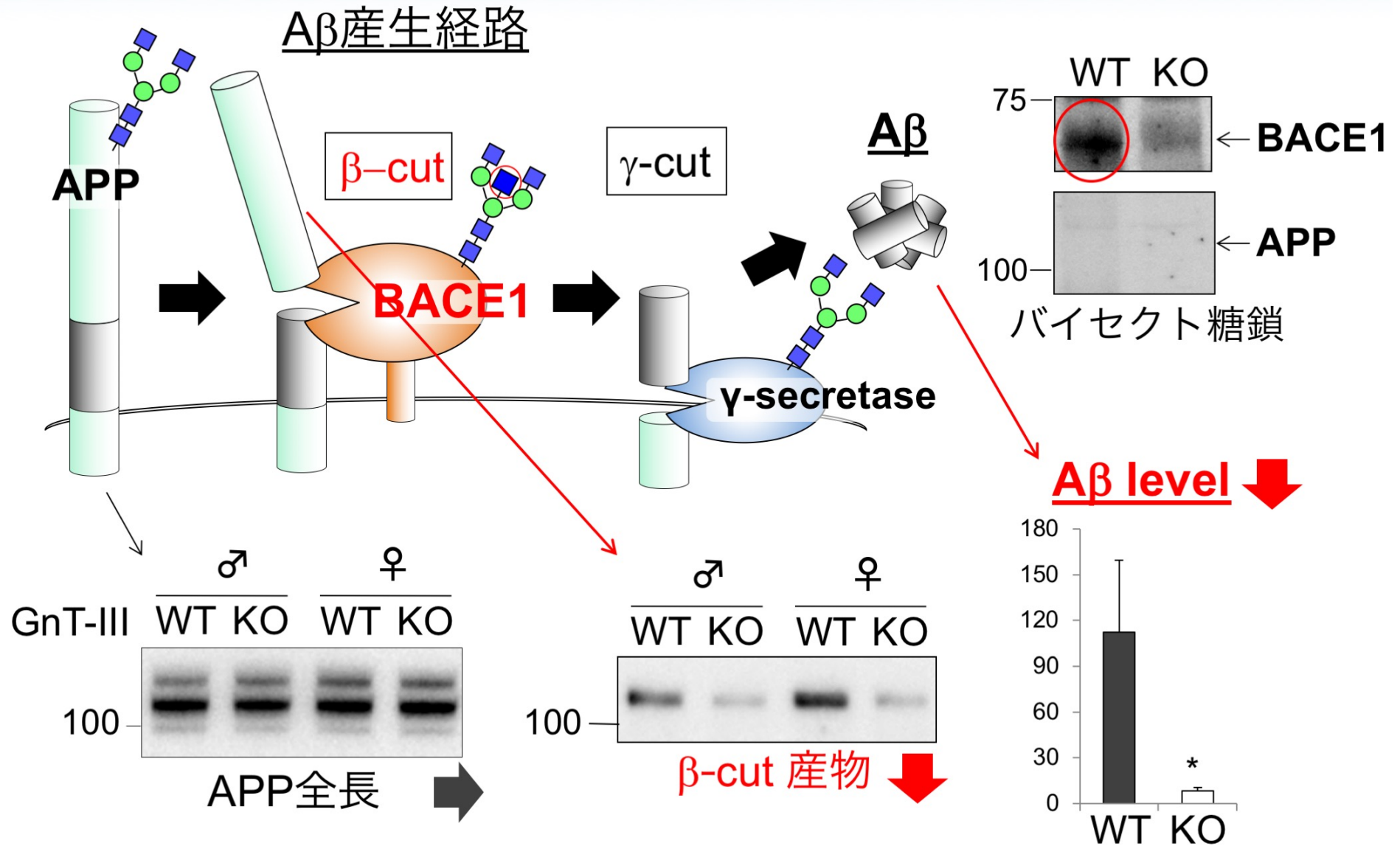
もしくは

A→C→B→A→C→B

短期記憶能力



なぜA β が蓄積しないか？：標的はBACE1

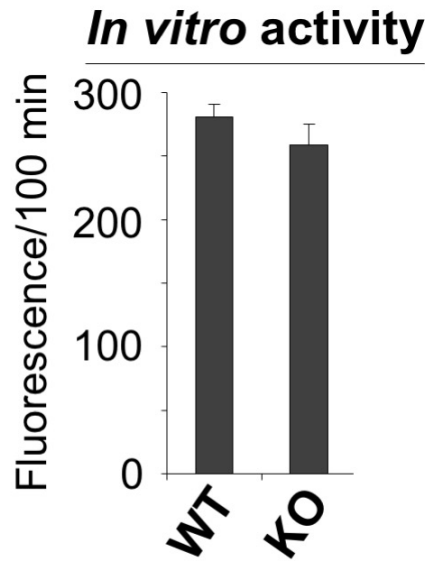
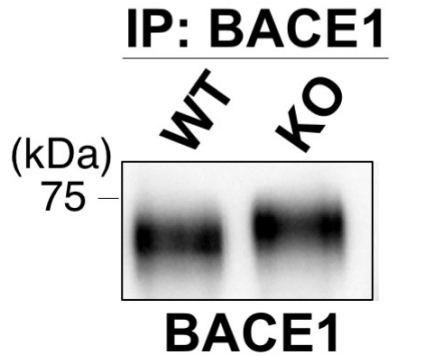


バイセクト糖鎖の欠損によりBACE1の機能が低下

(Kizuka et al., *EMBO Mol. Med.*, 2015, 7, 175)

糖鎖欠損によってBACE1の分布が変化

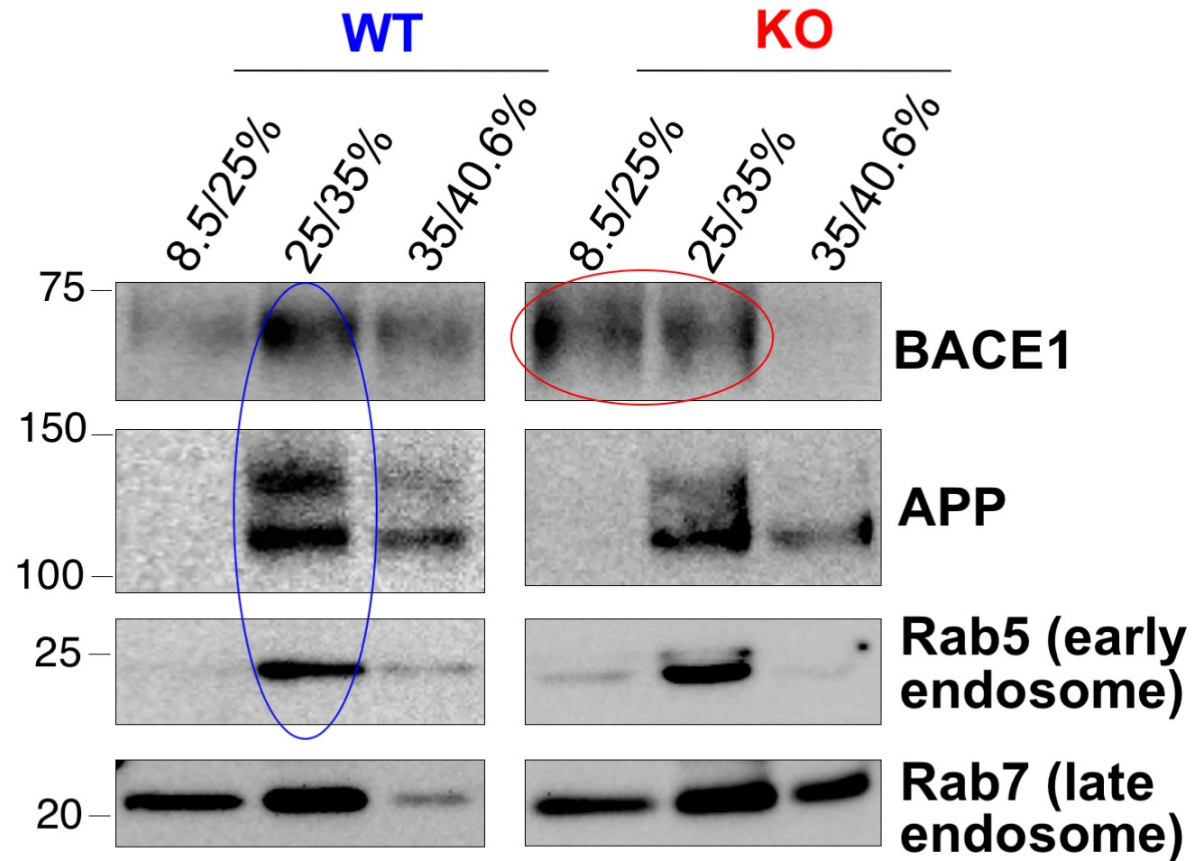
In vitro 酵素活性



切る能力自体は変化しない

細胞内のオルガネラ分画

(スクロース密度勾配遠心)



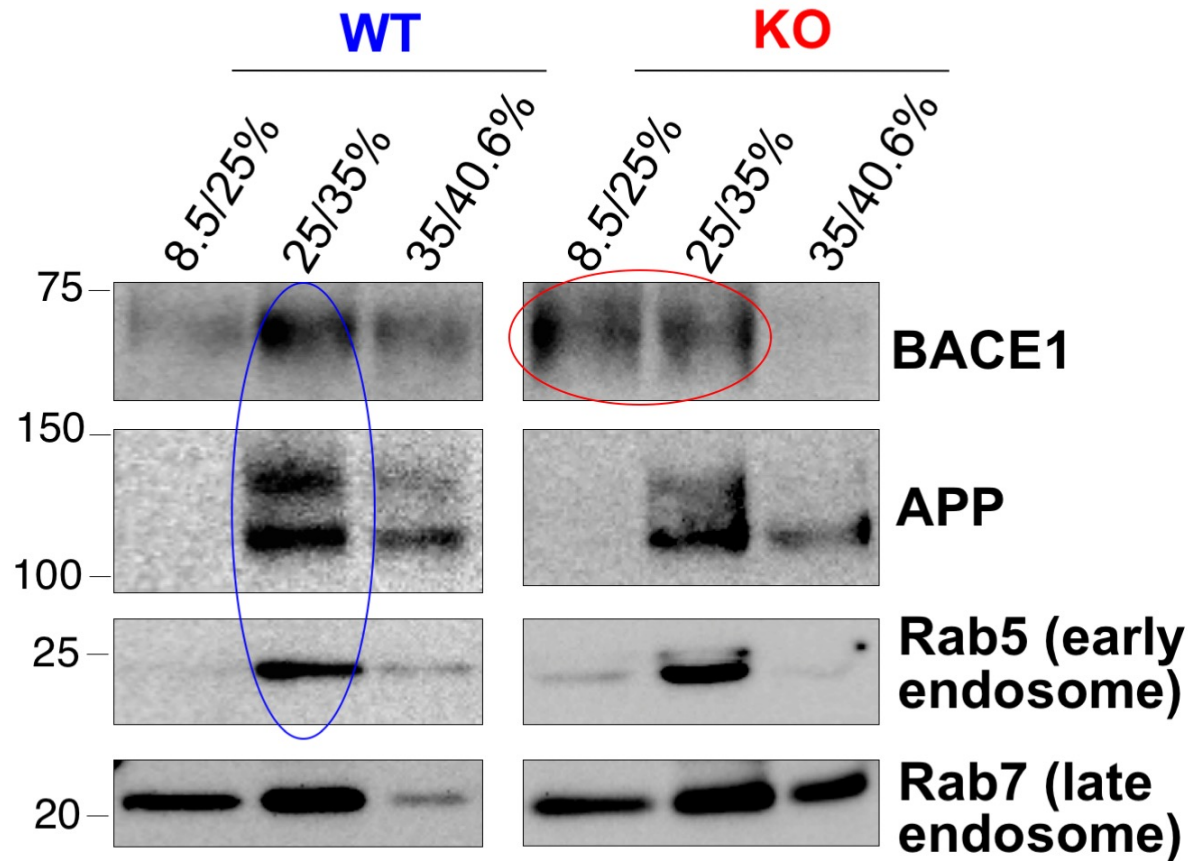
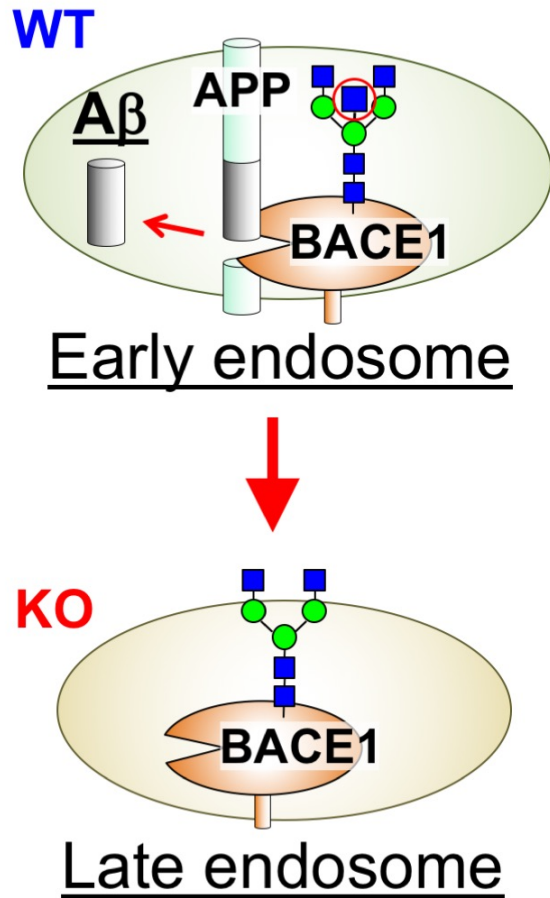
BACE1 { WT: early endosome-rich fraction
KO: early + late endosome

(Kizuka et al., *EMBO Mol. Med.*, 2015, 7, 175)

糖鎖欠損によってBACE1の分布が変化

細胞内のオルガネラ分画

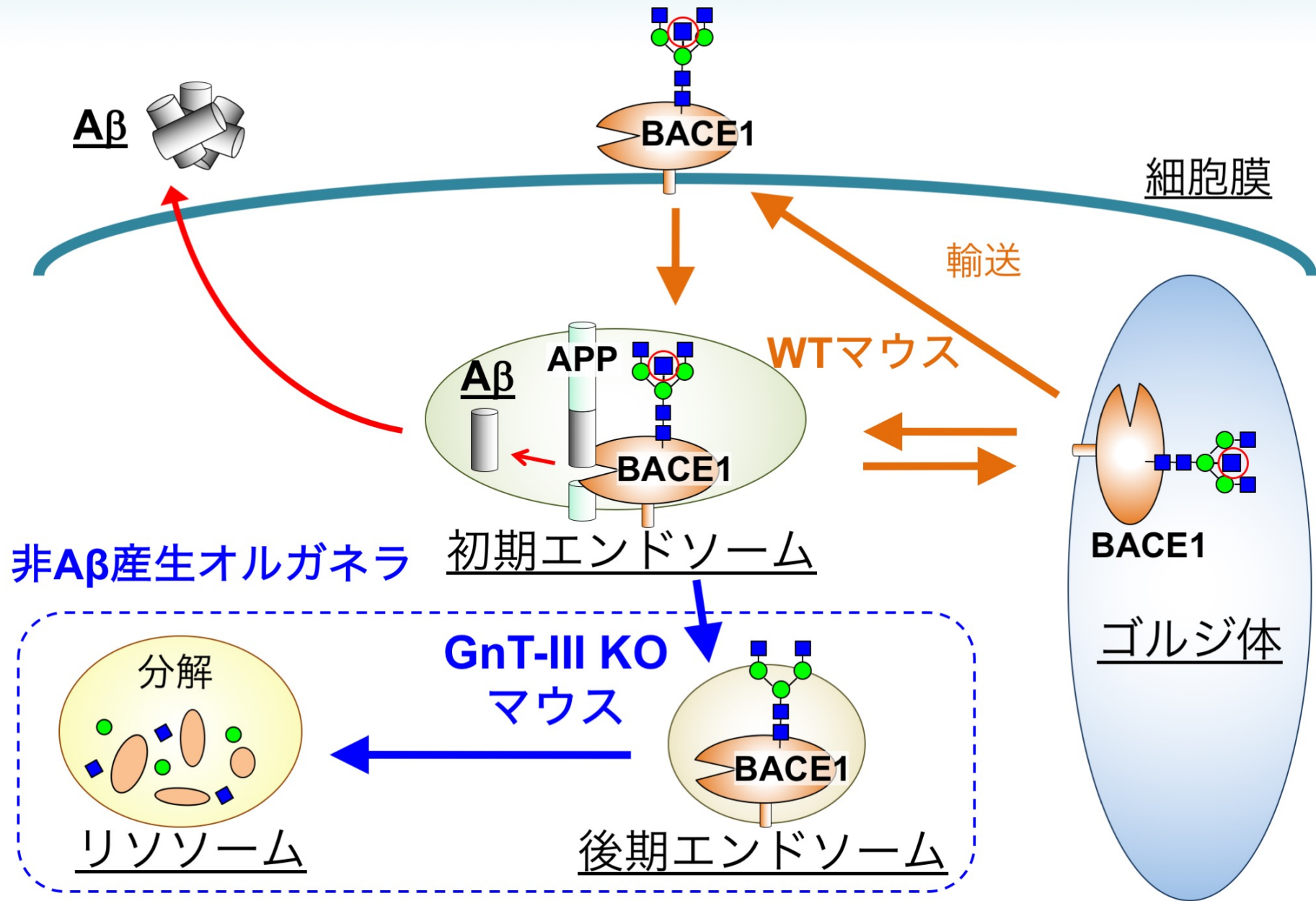
(スクロース密度勾配遠心)



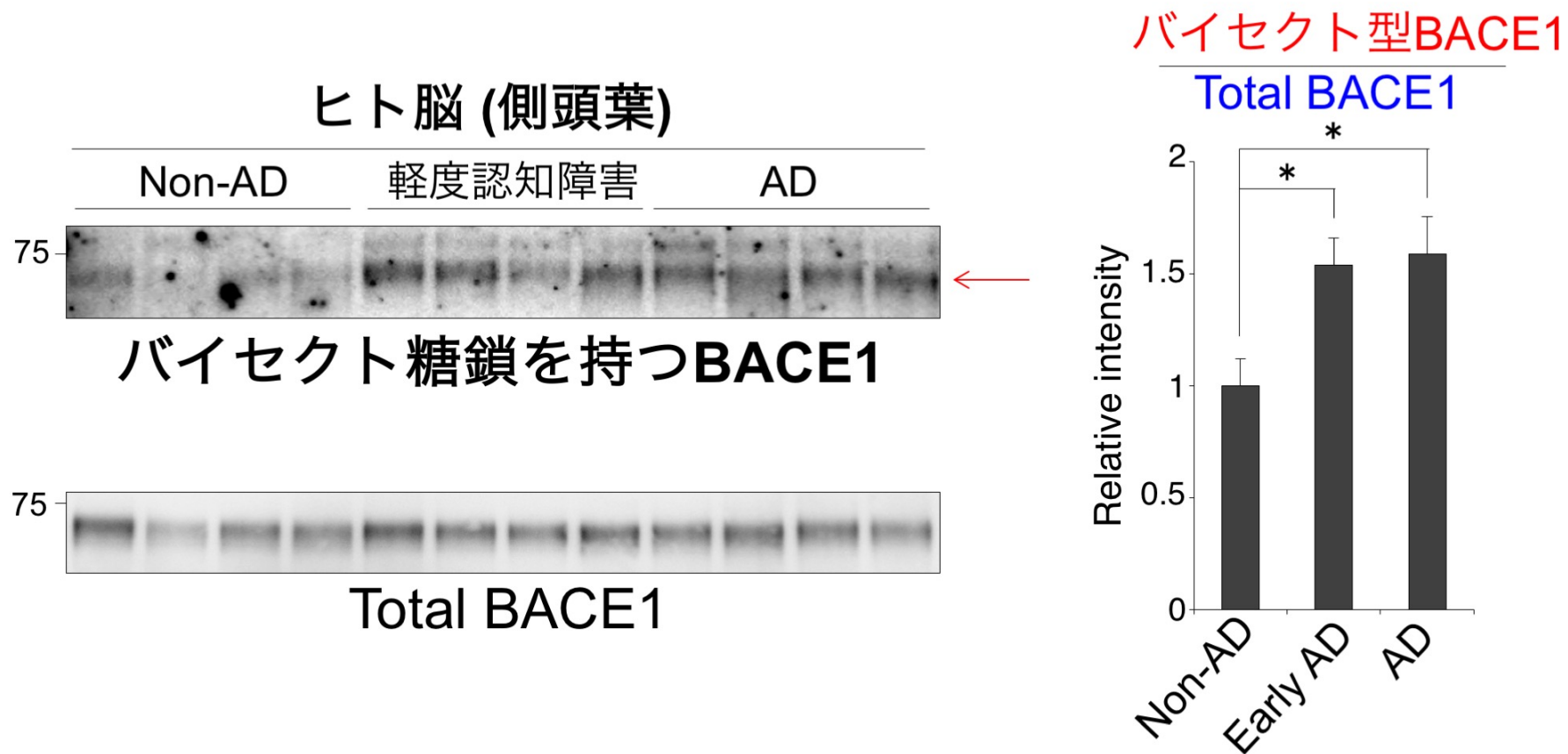
BACE1 { WT: early endosome-rich fraction
KO: early + late endosome

(Kizuka et al., *EMBO Mol. Med.*, 2015, 7, 175)

GnT-III KOマウスでのまとめ



ヒトでも起きている？

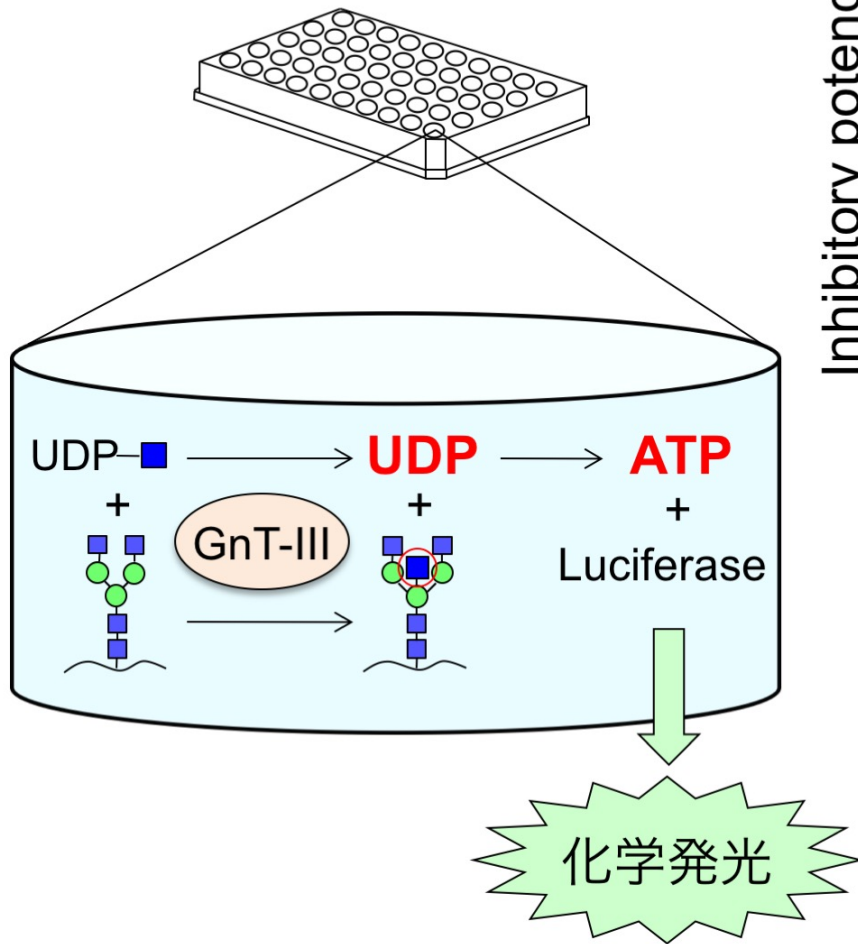


AD患者ではBACE1のバイセクト糖鎖が増加

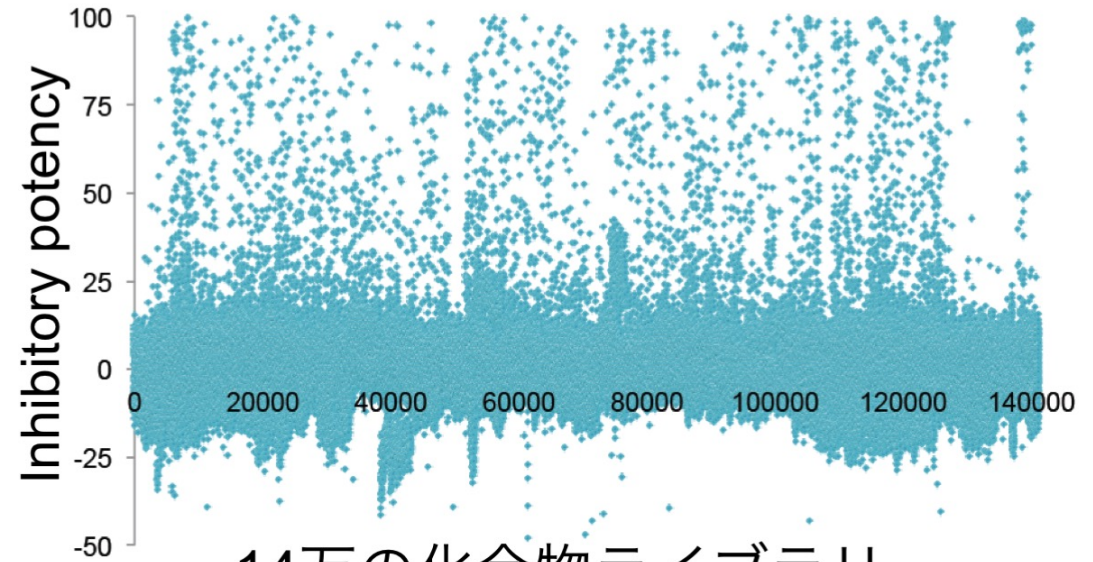
→ バイセクト糖鎖はヒトにおいてもBACE1の機能制御を通じてADの病態を制御している可能性

GnT-III阻害剤の探索

High-throughput assay
(UDP-Glo by Promega)



1st screening



14万の化合物ライブラリー

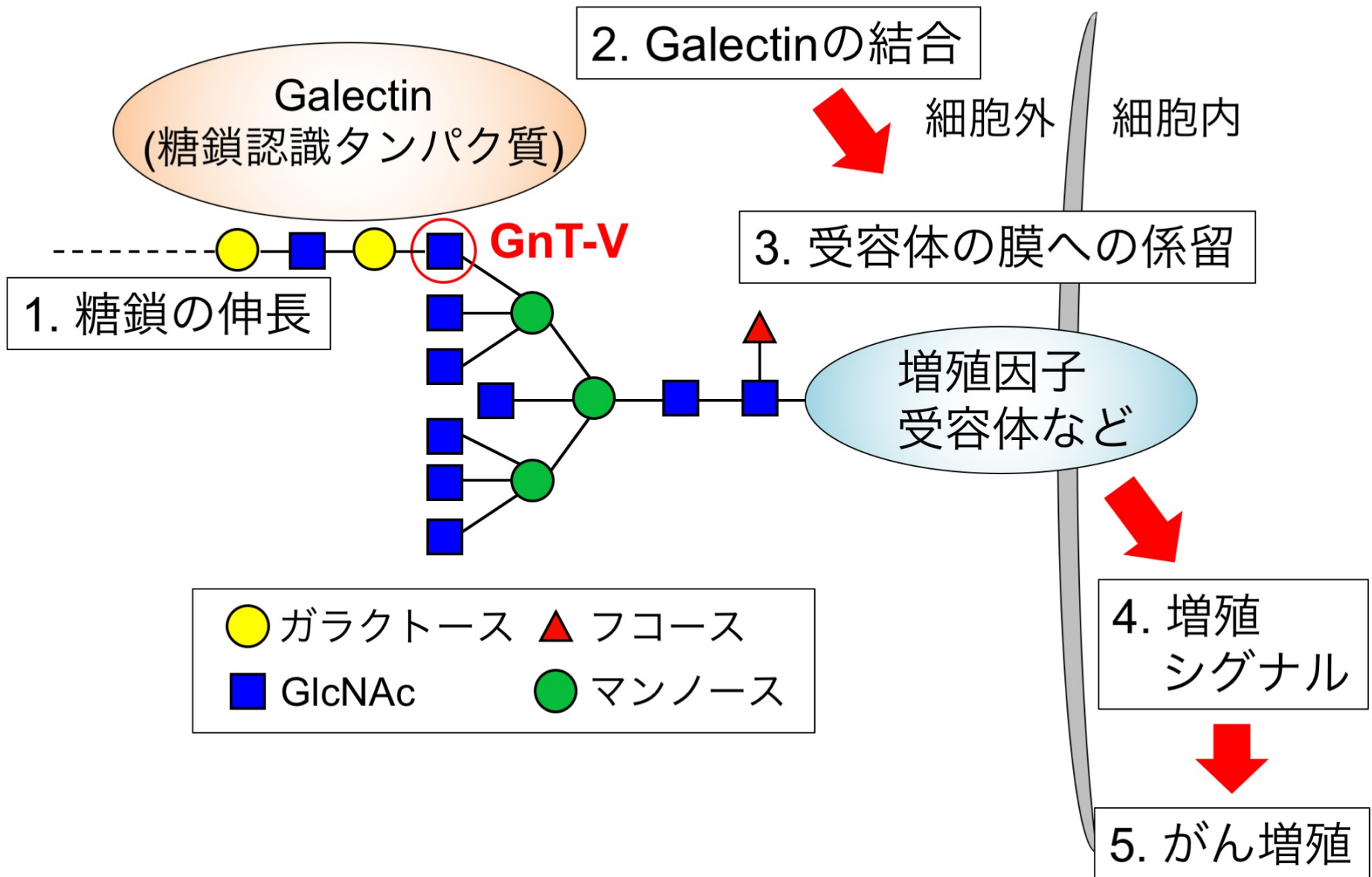
2nd screening

実施中

Contents

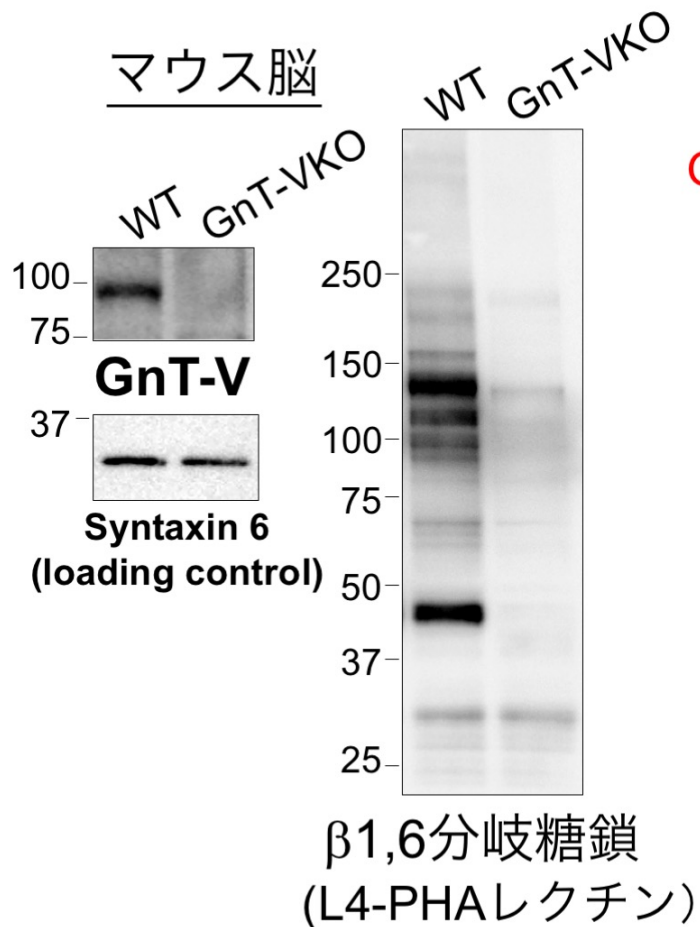
1. 糖鎖(複合糖質)と糖転移酵素とは
2. アルツハイマー病と糖転移酵素の話
3. がんと糖転移酵素の話

機能：一つのメカニズム

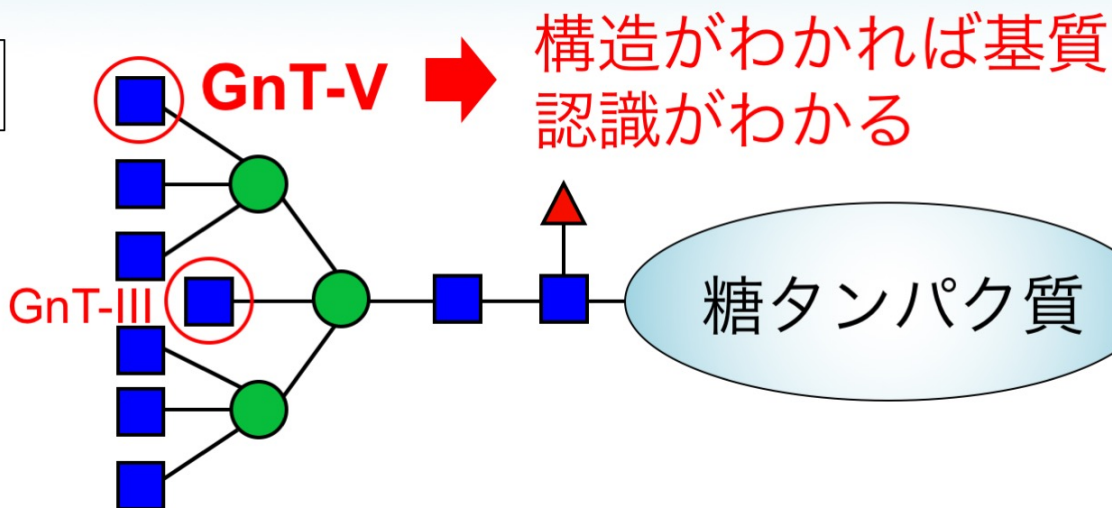


生合成：2つのクエスチョン

1. タンパク質の選択性

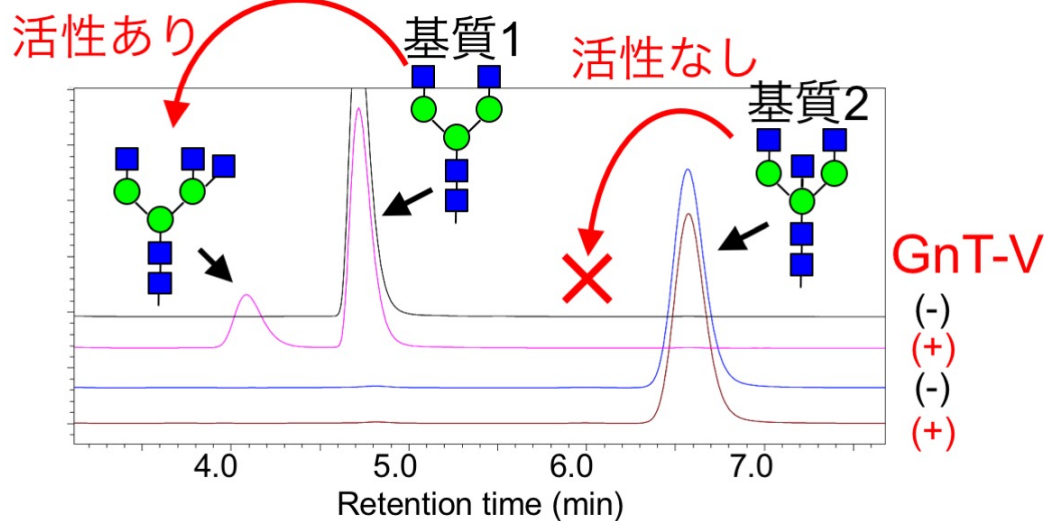


明らかにタンパク質
を選んでいる



2. GnT-IIIによる負の制御

GnT-Vの活性測定

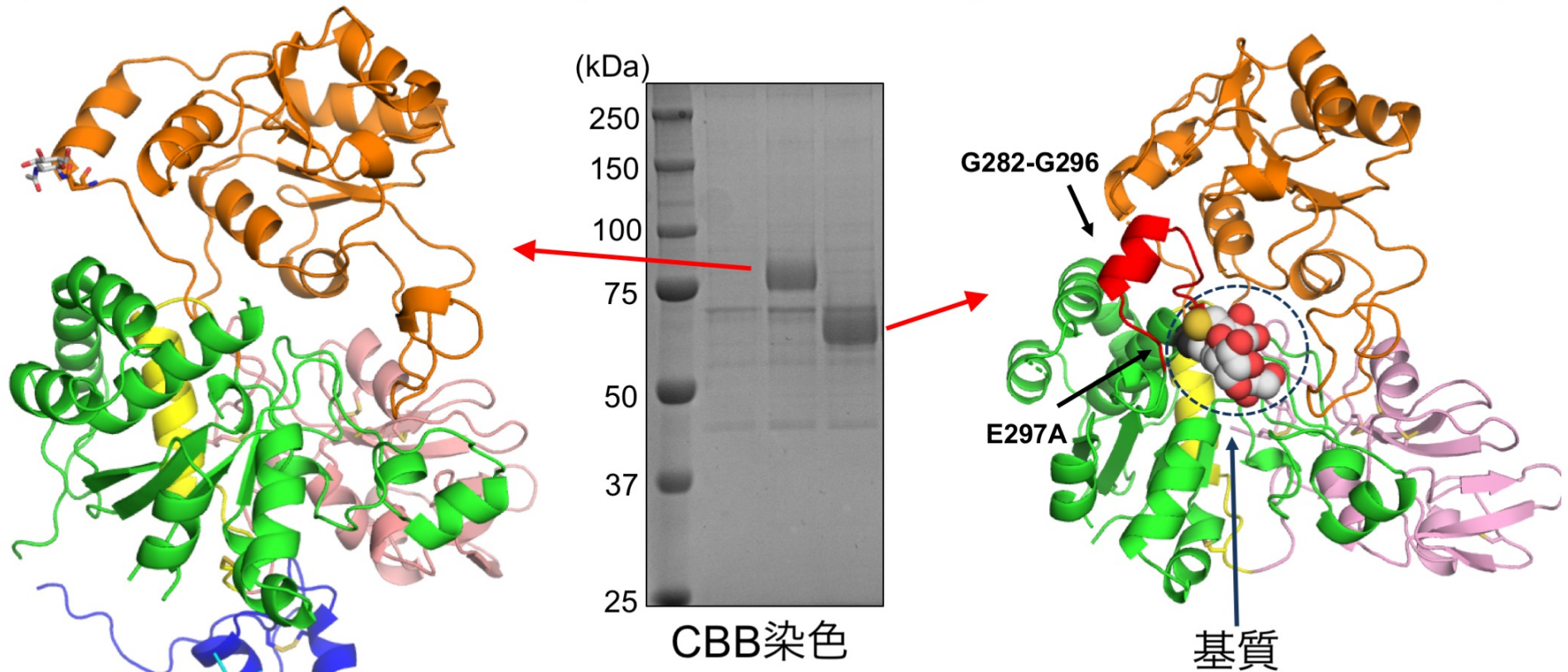


➡ GnT-IIIが働くとGnT-Vは働けない

GnT-Vの結晶構造

GnT-Vの触媒ドメイン

改良型GnT-V (ver. 4)



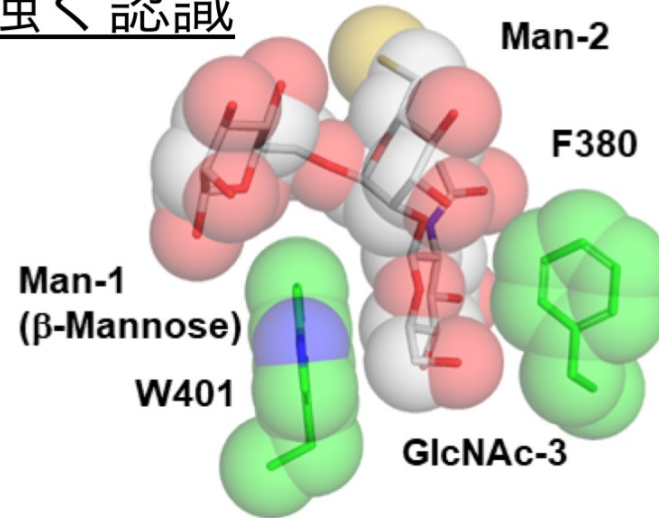
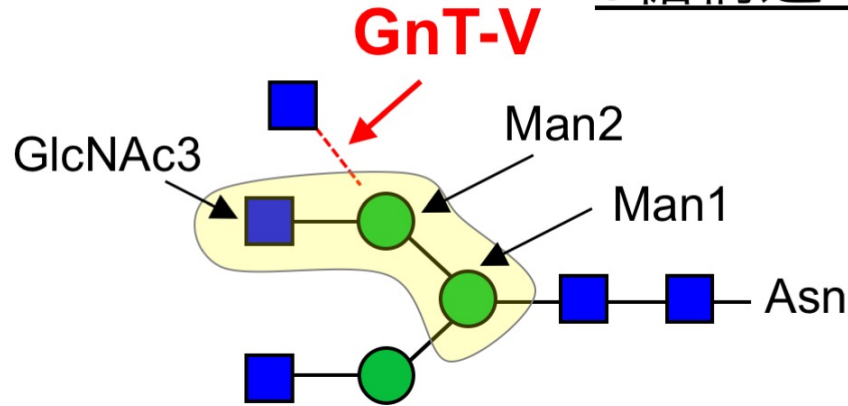
改良を重ねて基質との複合体を得る

基質との複合体が取れない

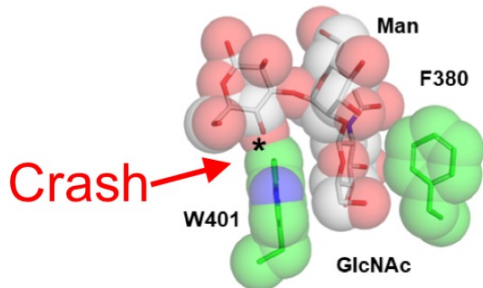
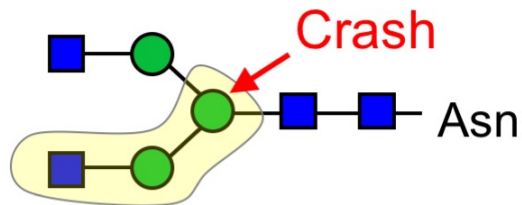
(Nagae and Kizuka et al., *Nat. Commun.*, 2018, 9, 3380)

GnT-Vによる厳密な枝の認識

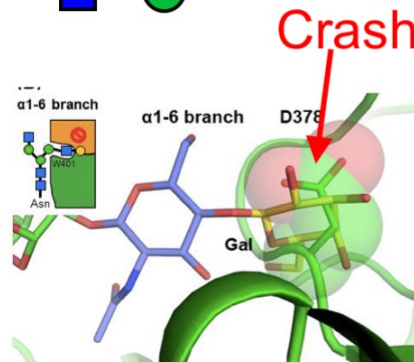
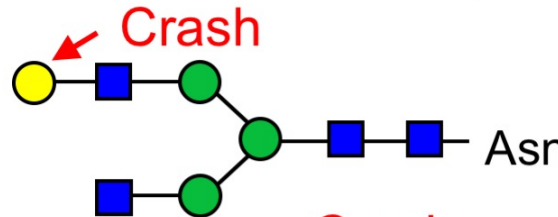
3糖構造を強く認識



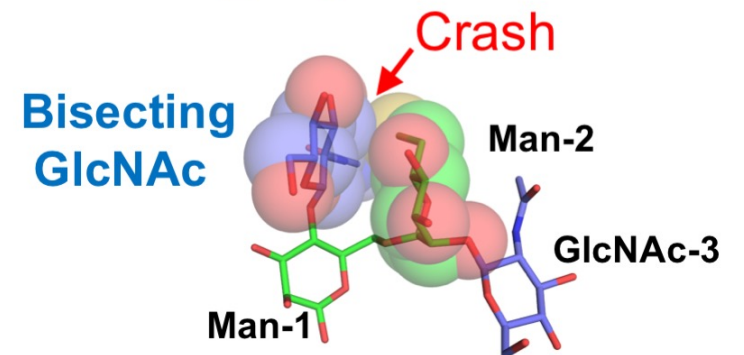
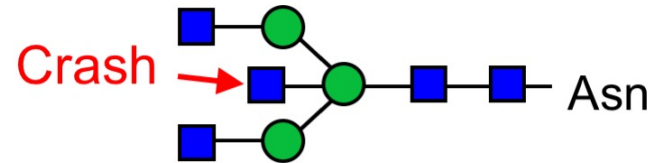
下側の枝



伸長した枝



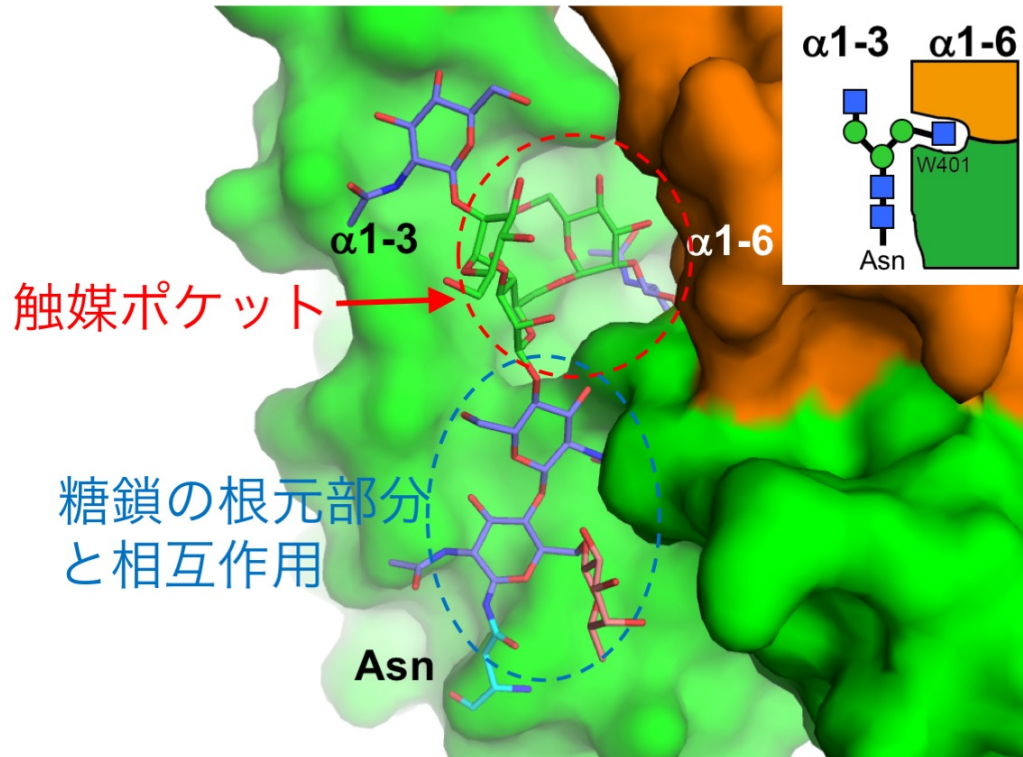
Bisecting GlcNAc



(Nagae and Kizuka et al., *Nat. Commun.*, 2018, 9, 3380)

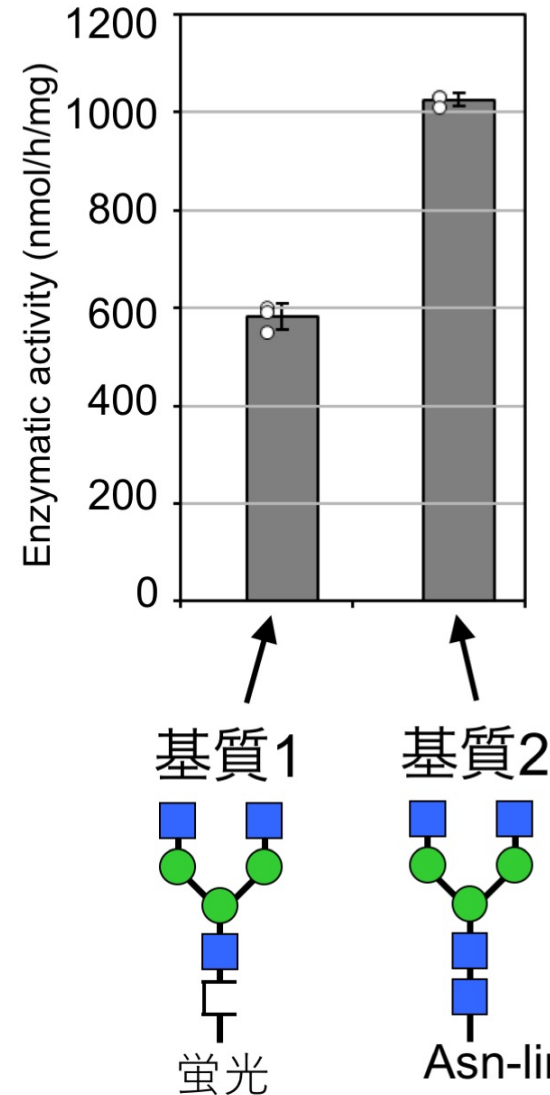
糖鎖の根元の周辺を認識している模様

触媒ポケット周辺



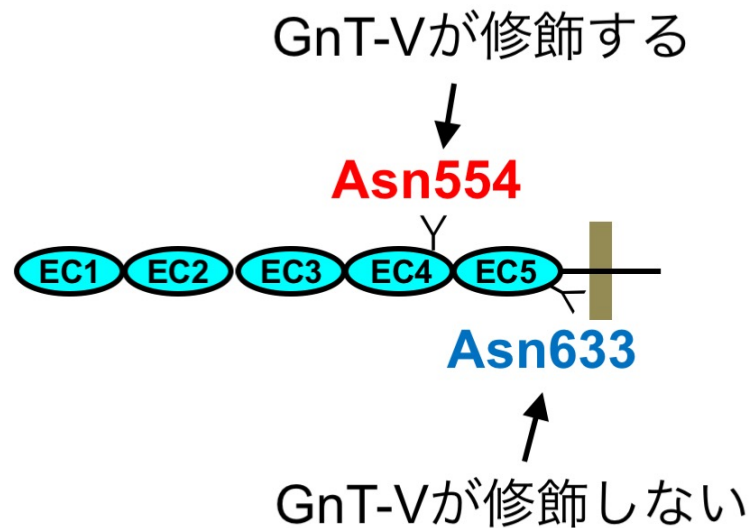
Asn周辺のアミノ酸配列によって
活性(基質認識)が変わりうる

GnT-Vの酵素活性

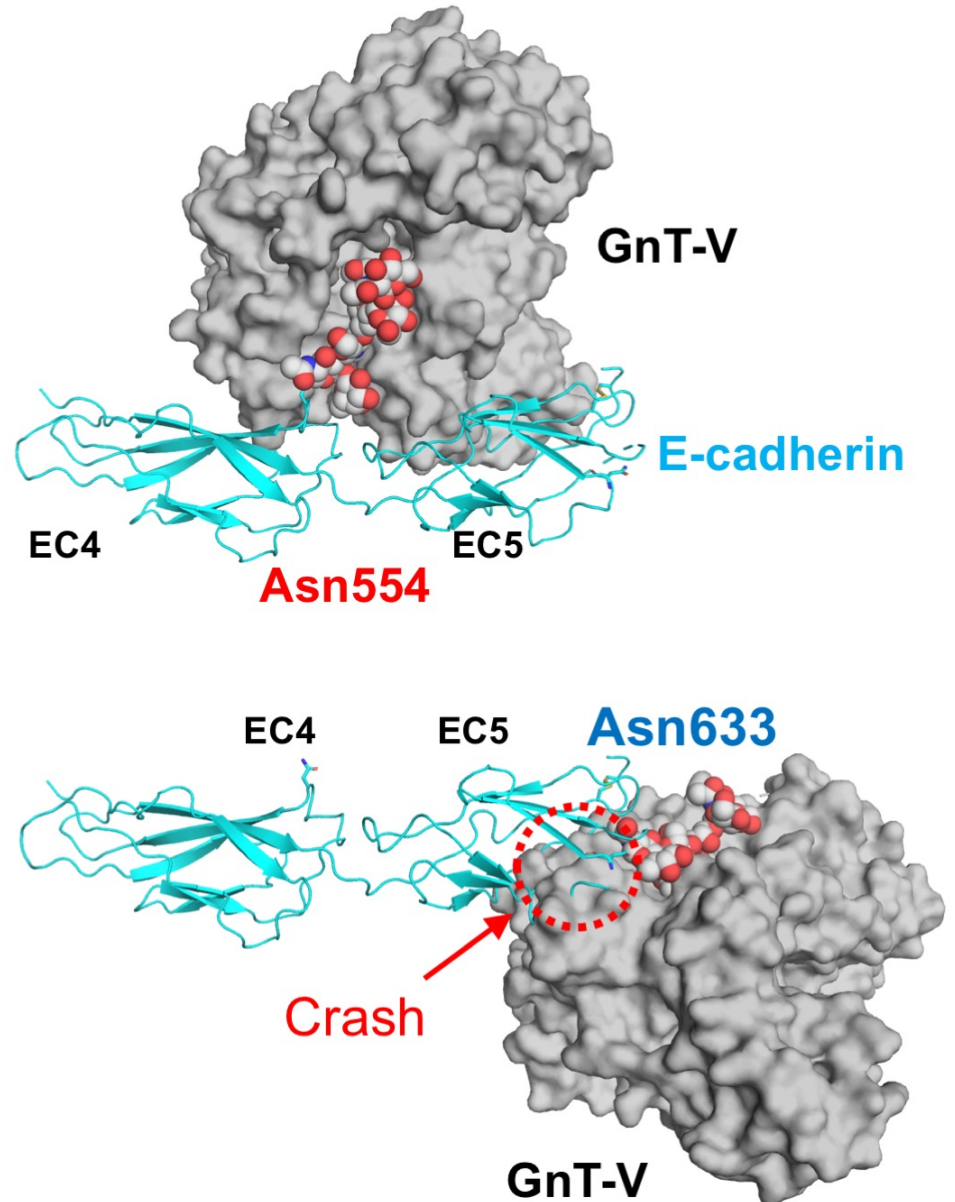


少し大きな視点での制御もある

E-cadherin

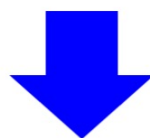


GnT-Vが糖鎖を修飾するためには、タンパク同士のCrashも避ける必要がある(当たり前かもしれませんが)



小まとめ

- ① がんに関連の深いGnT-Vの構造を明らかにした
- ② GnT-Vは厳密に糖鎖の枝と構造を認識
- ③ タンパク側の配列や立体構造による制御もある



今後の展開

- ・ タンパク選択性のより詳細な機構の解明
- ・ 阻害剤の開発

まとめ

- ① 糖転移酵素の多くは、ゴルジ体にあるII型膜タンパク質である
- ② Bisecting GlcNAcはアルツハイマー病の治療ターゲットである
→ Bisecting GlcNAcはBACE1の細胞内分布を制御し、 $A\beta$ 産生を促進する
- ③ GnT-Vはタンパク質を選んで糖鎖を転移し、がんの悪性化に関わる β 1,6分岐を合成する

謝辞

Kizuka Lab (Gifu)

Tetsuya Hirata
Chizuko Yonekawa
Yuko Tokoro
Mayumi Yamada
Seita Tomida
Natsumi Kasahara
Haruna Akatsuka

Gifu University

Hikomune Ando
Hidenori Tanaka
Kenichi Suzuki

Hiroshima University

Miyako Nakano

RIKEN

Systems Glycobiology Research Group

Naoyuki Taniguchi
Shinobu Kitazume
Keiko Sato
Ritsuko Oka
Yoshiki Yamaguchi
Masamichi Nagae

Dr. Saido's group

Takaomi Saido
Takashi Saito

Fujita Health University

Kazuki Nakajima