

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07031

研究課題名(和文) 二刀流酵素sEHによる長鎖不飽和脂肪酸の脳内作用調節の解明

研究課題名(英文) Analysis of bifunctional enzyme sEH in the brain

研究代表者

大黒 亜美 (Oguro, Ami)

広島大学・医系科学研究科(薬)・特定准教授

研究者番号：20634497

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：可溶性エポキシド加水分解酵素(sEH)はエポキシド加水分解活性と脱リン酸化活性の二つの活性を持つ酵素である。本研究により、ドコサヘキサエン酸(DHA)エポキシドからsEHにより生成するDHAジオール体(19,20-DHDP)が脳に存在し、マウスのDHA摂取により顕著に増加することを見出した。また19,20-DHDPは、神経保護作用を持つことを明らかにした。一方で、sEHの脱リン酸化活性の欠損マウスを作製し、行動異常を示す表現型や、脳における脂質代謝変動や遺伝子発現変動を明らかにした。従ってsEHの脱リン酸化活性も脳機能の制御に関与することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで成獣においては、脳におけるDHA摂取効果が見られるにも関わらず、脳内のDHA量は変化しないことが知られていた。本研究では、DHA量は変化せず、DHAのsEHによる代謝物であるDHAジオール体がDHA摂取により脳で増加することを見出し、代謝物の脳における重要性を示した。また妊娠マウスのDHA摂取は、代謝物の生成を介して胎児脳神経のメチル水銀毒性を軽減できることを明らかにした。従って、DHAやその代謝物を妊婦が補給することは、メチル水銀による胎児の脳発達異常を軽減できる可能性を示した。一方で、また機能が不明であったsEHの脱リン酸化活性が、脂質代謝を介して脳機能を制御することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Soluble epoxide hydrolyzing enzyme (sEH) is an enzyme which has dual activities of epoxide hydrolase and phosphatase. In this study, we found that docosahexaenoic acid (DHA) diol (19,20-DHDP), which is generated by sEH from DHA epoxide, is present in the brain and is significantly increased by DHA intake in mice. We also found that 19,20-DHDP has neuroprotective effects. On the other hand, we generated mice deficient in sEH phosphatase activity and revealed a phenotype of behavioral abnormalities, as well as changes in lipid metabolism and gene expression in the brain. Thus, these results suggest that the phosphatase activity of sEH is also involved in the regulation of brain function.

研究分野：衛生薬学、脂質生化学

キーワード：エポキシド加水分解酵素 長鎖不飽和脂肪酸 ドコサヘキサエン酸 脱リン酸化活性 リゾホスファチジン酸 チトクロームP450

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

アラキドン酸やドコサヘキサエン酸 (DHA) などの長鎖不飽和脂肪酸は、脳内リン脂質中に豊富に存在し、記憶や学習などの脳機能維持に重要である。実際に、ヒト乳児におけるアラキドン酸摂取は、精神発達指数を増加させることや、DHA 摂取が老化や脳疾患に伴う学習や記憶の低下に対する予防や改善に有効であることが報告されている。高齢化社会において、これら不飽和脂肪酸の摂取による脳機能低下の予防や改善は注目されているものの、これらがどのように脳に作用するのか、その作用機序は十分には明らかでない。長鎖不飽和脂肪酸は、膜流動性への作用に加えて、その代謝物が様々な生理活性を持つことで作用を発揮する。申請者はこれまで、これら代謝物の生理機能に着目した研究を行ってきており、アラキドン酸エポキシド (EET) がラット海馬の神経細胞の軸索伸長を促進する作用を持つことを見出した。従って、長鎖不飽和脂肪酸の脳機能への作用機序として、これら代謝物のポジティブな作用が関わっているのではないかと考えた。

可溶性エポキシド加水分解酵素 (sEH) は、二つのドメインから成り (図 1)、その C 末端ドメインにアラキドン酸や DHA などの不飽和脂肪酸エポキシド (EET、EDP) を加水分解する活性を持つ。sEH は肝臓や腎臓に多く発現しているが脳にも発現しており、申請者は、sEH のエポキシド加水分解活性阻害剤が、EET による神経突起伸長の促進作用を増大させることを明らかにしている。しかし sEH が EET や EDP の代謝を介して、実際に学習や記憶などの脳機能を調節しているかはまだ明らかでない。

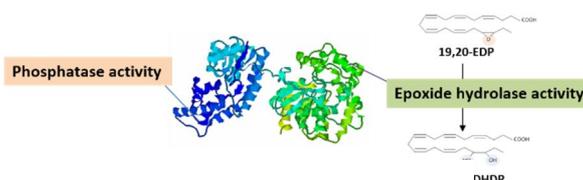


図 1. sEH の二つの活性

一方、sEH の N 末端ドメインは、2003 年に脱リン酸化活性を有することが報告され、申請者はその生体内基質がリゾホスファチジン酸 (LPA) であることを見出した。アラキドン酸や DHA は、LPA としてエステル化された形でも生理活性を示すことが報告されている。近年、sEH のノックアウトマウスは不安様行動を示すことが報告されたが、この表現型はエポキシド加水分解活性の阻害剤の投与で再現できず、sEH のもう一つの活性である脱リン酸化活性の関与が考えられたが詳細は明らかではない。そこで申請者は、sEH の LPA 脱リン酸化活性が脳機能を制御しているのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、アラキドン酸や DHA の脳機能への作用機序解明の一端として、sEH のエポキシド加水分解活性と脱リン酸化活性の二つの活性に着目し、それらを介してアラキドン酸や DHA を含む生理活性脂質が脳内でどのように調節されているか、またそれらによって学習や記憶などの脳機能にどのような影響を与えるか、を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

パーキンソン病は神経変性疾患の一つであり、黒質-線条体の神経細胞の脱落により、運動機能障害などの症状が見られる。これらの症状は DHA 摂取により緩和されることが報告されているがその作用機序は不明である。そこで、まずロテノン投与によるパーキンソン病モデルラットを用いて DHA 摂取効果、およびその効果における sEH のエポキシド加水分解活性による代謝物の作用を検討した。7 週齢 SD ラットにロテノンを 3 mg/kg/day となるように 5 日間連続投与することでパーキンソン病モデルラットを作製し、ロテノン投与の 4 日前から DHA を飼料の総脂質の 4% となるように混合してラットに摂取させた。また DHA 代謝物の関与を検討するため、sEH の阻害剤 TPPU を 5 mg/L となるように飲料水に混合し、DHA と共にラットに摂取させた。これらラットの運動機能をシリンダー試験や回転輪試験で評価し、脳における DHA 代謝物を LC-MS を用いて定量した。また DHA 代謝物の効果を初代神経細胞や PC12 細胞を用いて検討した。

一方で、sEH の脱リン酸化活性の機能解析について、sEH の脱リン酸化活性ドメインの活性中心に変異を入れることで、エポキシド加水分解活性には影響を与えず、脱リン酸化活性のみ欠損させたマウスの作製を CRISPR-Cas9 システムを用いて、Gonad 法 (Takahashi, 2015, Gurumurthy, 2019) により作製した。これらのマウスを用いて行動試験および遺伝子発現解析を行った。

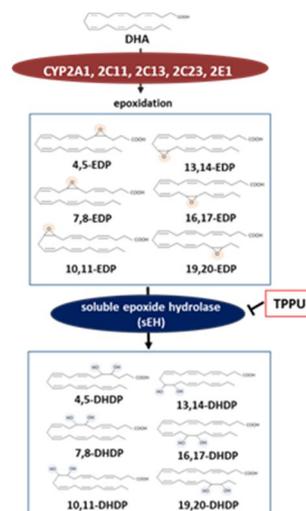


図 2. DHA の sEH による代謝物

#### 4. 研究成果

ロテノン投与はパーキンソン病に特徴的な運動機能低下を引き起こした(図 3)。一方で、DHA をラットに摂取させたところ、これらの運動機能の低下が軽減することが示された。しかしながら、DHA と共に sEH のエポキシド加水分解活性阻害剤である TPPU をラットに摂取させたところ、DHA の摂取効果を抑制することが示された。これらの結果は、DHA の摂取効果において、DHA エポキシ体から sEH により生成する DHA ジオール体が関与している可能性を示唆している。

またドーパミンの産生に関わるチロシンヒドロキシラーゼ(TH)の線条体における発現量がロテノンにより低下するが、DHA 摂取によりその低下が抑制されることが示され、この効果もまた TPPU により抑制されることが示された(図 4)。

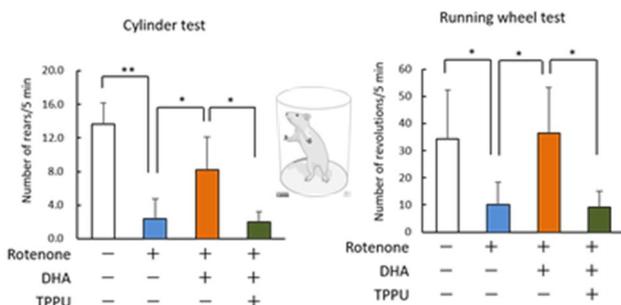


図 3 DHA 及び sEH 阻害剤 TPPU 摂取がロテノン誘発性パーキンソン病モデルラットの運動機能障害に与える影響

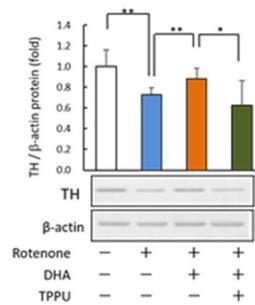


図 4 DHA 及び TPPU がパーキンソン病モデルラットの TH 発現低下に与える影響

ロテノン誘導性のパーキンソン病様症状には、脳内の酸化ストレスが関与することが知られている。そこで、DHA 摂取効果の酸化ストレスへの影響を検討した。ロテノン投与により線条体の酸化ストレスが増加したが、この増加も DHA 投与により抑制され、TPPU により DHA の摂取効果が抑制された(図 5)。また、DHA 摂取は線条体における SOD1 やカタラーゼなどの抗酸化酵素の発現を増加させたが、この効果もまた TPPU により抑制されることが示された。また DHA 摂取は、これら抗酸化酵素の発現誘導に関わる転写因子 Nrf2 タンパク質の安定化を促進することが示された(図 5)。これらの結果より、DHA 摂取は抗酸化酵素の促進による酸化ストレスの軽減により、ロテノン誘導性のパーキンソン病様症状を抑制した可能性が示された。またこれら DHA 摂取による酸化ストレスの軽減効果においても sEH のエポキシド加水分解活性が重要であることが示された。

実際にラット脳内の DHA 代謝物を LC-MS により測定したところ、DHA のみならず、DHA エポキシ体や DHA ジオール体が脳に存在することが示された(図 6)。また DHA 摂取により脳内の DHA 量は変化しないものの、DHA ジオール体が増加することが示された。また sEH のエポキシド加水分解活性の阻害剤 TPPU の摂取により確かに DHA エポキシ体が増加し、DHA ジオール体が減少することが確認できた(図 6)。これまで、DHA 摂取による脳における DHA の増加は胎児や乳児では見られるものの、成体では見られないことが他のグループからの研究でも報告されており、成体における DHA 摂取が DHA ジオール体を増加させることは本研究において初めて見出した結果である。

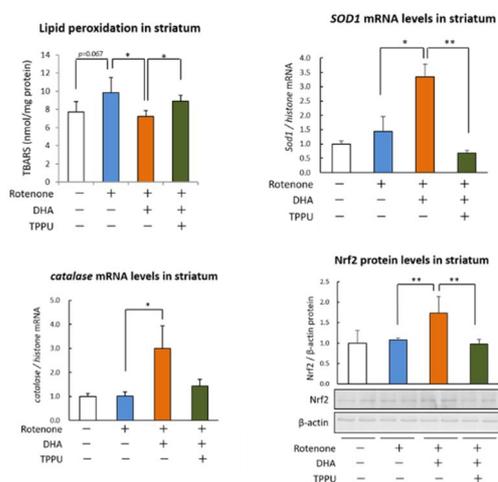


図 5 DHA 摂取が脳内の酸化ストレスに与える影響

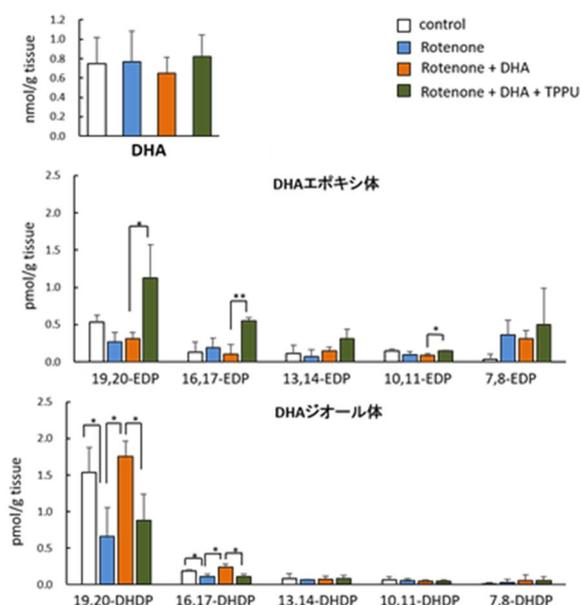


図 6 LC-MS によるラット脳内の DHA 代謝物の定量

次に、神経様細胞である PC12 細胞および、胎児マウスより単離した初代神経培養細胞を用いて、sEH のエポキシド加水分解活性により生成する DHA ジオール体の生理活性を検討した (図 7, 8)。その結果、DHA ジオール体である 19,20-DHDP は SOD1 やカタラーゼといった抗酸化酵素の発現を増加させることが示された。従って、DHA 摂取により、sEH のエポキシド加水分解活性により生成した DHA ジオール体が脳で増加することにより、抗酸化作用によりパーキンソン病様症状が抑制されたと考えられる。これらの結果は、DHA の脳における摂取効果において sEH を介した DHA 代謝物の効果が重要であることを示唆している。

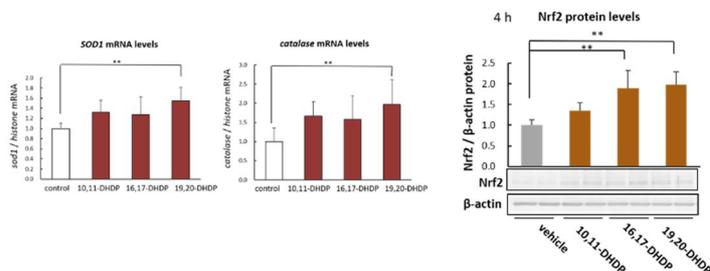


図 7 PC12 細胞における DHA ジオール体添加時の抗酸化因子の発現

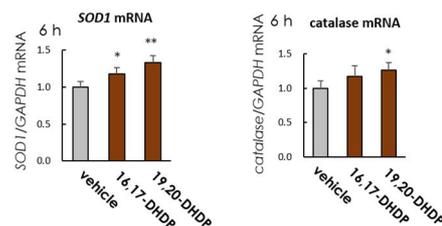


図 8 初代神経細胞における DHA ジオール体添加時の抗酸化因子の発現

また、sEH のエポキシド加水分解活性により生成する DHA ジオール体は、母体から胎児へと移行し、胎児の脳内においても、メチル水銀毒性から神経細胞を保護することを明らかにした。実際にこれら DHA 代謝物は臍帯血や母乳にも含まれていることを見出していることから、母体から仔へと積極的に移行することが示された。

次に sEH のもう一つの活性である脱リン酸化活性の脳における生理機能を解析するため、sEH の脱リン酸化活性のみ欠損させたマウスを作製した。その結果、これらのマウスは WT マウスに比べて、行動異常が観察され、また脳内の LPA 量が増加していることが示された。またこれらのマウスを用いて脳内で発現が変動する遺伝子を網羅的に調べたところ、いくつかの候補遺伝子が明らかになった。本研究により、sEH はエポキシド加水分解活性のみならず、その脱リン酸化活性も脳機能の制御において重要な役割を担っていることが示された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Oguro Ami, Ishihara Yasuhiro, Siswanto Ferbian Milas, Yamazaki Takeshi, Ishida Atsuhiko, Imaishi Hiromasa, Imaoka Susumu	4. 巻 1866
2. 論文標題 Contribution of DHA diols (19,20-DHDP) produced by cytochrome P450s and soluble epoxide hydrolase to the beneficial effects of DHA supplementation in the brains of rotenone-induced rat models of Parkinson's disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids	6. 最初と最後の頁 158858-158858
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbalip.2020.158858	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 Oguro Ami, Fujita Kenta, Ishihara Yasuhiro, Yamamoto Megumi, Yamazaki Takeshi	4. 巻 22
2. 論文標題 DHA and Its Metabolites Have a Protective Role against Methylmercury-Induced Neurotoxicity in Mouse Primary Neuron and SH-SY5Y Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3213-3213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22063213	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 Siswanto FM, Oguro A, Arase S, Imaoka S	4. 巻 35
2. 論文標題 WDR23 regulates the expression of Nrf2-driven drug-metabolizing enzymes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Drug Metab. Pharmacokinet.	6. 最初と最後の頁 441-455
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dmpk.2020.06.007	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 Kobayashi Y, Oguro A, Yagi E, Mitani A, Kudoh SN, Imaoka S	4. 巻 45(12)
2. 論文標題 isphenol A and rotenone induce S-nitrosylation of protein disulfide isomerase (PDI) and inhibit neurite outgrowth of primary cultured cells of the rat hippocampus and PC12 cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Toxicol. Sci.	6. 最初と最後の頁 783-794
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/jts.45.783	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 Oguro A*, Sugitani A, Kobayashi Y, Sakuma R, and Imaoka S	4. 巻 46(1)
2. 論文標題 Bisphenol A stabilizes Nrf2 via Ca <sup>2+</sup> influx by direct activation of the IP3 receptor.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Toxicol. Sci.	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/jts.46.1	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 Kobayashi Y, Oguro A, Imaoka S	4. 巻 55(2)
2. 論文標題 Feedback of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) transcriptional activity via redox factor-1 (Ref-1) induction by reactive oxygen species (ROS)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Free Radic Res	6. 最初と最後の頁 154-164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10715762.2020	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 Kobayashi Y, Oguro A, Hirata Y, Imaoka S	4. 巻 16(2)
2. 論文標題 The regulation of Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1alpha) expression by Protein Disulfide Isomerase (PDI)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0246531
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0246531	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 Siswanto FM, Oguro A, Imaoka S	4. 巻 296
2. 論文標題 Sp1 is a substrate of Keap1 and regulates the activity of CRL4A WDR23 ubiquitin ligase toward Nrf2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem	6. 最初と最後の頁 100704
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.100704	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 Siswanto FM, Sakuma R, Oguro A, Imaoka S	4. 巻 77(8)
2. 論文標題 Chlorogenic acid activates Nrf2/SKN-1 and prolongs the lifespan of <i>Caenorhabditis elegans</i> via the Akt-FOXO3/DAF16a-DDB1 pathway and activation of DAF16f	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Gerontol A Biol Sci Med Sci.	6. 最初と最後の頁 1503-1516
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/gerona/giac062	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 Siswanto FM, Mitsuoka Y, Nakamura M, Oguro A, Imaoka S	4. 巻 12
2. 論文標題 Nrf2 and Parkin-Hsc70 regulate the expression and protein stability of p62/SQSTM1 under hypoxia.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 21265
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-25784-0	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 -

〔学会発表〕 計9件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 大黒亜美 石原康宏 今岡進 山崎岳
2. 発表標題 ドコサヘキサエン酸(DHA)摂取によるロテノン誘発性パーキンソン病様症状の軽減効果におけるDHA代謝物の作用解析
3. 学会等名 第48回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大黒 亜美、石原康宏、山崎 岳
2. 発表標題 DHA代謝物によるロテノン誘導性パーキンソン病様症状抑制作用の検討
3. 学会等名 フォーラム2021: 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大黒 亜美, 藤田 健太, 石原 康宏, 山元 恵, 山崎 岳
2. 発表標題 メチル水銀毒性軽減におけるドコサヘキサエン酸及びその代謝物の作用解明
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会2021 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大黒亜美、石原康宏、今岡進、山崎岳
2. 発表標題 DHA代謝物によるパーキンソン病症状の軽減効果の検討
3. 学会等名 第94回 日本生化学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大黒 亜美 石原 康宏 山崎 岳
2. 発表標題 胎児期メチル水銀暴露による神経毒性にDHA及びその代謝物が及ぼす作用解析
3. 学会等名 令和3年度メチル水銀研究ミーティング
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大黒 亜美、石原康宏、山崎岳、今岡 進
2. 発表標題 ドコサヘキサエン酸(DHA)生体内代謝物のパーキンソン病における作用解析
3. 学会等名 第61回 日本生化学会 中国・四国支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤田 健太、石原 康宏、大黒 亜美、山崎 岳
2. 発表標題 多価不飽和脂肪酸による神経毒に対する培養神経細胞の保護効果とその分子機構
3. 学会等名 第61回 日本生化学会 中国・四国支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Oguro A. and Ishihara Y.
2. 発表標題 Role of DHA metabolites in protective effects of DHA supplementation in the brains of rotenone-induced rat models of Parkinson's disease.
3. 学会等名 1st International Electronic Conference on Biomolecules: Natural and Bio-Inspired Therapeutics for Human Diseases. (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大黒亜美 藤田健太 石原康宏 山元恵 山崎岳
2. 発表標題 ドコサヘキサエン酸(DHA)代謝物のメチル水銀毒性に対する神経細胞保護作用の検討
3. 学会等名 環境省「重金属等による健康影響に関する総合的研究」メチル水銀研究ミーティング
4. 発表年 2021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	山崎 岳  (Yamazaki Takeshi)  (30192397)	広島大学・統合生命科学研究科(総)・教授    (15401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	石原 康宏  (Ishihara Yasuhiro)  (80435073)	広島大学・統合生命科学研究科（総）・教授    (15401)	
研究分担者	今岡 進  (Imaoka Susumu)  (60145795)	関西学院大学・生命環境学部・教授    (34504)	

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