

脳老化に伴う糖鎖の変化と老化関連疾患

遠藤 玉夫

ヒトゲノムが解明され、生命科学研究は今日、ゲノム研究から得られた遺伝子情報がどのように生体の中で発現し機能しているのかを解明する段階に至っている。生体内のタンパク質の多くは、翻訳された後に様々な修飾を受けることによって、細胞間の認識や細胞内情報伝達等で機能しているが、このタンパク質翻訳後修飾の主要な一つが糖鎖である。糖鎖はタンパク質の物性に影響を与えるとともに分子間の認識に大きな役割を持つ。たとえば脳における複雑な神経回路の形成には、細胞間の糖鎖認識が重要な役割を担っていると予想される。本稿では、脳の老化と関連疾患について糖鎖という観点から考える。高齢化に伴い発症率が高まる認知症の予防・防止に向けて、脳老化に伴う変化の解明と機能維持を目標とした基盤研究が喫緊の課題である。

1. はじめに

ヒトのゲノム情報がほぼ明らかになり、いわゆるポストゲノム研究が盛んに行われている。遺伝子から作られたタンパク質は、リン酸化や糖鎖付加など翻訳後修飾を受け機能を発揮するようになる。糖鎖はABO式血液型に代表されるような個体識別マーカーやがんなどの疾患マーカーとして知られている。また、インフルエンザウイルス、ピロリ菌、O-157毒素、コレラ毒素などの感染という点でも注目されている¹⁾。最近のデータによると、生体で作られるタンパク質の50%以上は糖鎖が付加されていると考えられている。糖鎖がタンパク質機能に対していかに関与し、どのようにタンパク質に機能を付加するかは、ポストゲノム研究の重要な研究テーマのひとつである(表1)。

糖鎖は、遺伝子の直接の産物ではなく二次産物である。DNA→RNA→タンパク質と鋳型に従って情報が伝えられるシステム(いわゆるセントラルドグマ、図1)と違って、

表1 糖タンパク質糖鎖の主な機能

(1) タンパク質の物性への関与	安定性 極性 水溶性 タンパク質分解酵素に対する抵抗性 立体構造
(2) 認識やシグナル分子としての関与	細胞内 小胞体における品質管理 リソソームへの選択的移行
	細胞外 血清糖タンパク質のクリアランス リンパ球のホーミング 血液型物質 個体発生や細胞分化 細胞のがん性変化や転移性 ウイルスや細菌の感染 細胞どうしの認識 細胞と細胞外マトリックスの認識

糖鎖の生合成は鋳型なしに進められる。遺伝情報はDNAの塩基配列によってコードされており、それがRNAの配列に転写され、さらにタンパク質(アミノ酸配列)に翻訳される。このシステムでは、塩基配列やアミノ酸配列が生命情報を規定する。一方、糖鎖はDNAが直接コードしていない生命情報を担っている。後述するようにひとつの糖鎖の発現には、複数の糖転移酵素の協同作業に加え糖ヌク

東京都健康長寿医療センター研究所老化機構研究グループ (〒173-0015 東京都板橋区栄町 35-2)

Glycan changes during brain aging and age-associated diseases

Tamao Endo (Molecular Glycobiology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakaecho, Itabashi-ku, Tokyo 173-0015, Japan)

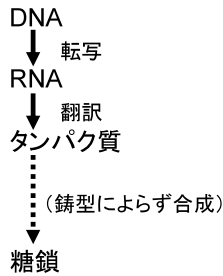


図1 セントラルドグマ

DNA→RNA→タンパク質と鑄型に従って遺伝情報が伝えられるシステム（いわゆるセントラルドグマ）と異なり、糖鎖の合成は鑄型なしに進められる。

レオチドの供給など結局数十の遺伝子産物が関与する。こうしたシステムで合成される糖鎖には、細胞の生理的条件下で左右されやすいという特徴が生まれてくる。

ところで、老化は細胞や組織の様々な生理的变化の統合的な結果と考えられる複雑な生命現象である。そこで細胞や組織の生理的变化を反映する糖鎖の老化に伴う変化を明らかにすることによって、細胞や組織で起こる加齢現象を解明できると期待される。つまり糖鎖の加齢変化を明らかにすることは、老化研究のうえできわめて重要な課題であると言える。我々は、老化の背景には糖鎖に含まれる情報および認識機序の変化があるというアイデアに基づき、糖タンパク質糖鎖の老化と機能変化という問題に取り組んでいる。

一方、脳は身体すべての司令塔であるばかりでなく、精神面の活動もコントロールし精密に調整されている究極の器官である。老化に伴う脳の変化としては、その重量や大きさが減少することはよく知られているし、白質に対する灰白質の比率変化なども報告されている。以上のようなことから、老化に伴って脳では多くの分子が変化することが予想されていた。

2. 生体における糖鎖の分布

まず、DNA、RNA、タンパク質とは異なるシステムで合成される糖鎖の特徴をまとめてみよう。糖鎖は生体において独立に存在することはまれで、タンパク質と結合した糖タンパク質および脂質と結合した糖脂質として存在している。糖脂質は主にセラミドと呼ばれる脂質に糖鎖が結合している。これに対して、糖タンパク質には通常構造の異なる複数の糖鎖が結合しており、その結果分子形態はきわめて多様となる。そのなかで二糖の繰り返しからなる糖鎖を持ち、プロテオグリカンと総称され細胞間マトリックスの主要構成成分である糖タンパク質の一群がある。結合しているコンドロイチン硫酸やヘパラン硫酸と呼ばれる糖鎖（グリコサミノグリカンと総称される）は、二糖ユニットの繰り返し数や硫酸化の程度や位置が多様であり、その構

造は複雑である。

多細胞生物の特徴は、様々な形態と機能を持つ分化した細胞が、それぞれの役割を分担しながら全体として統一された個体を作り上げていることである。この高度に組織化された細胞社会を形成し維持していくために、糖鎖は存在意義を持つと考えられている。電子顕微鏡が開発された当時、細胞の観察により細胞表面は糖鎖で覆われていることが明らかになった。こうした糖鎖の分布から細胞の認識における重要性は早くから示唆された。

糖タンパク質は生体成分のなかで決して特殊な存在ではなく、生体で作られ出される多くのタンパク質は多かれ少なかれ糖を含んでいる。たとえば、ヒトの血清中には少なくとも100種類以上のタンパク質が存在するが、糖を含んでいない単純タンパク質はアルブミンとCRP（C反応性タンパク質）のみである。糖タンパク質は細胞膜の構成成分として、あるいは細胞外に分泌されるなど生体で広く分布している。糖鎖はタンパク質の安定性など物性に影響を与えるばかりでなく、細胞内外におけるタンパク質の輸送など、認識分子として重要な働きをしていることが次々と明らかになっている（表1）。

3. 糖鎖の生合成

糖タンパク質の糖鎖は、タンパク質との結合様式によってN結合型糖鎖とO結合型糖鎖に分類される。N結合型糖鎖は、アスパラギン（Asn）のアミド基にGlcNAc（N-アセチルグルコサミン）を介して結合している。一方、O結合型糖鎖は、タンパク質のセリン（Ser）またはスレオニン（Thr）の水酸基に糖鎖が付加しており、一般にはGalNAc（N-アセチルガラクトサミン）を介して結合している。

糖鎖は単糖のつながった高分子であるが、それぞれの単糖（実際はフリーな単糖ではなくそれぞれ糖ヌクレオチドの形）はひとつひとつ特異的な糖転移酵素によって順番につなげられる。糖転移酵素遺伝子はヒトの場合全遺伝子の約1%、300程度あると考えられており、これまでに半数以上が明らかにされている。先に述べたように糖鎖は、遺伝子の直接の産物ではなく二次産物である。もし仮に合成の途中で働く糖転移酵素が活性を失うと、それ以降働く糖転移酵素が存在しても糖鎖はそのステップ以上伸びることはない。なぜならば各糖転移酵素は厳密な基質特異性を有するからである。したがって、ひとつの糖転移酵素の異常は、最終的な糖鎖構造を大きく変える。糖転移反応はもう少し複雑で、上述したように糖供与体として糖ヌクレオチドを必要とする。この供与体は細胞質や核において合成されるため、糖鎖の合成の場であるゴルジ内腔に運ばれることが必要である。この輸送はゴルジ膜にある糖ヌクレオチド輸送体によって担われている。つまりこの輸送体の活性

により糖鎖合成に必要な糖ヌクレオチド供給量が決まり、この輸送体が十分に働かないと糖転移反応が進行しない。糖鎖の生合成はこのように複雑な制御を受けているので、細胞内外の環境変化の影響を受けやすい、という特徴がある。

4. 脳老化における糖鎖変化

ヒト脳では老化に伴いリン脂質やコレステロールとともに糖脂質の組成が変化することが報告されている²⁾。しかしながらこうした変化が、脳の機能変化といかに関係するかよく分かっていない。というのは、たとえ脳を部位限局的に分析しても、ニューロンやグリア細胞が複雑に絡み合っているからである。そこでシナプス膜に焦点を当てた解析研究がある。シナプス膜では、シアル酸を含む糖脂質(ガングリオシド)は加齢に従って減少していた³⁾。老齡シナプスでは神経伝達物質アセチルコリンの放出が減少することが知られているが、ガングリオシドの変化によりシナプス膜流動性が変化して、アセチルコリンの放出が減少して伝達効率を低下させているかもしれない。

脳プロテオグリカンは、細胞外マトリックス分子、神経細胞接着分子や成長因子と結合し、神経突起形成を調節していることが明らかになり、脳の発生や修復過程において重要な役割を果たしていることが本特集でも紹介されている。軟骨、皮膚や血管での老化に伴うプロテオグリカンの変化は報告されているが、脳老化との関係についてはほとんど情報が得られておらず今後の研究を待ちたい。

脳糖タンパク質については白質と灰白質からプロテアーゼ消化により得た糖ペプチドについて、コンカナバリン A カラムによる分画や構成単糖分析から加齢変化が報告された⁴⁾。しかしながら、使用された分析法はかなり大雑把であると言わざるを得ない。そこで我々は、脳糖タンパク質の老化に伴う変化をプロテオーム手法と、糖鎖構造を特異的に認識するレクチン(糖結合タンパク質)を組み合わせて解析した。

5. プロテオームによる解析

脳各部の可溶性画分と膜画分のタンパク質について SDS-PAGE にて分画した後に様々なレクチンの反応性を検討し、老齡ラット(29月齢)と若齡ラット(9週齢)の糖タンパク質の発現パターンを比較した。その結果多くの糖タンパク質が老化に伴い変化することが明らかになった⁵⁾。レクチンとの反応性の変化の原因として、1) 糖タンパク質の発現の増減、2) 糖タンパク質に結合している糖鎖の構造変化、による可能性が考えられる。今後、変化する糖タンパク質を明らかにすることが必要である。可溶性画分の解析結果について少し詳しく述べてみよう。

若齡ラットおよび老齡ラット大脳皮質可溶性画分の糖タンパク質を調べてみると、老齡ラットにおいて14個のスポットでレクチン(コンカナバリン A)との反応性が上昇していた(図2)。これらのスポットは高マンノース型糖鎖を分解する Endo H 処理により反応性が消失することから、高マンノース型糖鎖の修飾を受けていると考えられ

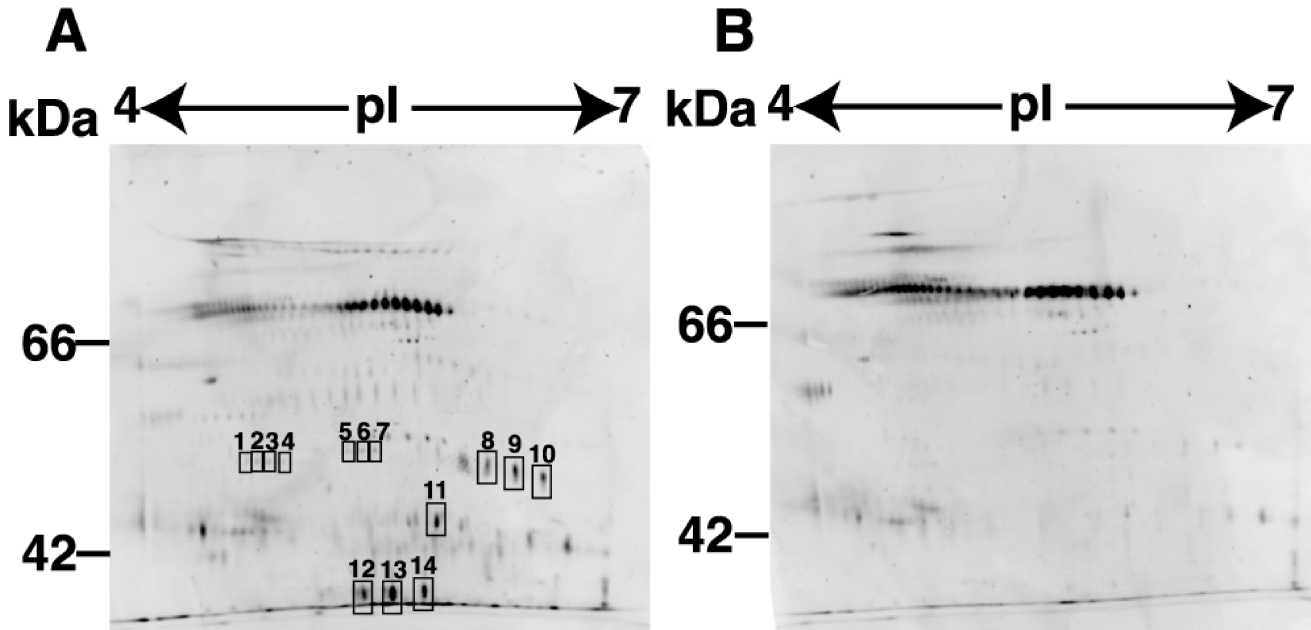


図2 ラット大脳皮質可溶性タンパク質の二次元電気泳動後のコンカナバリン A による検出

老齡(34月齢:A)若齡(2月齢:B)。老齡ラットにおいて14個のスポット(1~14)でコンカナバリン A に対する反応の上昇がみられた。このうち3スポット(12, 13, 14)が、カテプシン D と同定された。一次元目は等電点(PI, 4~7)で分離し、二次元目は電気泳動により分離した。縦軸の66 kDa と42 kDa は分子量マーカーの泳動位置を示す。

た。老齢ラットで増加したスポットを回収し、トリプシン消化後質量分析計により糖タンパク質を同定したところ、3スポットがリソソームのタンパク質分解酵素であるカテプシンDと同定された。ただしカテプシンDは老化に伴って増加するが、他のリソソーム酵素 (β -ヘキサミンダーゼと β -グルクロニダーゼ) は増加しないことから、カテプシンDの上昇は単なるリソソーム膜の破綻によるものではないと考えられた⁶⁾。最近、我々はこのカテプシンDの細胞内蓄積には、プロテアソームや酸化ストレスが関与していることを明らかにした⁷⁾。細胞は合成異常タンパク質を小胞体から細胞質に放出して処理する品質管理機能を持つ。老化に伴いこの処理システムに障害が生じたために糖タンパク質が細胞質に蓄積し、アポトーシスへとつながる可能性が考えられる。

6. シアル酸化糖鎖の解析

レクチンを用いた組織染色により脳のシアル酸化糖鎖の加齢変化を老齢ラットと若齢ラットで比較した⁸⁾。シアル酸を特異的に認識するイヌエンジュレクチン (MAL) と

ニホンニワトコレクチン (SNA) を用いて検討したところ、老齢と若齢では網状層の染色性の違いが見られ、老化によって反応性が減少する傾向が認められた。そこで細胞のどの部分にこれらのレクチンが反応しているのか明らかにするために、電子顕微鏡を用いてさらに解析を行った (図3)。三角印、矢印で示すように MAL と SNA は、若齢および老齢ともに網状層のシナプス前後膜を染色したが、老齢になるといずれも染色性は著しく減少した。MAL はシアル酸 α 2-3 結合を、SNA はシアル酸 α 2-6 結合を特異的に認識することから、この結果はシナプス膜上に存在するシアル酸 α 2-3 や α 2-6 結合を持つ分子が、老化に伴い減少していることを示している⁹⁾。シアル酸は陰性荷電を持つので、シアル酸の発現がシナプス前後膜で減少することは、シナプス前後膜間の陰性荷電どうしの静電的な反発が低下して、シナプス間隙が狭まると考えることもできる。もしそうならば老化によって神経伝達分子の放出能力が低下したシナプスが、その機能低下を補填するためにこのようなシアル酸発現変化を起こしているのかも知れない。一方、生体内にはシアル酸を認識する siglec と呼ばれ

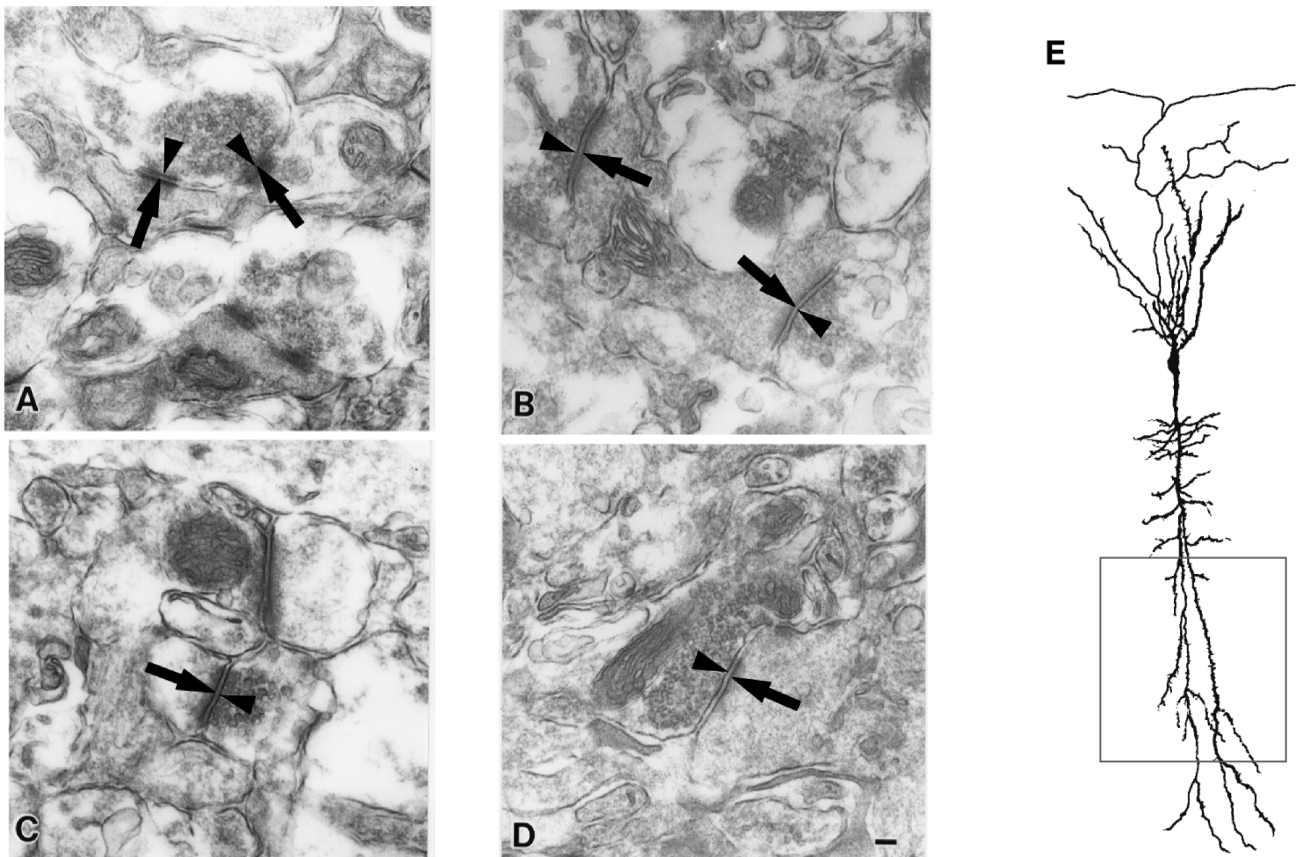


図3 ラット海馬網状層の電子顕微鏡による解析

若齢 (9週齢: AとC) 老齢 (30月齢: BとD) ラット海馬CA1領域をMAL (AとB) とSNA (CとD) にて染色し、透過型電子顕微鏡を用いて観察した。その結果、両レクチンの反応性は若齢ラットのシナプス前膜 (三角印) と後膜 (矢印) において認められた。一方、老齢ラットではその反応性が減少していた。Eに海馬網状層の神経細胞を示した。四角で囲った領域で形成されるシナプスを観察した。なお、D図中右下にあるバーは、0.1 μ mの長さを示している。

る一群の接着因子が存在する。中枢神経系ではMAG (myelin-associated glycoprotein) がこのファミリーに属する。老化に伴うシアル酸の減少は、siglec様分子との結合の低下につながり、ひいてはシナプス間隙の接着を弱め間隙の拡大を生じ、シナプスの伝達効率を低下させるという逆の可能性も考えられる。

一方小脳においては、MALとSNAは異なる染色像を示した。若齢ラットではMALは顆粒層を強く染め分子層や髄体は弱く染色されたが、SNAは顆粒層や分子層に比べ髄体を強く染めた。老化するとMALは髄体を強く染め、SNAは顆粒層を強く染めるようになった。また、MALによる染色は老齢ラットのプルキンエ細胞層で弱くなっていた¹⁰⁾。今後どのような分子に結合しているシアル酸が変化しているのか、どのようなメカニズムでシアル酸が変化するか、さらに量的な変化だけでなく質的な変化も視野に入れて解析する必要がある。

ポリシアル酸は、神経細胞接着分子NCAM (neural cell adhesion molecule) に発現する糖鎖であり、 α 2-8結合したシアル酸が数個から数十個結合している。ポリシアル酸は、その大きな負荷電によって分子間の相互作用を調節している。一般に細胞間相互作用に関与する分子は、その発現量によって調節されていると考えられているが、NCAMの発現量は胎仔期から成体までそれほど大きく変化しない。ところが、ポリシアル酸は神経ネットワーク形成過程で劇的に変化し、胎仔期から出生直後にかけて高い発現を示し、成体になるとほとんど消失する。しかし海馬や側脳室の上衣下層など限られた場所では、ポリシアル酸の発現は成体になっても低下しながら引き続き観察される。我々は29月齢ラットの海馬でもポリシアル酸陽性細胞を確認した⁸⁾。成体ラットではポリシアル酸陽性細胞の数と新生神経細胞の数はよく相関することから¹¹⁾、老齢ラット脳でも神経細胞の新生が起こっていることを示している。

シアル酸と脊髄における神経軸索再生に関する興味深い報告があるので紹介しよう。成体の中枢神経の軸索は、一度損傷を受けると再生が難しい。たとえば脊髄損傷は患者の生活の質を著しく低下させ、再生医療分野における重要な課題となっている。こうした脊髄神経軸索の再生を妨げる分子の存在が知られており、MAG, NogoA, OMgp, コンドロイチン硫酸などがある。このうちMAGは前述したように、シアル酸特にガングリオシドに結合する。脊髄損傷モデルにおいてシアリダーゼによりシアル酸を除去すると、損傷後の神経軸索再生が観察され、機能的にも回復する^{12,13)}。コンドロイチナーゼによる軸索再生もよく知られた現象であり、軸索再生と糖鎖は興味深い対象である。

最近加齢と脳ガングリオシドに関する興味深い報告がなされた。GM2/GD2合成酵素とGD3合成酵素の両方をノックアウトしたマウス脳(結果としてGM3だけを発現

している)では、加齢に伴い脳の重量が減少し、歩行異常や振せんを示すようになる。何故このような神経変性疾患症状を示すのか調べてみると、補体関連遺伝子の異常な発現亢進が観察され、それらの発現は加齢に伴い上昇していた。そこで炎症性サイトカインを調べてみると、やはり加齢に伴い上昇していた。これらの結果は、複雑な構造のガングリオシド欠損により細胞膜構造異常が惹起され、それが引き金になって補体の活性調節因子の機能が損なわれ、補体の活性化や炎症反応の加齢に伴う亢進により神経変性が誘導されると考えられる¹⁴⁾。

7. 老化関連疾患

アルツハイマー病(AD)は、認知症を代表する疾患であり、記憶の障害、思考や判断力の低下、言語や行動の異常などの症状を示す。現在進行を遅らせる薬はあるが、根本的な治療薬は未だ開発されていない。ADの代表的な病理所見として、神経細胞の変性や消失による脳萎縮に加えて、老人斑や神経原繊維変化がある。老人斑は $A\beta$ の細胞外の蓄積により形成されること、神経原繊維変化は細胞内でのタウの蓄積によることが明らかとなっている。

$A\beta$ はアミロイド前駆体タンパク質(APP)がまず β -セクレターゼ(BACE1)の作用によって切断され、次に γ -セクレターゼにより切断されることで生じる。APPは分子量120~130 kDaの膜貫通型の糖タンパク質でN結合型糖鎖を二箇所持ちO結合型糖鎖の修飾も受ける^{15~17)}。これまでに培養細胞を用いた解析から、APPのN結合型糖鎖がAPPの細胞内移行やプロセシングに影響すること^{15,18~20)}、更にセクレターゼの糖鎖も酵素活性に影響すること²¹⁾が明らかになっている。ところで、BACE1は $A\beta$ の産生を引き起こす酵素として同定されたが、その正常な生理的基質については不明であった。その後 α 2-6シアル酸転移酵素が生理的な基質であることが明らかになった²²⁾。興味深いことに、通常は膜結合型タンパク質である α 2-6シアル酸転移酵素が、BACE1により切断されて可溶性になることで分泌型の糖タンパク質のシアル酸化が増えるという現象が観察された²³⁾。AD患者脳ではBACE1活性が上昇していることより、分泌性の糖タンパク質のシアル酸化レベルが増加する可能性も考えられる。とするとシアル酸化タンパク質は、新たなADの診断マーカーになる可能性もあり今後の進展を期待したい。

ここで我々が行った研究について少し述べてみたい。ADは家族性ADと呼ばれる遺伝性のタイプと、孤発性ADに大別できる。家族性ADのなかにAPP遺伝子の変異によって、 $A\beta$ の産生が高まるタイプが知られている。APPはN結合型糖鎖を持つので、この糖鎖と $A\beta$ の産生に何らかの関連があるのではないかと考え、糖鎖について詳しく調べてみた。その結果、正常なAPPに比べて変異

型 APP では bisecting GlcNAc を持っている糖鎖構造が増えていることが分かった²⁴⁾。一方、AD 患者の脳における糖鎖関連遺伝子の発現を調べてみると、興味深いことに bisecting GlcNAc を転移する酵素 (*N*-acetylglucosaminyltransferase III, GnT-III, 図 4A) が増加していることが判明した²⁴⁾。以上のことから、「bisecting GlcNAc を持つ APP は A β を産生しやすい」という仮説をたて、神経細胞株での GnT-III の過剰発現による A β 産生への影響を調べた²⁵⁾。その結果、予想に反して GnT-III の過剰発現により、A β 40 や A β 42 の分泌量はともに約 40% 程度減少した (図 4B)。これを裏付けるようにこの細胞では、 α -セクレターゼの活性が上昇し、 β -セクレターゼは活性がやや減少しており、A β 産生低下の方向に動いていることが分かった。このように A β 産生が減少した理由は不明であるが、ひとつの可能性として我々の仮説とは逆に、AD で上昇した A β が GnT-III の発現を誘導するのではないかと考えられた。そこで神経細胞に A β を添加して GnT-III の発現を調べたところ、A β 42 の添加により GnT-III の発現が増加した²⁵⁾。以上の結果から、老化によって A β 42 が増えることにより GnT-III が誘導され、APP の糖鎖構造に bisecting GlcNAc が増え A β の産生を抑制する、という新たなメカニズムが予想された (図 5)。今後の詳細な解析が必要であるが、GnT-III は AD の病状の進行を遅らせる、つまり防衛的に働く可能性が考えられる。ところで本研究を進めていた頃、A β の刺激により健常人の単球の GnT-III の発現が増加するが、AD 患者では減少するという報告が他のグループからなされた²⁶⁾。またその論文では、健常人の単球は

A β を貪食できるが、AD 患者の単球は A β を貪食できないということから、AD では単球の GnT-III の発現低下が貪食能の低下をもたらすのではないかと推測している。なお興味深いことに、ある AD 患者ではクルクミンによって単球の GnT-III の発現が高まるとともに A β 貪食能も高まるという²⁶⁾。今後は GnT-III の増加から A β の産生低下が起こる経路を明らかにするとともに、GnT-III の発現を増加させる化合物のスクリーニングを進め、AD の発症予防や治療に向け研究を進めていきたい。

最近、脳血管内皮細胞は APP770 を発現しており、*N* 結合型糖鎖に加え *O* 結合型糖鎖の修飾を受けることにより、細胞表面からの取り込み、引き続いての切断と代謝、さらに分泌が制御されている可能性が報告された²⁷⁾。神経細胞では APP695 が主に発現していることは知られているが、今後血管内皮細胞と神経細胞における APP 代謝メカニズムの相違や血管内皮由来の A β の AD における病理学的役割の解明が期待される。

AD におけるもうひとつの蓄積物質であるタウは、本来微小管に結合し細胞骨格を形成する細胞内タンパク質である。AD の患者においては、微小管に結合する領域が高度にリン酸化され、結合活性を失い細胞質に不定形な沈澱を形成し蓄積する (AD P-Tau)。一方ではタウ同士が重合することにより細胞内に線維状物質として蓄積する (PHF-Tau)。タウの線維化においてタウ自身に *N* 結合型糖鎖が付加することが重要であるという結果が Wang らにより報告された²⁸⁾。そこで我々は彼らの協力を得て AD 患者脳由来タウの *N* 結合型糖鎖を解析した。その結果、健常脳の

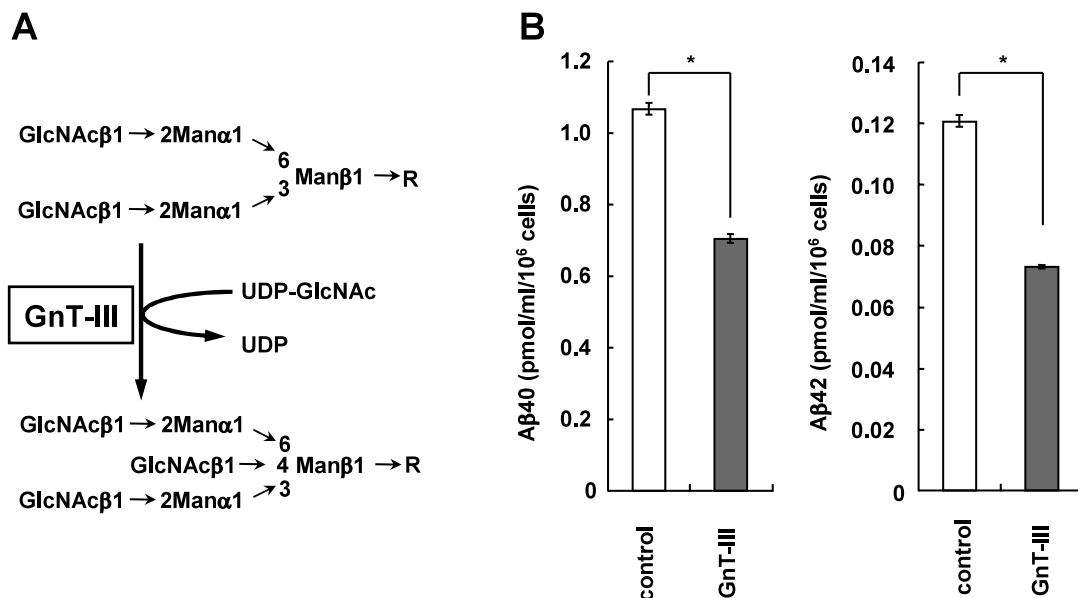


図 4 GnT-III の発現による A β の分泌の減少

A) GnT-III による bisecting GlcNAc 形成の酵素反応式。R は 4GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-Asn 構造を示す。B) GnT-III の強制発現により、細胞からの A β 40 と A β 42 の分泌量は、ともに約 40% 程度減少した (*; $p < 0.01$)。

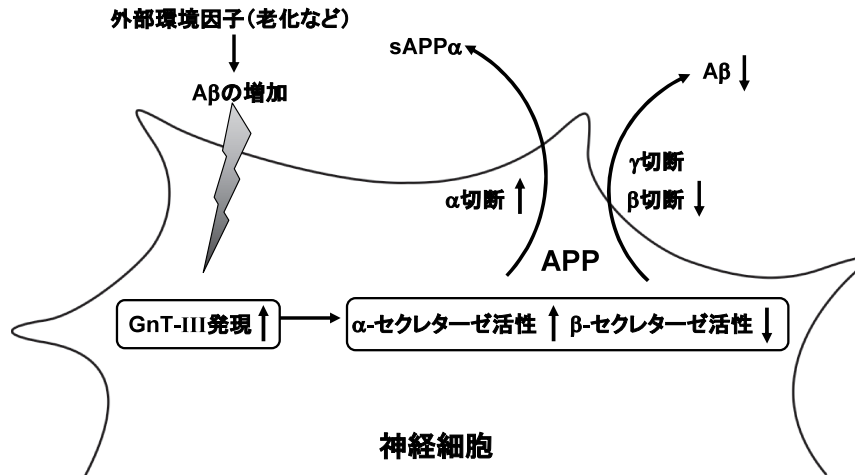


図5 神経細胞におけるAβの増加に対するGnT-IIIによる防御反応

神経細胞では二通りの方法でAPPを分解している。α切断ではAβは産生されないが、β切断とγ切断によってAβが産生される。老化などで脳にAβが増えた時に、それ以上Aβが産生されないようにするために、GnT-IIIが増えてβ切断経路を下げα切断経路を優位にするという生体防御メカニズムが示唆された。Aβの受容体やGnT-IIIの上昇に至るシグナル伝達系などは今後の課題である。

タウからはN結合型糖鎖は検出されなかったが、AD P-TauとPHF-Tauから高マンノース型、シアル酸を含む複合型、更に短くプロセシングされた糖鎖を検出した²⁹⁾。細胞質のタンパク質であるタウがN結合型糖鎖の修飾を受けることは、通常の生合成経路からは考えにくい。先に述べたタンパク質の品質管理機能、分解系に異常が生じたため糖タンパク質が細胞質内に蓄積し病態に関わっているのかも知れない。高齢者に多いもうひとつの神経変性疾患としてパーキンソン病がある。その病型のなかで劣性遺伝性のパーキンソン病では、細胞質タンパク質であるα-synucleinにシアル酸化の結合型糖鎖修飾を受けた分子が蓄積し、病態との関連性も指摘されている³⁰⁾。このように細胞質の糖タンパク質は、生理的な意義あるいは病理的な意義を持つ可能性があり、今後の展開が期待される³¹⁾。

最後にN-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 1分子による糖修飾について簡単に述べたい。この糖修飾は一般に見られる細胞表面あるいは細胞外にある糖タンパク質とは異なり、もともと細胞質や核におけるタンパク質の糖修飾として発見された。GlcNAcにより修飾される部位は、Ser/Thr残基であり、リン酸化部位あるいはその近傍が多い。細胞質や核にあるGlcNAc転移酵素及び脱離酵素により制御されている。シグナル伝達、細胞分裂、転写制御など生理的な意義の解明に向けた研究が精力的に進められている^{32,33)}。GlcNAcの脱着によりリン酸化を制御しているとの考えもあり、タウの場合GlcNAc修飾を受けるので、ADの病理に関わるリン酸化と関連する可能性もある。

8. グライコプロテオミクスへの展開

プロテオミクスにおけるハイスループットな分析技術は著しく向上している。こういった技術を駆使して、ある組織や細胞などの疾患や発生に伴い変化する全てのタンパク質を同定し、そのタンパク質の機能を明らかにし、その変化の意義を理解しようとするのがプロテオーム研究である。たとえば我々は、ラット海馬シナプトソームタンパク質を解析し、老化に伴ってアクチンやその折り畳みに関わる因子が変化することを明らかにした³⁴⁾。

ところで、すでに述べたようにタンパク質の50%以上は糖鎖が付加されているので、プロテオミクス解析だけでは不十分である。また、糖タンパク質はアミノ酸配列が同じでも、糖鎖が不均一なことに起因する混合物として存在している。そのため糖タンパク質の機能を明らかにするためには、グライコミクス(糖鎖全体を対象とした研究)あるいはグライコプロテオミクス(糖タンパク質全体を対象とした研究)が必要となる。糖鎖の生合成は糖転移酵素の発現に基づいており、ゲノム情報から糖鎖構造を予測することは現時点では不可能である。また、PCRのような増幅技術も存在しないし、DNAシーケンサーやペプチドシーケンサーのような簡便な糖鎖の配列決定方法も存在しない。そのため糖鎖の構造解析は、複数の技術を組み合わせられており、決まった一定の方法は現在のところない。糖タンパク質糖鎖の解析は、不均一性・構造多様性によりこれまで解析が立ち後れていたが、質量分析計を用いた解析システムも開発されつつある^{35,36)}。今後は個々の糖タンパク質の老化や疾病に伴う変化が糖鎖も含め具体的

に明らかになることが期待される。

グライコプロテオミクスは、糖タンパク質の機能を明らかにすることを目指している。そのためには、糖鎖構造、タンパク質への糖鎖結合部位、タンパク質の同定（アミノ酸配列情報）をハイスループットな方法によって得なければならない。ソフトイオン化の開発とタンデム質量分析法、特に多段階質量分析 MSⁿ が実用的になったことにより、こうした情報をハイスループットに得ることが可能となりつつある^{37,38)}。今後の発展を期待したい。

9. おわりに

本稿で述べたように脳糖タンパク質糖鎖の研究は、まだ立ち後れていると言っている。しかしながら最近の糖鎖解析技術には著しい進歩がある。今後はこれらの方法を駆使し、個々の糖タンパク質やその糖鎖の老化や疾病に伴う変化が明らかにされるのが期待される。老化に伴う変化の解明から、脳機能維持のためにどのような糖タンパク質や糖鎖の発現を賦活化すればよいか、あるいはどのような糖鎖修飾を防げばよいかといった道が切り拓かれることであろう。最近カロリー制限やインスリンシグナル伝達系といった糖に関連する事象が、個体老化あるいは寿命研究や生活習慣病研究における重要なキーワードとなっている。今後糖鎖研究により、老化メカニズムの解明および老化関連疾患の病態解明がなされ、健康長寿（サクセスフルエイジング）の実現が達成されることを期待したい。

文 献

- 1) 遠藤玉夫 (2007) 生化学, 79, 1105-1119.
- 2) Svennerholm, L., Bostrom, K., Jungbjer, B., & Olsson, L. (1994) *J. Neurochem.*, 63, 1802-1811.
- 3) Tanaka, Y., Waki, H., Kon, K., & Ando, S. (1997) *Neuroreport*, 8, 2203-2207.
- 4) Brunngraber, E.G. & Webster, J.C. (1986) *Neurochem. Res.*, 11, 579-588.
- 5) Sato, Y., Kimura, M., & Endo, T. (1998) *Glycoconj. J.*, 15, 1133-1140.
- 6) Sato, Y., Suzuki, Y., Ito, E., Shimazaki, S., Ishida, M., Yamamoto, T., Yamamoto, H., Toda, T., Suzuki, M., Suzuki, A., & Endo, T. (2006) *Mech. Ageing Dev.*, 127, 771-778.
- 7) Miura, Y., Sakurai, Y., Hayakawa, M., Shimada, Y., Zempel, H., Sato, Y., Hisanaga, S., & Endo, T. (2010) *Biol. Pharm. Bull.*, 33, 22-28.
- 8) Sato, Y. & Endo, T. (1999) *Neurosci. Lett.*, 262, 49-52.
- 9) Sato, Y., Akimoto, Y., Kawakami, H., Hirano, H., & Endo, T. (2001) *J. Histochem. Cytochem.*, 49, 1311-1319.
- 10) Sasaki, T., Akimoto, Y., Sato, Y., Kawakami, H., Hirano, H., & Endo, T. (2002) *J. Histochem. Cytochem.*, 50, 1179-1186.
- 11) Seki, T. & Arai, Y. (1995) *Neuroreport*, 6, 2479-2482.
- 12) Yang, L.J., Lorenzini, I., Vajn, K., Mountney, A., Schramm, L.P., & Schnaar, R.L. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 11057-11062.
- 13) Mountney, A., Zahner, M.R., Lorenzini, I., Oudega, M., Schramm, L.P., & Schnaar, R.L. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 11561-11566.
- 14) Ohmi, Y., Tajima, O., Ohkawa, Y., Mori, A., Sugiura, Y., & Furukawa, K. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 22405-22410.
- 15) Pahlsson, P. & Spitalnik, S.L. (1996) *Arch. Biochem. Biophys.*, 331, 177-186.
- 16) Sato, Y., Liu, C., Wojczyk, B.S., Kobata, A., Spitalnik, S.L., & Endo, T. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, 1472, 344-358.
- 17) Tomita, S., Kirino, Y., & Suzuki, T. (1998) *J. Biol. Chem.*, 273, 6277-6284.
- 18) Pahlsson, P., Shakin-Eshleman, S.H., & Spitalnik, S.L. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 189, 1667-1673.
- 19) Saito, F., Tani, A., Miyatake, T., & Yanagisawa, K. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 210, 703-710.
- 20) Yazaki, M., Tagawa, K., Maruyama, K., Sorimachi, H., Tsuchiya, T., Ishiura, S., & Suzuki, K. (1996) *Neurosci. Lett.*, 221, 57-60.
- 21) Charlwood, J., Dingwall, C., Matico, R., Hussain, I., Johanson, K., Moore, S., Powell, D.J., Skehel, J.M., Ratcliffe, S., Clarke, B., Trill, J., Sweitzer, S., & Camilleri, P. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 16739-16748.
- 22) Kitazume, S., Tachida, Y., Oka, R., Shirotani, K., Saido, T.C., & Hashimoto, Y. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 13554-13559.
- 23) Nakagawa, K., Kitazume, S., Oka, R., Maruyama, K., Saido, T.C., Sato, Y., Endo, T., & Hashimoto, Y. (2006) *J. Neurochem.*, 96, 924-933.
- 24) Akasaka-Manya, K., Manya, H., Sakurai, Y., Wojczyk, B.S., Spitalnik, S.L., & Endo, T. (2008) *Glycoconj. J.*, 25, 775-786.
- 25) Akasaka-Manya, K., Manya, H., Sakurai, Y., Wojczyk, B.S., Kozutsumi, Y., Saito, Y., Taniguchi, N., Murayama, S., Spitalnik, S.L., & Endo, T. (2010) *Glycobiology*, 20, 99-106.
- 26) Fiala, M., Liu, P.T., Espinosa-Jeffrey, A., Rosenthal, M.J., Bernard, G., Ringman, J.M., Sayre, J., Zhang, L., Zaghi, J., Dejbakhsh, S., Chiang, B., Hui, J., Mahanian, M., Baghaee, A., Hong, P., & Cashman, J. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 12849-12854.
- 27) Kitazume, S., Tachida, Y., Kato, M., Yamaguchi, Y., Honda, T., Hashimoto, Y., Wada, Y., Saito, T., Iwata, N., Saido, T., & Taniguchi, N. (2010) *J. Biol. Chem.*, 285, 40097-40103.
- 28) Wang, J.Z., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (1996) *Nat. Med.*, 2, 871-875.
- 29) Sato, Y., Naito, Y., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., & Endo, T. (2001) *FEBS Lett.*, 496, 152-160.
- 30) Shimura, H., Schlossmacher, M.G., Hattori, N., Frosch, M.P., Trockenbacher, A., Schneider, R., Mizuno, Y., Kosik, K.S., & Selkoe, D.J. (2001) *Science*, 293, 263-269.
- 31) Suzuki, T. (2007) *Semin. Cell. Dev. Biol.*, 18, 762-769.
- 32) Butkinaree, C., Park, K., & Hart, G.W. (2010) *Biochim. Biophys. Acta*, 1800, 96-106.
- 33) Hanover, J.A., Krause, M.W., & Love, D.C. (2010) *Biochim. Biophys. Acta*, 1800, 80-95.
- 34) Sato, Y., Yamanaka, H., Toda, T., Shinohara, Y., & Endo, T. (2005) *Neurosci. Lett.*, 382, 22-26.
- 35) Sato, Y., Suzuki, M., Nirasawa, T., Suzuki, A., & Endo, T. (2000) *Anal. Chem.*, 72, 1207-1216.
- 36) Kameyama, A., Kikuchi, N., Nakaya, S., Ito, H., Sato, T., Shikanai, T., Takahashi, Y., Takahashi, K., & Narimatsu, H. (2005) *Anal. Chem.*, 77, 4719-4725.
- 37) Wada, Y., Tajiri, M., & Yoshida, S. (2004) *Anal. Chem.*, 76, 6560-6565.
- 38) Kubota, K., Sato, Y., Suzuki, Y., Goto-Inoue, N., Toda, T., Suzuki, M., Hisanaga, S., Suzuki, A., & Endo, T. (2008) *Anal. Chem.*, 80, 3693-3698.