

研究題目 神経細胞特異的糖脂質生合成経路の解明

研究組織

研究代表者：平林祐介（東京大学工学系研究科）

共同研究者：小迫英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：櫻井結衣（東京大学工学系研究科）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

脂質は細胞を構成する主要な要素の一つであり、様々な種類の脂質が適切な割合で細胞膜に取り込まれることが生体の恒常性に重要である。多様な脂質分子の中でも特に融点温度の高いスフィンゴ脂質は、その含有量の多寡が細胞膜の性質に大きな影響を与えるため、その量は厳密に制御される必要がある。スフィンゴ脂質はスフィンゴミエリンと糖鎖修飾された脂質である糖脂質に大別され、スフィンゴミエリンと糖脂質は共通の基質であるセラミドから合成される。特に糖脂質は神経系に多く存在し、神経系において重要な機能を果たすことが知られている。実際、糖脂質の代謝異常は **Gaucher Disease** をはじめとする様々な疾患を引き起こす。そのため、糖脂質の代謝研究は非常に重要であり、糖脂質代謝に重要なタンパク質の同定が進んできた。しかしながら糖脂質の生合成経路、とりわけ、スフィンゴミエリン合成と糖脂質合成に共通の基質であるセラミドから糖脂質が選択的に合成されるメカニズムは長年不明であり、糖脂質の合成量がどのように制御されるかは明らかにされていなかった。

我々はこれまでに糖脂質の選択的合成に必須の小胞体局在タンパク質を同定し、さらにはそれが神経系に特徴的である可能性を提示した。そこで、複数の臓器でこの相互作用プロテオーム解析を行うことにより、神経系に特徴的な糖脂質生合成制御メカニズムを解明する重要な手がかりが得られることが期待された。**Gaucher Disease** をはじめとする糖脂質代謝の異常による疾患は **Lysosomal Storage Disorders (LSDs)** と総称されるが、興味深いことにその多くは特に神経系の症状を引き起こす。本研究

は、神経系において特徴的な脂質代謝メカニズムを初めて明らかにする可能性があるという点で非常に独創的であり、糖脂質代謝の異常と神経変性疾患を繋ぐメカニズムの解明やこれらの疾患の治療法の開発に繋がるものである。

[1-2]研究の方法・経過

我々が今回注目した小胞体局在タンパク質について、このタンパク質に結合するタンパク質群をマウス脳及び肝臓由来のサンプルから免疫沈降により単離し、**LC-MS/MS** 解析により同定した。免疫沈降後に **on-bead** トリプシン消化し、ラベルフリー定量解析および **PRM (parallel reaction monitoring)** を用いた精密定量解析によって、脳組織と他組織からの免疫沈降物のプロテオームの比較を行った。これにより、非常に感度良くかつ、正確に神経系に特徴的な複合体の構成因子を同定した。実験は予定通りに行われ、複数の個体由来の組織を用いた複数回の実験を行うことで統計的に有意に単離されたタンパク質だけに注目し、その後の研究を行っている。

さらに、免疫沈降法によって得られたデータを補完するために、**BioID** 法による、**proximity labeling** を行う予定であった。こちらに関しては、ビオチンの濃度、反応時間等の条件を現在検討中であるが、ほぼ条件は決定しており、今後予定していた実験を実行する。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

LC-MS/MS 解析の結果を統計処理し、**Control** に比べ有意に多く免疫沈降されてきたタンパク質を同定した。その結果、これまでの培養細胞を用いた研究の結果や既報から結合が予

想されたタンパク質群が同定された。加えて、多くのタンパク質が脳組織特異的に今回注目した小胞体タンパク質に結合することが明らかになった。ここで得られたタンパク質群の中には、脂質の制御に関わることがこれまでに報告されているタンパク質に加え、タンパク質修飾に関連する酵素などが多数同定された。現在我々はこれらのタンパク質について、ニューロン特異的糖脂質合成に果たす役割を検討している。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

今後は今回同定されたタンパク質群の、ニューロン特異的な糖脂質合成、あるいは代謝における役割を明らかにし、更にはこれらのタンパク質の欠損や変異がニューロンの機能や、生体脳の機能にどのような影響を及ぼすかを明らかにしていく。これにより、これまで明らかにすることが出来なかった、神経活動を支える分子基盤の解明が可能になる。また、その結果は疾患の原因の同定にも繋がると考えられる。

本研究によって得られたタンパク質群の解析の結果、これまで全く予想していなかった脂質修飾経路に今回注目した小胞体タンパク質が関係する可能性が明らかになった。これにより、本来の目的であった糖脂質合成の制御だけではなく、新たな新規経路の開拓につながると考えている。

【3】 主な発表論文等

[3-1] 論文発表、なし

[3-2] 学会発表、なし

[3-3] 成果資料等、なし

【4】 今後の課題等

本年度は予定した、proximity labeling によるタンパク質同定を完了することが出来なかったが、今後この実験によって得られた結果から、本年度得られたデータの解析を更に進める。これにより、より標的を絞った解析を遂行することができる。