

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860199

研究課題名(和文) コレステロールへの糖修飾によるパーキンソン病発症の制御メカニズムの解析

研究課題名(英文) Parkinson's disease pathogenesis mediated by glycosylation of cholesterol

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・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：80623462

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ニワトリ胎児脳から糖脂質・ β -コレステリルグルコシド(β -CG)の精製に成功し、脳における β -CGの存在を初めて明らかにした。高速液体クロマトグラフィー/質量分析法(LC/MS)を用いて β -CGの解析システムを開発し、パーキンソン病モデル動物の脳、およびパーキンソン病患者剖検脳における β -CG発現量を解析した。パーキンソン病モデル動物の脳ではコントロールと比較して β -CGが増加し、パーキンソン病患者剖検脳では大きな差はなかった。

研究成果の概要(英文)： β -Cholesterylglucoside (β -CG), a member of glycolipid, was successfully purified from embryonic chicken brains, and the presence of β -CG in vertebrate brain was demonstrated for the first time. An analytical system for β -CG was developed using liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS), and the expression levels of β -CG in the brains of Parkinson's disease (PD) model animals and postmortem PD patients were analyzed. β -CG increased in the brains of PD model animals compared to those of controls, and there was no significant difference in β -CG expression levels between the brains of postmortem PD patients and those of controls.

研究分野：脂質生化学

キーワード：パーキンソン病 GBA β -コレステリルグルコシド コレステロール グルコシルセラミド

1. 研究開始当初の背景

(1) パーキンソン病発症・進行に關与する -シヌクレイン(-Syn)の纖維形成と伝播

パーキンソン病は、中脳黒質のドーパミン産生神経細胞の変性を伴う神経変性疾患である。諸説ある疾患発症メカニズムの中で、中脳黒質におけるドーパミン産生細胞内の神経特異的タンパク質 -シヌクレイン(-Syn)の纖維形成が主な発症原因であると考えられている。

-Syn は、シナプスでの神経伝達に重要なタンパク質であり、通常は単量体で機能している。-Syn は多量体化しやすい性質があり、多量体化が進み、異常に折りたたまれて纖維が形成されると神経毒性を示すため、通常はリソソームで分解される。パーキンソン病患者では、リソソームでの -Syn 分解能が低下し、神経毒性を示す -Syn の纖維が形成され、ドーパミン産生神経細胞の変性が引き起こされる¹⁾。疾患が進行すると、原発巣である中脳黒質から -Syn が伝播され、伝播先で -Syn の纖維形成のシードとなり、神経変性が拡大することが明らかになっており^{2,3)}、-Syn の纖維形成と伝播が疾患発症・進行の重要なメカニズムであると考えられている。

(2) 酸性グルコシルセラミド分解酵素 (GBA1)の機能不全による -Syn の纖維形成

これまで、リソソームでの -Syn 分解能の低下、およびそれに続く -Syn の纖維形成が引き起こされる原因は明らかになっていなかったが、最近、リソソームで働く酸性グルコシルセラミド分解酵素(GBA1)の機能低下がそれらの原因となることが明らかになった^{4,5)}。GBA1 は、リソソームと細胞膜に局在する膜タンパク質であり、糖脂質グルコシルセラミドをグルコースとセラミドに分解する加水分解酵素である。特筆すべき事柄として、GBA1 遺伝子変異は孤発性パーキンソン病の最も強力な遺伝的リスクとなることが報告されている⁶⁾。

Mazzulli らは、GBA1 欠損神経細胞では、GBA1 の基質であるグルコシルセラミドが蓄積し、リソソームにおけるタンパク質分解能の低下、そして -Syn の纖維形成が引き起こされることを報告しており⁴⁾、GBA1 によって本来分解されるべきグルコシルセラミドがリソソーム内に蓄積することがパーキンソン病発症の原因となるという仮説が提唱されている。しかし、グルコシルセラミドの蓄積が -Syn の纖維形成を引き起こすメカニズムの詳細は明らかにされておらず、GBA1 を介したパーキンソン病発症の制御メカニズムは未だ不明な点が多い。

(3) GBA1 の新機能の発見

GBA1 はこれまでにグルコシルセラミド分解酵素として研究されてきたが、申請者は GBA1 の新機能として、グルコシルセラミドのグルコースをコレステロールへ転移する活

性を見出し、GBA1 が糖脂質・ -コレステリルグルコシド(-CG)を合成することを発見した^{7,8)}。 -CG は、コレステロールにグルコースが -グリコシド結合した糖脂質である。 -CG がどのような組織で発現しているかはこれまで明らかになっていない。申請者が -CG 合成を担うことを明らかにした GBA1 は、脳ではその発現量が高く、パーキンソン病との関与が疑われることから、申請者は -CG が脳において発現しているのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、GBA1 を介したパーキンソン病発症の制御メカニズムを明らかにすることである。

近年、GBA1 の機能破綻がパーキンソン病発症を引き起こすことが明らかになりつつある。申請者は最近、GBA1 がグルコシルセラミド分解活性だけではなく、 -CG 合成活性を有することを明らかにした。これまでに GBA1 がコレステロールにグルコースを転移する機能をもつことは知られておらず、申請者の発見は、GBA1 が關与するパーキンソン病について、これまで考えられていなかった -CG 合成という新たな視点から疾患発症の分子基盤を明らかにできる可能性を示唆する。GBA1 の機能低下に伴い、本来分解されるべきグルコシルセラミドが蓄積することが疾患発症の原因となるという仮説が数多く提唱されているが、申請者は、GBA1 の機能低下によって -CG 合成不全になることも疾患発症の一因となるのではないかと予想している。

本研究では、GBA1 による -CG 合成という新しい視点からパーキンソン病発症の制御メカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

GBA1 を介したパーキンソン病発症の制御メカニズムへの -CG の関与の可能性を明らかにするため、以下の4つのステップで研究を進めた。

(1) -CG 解析システムの開発

高速液体クロマトグラフィー/質量分析法(LC/MS)を用いて -CG の解析システムの開発を試みた。LC 分離モードには、従来の順相および逆相では困難であった糖構造の異なる脂質間の分離が可能な親水性相互作用クロマトグラフィーの採用を試みた。

(2) 脳からの -CG の精製および構造決定

-CG はヒト線維芽細胞に存在することが以前に報告されているが、完全に構造決定がなされた例はない。また、脳での -CG の存在は未報告である。本研究では、ニワトリ胎児の脳を出発材料とし、多段階のクロマトグラフィーを駆使して -CG の精製を行った。

精製品について、質量分析および核磁気共鳴 (NMR) 分析を行い、構造を解析した。

(3) 疾患モデルにおける β -CG の発現解析

疾患モデルとして、GBA1 欠損または機能不全動物の脳、パーキンソン病患者剖検脳を利用し、(1) で開発した β -CG 解析システムによって β -CG 発現量をコントロールと比較した。

(4) 疾患発症の制御メカニズムへの β -CG の関与の検証

パーキンソン病における β -Syn 伝播に関して、オリゴマー化した β -Syn が、脂質ラフト構成成分から成るエクソソームと呼ばれる膜小胞を介して細胞間を輸送されることが明らかにされている⁹⁾。エクソソームは、後期エンドソーム内腔に存在する直径約 70 ~ 150 nm の膜小胞であり、その膜上および小胞内に様々なタンパク質、核酸、脂質を含み、近年、細胞間のコミュニケーションツールとして注目されている。

エクソソームを介した β -Syn 伝播に関して、これまでに GBA1 や β -CG の関与の報告はない。神経細胞の培養上清から浮遊細胞や死細胞を除去後、超遠心による沈殿画分としてエクソソームを調製し、(1) で開発した β -CG 解析システムによってエクソソームにおける β -CG 発現量をエクソソーム放出元の神経細胞と比較した。

4. 研究成果

(1) LC/MS による β -CG 解析システムの開発

親水性相互作用クロマトグラフィーを用いた新たな脂質分析系を構築した結果、マウス脳において β -CG の存在を見出した。 β -CG の組織分布はこれまでほとんど明らかになっておらず、脳における β -CG の存在は本研究によって初めて明らかになった。これまで、脳に存在する糖脂質は詳細に研究されてきたにも関わらず、 β -CG の存在が明らかになっていなかった原因は、 β -CG が脳に多量に存在するガラクトシルセラミドに埋もれていたことが考えられる。LC/MS による詳細な分析によって、ガラクトシルセラミドは β -CG の約 100 倍存在することが明らかになった。

(2) 脳からの β -CG の精製および構造決定

順相クロマトグラフィー、および 2 段階の逆相クロマトグラフィーを駆使してニワトリ胎児脳に多量に存在するガラクトシルセラミドを除去し、 β -CG が濃縮された画分を得た。 β -CG のステロール部分の構造決定、特に環構造内の二重結合の位置を決定することは、エレクトロスプレーイオン化法を用いた質量分析、および一次元 NMR 分析では困難を極めた。そこで今回は、二次元 NMR、およびスパイラル型の工学系を搭載したマト

リクス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計 (日本電子株式会社製 JMS-S3000) を用いてステロール部分の構造決定を行い、精製した脂質が β -CG であることを確認した^{発表論文}。また、精製品を脱糖鎖処理し、得られたアグリコンについてガスクロマトグラフィー質量分析を行い、精製品のアグリコンがコレステロールであることを確認した^{発表論文}。

(3) 疾患モデルにおける β -CG の発現解析

GBA1 欠損または機能不全動物の脳では、コントロールと比較して予想外にも β -CG が増加していた。パーキンソン病患者剖検脳では、コントロールと比較して β -CG 発現量に大きな差はなかった。剖検脳についてはサンプル数が少なかったため、今後サンプル数を増やして解析を行う必要がある。

申請者らは、最近 β -CG が GBA1 だけでなく中性グルコシルセラミド分解酵素 GBA2 によっても合成され、生体内では GBA2 が主に β -CG 合成を担い、GBA1 は β -グルコシダーゼとして β -CG 分解を担っている可能性を明らかにした^{発表論文}。興味深いことに、コレステロール・スフィンゴ脂質の代謝異常症であるニーマン・ピック病 C 型や、リソソームのコレステロール濃度が高い条件では、GBA1 は β -CG の分解ではなく合成を担い、 β -CG が増加する^{発表論文}。

今回、GBA1 欠損または機能不全動物の脳において β -CG の増加が見られたことは、GBA1 による β -CG 分解が低下したことによると考えられた。今後、GBA1 機能不全によって引き起こされる β -Syn の繊維形成に β -CG の増加が関与するか否かを解析していきたい。

(4) 疾患発症の制御メカニズムへの β -CG の関与の検証

神経細胞由来エクソソームでは、エクソソーム放出元の神経細胞と比べて β -CG 発現量が高く、 β -CG がエクソソームに濃縮されている傾向が見られた。今後、エクソソームを介した β -Syn の伝播に β -CG が関与するか否かを解析していきたい。

< 引用文献 >

- 1) Forman, M. S. *et al.* Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. *Nat. Med.*, 10; 1055-1063 (2004).
- 2) Kordower, J. H. *et al.* Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat. Med.*, 14; 504-506 (2008).
- 3) Luk, K. C. *et al.* Pathological alpha-synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science*, 338;

949-953 (2012).

- 4) Mazzulli, J. R. *et al.* Gaucher disease glucocerebrosidase and alpha-synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies. *Cell*, 146; 37-52 (2011).
- 5) Gegg, M. E. *et al.* Glucocerebrosidase deficiency in substantia nigra of parkinson disease brains. *Ann. Neurol.*, 72; 455-463 (2012).
- 6) Sidransky, E. *et al.* Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.*, 361; 1651-1661 (2009).
- 7) Akiyama, H. *et al.* Novel sterol glucosyltransferase in the animal tissue and cultured cells: Evidence that glucosylceramide as glucose donor. *Biochim. Biophys. Acta*, 1811; 314-322 (2011).
- 8) Akiyama, H. *et al.* Cholesterol glucosylation is catalyzed by transglucosylation reaction of -glucosidase 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 441; 838-843 (2013).
- 9) Emmanouilidou, E. *et al.* Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. *J. Neurosci.*, 30; 6838-6851 (2010).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

Akiyama, H., Nakajima, K., Itoh, Y., Sayano, T., Ohashi, Y., Yamaguchi, Y., Greimel, P., and Hirabayashi, Y. Aglycon diversity of brain sterylglucosides: Structure determination of cholesteryl- and sitosterylglucoside. *J. Lipid Res.*, 57; 2061-2072 (2016). 査読有
DOI : 10.1194/jlr.M071480

秋山央子, 平林義雄. 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. *JSBMS Letters*, 41; 43-46 (2016). 査読有

<http://mol.medicalonline.jp/library/archive/search?jo=er3jsbms&ye=2016&vo=41&issue=3&UserID=134.160.173.66>

Nakajima, K., Akiyama, H., Tanaka, K., Kohyama-Koganeya, A., Greimel, P., and Hirabayashi, Y. Separation and analysis of mono-glucosylated lipids in brain and skin by hydrophilic interaction chromatography based on carbohydrate and lipid moiety. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 1031; 146-153 (2016). 査読有
DOI : 10.1016/j.jchromb.2016.07.047

Marques, A. R.*, Mirzaian, M.*, Akiyama, H.*, Wisse, P., Ferraz, M. J., Gaspar P1, Ghauharali-van der Vlugt, K., Meijer, R., Giraldo, P., Alfonso, P., Irún, P., Dahl, M., Karlsson, S., Pavlova, E. V., Cox, T. M., Scheij, S., Verhoek, M., Ottenhoff, R., van Roomen, C. P., Pannu, N. S., van Eijk, M., Dekker, N., Boot, R. G., Overkleeft, H. S., Blommaert, E., Hirabayashi, Y., and Aerts J. M. Glucosylated cholesterol in mammalian cells and tissues: formation and degradation by multiple cellular -glucosidases. *J. Lipid Res.*, 57; 451-63 (2016). *The authors contributed equally to this work. 査読有
DOI : 10.1194/jlr.M064923

平林義雄, 秋山央子, 中嶋和紀. 糖脂質の新機能 多様な脂質のグルコース修飾機構と意義, 生化学, 第86巻第6号; 735-743 (2014). 査読有
<http://www.jbsoc.or.jp/seika/wp-content/uploads/2015/07/86-06-04.pdf>

[学会発表](計7件)

秋山央子. 新規脳内糖化ステロールの発見 -神経変性疾患発症の新たな分子基盤の解明-. 第15回ホスファチジルセリン研究会, 2016年11月18日, 早稲田大学日本橋キャンパス 大ホール(東京都中央区).

秋山央子他. HILIC-MS/MSを用いたパーキンソン病に關与する新規脳内糖脂質の発見. 第41回日本医用マススペクトル学会年会, 2016年9月15日, ウィンクあいち(愛知県名古屋市).

秋山央子他. 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. 第35回日本糖質学会, 2016年9月1日, 高知市文化プラザ かるぽーと (高知県高知市).

秋山央子他. 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. 第 58 回日本脂質生化学会, 2016 年 6 月 10 日, にぎわい交流館 AU (秋田県秋田市).

Akiyama, H. et al. Novel glycosylated sterol metabolite in vertebrate brain possible linked to Parkinson's disease. The 14th Gordon Research Conference Glycolipid and Sphingolipid Biology, 2016 年 3 月 6-11 日, Lucca (Italy).

秋山央子他. Cholesterol glucosylation is catalyzed by transglucosylation reaction of α -glucosidase 1. 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014 年 11 月 27 日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市).

秋山央子他. 酸性グルコシダーゼ GBA1 の新機能 “ コレステロールへのグルコース転移活性 ” の発見. 第 56 回日本脂質生化学会, 2014 年 6 月 6 日, 近畿大学東大阪キャンパス(大阪府東大阪市).

〔図書〕(計 2 件)

秋山央子, 香山綾子, 平林義雄. エル・アイ・シー・モデル動物利用マニュアル疾患モデルの作製と利用 - 脂質代謝異常と関連疾患, 下巻, 第 6 章 細胞内脂質シグナル関連因子, 第 7 節 糖脂質代謝酵素; 361-385 (2015).

秋山央子, 平林義雄. 医歯薬出版. 医学のあゆみ, 生命を支える脂質 最新の研究と臨床, あらたなグルコース化脂質の存在と役割; 248, 1031-1036 (2014).

〔産業財産権〕なし

〔その他〕 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋山 央子 (Hisako Akiyama)
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
研究者番号: 80623462

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし