

令和 5 年 10 月 4 日現在

機関番号：86102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03584

研究課題名(和文)パーキンソン病の病態における糖鎖修飾異常の関与

研究課題名(英文) Involvement of abnormal glycosylation in the pathogenesis of Parkinson's disease

研究代表者

黒田 由紀子 (Kurota, Yukiko)

独立行政法人国立病院機構徳島病院(臨床研究部)・その他部局等・研究員(移行)

研究者番号：70398014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：私達はパーキンソン病は細胞内で一部がO-GlcNAc修飾(O-GlcNAcylation)されてミトコンドリアに局在していることを見出した。糖化パーキンソン病に脱糖鎖切断酵素のO-glycosidaseとSialidase Aを同時に添加した場合に非糖化パーキンソン病のバンドの高さにシフトした。単糖分析ではO型糖鎖結合されていることが明らかとなった。グライコブロットング法では(HexNAc)1が主要成分であり、Click-iT反応でもO-GlcNAc修飾が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた知見より、哺乳動物細胞内でパーキンソン病の一部はO-GlcNAcを含むO型糖鎖が付加されていることは確実である。我々は本研究においてO-GlcNAc修飾機構の異常がパーキンソン病の発症要因になりうるか否かを、家族性パーキンソン病である PARK2 において、さらには孤発性パーキンソン病において明らかにするために計画された。

研究成果の概要(英文)：We have found that Parkin is intracellularly modified with O-GlcNAc (O-GlcNAcylation) and localized to mitochondria. When the deglycosylating enzymes O-glycosidase and Sialidase A were added simultaneously to the glycosylated parkin, there was a shift in the height of the bands of the non-glycosylated Parkin. Monosaccharide analysis suggested that Parkin was O-glycosylated. Glycoblotting analysis showed that (HexNAc)1 was the major component, and the Click-iT reaction also confirmed O-GlcNAc modification.

研究分野：分子生物学

キーワード：パーキンソン病

1. 研究開始当初の背景

代表的な神経難病の一つであるパーキンソン病は、黒質のメラニン含有細胞の変性を特徴とする。その病態の分子メカニズムはなお明らかではない。近年、家族性パーキンソン病の原因遺伝子の機能解析を通して孤発性パーキンソン病の病態の解明が試みられつつある。パーキンは最も高頻度に発症する家族性パーキンソン病の原因遺伝子 (PARK2) である。パーキンがユビキチン・リガーゼ (E3) 活性を持つこと、およびミトコンドリアのオートファジーに重要な役割を担っていることより、ユビキチン・プロテオソーム系の異常が PARK2 の発症メカニズムの主要因であると考えられている。一方、我々は PARK2 の病態解明を進める中で、パーキンがミトコンドリア遺伝子の転写・複製を促進することを早くから報告した。そしてミトコンドリア内においてパーキンは O 型糖鎖修飾を受けていることを見出した。

2. 研究の目的

我々は PARK2 の病態解明を進める中で、パーキンがミトコンドリア遺伝子の転写・複製を促進することを早くから報告した。そしてミトコンドリア内においてパーキンは O 型糖鎖修飾を受けていることを見出した。我々はこの糖鎖修飾がパーキンの機能にどのような影響を与えているのか、さらにパーキンソン病の病態にどのように関連しているのかを明らかにするため本研究を立案した。予備的検討により、修飾糖鎖には O-結合型アセチルグルコサミン (O-GlcNAc) が付加されていることを見出した。さらに、我々はパーキンが O-GlcNAc 転移酵素 (OGT) に結合していることを見出した。このことはパーキンが自ら O-GlcNAc 修飾を受けるのみならず、他のタンパクの O-GlcNAc 修飾を制御している可能性を示唆するものである。本研究では複数のアプローチ方法を用いて、予備的検討で得られた断片的な知見を踏まえ、パーキンと O-GlcNAc 修飾機構との関連を系統的にさらに掘り下げて検証し、O-GlcNAcylation の障害が、PARK2 のみならず孤発性パーキンソン病の発症メカニズムに寄与しているか否かを明らかにする。

3. 研究の方法

パーキンに付加されている修飾糖鎖の同定

我々はパーキンに O 型糖鎖が付加されたアイソフォームが存在することを見出した。この糖鎖には O-GlcNAc が含まれることを確認しているものの、すべての糖鎖成分は同定するに至っていないことから、本研究では以下の 2 系統の実験系により全ての糖鎖の同定を計画している。哺乳動物細胞発現系でパーキンを精製し (His, GFP および halo のタグを有する 3 種類のベクターを用意している) enzymatic deglycosylation kit により O 型糖鎖を遊離したのち、2AB で蛍光ラベルし、LC-MS/MS により糖鎖を同定する。また別に、ヒドラジン分解で遊離させた糖鎖を PA 蛍光標識したのち ESI-Q-TOF/MS で解析することを計画している。

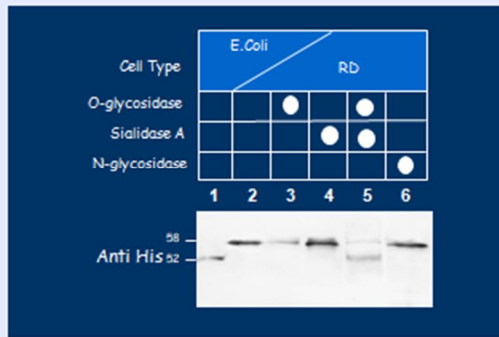
パーキンにおける O-GlcNAc 付加部位の同定

我々はパーキンにおける O-GlcNAc 付加部位の同定を計画した。O-GlcNAc の単糖が付加された状態では分子量 (MW 221.21) の変化が小さく、通常の質量分析では検出が困難であった。この研究のために、我々は住友ベークライト株式会社と共同で、Click 反応を用いて O-GlcNAc を特異的に TAMRA で蛍光ラベルしたのち、トリプシンでペプチドに分解し、LC-MS/MS 解析する方法を考案した。さらに、我々はもう一つの方法として、O-GlcNAc を同様の方法でビオチン・ラベルしたのち、ペプチドに分解し、ストレプトアビジン・アガロースで沈降させ、そのペプチド断片を同様に質量分析することを計画している。既に我々は後者の方法で 24aa の範囲で同付着部位を特定しており、本研究ではさらにその領域を限定する予定である。

4. 研究成果

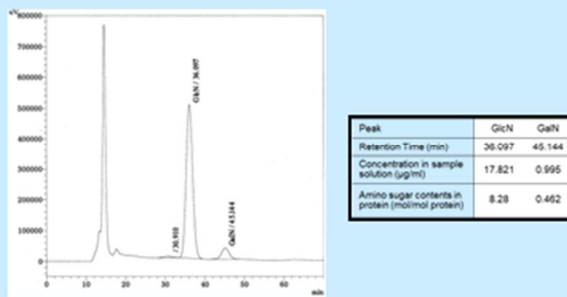
糖化パーキンに脱糖鎖切断酵素の O-glycosidase と Sialidase A を同時に添加した場合に非糖化パーキンのバンドの高さにシフトした。単糖分析では N-アセチルガラクトサミンおよび N-アセチルグルコサミンが検出され O 型糖鎖結合されていることが明らかとなった。グライコプロッティング法では (HexNAc) 1、(NeuAc) 1、(HexNAc) 1 (NeuGu) 1、(Hex) 1 (HexNAc) 1 (Deoxyhexose) 1 が主要なピークとして検出された。

Deglycosylation Analysis



The addition of the deglycosidases O-glycosidase and Sialidase A to parkin shifted the height of the non-glycosidized parkin band.

Monosaccharide analysis



The results of monosaccharide analysis detected N-acetylgalactosamine and N-acetylglucosamine. This suggests that Parkin is modified with O-type sugar chains.

Glycoblotting Analysis

Observed MALDI-TOFMS signals and deduced composition of BOA-labeled O-Glycans.

Peak	m/z	Exact mass	Presumptive composition	pmol
1	348.9600963	349.13756	(HexNAc)1	14.0487
	451.4265089	451.16925	(NeuAc)1	3.92964
	495.0318898	495.19547	(HexNAc)1 (Deoxyhexose)1	1.37691
	597.1448365	597.22716	(Deoxyhexose)1 (NeuAc)1	0.60217
	632.2032026	632.21667	(Hex)3	0.50602
	657.2418082	657.2483	(Hex)1 (HexNAc)1 (Deoxyhexose)1	2.81585
	670.2436733	670.24355	(HexNAc)1 (NeuGc)1	3.69013
	803.3192596	803.30621	(Hex)1 (HexNAc)1 (Deoxyhexose)2	0.32453
	950.4723727	950.32299	(Hex)1 (NeuGc)2	0.48871
⊕ 1	958.3755744	958.3757	(HexNAc)4	10
	994.550822	994.34921	(Hex)2 (HexNAc)1 (NeuGc)1	0.82956
	1038.542891	1038.37543	(Hex)3 (HexNAc)2	0.54242
	1127.69348	1127.41187	(Hex)3 (HexNAc)1 (Deoxyhexose)2	0.46283
	1232.731148	1232.44323	(Hex)4 (Deoxyhexose)3	0.26312
	1276.999854	1277.42832	(Hex)5 (NeuGc)1	0.62138
	1346.812131	1346.48617	(Hex)4 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1	0.50167

Hex: Hexose, HexNAc: N-Acetylhexosamine, NeuAc: N-Acetylneuraminic Acid, NeuGc: N-glycolylneuraminic acid

⊕ 1, 10 pmol of internal standard (HexNAcGN4)

In the glycoblotting analysis, (HexNAc) 1 was the most major glycan, and (NeuNAc) 1 and (HexNAc) 1 (NeuGc) 1 were the second group of glycans.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yukiko Kuroda Maki, et.al.	4. 巻 13
2. 論文標題 Parkin gene analysis of familial Parkinson's disease in Tokushima National Hospital of 2021-2022	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Tokushima National Hospital	6. 最初と最後の頁 1-3
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 -

1. 著者名 Yukiko Kuroda Maki, et al.	4. 巻 13
2. 論文標題 Gene analysis of the Parkin-related gene Kloklin 1in Tokushima National of 2021-2022	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Tokushima National Hospital	6. 最初と最後の頁 4-6
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 -

1. 著者名 Yukiko Kuroda Maki, et.al.	4. 巻 12
2. 論文標題 Parkin gene analysis of familial Parkinson's disease in Tokushima National Hospital of 2020-2021	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Tokushima National Hospital	6. 最初と最後の頁 1-3
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 -

1. 著者名 Yukiko Kuroda Maki, et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 Gene analysis of the Parkin-related gene Kloklin 1in Tokushima National of 2020-2021	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Tokushima National Hospital	6. 最初と最後の頁 4-6
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 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yukiko Maki
2. 発表標題 Mechanism of O-GlcNAcylation in Parkin
3. 学会等名 第64回 日本神経学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 牧 由紀子
2. 発表標題 Intracellular glycosylation of Parkin protein
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 牧 由紀子
2. 発表標題 パ-キンおよびパーキン関連遺伝子 (Klokin 1) の変異解析：徳島病院における成績
3. 学会等名 第76回国立病院総合医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yukiko Maki
2. 発表標題 Biochemical analysis of Parkin glycosylation
3. 学会等名 第62回 日本神経学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三ツ井 貴夫、牧 由紀子
2. 発表標題 デュシェンヌ型筋ジストロフィー生検骨格筋におけるチアミン・トランスポーター
3. 学会等名 第62回 日本神経学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 牧 由紀子
2. 発表標題 徳島病院におけるPARK2およびPARK2関連遺伝子 (Klokin 1) の変異解析
3. 学会等名 第75回 国立病院総合医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yukiko Maki
2. 発表標題 Parkin is modified with O-GlcNAc
3. 学会等名 第61回 日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020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
研究 分 担 者	三ツ井 貴夫 (Mitsui Takao) (80294726)	独立行政法人国立病院機構徳島病院 (臨床研究部) ・その他 部局等 ・その他 (86102)	

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
---------	---------