

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K14687

研究課題名（和文）新規脳内糖化ステロール群の発見に基づくステロール代謝経路の再構築

研究課題名（英文）Reconstruction of sterol metabolic pathways based on the discovery of novel glycosylated sterols in the brain

研究代表者

平林 義雄（Hirabayashi, Yoshio）

国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・客員主管研究員

研究者番号：90106435

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：申請者が脊椎動物の脳で発見した新規ステロール代謝産物・糖化ステロール群に着目し、脳において未知のステロール代謝経路が存在する可能性を検証した。新規糖化ステロール群の構造解析より、コレステロールや植物性ステロールにグルコースやガラクトースが結合した糖脂質が脳に存在することが初めて明らかになった。また、それらの合成・分解は、これまでステロール代謝への関与が知られていなかった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。

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合成・分解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。脳内新規糖化ステロール群の代謝調節という新しい機能に着目することにより、グルコシルセラミド分解酵素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可能性があり、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）：We focused on novel sterol metabolites, glycosylated sterols that we discovered in vertebrate brain, and verified whether unreported sterol metabolic pathways exist in the brain. Structural analysis of the glycosylated sterols revealed for the first time that glycolipids, in which glucose and galactose are bound to cholesterol and a plant sterol, are present in the brain. Their synthesis and degradation were found to be mediated by glucosylceramide-degrading enzymes, whose involvement in sterol metabolism was not previously reported.

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

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、動物の脳に糖脂質・グルコース化コレステロール (1-*O*-cholesteryl- β -D-glucopyranoside, GlcChol) が存在することを発見した。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。脊椎動物において、GlcChol の組織分布や細胞内局在、生理機能などはほとんど不明であった。申請者らは、脳に GlcChol が存在するかどうかを明らかにするため、脳組織から糖化ステロールを精製し、構造解析を行った。その結果、脊椎動物では GlcChol 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が、脳においては一群を成して存在することを見出した。既に調べ尽くされた感のあるステロール代謝経路だが、脳内では報告例のない中間経路、もしくは新規の代謝経路が存在する可能性が浮上した。

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 (1)、その反応が *in vitro* では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)、ならびに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) によって行われることを明らかにしてきた (2,3)。GBA1 または GBA2 の機能不全は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ことが知られている (4,5)。また申請者らは、GBA1 と GBA2 が *in vitro* で GlcChol 分解活性をもつことも明らかにしている (2,3)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、申請者が発見した脳内新規糖化ステロール群に着目し、それらの構造、代謝経路、局在、生理機能を明らかにすることである。新規糖化ステロール群の存在は、脳において未知のステロール代謝経路が存在する可能性を示唆しており、本研究では、完成されたと考えられているステロール代謝経路を再構築することを目指した。

3. 研究の方法

新規糖化ステロール群 (GlcChol 群) の生理的意義を解明するため、(1) GlcChol 群の構成分子の構造決定、(2) GlcChol 群の代謝酵素の同定、(3) GlcChol 群の局在解析、(4) GlcChol 群の生理機能解析という 4 つのステップで研究を進めた。

4. 研究成果

(1) GlcChol 群の構成分子の構造決定

ニワトリ胎児ならびにラット成体の脳から複数の糖化ステロールを精製し、NMR や質量分析法を用いて構造決定を行った。その結果、GlcChol に加えて、植物で報告されていた植物ステロールにグルコースが結合したシトステリルグルコシド (GlcSito)、バクテリアで報告されていたコレステロールにガラクトースが結合したコレステリルガラクトシド (GalChol) が脳に存在することが初めて明らかになった。

(2) GlcChol 群の代謝酵素の同定

GlcChol 群が *in vivo* で GBA1 と GBA2 によって代謝される可能性を明らかにするため、*Gba1* ノックアウト (KO)、*Gba2* KO、*Gba1*・*Gba2* ダブルノックアウト (DKO) を行ったメダカ、ならびに *Gba2* KO マウスを用いて解析を行った。それぞれの動物の脳から脂質を抽出し、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) で GlcChol 群の定量を行った。

その結果、GlcChol は、野生型メダカの脳と比べて *Gba1* KO メダカの脳において増加し、*Gba2* KO メダカならびに *Gba1*・*Gba2* DKO メダカの脳において減少した。GalChol は、野生型メダカの脳と比べて *Gba1* KO メダカ、*Gba2* KO メダカならびに *Gba1*・*Gba2* DKO メダカの脳において減少した。GlcSito は、野生型メダカの脳と比べて *Gba1* KO メダカの脳では変化がなく、*Gba2* KO メダカならびに *Gba1*・*Gba2* DKO メダカの脳において増加した。*Gba2* KO マウスの脳においても *Gba2* KO メダカの脳と同様の結果が得られた。これらの結果より、*in vivo* では GlcChol は GBA2 によって合成され、GBA1 によって分解されること、GalChol は GBA1 と GBA2 によって合成されること、GlcSito は GBA2 によって分解されることが明らかになった。GlcChol と GlcSito は *in vitro* や *in vivo* で神経毒性を示すことが報告されている (6,7)。神経毒性を有する GlcChol と GlcSito を無毒化するために、GBA1 や GBA2 がそれらを分解している可能性が考えられた。

(3) GlcChol 群の局在解析

申請者らは以前に、ヒト線維芽細胞の脂質ラフト画分から GlcChol 合成活性を検出した (8)。脂質ラフトの脂質組成は、細胞外膜小胞エクソソームのそれと類似していることから、GlcChol 群がエクソソームに局在するのではないかと予想した。神経細胞ならびにグリア細胞の培養上清から超遠心法によってエクソソームを調製し、LC-MS/MS で GlcChol 群の発現を解析した。その結果、GlcChol、GlcSito、GalChol がエクソソームにおいて検出され、GlcChol 群がエクソソームを介して細胞外に放出されていることが明らかになった。特に、GlcChol と GlcSito は細胞と比較してエクソソームでの含有量が高かったことから、神経毒性を有する GlcChol と GlcSito を細胞外に排出する機構として、エクソソームが利用されている可能性が考えられた。

(4) GlcChol 群の生理機能解析

GlcChol群の生理機能を理解するため、下記の2つの解析を行った。

発生に伴う脳内GlcChol群の発現解析

胎生12日目～生後10週目のマウスの脳から抽出した脂質を用いて、LC-MS/MSでGlcCholとGalCholを定量した。その結果、GlcCholとGalCholは胎生12日～生後10週の期間を通して発現しており、発達に伴って発現量が変動することが明らかになった。GlcCholは発達に伴ってゆるやかに増加したのに対し、GalCholは、ミエリン形成開始時期に一致する生後10日目以降に著しく増加した。ミエリンの主要な構成成分の1つである糖脂質・ガラクトシルセラミド (GalCer) も生後10日目以降に著しく発現が増加した。GalCholが発現するグリア細胞でGalCer合成酵素をノックダウンしたところ、GalCerならびにGalCholの発現量が低下した。このことから、GalCholの発現がGalCer依存적であり、GalCholがミエリンに存在する可能性が示唆された。

Gba2 KOマウス由来線維芽細胞を用いた解析

野生型マウスならびにGba2 KOマウスの胎児より、それぞれ線維芽細胞を樹立した。細胞から脂質を抽出し、LC-MS/MSでGlcCholの定量を行った結果、Gba2 KOマウス由来線維芽細胞 (Gba2 KO-MEF) では、野生型マウス由来線維芽細胞 (WT-MEF) と比較してGlcCholが有意に低下していた。また、Gba2 KO-MEFはWT-MEFと比較して、後期エンドソーム、ゴルジ体の分布様式が顕著に変化していた。Gba2 KO-MEFでは、グルコシルセラミドやセラミドなどの脂質量もWT-MEFと比べて変動していたことから、Gba2 KO-MEFで見られた細胞内小器官の分布様式の変化がGlcCholによって引き起こされたか否かについては今後検証が必要である。

上記4ステップの解析結果より、脳内にはこれまで知られていなかったステロール代謝経路が存在し、GBA1とGBA2によってGlcChol群の合成、分解が行われていることが明らかになった。GBA1とGBA2はこれまでグルコシルセラミド分解酵素として機能することが知られていたが、本研究によって、GlcChol群の代謝酵素としても機能することが明らかになった。GlcChol群の代謝調節という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., 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Ly, P. T., Pelech, S., and Shaw, C. A. (2008) Cholesteryl Glucoside Stimulates Activation of Protein Kinase B/Akt in the Motor Neuron-Derived NSC34 Cell Line. *Neurobiol. Lipids* 7, 620081.
7. Tabata, R. C., Wilson, J. M., Ly, P., Zwiegers, P., Kwok, D., Van Kampen, J. M., Cashman, N., and Shaw, C. A. (2008) Chronic exposure to dietary sterol glucosides is neurotoxic to motor neurons and induces an ALS-PDC phenotype. *Neuromolecular Med.* 10, 24-39.
8. Akiyama, H., Hamada, T., Nagatsuka, Y., Kobayashi, S., Hirabayashi, Y., and Murakami-Murofushi, K. (2011) A possible mechanism of cholesteryl glucoside formation involved in heat shock response in the animal cell membrane. *Cytologia* 76, 19-25.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4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 未定
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 未定
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 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 -

1. 著者名 Akiyama H, Nakajima K, Itoh Y, Sayano T, Ohashi Y, Yamaguchi Y, Greimel P, Hirabayashi Y	4. 巻 57
2. 論文標題 Aglycon Diversity of brain sterylglucosides: structure determination of cholesteryl- and sitosterylglucoside	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Journal of Lipid Research	6. 最初と最後の頁 2061-2072
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1194/jlr.M071480	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 41
2. 論文標題 脳における新たなステロール代謝経路: 糖化ステロール群の発見	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 JSBMS Letters	6. 最初と最後の頁 43-46
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12件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

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 α -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、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 平林義雄
2. 発表標題 Generation of cholesteryl glycosides by metabolic crosstalk between cholesterol and glycosphingolipid, and its biological implication
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 平林義雄
2. 発表標題 ナゾの脳脂質、スフィンゴ脂質の発見から135年 - 新たなナゾへの挑戦 -
3. 学会等名 ヘルスフードEXPO セラミド研究出版記念講演（招待講演）
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、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

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、長塚靖子、大橋陽子、山口芳樹、Peter Greimel、平林義雄
2. 発表標題 パーキンソン病発症因子・酸性グルコシルセラミド分解酵素GBA1の新規糖脂質代謝産物の発見
3. 学会等名 第35回日本糖質学会年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 秋山央子、中嶋和紀、伊藤喜之、佐矢野智子、長塚靖子、大橋陽子、山口芳樹、Peter Greimel、平林義雄
2. 発表標題 パーキンソン病に關与する新規脳内糖化ステロールの発見
3. 学会等名 第58回日本脂質生化学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 秋山 央子、中嶋和紀、伊藤喜之、佐矢野智子、長塚靖子、大橋陽子、山口芳樹、Peter Greimel、平林義雄
2. 発表標題 HILIC-MS/MSを用いたパーキンソン病に関連する新規脳内糖脂質の発見
3. 学会等名 第41回日本医用マススペクトル学会年会（招待講演）
4. 発表年 2016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
連携研究者	秋山 央子 (Akiyama Hisako) (80623462)	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 (82401)	
連携研究者	佐矢野 智子 (Sayano Tomoko) (20733934)	国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・ 研究員 (82401)	