

令和 3 年 8 月 20 日現在

機関番号：82401

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2018～2020

課題番号：17KK0147

研究課題名（和文）新規脳内糖化ステロールの代謝酵素の組織化学的局在解析システムの開発

研究課題名（英文）Development of a histochemical analytical system for metabolic enzymes of novel brain glycosylated sterols

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） 11,200,000円

渡航期間：7ヶ月

研究成果の概要（和文）：グルコシルセラミド分解酵素（GBA）は、脳内新規糖化ステロール（SG）群の合成・分解を担う。GBAの阻害剤ライブラリーを用いた解析より、GBAが同一の活性部位を利用して種々のSG代謝活性を發揮することが判明した。また、質量分析法を用いてマウス脳切片から回収した1 mm²以内の領域からSG群の検出に成功した。活性をもつGBAは阻害剤への蛍光修飾により可視化できるため、酵素活性と酵素反応産物の局在情報の重ね合わせによりGBAのSG代謝活性の組織化学的局在解析が可能になると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SG群の代謝を担うGBAは、その機能不全がパーキンソン病や小脳失調などの難治性神経変性疾患の原因となる。本研究で提案したGBAのSG代謝活性の組織化学的局在解析法を用いることで、SG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るため、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）：The glucosylceramide-degrading enzyme (GBA) is responsible for the synthesis and degradation of newly found glycosylated sterols (SGs) in the brain. Using a library of GBA inhibitors, I found that GBA exerts various SG metabolic activities using the same active site. I succeeded in detecting SGs in a region of less than 1 mm² recovered from mouse brain sections using mass spectrometry. Since active GBA can be visualized by fluorescence modified inhibitor, superimposition of the localization of enzyme activity and enzyme reaction products will enable histochemical localization analysis of SG metabolic activities of GBA.

研究分野：脂質生化学

キーワード：ステロール 糖化ステロール 糖脂質 グルコシルセラミド分解酵素

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、動物では1種類しか存在しないと考えられてきた糖化ステロール (SG) が、脳において一群を成して存在することを発見した(1,2)。驚いたことに、一群のSG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、既知のグルコース化コレステロール (GlcChol) に加えて、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が存在していた。さらに申請者らは、グルコシルセラミド (GlcCer) 分解酵素である GBA1 と GBA2 が脳内 SG 群の代謝酵素として機能することを見出し、SG の分子種の違いにより GBA1 と GBA2 が合成活性や分解活性を発揮することを明らかにした(2-5)。GBA1 と GBA2 は β -グルコシダーゼとして同定された加水分解酵素であるため、これまで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。しかし申請者らは、GBA1 と GBA2 が GlcCer 分解活性だけでなく、ガラクトシルセラミド (GalCer) 分解活性をもち、GalCer のガラクトースをコレステロールに転移して GalChol を合成する活性を有することを見出した(2)。

GBA1 と GBA2 の活性低下はパーキンソン病や小脳失調を引き起こすことが知られており(6,7)、GBA1 と GBA2 の局在だけでなく、GBA1 と GBA2 が活性を有する状態にあるか否かが病態発症に重要である。GBA1 と GBA2 は、それぞれ特異的な活性阻害剤が開発されている。それらは GBA1 と GBA2 の活性部位に結合することで、本来の基質が活性部位に結合できなくなることを利用して阻害活性を示す。これまでに開発された GBA1 と GBA2 の活性阻害剤は、GlcCer 分解活性を指標として阻害活性の評価が行われてきた。海外共同研究者であるオランダ・ライデン大学 Johannes M. Aerts 教授は、長年 GlcCer 分解酵素の研究を行っており、GlcCer 分解酵素に特化した阻害剤ライブラリーを所有している。海外共同研究者は、GBA1 と GBA2 それぞれに対する阻害剤が GBA1 と GBA2 の活性部位に結合することを利用し、阻害剤を蛍光色素で修飾することにより、抗体を用いた従来法では困難であった活性を有する GBA1 と GBA2 をそれぞれ別々に組織・細胞レベルで可視化する方法を開発した。

2. 研究の目的

本研究では、GBA1 と GBA2 がもつ様々な SG 代謝活性について、活性特異的な組織化学的局在解析システムを構築することを目的とした。

3. 研究の方法

海外共同研究者が有する GBA1 と GBA2 の阻害剤ライブラリーを利用し、GBA1 と GBA2 による SG 群の合成・分解活性について、それぞれの活性に阻害効果を示す化合物のスクリーニングを行った。スクリーニングの結果、GBA1 と GBA2 がそれぞれ既報の活性部位を利用して様々な活性を発揮している可能性が明らかになり、活性部位に結合する阻害剤を用いると様々な活性を見分けられないことが判明した。そのため、酵素反応産物である SG 群そのものを液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC/MS) によって可視化する技術の開発を行った。

4. 研究成果

(1) GBA1 と GBA2 の SG 代謝活性を阻害する化合物のスクリーニング

GBA1 と GBA2 の阻害剤ライブラリーを利用したスクリーニングの結果、GBA1 と GBA2 が有する GlcCer 分解、GalCer 分解、SG 合成・分解などの様々な活性を同時に阻害する阻害剤を複数見つけたが、それぞれの活性を別々に阻害することができる阻害剤を見つけるには至らなかった。GBA1 と GBA2 の活性部位はそれぞれ1つであることが報告されており、阻害剤ライブラリーに登録されている化合物の多くは既報の活性部位に結合する。今回得られた結果より、GBA1 と GBA2 がそれぞれ既報の活性部位を利用して様々な活性を発揮している可能性が明らかになった。

(2) SG 群のイメージング技術の開発

SG 群の構成分子を特異的に認識するプローブや抗体は存在しない。そのため、SG 群の組織・細胞内での定量的局在解析は不可能である。本研究では、質量分析計を用いた SG のイメージング技術の開発に取り組んだ。

従来法のマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF-MS) を用いたイメージング質量分析法では、脳組織中に多量に存在する GalCer によって微量脂質は埋もれてしまい、SG 群の可視化は困難を極めた。また、SG 群の中には、同一分子量で構造が類似する異性体 (GlcChol と GalChol) が含まれるが、クロマトグラフィーを用いない従来法では異性体の識別が困難であった。申請者は、LC/MS の LC 部分に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 (HILIC) を採用することで、GlcChol と GalChol の分離・分析に成功した(2)。そこで、HILIC を用いた分析系を用いて、脳組織切片上の各区画から抽出した脂質を分析することにした。

LC/MS を用いた SG のイメージング技術の開発には、指定した微小領域由来の脂質抽出物をロスなく分析に供する方法と、分析方法の高感度化が必要不可欠である。前者については、溶媒抽出表面分析法の検討と従来の液液抽出法の改良を行った。溶媒抽出表面分析法では、脳切片から有機溶媒を用いて抽出した脂質溶液を直接 LC に導入する。脂質抽出効率が高い溶媒を用いた場合、LC で用いたカラムからの SG 群の溶出力が高くなり、異性体の分離を達成できないことが判明した。抽出効率を保持しつつ異性体分離を達成できる溶媒の組み合わせを今後検討していく必要がある。従来の液液抽出法の改良では、抽出のスケールを最小限にし、低吸着性の容器を用いることで、マウス脳からレーザーマイクロダイセクションで回収した領域より 1 mm² 以内 (約 1000 細胞) の空間分解能で SG 群の検出に成功した。SG 群の発現パターンは、中脳、海馬、小脳、延髄でそれぞれ異なることが明らかになり、その発現パターンは、SG 群合成の基質である GlcCer や GalCer の発現パターンに一致することが明らかになった。

後者の分析方法の高感度化については、セミマイクロ流量からナノ流量へのスケールダウンを試みた。ナノ流量では、配管の体積やサンプル注入量をセミマイクロ流量の場合と同一になるようにスケールダウンできないことが原因し、GlcChol と GalChol の分離が難しい可能性が浮上した。しかしながら、SG 群以外の糖脂質異性体の中でナノ流量においても分離が可能であるものがあつたため、GlcChol と GalChol については、今後スケールダウンの検討をさらに詳細に進めることで分離が可能になるかもしれない。

上記の結果より、活性をもつ GBA1 と GBA2 については海外共同研究者が開発済の蛍光標識された阻害剤を用いて可視化し、酵素反応産物である SG 群については LC/MS を用いて可視化することにより、酵素活性と酵素反応産物の局在情報を重ね合わせることが可能になると考えられる。この手法を用いて、GBA1 と GBA2 がもつ様々な SG 代謝活性について、活性特異的な組織化学的局在解析が実現できれば、GBA1 や GBA2 の機能不全によって引き起こされる難治性神経変性疾患への SG 群の関連を明らかにすることができるかと期待している。

< 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., 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. (2020) Glucocerebrosidases catalyze a transgalactosylation reaction that yields a newly-identified brain sterol metabolite, galactosylated cholesterol. *J. Biol. Chem.* 295, 5257-5277.
3. 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.
4. Akiyama, H., Kobayashi, S., Hirabayashi, Y., and Murakami-Murofushi, K. (2013) Cholesterol glucosylation is catalyzed by transglucosylation reaction of -glucosidase 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 441, 838-843.
5. 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.
6. 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.
7. 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.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2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 Lelieveld, L. T., Mirzaian, M, Kuo, C-L., Artola M., Ferraz, M. J., Peter, R. E. A., Akiyama, H., Greimel, P., van den Berg, R. J. B. H. N., Overkleeft, H. S., Boot, R. G., Meijer, A. H., and Aerts, J. M. F. G.	4. 巻 60
2. 論文標題 Role of α -glucosidase 2 in aberrant glycosphingolipid metabolism: model of glucocerebrosidase deficiency in zebrafish	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Lipid Research	6. 最初と最後の頁 1851-1867
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1194/jlr.RA119000154	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 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 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 印刷中
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 印刷中
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 Nakanishi, E., Uemura, N., Akiyama, H., Kinoshita, M., Sawamura, M., Taruno, Y., Yamakado, H., Matsuzawa, S., Takeda, S., Hirabayashi, Y., and Takahashi, R.	4. 巻 未定
2. 論文標題 Impact of GBA2 on neuronopathic Gaucher 's disease and -synuclein accumulation in medaka (Oryzias latipes)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 未定
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

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

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 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 秋山央子
2. 発表標題 Flexible activity of glucocerebrosidase generates a unique glycolipid metabolic network
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 秋山央子
2. 発表標題 親水性相互作用クロマトグラフィー-質量分析法を用いた新規脳内糖脂質異性体の発見
3. 学会等名 大阪大学蛋白質研究所セミナー（招待講演）
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
オランダ	ライデン大学			