

平林 義雄

(独) 理化学研究所・脳科学総合研究センター
平林研究ユニット・ユニットリーダー

糖修飾システムによる神経機能の発現・制御

1. 研究実施の概要

中枢神経系組織や好中球に特異的に存在する糖脂質、ホスファチジルグルコシドが、脂質ミクロドメイン(ラフト)に局在する新しい細胞表面脂質分子であることを見いだしている。この新規糖脂質の代謝産物であるリゾ体は、強力な神経ガイダンス活性を有していることを発見したので、in vitro での神経機能のメカニズム解析をすすめる。特に、合成酵素であるグルコース転移酵素遺伝子やリゾ体糖脂質の特異的受容体の探索を進める。一方、グルコシルセラミド合成の個体レベルでの機能(特にエネルギー代謝ホメオスタシスの維持機構)を、マウス、ショウジョウバエを使い解析する。一部は、ゼブラフィッシュの系(九大・伊東ら)でスフィンゴ脂質機能を解析する。最近、本研究過程で、体内中のグルコースおよびエネルギーホメオスタシスに関わる新しいオーファン GPCR 受容体タンパクの存在を見いだした。この受容体遺伝子は生物間でよく保存され、その機能的重要性が示唆されている。そこで、モデル動物としてショウジョウバエを使い、この受容体の有する細胞外グルコースのセンシング機能と、受容体による細胞間・臓器間の代謝ネットワーク機構を解明することにより、新しい代謝(糖と脂質)生物学の創成に貢献する。

2. 研究実施内容(文中にある参照番号は 4.(1)に対応する)

グルコースは、生命を維持するための基本的なエネルギー源であるとともに、グリコバイオロジーの原点とも言える最重要物質である。本研究では、特に脳の発達と機能維持に必須であるグルコースおよびグルコース修飾化脂質と細胞間シグナリングに関する研究を中心に展開する。

I. グルコース化糖脂質の新機能

1) グルコシルセラミド糖脂質の機能

スフィンゴ糖脂質は、神経系の形成・形態維持・機能、さらに各種神経変成疾患の発症に重要な役割を演じていると考えられているが、その分子メカニズムはほとんど不明である。申請者は、糖修飾酵素のなかで、糖脂質合成の鍵を握るグルコシルセラミド合成酵素であるグルコース転移

酵素(GlcT-1)に着目し解析を行ってきた¹⁾。脳での発現分布を調べたところ小脳プルキンエ細胞に GlcT-1 が強発現していた。本プロジェクトにおいて GlcT-1 遺伝子のプルキンエ細胞特異的ノックアウトマウスを作製することに成功している。このマウスの小脳組織を電子顕微鏡で詳細に観察したところ、プルキンエ細胞の細胞体・樹状突起は正常の形態を示したが、軸索に異常形態を見いだした。特に、軸索(特にパラノーダル領域周辺)の周囲を囲むミエリン構造に異常が認められた。この結果は、成熟した神経細胞のスフィンゴ糖脂質は、軸索の形態維持とミエリンとの細胞間相互作用に必須な因子であることが示唆された。また、グルコシルセラミドの微量定量法を開発することに成功するとともに^{5) 8) 10)}、ゼブラフィッシュの初期発生の解析系を使うことにより、グルコシルセラミドは脊索の形成に直接関与していることを見いだした(伊東グループ)。GlcCer はグルコセレブロシダーゼによりグルコースが外された後、セラミダーゼによってスフィンゴシン塩基と脂肪酸に分解代謝される。伊東らは、脊椎動物の形質膜II型糖タンパク質として存在する中性セラミダーゼを見出している。緑膿菌由来の中性セラミダーゼを精製し、その結晶化と X-線構造解析に成功した。その結果、本酵素は Zn イオンを活性中心に持つ金属酵素であることが判明した⁷⁾。

2) 神経系新規グルコース化脂質の生理機能と生合成

スフィンゴ糖脂質は生体膜の脂質微小領域(ラフト)の主要成分であることから、近年多くの研究者の注目を浴びている。脂質微小領域は、小胞輸送、エンドサイトーシス、生体内シグナル発信の基地として極めて重要な役割を演じている。申請者は、ヒトを含めた哺乳動物細胞には、ホスファチジルグルコシド(PtdGlc)という今まで知られていなかった新しいタイプの糖脂質が存在していることを発見した。我々が新たに確立した単クローン抗体(DIM21)を使うことにより³⁾、発達期の放射状グリアに時期特異的に発現していることを見だし、その完全構造決定に成功している²⁾。またPtdGlcの代謝産物であるリゾ体化合物は、微量で神経軸索伸長方向を負に制御する生理活性を有していることを見いだした。昨年以來、リゾ体糖脂質の特異的受容体 GPCR の同定をすすめる、複数の候補 GPCR 遺伝子を単離した(理研 BSI, 上口研究室との共同研究)。一方、PtdGlc の生合成経路を検討したところ、今まで報告されていない新しいグルコース転移酵素が関わっていることを突き止めるとともに、その責任遺伝子と予想されるクローンを得ることに成功した(小堤、谷口(直)との共同研究)。PtdGlc は、成体マウス脳の神経幹細胞と考えられる細胞表面に強発現している⁹⁾。又、神経再生時には再び発現してくるので、PtdGlc に関する基礎研究は神経再生治療の新たな手段を提供すると期待される。

II. グルコースホメオスタシスに関わる GPCR 膜受容体機能

体内中のグルコースレベルの恒常性(グルコースホメオスタシス)制御機構の解明は代謝疾患との関連で特に重要である。我々はオファエン G 蛋白質結合7回膜貫通型受容体 (GPCR)の中から、ショウジョウバエの膜タンパク (BOSS)が、i) エネルギーセンシング器官である脂肪体に発現していた、ii) 生理的濃度の細胞外グルコースと反応した、iii) この受容体分子の欠損は体液グルコースの上昇、脂質(トリグリセリド)の蓄積を示した。その主原因は、インスリンの分泌低下によりインスリンシグナルが活性化されないためであると考えられた。BOSS はエネルギー代謝ホメオスタシス維持の機構に重要な役割を演じていることが示唆された⁴⁾。

III. 側頭葉てんかんモデルとしてのシアル酸転移酵素(ST3Gal IV)のノックアウトマウス

側頭葉てんかんモデルマウスを用いた実験により⁶⁾、てんかん発作発症過程に連動する、脳内成長ホルモンとST3Gal IVの発現亢進を見いだしている。そこで本研究では、これらの分子が、実際にてんかん発症に直接関わるのかどうかを検討した。てんかん刺激と同時に成長ホルモンを海馬内に注入すると、てんかん発作の誘導を亢進し、分泌抑制剤を注入するとてんかん発作の誘導を抑制した。さらに、成長ホルモンの海馬内単独投与が、てんかん発作獲得に連動して発現上昇を示す Egr1 の発現上昇を誘導した。これは、脳内においても、成長ホルモンを介したシグナル系が存在する事を示している。一方で、ST3Gal IV欠損マウスは、てんかん刺激を導入しても、発作を獲得しない事がわかった。このことは、ST3Gal IVによるシアル酸修飾が、てんかん発症に必須であることを示す。さらにST3Gal IV欠損マウスは、気分障害・睡眠障害を伴う生体リズム不全を示し、血中の成長ホルモンと Igf1 の分泌量の減少を伴う成長阻害を示した。これは、成長ホルモンの分泌が、ST3Gal IVの発現量に影響を受けることを示唆すると共に、生体リズム調節に、ST3Gal IVによるシアル酸修飾が必須である事が示唆された。

3. 研究実施体制

(1)「平林」グループ(研究機関別)

①研究分担グループ長：平林 義雄

((独)理化学研究所・脳科学総合研究センター・平林研究ユニット、ユニットリーダー)

②研究項目：グルコースおよびグルコース関連糖脂質の神経機能と細胞間シグナリング

(2)「伊東」グループ(研究機関別)

①研究分担グループ長：伊東 信(九州大学大学院農学研究院・生物機能科学部門、教授)

②研究項目：グルコシルセラミド代謝マシナリーの生物機能の解明

(3)「加藤」グループ

①研究分担グループ長：加藤 啓子

(大阪府立大学大学院・生命環境科学研究科・獣医学専攻、准教授)

②研究項目：モデルマウスによる神経可塑性機構の解明

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

1. Hirabayashi Y, Furuya S. Roles of l-serine and sphingolipid synthesis in brain development and neuronal survival. *Prog Lipid Res.* 47(3), 188-203 (2008)
2. Ito S, Nabetani T, Shinoda Y, Nagatsuka Y, Hirabayashi Y. Quantitative analysis of a novel glucosylated phospholipid by liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem.* 376, 252-257 (2008)

3. Peter Greimel, Milaine Lapeyre, Yasuko Nagatsuka, Yoshio Hirabayashi, Yukishige Ito. Syntheses of phosphatidyl- β -D-glucoside analogues to probe antigen selectivity of monoclonal antibody 'DIM21'. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 16, 7210-7217 (2008)
4. Ayako Kohyama-Koganeya, Yeon-Jeong Kim, Masayuki Miura, Yoshio Hirabayashi. Drosophila Bride of sevenless (boss) functions as a glucose-responding receptor: loss of boss causes abnormal sugar and lipid metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(40), 15328-15333 (2008)
5. Y. Hayashi, K. Zama, E. Abe, N. Okino, T. Inoue, K. Ohno and M. Ito.
6. A sensitive and reproducible fluorescent-based HPLC assay to measure the activity of acid as well as neutral β -glucocerebrosidases. *Anal. Biochem*. 383, 122-129 (2008)
7. Kato K., Iwamori, M., and Hirabayashi Y.
8. Increase of GQ1b in the hippocampus of mice following kindled-seizures. *Neurosci Lett*. 441, 286-290 (2008)
9. T. Inoue, N. Okino, Y. Kakuta, A. Hijikata, H. Okano, H. Goda, M. Tani, N. Sueyoshi, K. Kambayashi, H. Matsumura, Y. Kai and M. Ito.
10. Mechanical insights into the hydrolysis and synthesis of ceramide by neutral ceramidase. *JBC* on line doi:10.1074/jbc.M808232200 (2008)
11. K. Zama, Y. Hayashi, S. Ito, Y. Hirabayashi, T. Ito, T. Inoue, K. Ohno, N. Okino and M. Ito. Simultaneous quantification of glucosylceramide and galactosylceramide by normal phase HPLC using O-phthalaldehyde derivatives prepared with sphingolipid ceramide N-deacylase. *Glycobiology*. (2009) In press
12. Kinoshita MO, Furuya S, Ito S, Shinoda Y, Yamazaki Y, Greimel P, Ito Y, Hashikawa T, Machida T, Nagatsuk Y, Hirabayashi Y.
13. Lipid rafts enriched in phosphatidylglucoside direct astroglial differentiation by regulating tyrosine kinase activity of epidermal growth factor receptors. *Biochem J*. 419(3), 565-575 (2009)
14. Y. Ishibashi, Y. Nagamatsu, S. Meyer, A. Imamura, H. Ishida, M. Kiso, N. Okino, R. Geyer, M. Ito.
15. Transglycosylation-based Fluorescent Labeling of 6-Gala Series
16. Glycolipids by EGALC. *Glycobiology*. (2009) In press

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数：1 件（CREST 研究期間累積件数：5 件）