

主論文の要旨

**Expression of B4GALNT1, an essential
glycosyltransferase for the synthesis of complex
gangliosides, suppresses BACE1 degradation and
modulates APP processing**

〔 複合ガングリオシド合成における必須酵素、B4GALNT1 の発現は
BACE1 の分解を抑制することで APP 切断を調整する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻
生物化学講座 分子細胞化学分野

(指導：岡島 徹也 教授)

山口 世堯

【緒言】

Alzheimer disease(AD)は、認知症の中でも最も大きな割合を占める疾患である。ADに特異的な病理学的特徴として、amyloid β ($A\beta$)の脳内沈着が知られている。 $A\beta$ は amyloid precursor protein(APP)から β 、 γ secretase によって切断を受けて産生される。そのため、APP切断の制御がADにおける治療標的として注目されてきた。

脳内では、様々な種類の酸性スフィンゴ糖脂質、ganglioside が発現している。中でも、複合 ganglioside は神経系の維持に関わっていることが報告されている。複合 ganglioside の産生には二つの糖転移酵素、ST8SIA1(GD3 synthase)と、B4GALNT1(GM2/GD2 synthase)が必須である(Fig. 1a)。これまでに、AD患者の脳において ganglioside 発現パターンが健常者と異なっており、GM2やGM1の発現が上昇していることも報告されている。また、ST8SIA1の欠失マウスにおいてAD病態の改善が認められ、更に細胞外からGD3を加えることで、 $A\beta$ の発現が亢進することが報告されている。しかし、AD患者における ganglioside 組成変化の原因や、ganglioside がAD病態に影響を与える詳細な機序については不明であった。

【対象及び方法】

GM3のみを発現している melanoma 細胞株(SK-MEL-28 N1)に対し、種々の ganglioside 合成酵素(ST8SIA1、B4GALNT1、B3GALT4) cDNA を強制発現させ、異なる ganglioside を発現する細胞株を作製した。その結果、GM3発現細胞株、GM2発現細胞株、GM1発現細胞株、GD3発現細胞株、GD2発現細胞株が得られた(Fig. 1b)。

これらの細胞株に対し RIPA buffer により whole cell lysate を作製した。immunoblot (IB)により、APP、ヒト脳における主な β secretase である BACE1、 γ secretase の活性サブユニットである PSEN1 のタンパク質レベルを解析した。また、APP が β secretase、 α secretase によって切断され、産生される β -C terminal fragment(β -CTF)、 α -C terminal fragment(α -CTF)は細胞株に γ secretase inhibitor (DAPT)を作用させた後に調製した whole cell lysate を用いて、それぞれのタンパク質レベルを IB により解析した。

それぞれの細胞株から trizol により total RNA を抽出し、作製した cDNA を用いて quantitative PCR を行い、APP、BACE1、PSEN1 の mRNA レベルを検討した。

BACE1 の分解速度を検討するため、それぞれの細胞株に cycloheximide (CHX)を作用させた後の whole cell lysate を用いて IB を行うことで、BACE1 の分解速度を解析した。また、proteasome inhibitor MG132 と lysosome inhibitor chloroquine を作用させた後に回収した whole cell lysate を用いて、proteasome、lysosome による BACE1 の分解速度も検討した。

細胞外 ganglioside が与える影響を検討するために、6 well plate に撒いた細胞株に対し、それぞれ $30\mu\text{M}$ に調整した ganglioside 含有培養液を加え、21時間後に whole cell lysate を回収し、IB により APP、BACE1、 β -CTF のタンパク質レベルを解析した。

lipid raft の回収は、まず、撒いた細胞株に 1% Brij98 と TNE buffer を作用させ、得られた lysate をホモジナイズした後、lysate 1ml と 80%スクロース 1ml を混合し、超遠心チューブに移した。その上から、1.25ml の 30%スクロース、0.75ml の 5%スクロースを重層した後、10400g16 時間で超遠心にかけて。遠心後の lysate を上から 0.4ml ずつ分取して得られた 10 の fraction を、IB にかけることで APP、BACE1 のタンパク質の分布を検討した。

【結果】

IB により APP の切断を調べた結果、B4GALNT1 を発現している細胞株(GM2 発現細胞株、GM1 発現細胞株、GD2 発現細胞株)に共通して、 β -CTF が 4 倍以上に増加していた(Fig. 2)。そこで、BACE1 の発現や基質である APP の発現を調べたところ、B4GALNT1 発現細胞株に共通して BACE1 のタンパク質レベルでの発現が 2~3 倍以上に増加していた。APP の発現も上昇していたが、 β -CTF や BACE1 の発現に比べ、上昇量は 1.5~2 倍と小さかった。また、PSEN1 の発現に変化は認められなかった(Fig. 3a, b)。

これらの発現変化の原因を解明するために、APP、BACE1、PSEN1 の mRNA レベルを検討したが、どの mRNA も発現に変化は見られなかった(Fig. 3c)。そこで、B4GALNT1 の発現が BACE1 の分解制御に影響を与えている可能性を考え、CHX を使用し、BACE1 の分解速度を検討した。すると、B4GALNT1 発現細胞において、顕著に BACE1 の分解が抑制されていることが判明した(Fig. 4)。BACE1 の分解は proteasome または、lysosome によって行われることが報告されていた為、MG132 と chloroquine を用いた実験により、どちらの系がより強く影響を受けているかを検討した。すると、興味深いことに B4GALNT1 発現細胞株に共通して、lysosome における BACE1 の分解のみが顕著に抑制されていることを示す結果が得られた(Fig. 5)。

しかし、BACE1 の分解抑制が、導入した B4GALNT1 それ自体の発現によるものか、導入したことで産生される GalNAc 含有 ganglioside (GM2、GM1、GD2)の発現によるものかは不明であった。そこで、細胞外から様々な ganglioside を加えた後に、BACE1 の発現を調べた。しかし、細胞外 ganglioside の添加によっては、BACE1 や β -CTF 発現には変化が見られなかった(Fig. 6)。

これまでに、APP の β 切断はコレステロールや ganglioside を豊富に含む lipid raft で行われると報告されており、lipid raft における BACE1 の発現上昇は β -CTF 産生を上昇させると考えられる。B4GALNT1 の発現により、発現の亢進した BACE1 が lipid raft でも発現しているかどうかを検討するため、lipid raft における APP と BACE1 の発現をショ糖密度勾配遠心法により調べた。すると、GM2、GM1 発現細胞株において lipidraft で BACE1 の発現が亢進していることが判明した(Fig. 7)。

【考察】

これまでも、AD 患者の脳において ganglioside 発現パターンが健常者と異なる

ことや、ganglioside が A β と結合したり、APP の切断を制御することで、AD の病態に影響を与えていることがいくつも報告されている。しかし、その詳細な原因や機序は不明な点が多い。

今回の研究では、B4GALNT1 の発現により、BACE1 のタンパク質レベルでの発現が上昇する結果が得られている。AD 患者では GM2、GM1 の発現が脳内で上昇していることが報告されており、もしも B4GALNT1 の発現が AD 患者の脳において上昇しているのであれば、この AD 患者における ganglioside 発現の変化と矛盾しない。また、AD 患者において、BACE1 の発現が上昇していることがいくつかの論文で報告されているが、B4GALNT1 の発現により、BACE1 の発現が上昇することで A β の産生、AD の病態促進につながっている可能性も考えられる。しかし、残念ながら、これまでに AD 患者の脳における ganglioside 合成酵素の発現を報告した論文はなく、さらなる研究が期待される。

BACE1 が細胞内のどの細胞分画で APP を切断しているかについては、明らかな結論は出ていないが、early endosome と trans-Golgi network(TGN)の両方で BACE1 の発現が確認されており、これらの分画で切断を行っていることが報告されている。一方で、B4GALNT1 は主に TGN で発現し、GM2 や GD2 を産生していることが知られている。今回の結果から、B4GALNT1 の発現は BACE1 の安定性を亢進させ、BACE1 の発現、APP の β 切断を上昇させることが示唆されるが、細胞外からの ganglioside 添加は BACE1 発現や APP の β 切断に影響を与えなかった。このことから、B4GALNT1 それ自体か、もしくは産生される GalNAc 含有 ganglioside が TGN で BACE1 の安定性を制御している可能性が考えられた。仮に、B4GALNT1 または GalNAc 含有 ganglioside が TGN で BACE1 と相互作用し、BACE1 の安定性を亢進させるとした場合、TGN における BACE1 の発現が上昇することで、early endosome への供給源ともなり得、early endosome、TGN における APP の β 切断が亢進することが考えられる。更に、BACE1 の endosome から TGN への輸送が増えることで、endosome から lysosome への輸送、分解が抑制されることも可能性として考えられ、今回の研究結果とよく一致する。B4GALNT1 酵素タンパク質とその産物である ganglioside が直接 BACE1 と相互作用するのかどうか、また相互作用しているのであれば、どちらがしているのかについては、より詳細な研究が必要である。

【結論】

B4GALNT1 の発現上昇は、BACE1 の分解を抑制することで、BACE1 のタンパク質レベルでの発現を亢進させる。また、BACE1 の発現上昇は lipid raft でも認められ、APP の β 切断が促進される。これらの機序により、B4GALNT1 の発現が A β の産生、AD の病態を促進する可能性が示唆された。