

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15608

研究課題名(和文) 神経変性疾患治療への応用を目指した新規脳内糖化ステロールの分析基盤の開発

研究課題名(英文) Development of an analytical platform for novel brain glycosylated sterols toward applying for the treatment of neurodegenerative diseases

研究代表者

秋山 央子(Akiyama, Hisako)

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・研究員

研究者番号：80623462

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らが発見した脳内新規糖化ステロール群に特化した分析法を開発し、糖化ステロール群の代謝機構および生理機能を解析した。その結果、糖化ステロール群の代謝がグルコシルセラミド分解酵素によって行われることが明らかになった。また、グルコシルセラミド分解酵素の機能が低下したパーキンソン病モデルマウスの脳で糖化ステロール群の発現量が変動していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳内新規糖化ステロール群の代謝を担うことが明らかになったグルコシルセラミド分解酵素は、その機能不全がパーキンソン病や小脳失調などの神経変性疾患の原因となる。本研究で開発した分析法を用いることで、糖化ステロール代謝が難治性神経変性疾患発症の新たな分子基盤となり得る可能性を検証できるようになり、本研究成果の学術的・社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：I developed an analytical method specific to novel glycosylated sterols that we discovered in the brain, and analyzed the metabolic pathways and physiological functions of the glycosylated sterols. The results showed that the metabolism of the glycosylated sterols is mediated by glucosylceramide-degrading enzymes (GBA). In addition, the expression of glycosylated sterols was altered in the brains of mouse model of Parkinson's disease with impaired GBA function.

研究分野：脂質生化学

キーワード：糖脂質 糖化ステロール グルコシルセラミド分解酵素

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

申請者らは、脳に糖脂質・グルコース化コレステロール (1-*O*-cholesteryl- $\beta$ -D-glucopyranoside, GlcChol) が存在することを発見した(1)。GlcChol は、植物や菌類からヒトまで広く保存された糖化ステロールの一種であるが、これまで脳に存在することは知られていなかった。申請者らは、脳から精製した GlcChol の精密な構造決定過程で、GlcChol と構造が類似した一群の糖化ステロールが脳内に存在することを見出した。驚いたことに、一群の糖化ステロールは、糖部分ならびにステロール部分の両方に多様性があり、これまで脊椎動物では報告がなかったガラクトース化コレステロール (GalChol) や植物由来ステロールを有するグルコース化シトステロール (GlcSito) が存在していた。

脳における糖化ステロール群の局在や生理機能、代謝経路はほとんど不明である。申請者らはこれまでに、脊椎動物では糖脂質・グルコシルセラミドのグルコースがコレステロールに転移されて GlcChol が合成されることを見出し(2)、その反応がリソソームに局在する酸性グルコシルセラミド分解酵素 (GBA1) と、小胞体やゴルジ体に局在する中性グルコシルセラミド分解酵素 (GBA2) により行われることを明らかにしてきた(3,4)。GBA1 または GBA2 の機能不全はパーキンソン病 (PD) や小脳失調などの神経変性疾患の原因となることが知られている(5,6)。また申請者らは、GBA1 と GBA2 が GlcChol 合成活性だけでなく、GlcChol 分解活性をもつことを明らかにしている(3,4)。

### 2. 研究の目的

申請者らが発見した脳内新規糖化ステロール群に特化したターゲットリポドミクス解析系を開発し、糖化ステロール群の代謝機構および生理機能を解析することにより、糖化ステロール代謝が難治性神経変性疾患発症の新たな分子基盤となり得る可能性を検証する。

### 3. 研究の方法

高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法 (LC-MS/MS) と薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いて、糖化ステロール群の定量法ならびにそれらの合成活性測定法の開発を行った。また、開発した方法を用いて、グルコシルセラミド分解酵素の機能不全が関与する神経変性疾患について、疾患モデルマウスの脳や患者由来剖検脳における糖化ステロール群の定量を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 糖化ステロール群の定量法の開発

糖化ステロール群の定量法の開発には LC-MS/MS を用いた。糖異性体の分離に利用されている親水性相互作用クロマトグラフィーを LC 部分に採用することによって、同一分子量で構造が類似する糖化ステロール (GlcChol と GalChol) の分離が行えることが判明した。また、試料から脂質抽出を行う際の糖化ステロール群の抽出効率の補正には、以前に報告済の重水素ラベルされた GlcChol (GlcChol-*d7*) (1) を用いた。糖化ステロール群の定量には、Multiple reaction monitoring (MRM) モードを用い、プリカーサーイオンとしてアンモニウム付加体  $[M + NH_4]^+$  を、プロダクトイオンとしてステロール骨格に由来するイオンを選択した。興味深いことに、同濃度の GlcChol と GalChol を MRM モードで分析した場合に、GlcChol よりも GalChol のピークエリアが大きくなることが明らかになった。これは、グルコースとガラクトースは 4 位の水酸基の配向が異なっており、GlcChol よりも GalChol の方がプリカーサーイオンである  $[M + NH_4]^+$  を形成しやすいことが原因していると考えられた。GlcChol と GalChol のイオン化効率 (すなわち  $[M + NH_4]^+$  の形成しやすさ) が異なることが明らかになったため、両者を定量する際には、GlcChol-*d7* と GalChol を用いてそれぞれ検量線を作成し、GlcChol と GalChol を別々に定量することで正確性を確保した。

#### → 開発した糖化ステロール群の定量法を用いて得られた結果:

野生型マウスの脳の各部位における糖化ステロール群の発現量を解析した結果、脳の部位ごとに糖化ステロール群の発現量が異なることが明らかになった。GlcChol と GalChol の合成の基質となる糖脂質 (グルコシルセラミドとガラクトシルセラミド) は、脳の部位ごとに発現量が異なるため(7)、基質となる糖脂質の量に依存して GlcChol と GalChol の発現量が異なる可能性が考えられた。

続いて、GBA1 の機能が低下した PD モデルマウスの脳の各部位における糖化ステロール群の発現量を解析した。GlcChol 発現量は、野生型マウスと PD モデルマウスとで有意な差はなかった。GalChol ならびに GlcSito の発現量は、野生型マウスと比較して PD モデルマウスの大脳皮質で有意に減少し、嗅球では変化がなかった。PD モデルマウスにおける糖化ステロール群の発現変動が、PD モデルマウスで観察される神経変性と関連しているか否かを今後検証していく必要がある。また、PD モデルマウスにおいて、脳の部位ごとに糖化ステロール群の発現変動のパターンが異なっていたことから、糖化ステロール群の生理機能を明らかにするためには、部位ごとに発現量を解析していく必要性が示唆された。

さらに、PD 患者由来剖検脳における糖化ステロール群の発現量を解析した。GlcChol、GalChol、GlcSito の発現量は、コントロール群と PD 患者群とで有意な差はなかった。有意な差が得られなかった原因として、糖化ステロール群の発現量の個体間でのばらつきが大きか

ったこと、また分析した検体数が少なかったことが挙げられる。今後、検体数を増やして分析を進めていく必要がある。

## (2) 糖化ステロール群の合成活性測定法の開発

### LC-MS/MS を用いた糖化ステロール群の合成活性測定法

糖のドナーとなる化合物(糖脂質など)とステロールを基質として用い、組換えヒト GBA1(セレザイム®)またはヒト GBA2 を過剰発現させたヒト胎児腎細胞(HEK293T)を酵素源として 37℃ で 2 時間酵素反応を行い、酵素反応液から抽出した脂質を LC-MS/MS で解析することを試みた。酵素反応液に添加したステロールが多量に残存していること、同じく酵素反応液に添加した界面活性剤が脂質抽出物に混入することなどが原因し、LC-MS/MS で糖化ステロールのシグナルをとることが難しいことが判明した。そこで、TLC を用いて酵素反応液の脂質抽出物からステロールならびに界面活性剤を除去し、糖化ステロールを精製したところ、LC-MS/MS で糖化ステロールを検出することができるようになり、糖化ステロール群の合成活性測定ができるようになった。

### TLC を用いた糖化ステロール群の合成活性測定法

と同様の酵素反応を蛍光ラベルされたコレステロール(25-NBD-コレステロール)を用いて行い、酵素反応液から抽出した脂質を TLC で分離し、蛍光ラベルされた糖化ステロールの合成量を解析することを試みた。TLC に用いる展開溶媒を検討した結果、クロロホルム:メタノール(85:15, v/v)を用いると蛍光ラベルされた GlcChol と GalChol を分離できることが明らかになり、糖化ステロール群の合成活性測定ができるようになった。

### → 開発した糖化ステロール群の合成活性測定法を用いて得られた結果:

GBA1 と GBA2 はガラクトシルセラミド分解活性をもち、ガラクトシルセラミドのガラクトースをコレステロールに転移して GalChol を合成することがわかった。ガラクトシルスフィンゴシンならびに UDP-ガラクトースは GalChol 産生のガラクトースドナーとしては利用されないことがわかった。

GBA1 と GBA2 はグルコシルセラミドの加水分解を担う  $\beta$ -グルコシダーゼとして同定されたタンパク質である。これまでに GBA1 と GBA2 がガラクトース代謝に関与することは報告されていなかった。上記の結果より、GBA1 と GBA2 がグルコシルセラミド分解酵素としてだけでなく、 $\beta$ -ガラクトシダーゼとしてガラクトシルセラミド分解活性をもち、GalChol 合成酵素としても機能することが明らかになった。GalChol 合成という GBA1 と GBA2 の新しい機能に着目することにより、GBA1 または GBA2 の機能不全が神経変性疾患を引き起こすメカニズムを明らかにすることができると期待している。

### <引用文献>

1. Akiyama, H., Nakajima, K., Itoh, Y., Sayano, T., Ohashi, Y., Yamaguchi, Y., Greimel, P., and Hirabayashi, Y. (2016) Aglycon diversity of brain sterylglucosides: Structure determination of cholesteryl- and sitosterylglucoside. *J. Lipid Res.*, 57; 2061-2072.
2. Akiyama, H., Sasaki, N., Hanazawa, S., Gotoh, M., Kobayashi, S., Hirabayashi, Y., and Murakami-Murofushi, K. (2011) Novel sterol glucosyltransferase in the animal tissue and cultured cells: evidence that glucosylceramide as glucose donor. *Biochim. Biophys. Acta* 1811, 314-322.
3. Akiyama, H., Kobayashi, S., Hirabayashi, Y., and Murakami-Murofushi, K. (2013) Cholesterol glucosylation is catalyzed by transglucosylation reaction of  $\beta$ -glucosidase 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 441, 838-843.
4. Marques, A. R., Mirzaian, M., Akiyama, H., Wisse, P., Ferraz, M. J., Gaspar, P., Ghauharali-van der Vlugt, K., *et al.* (2016) Glucosylated cholesterol in mammalian cells and tissues: formation and degradation by multiple cellular  $\beta$ -glucosidases. *J. Lipid Res.* 57, 451-463.
5. Sidransky, E., Nalls, M. A., Aasly, J. O., Aharon-Peretz, J., Annesi, G., Barbosa, E. R., Bar-Shira, A., *et al.* (2009) Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* 361, 1651-1661.
6. Hammer, M. B., Eleuch-Fayache, G., Schottlaender, L. V., Nehdi, H., Gibbs, J. R., Arepalli, S. K., Chong, S. B., *et al.* (2013) Mutations in GBA2 cause autosomal-recessive cerebellar ataxia with spasticity. *Am. J. Hum. Genet.* 92, 245-251.
7. Nakajima, K., Akiyama, H., Tanaka, K., Kohyama-Koganeya, A., Greimel, P., and Hirabayashi, Y. (2016) Separation and analysis of mono-glucosylated lipids in brain and skin by hydrophilic interaction chromatography based on carbohydrate and lipid moiety. *Journal of Chromatography B* 1031, 146-153.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Akiyama, H., Ide, M., Nagatsuka, Y., Sayano, T., Nakanishi, E., Uemura, N., Yuyama, K., Yamaguchi, Y., Kamiguchi, H., Takahashi, R., Aerts, J. M. F. G., Greimel, P. and Hirabayashi, Y	4. 巻 295
2. 論文標題 Glucocerebrosidases catalyze a transgalactosylation reaction that yields a newly-identified brain sterol metabolite, galactosylated cholesterol	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 5257-5277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.012502	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Ikuno, M., Yamakado, H., Akiyama, H., Parajuli, L. K., Taguchi, K., Hara, J., Uemura, N., Hatanaka, Y., Higaki, K., Ohno, K., Tanaka, M., Koike, M., Hirabayashi, Y. and Takahashi, R.	4. 巻 28
2. 論文標題 GBA haploinsufficiency accelerates alpha synuclein pathology with altered lipid metabolism in a prodromal model of Parkinson's disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 1894-1904
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddz030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 秋山央子、平林義雄	4. 巻 90
2. 論文標題 グルコセレブロシダーゼによるステリルグルコシドの代謝制御機構	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 399-402
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2018.900399	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Akiyama H. and Hirabayashi Y	4. 巻 1861
2. 論文標題 A novel function for glucocerebrosidase as a regulator of sterylglucoside metabolism	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta	6. 最初と最後の頁 2507-2514
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2017.06.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 秋山央子、井手三津子、中西悦郎、上村紀仁、山口芳樹、Peter Greimel、上口裕之、高橋良輔、平林義雄
2. 発表標題 グルコシルセラミド分解酵素による新規脳内ステロール代謝物・ステロール配糖体の代謝制御
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hisako Akiyama
2. 発表標題 Glucocerebrosidase mediates a crosstalk between glycosphingolipid and sterol
3. 学会等名 1st Japan-Europe Workshop on Glycosphingolipids and Membrane Homeostasis (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hisako Akiyama, Mitsuko Ide, Etsuro Nakanishi, Norihito Uemura, Yoshiki Yamaguchi, Hiroyuki Kamiguchi, Ryosuke Takahashi, Peter Greimel and Yoshio Hirabayashi
2. 発表標題 Newly identified brain sterol metabolite glycosylated sterols are metabolized by -glucocerebrosidase 1 and 2 in vivo
3. 学会等名 25th International Symposium on Glycoconjugates (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 秋山央子、井手三津子、Peter Greimel、Hans Aerts、上口裕之、平林義雄
2. 発表標題 グルコシルセラミド分解酵素はステロールとガラクトシルセラミド間のトランスガラクトシレーション反応を触媒する
3. 学会等名 第61回日本脂質生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 秋山央子、井手三津子、佐矢野智子、中西悦郎、上村紀仁、Peter Greimel、高橋良輔、平林義雄
2. 発表標題 グルコシルセラミド分解酵素による脳内ステロール配糖体群の代謝制御
3. 学会等名 第60回日本脂質生化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hisako Akiyama, Yasuko Nagatsuka, Tomoko Sayano, Mitsuko Ide, Yoshiki Yamaguchi, Peter Greimel, Yoshio Hirabayashi
2. 発表標題 Identification of novel brain sterol metabolite galactosylated cholesterol synthesized by glucocerebrosidases
3. 学会等名 Glycolipid & Sphingolipid Biology, Gordon Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 秋山央子、中嶋和紀、伊藤喜之、佐矢野智子、大橋陽子、山口芳樹、Peter Greimel、平林義雄
2. 発表標題 脳における多様なステリルグリコシド：コレステロールおよび植物ステロール配糖体の完全構造決定
3. 学会等名 第65回質量分析総合討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 秋山央子、中嶋和紀、佐矢野智子、大橋陽子、山口芳樹、Peter Greimel、平林義雄
2. 発表標題 ステロールとスフィンゴ脂質の代謝的クロストークが生み出す新たな糖脂質
3. 学会等名 第59回日本脂質生化学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 秋山央子、中嶋和紀、佐矢野智子、長塚靖子、山口芳樹、Peter Greimel、平林義雄
2. 発表標題 新規脳内糖化ステロール群の発見：多様なステロールおよび糖鎖構造
3. 学会等名 第36回日本糖質学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----