

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06820

研究課題名(和文)脳特異的リン脂質分子種がつくる神経細胞膜機能ドメインの解明

研究課題名(英文)Functional domains of neuronal membranes produced by brain-specific phospholipid molecular species.

研究代表者

本家 孝一 (Koichi, Honke)

高知大学・その他部局等・副学長

研究者番号：80190263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：sn-1位にドコサヘキサエン酸鎖をもつホスファチジルコリン(DHAPPC)を有機化学合成してマウスに免疫し、DHAPPCに対する単クローン抗体mAb10G9を得た。mAb10G9は、ニューロンの軸索軸部と近傍の細胞内小胞を認識することがわかった。DHAPPCを含む細胞内小胞を部分精製し、プロテオミクス解析により、DHAPPCの生合成に関与するホスホリパーゼA1のABHD-Xを見出した。このABHD-Xの阻害剤処理により、ニューロン軸索軸部に対するmAb10G9の反応性が消失した。ABHD-Xに対する抗体を用いた免疫染色で、ABHD-Xの局在とmAb10G9エピトープの局在が一致した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳機能に重要と栄養学的に注目される多価不飽和脂肪酸のドコサヘキサエン酸を含むリン脂質分子種が、ニューロンの軸索軸部という特異的な領域に局在することを、リン脂質分子種に対する単クローン抗体を作製することで明らかにした。脳特異的なリン脂質に対する抗体の作製成功例は、研究代表者のチームが開発した1-オレイル2-パルミトイルホスファチジルコリンに対する単クローン抗体に続いて2例目である。研究代表者らは、オンサイトで生合成される特定のリン脂質分子種がつくる膜マイクロドメインが、機能性タンパク質の局所集積を制御するという仮説を提唱している。

研究成果の概要(英文)：Phosphatidylcholine with a docosahexaenoic acid chain at position sn-1 (DHAPPC) was chemically synthesized and immunized using mice to obtain mAb10G9, a monoclonal antibody against DHAPPC. The mAb10G9 was found to recognize the axon axis of neurons as well as intracellular vesicles near the axon axis. Intracellular vesicles containing DHAPPC were partially purified and their proteomic analysis revealed ABHD-X, a phospholipase A1 involved in the biosynthesis of DHAPPC. Inhibitor treatment of the ABHD-X abolished the reactivity of mAb10G9 for neuronal axon axis. Furthermore, immunostaining with an antibody against ABHD-X showed that the localization of ABHD-X coincided with that of the mAb10G9 epitope.

研究分野：脂質生化学

キーワード：リン脂質分子種 ドコサヘキサエン酸 ホスホリパーゼA1 単クローン抗体 / ヒドラーゼ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経細胞膜は、シナプス領域、傍シナプス領域、軸索領域など、機能の異なる複数の領域をもつが、特定の機能性タンパク質が特定の領域に局在するメカニズムは不明である。

生体膜の主成分であるリン脂質は、親水性の頭部アルコールとリン酸と、疎水性の脂肪酸鎖から成る。一般的には、グリセロール骨格の *sn*-2 位に不飽和脂肪酸をもつものが多いが、脳は *sn*-1 位に不飽和脂肪酸をもつユニークなホスファチジルコリン(PC)分子種を発現している。研究代表者らは、突起伸長した PC12 細胞から調製した細胞膜脂質ラフト画分をマウスに免疫して、突起先端部を特異的に認識する単クローン抗体 (mAb) #15 を作成し、mAb#15 のエピトープが、*sn*-1 位に不飽和脂肪酸のオレイン酸をもつ 1-oleoyl-2-palmitoyl-phosphatidylcholine (OPPC)であることを同定した。さらに、突起先端部の OPPC 膜ドメインに一致して、*sn*-1 位の脂肪酸鎖を付け替えるホスホリパーゼ A1 (PLA1) 活性が局在し、PLA1 活性阻害剤処理により OPPC 膜ドメインが消失するとともに、突起先端部に局在するドーパミン輸送体 (DAT) が突起先端部から消失することを見出した。最近、神経突起先端部で OPPC 膜ドメインを生成する PLA1 が pancreatic lipase related protein 2 (PLRP2) であることを同定し、ゲノム編集により PLRP2 を欠損させると、OPPC、DAT、並びに、SNARE タンパク質の一種である Syntaxin 4 の神経突起先端部への局在化が失われることを明らかにした。以上の知見から、オンサイトの PLRP2 が生成する OPPC 膜ドメインが、DAT 等の特定の機能性膜タンパク質を局在化するというメカニズムが明らかとなった。

n-3 ()系多価不飽和脂肪酸 (PUFA) のドコサヘキサエン酸 (DHA) が脳や網膜において減少すると、学習能力が低下して視力が落ち、血液脳関門にある DHA トランスポーターを欠失したマウスでは、認知能力の低下や運動失調など神経機能異常が起こることが示されている。しかし、DHA が脳神経組織でどのように利用されているのか、その分子メカニズムは未だ不明である。*sn*-1 位に DHA 鎖をもつホスファチジルコリン (DHAPPC) が脳に特異的に存在することが知られているが、脳内での発現部位や機能は未知である。

2. 研究の目的

本研究課題では、OPPC および DHAPPC 膜ドメインに集積する機能性膜タンパク質群を明らかにし、それらの膜ドメインの生成プロセスを明らかにすることにより、神経細胞膜上で特定のリン脂質分子種が固有の膜ドメインを形成し、そこに特定の機能性タンパク質が集積するという作業仮説を実証する。

具体的には、1) DHAPPC を生合成する *sn*-1 位リモデリング酵素 PLA1-X を同定する。2) OPPC と DHAPPC 膜ドメインに集積する膜タンパク質群を同定し、機能を解明する。

3. 研究の方法

1) DHAPPC を生合成する *sn*-1 位リモデリング酵素 PLA1-X の同定

PLRP2 欠失 PC12 細胞において、軸索の mAb10G9 反応性は消失しなかったため、PLRP2 は DHAPPC の生成には関与しないことが判明した。そこで、PLRP2 のスクリーニングと同様に、リパーゼやホスホリパーゼが属する α/β ヒドロラーゼファミリーの中から DHAPPC を生成する PLA1-X 候補を選び、PC12 細胞を NGF 処理したときに発現が亢進するものをスクリーニングする。NGF で発現亢進がみられた PLA1-X 候補について、CRISPR/Cas9 システムを用いて PC12 細胞で PLA1-X 欠失細胞を作成する。軸索の mAb10G9 反応性が消失する変異体クローンを選択する。欠失させた PLA1-X 候補の野生型 cDNA を導入して mAb10G9 反応性が回復するかを確認して、DHAPPC 生成に寄与する PLA1-X を確定する。

同定した PLA1-X に対するポリクローナル抗体 (ウサギに免疫して作製) もしくは蛍光タンパク質を融合した PLA1-X を発現させることにより、PLA1-X の細胞内局在と mAb10G9 認識部位との一致を確認する。それぞれの抗体を用いて、マウスやラットの脳における PLA1-X と

DHAPPC の発現部位を調べる。

将来的には、ゲノム編集技術を用いて PLRP2 遺伝子と PLA1-X 遺伝子のノックアウトマウスを作製し、脳神経機能への影響を解析する。

2) OPPC と DHAPPC 膜ドメインに集積する膜タンパク質群の同定と機能解明

NGF 処理した PC12 細胞に、mAb#15 と mAb10G9 を別々に反応させ、つづいて HRP で標識した二次抗体を反応させた後、EMARS 反応で標識試薬のチラミドをフェノキシラジカルに変換させ、OPPC あるいは DHAPPC の近傍分子をタグの FITC で標識する。ここまでの実験を繰り返し、試料をストックしておく。集めた細胞の細胞膜を中性界面活性剤と超音波を用いて可溶化し、抗 FITC 抗体固相化ビーズを用いて FITC 標識されたタンパク質を濃縮単離する。単離したタンパク質をトリプシン消化した後、nano-LC-ESI-MS/MS を用いてペプチドを同定する。

同定したタンパク質群の抗体を入手(または自作)し、蛍光顕微鏡または免疫電子顕微鏡を用いて mAb 認識部位と同定されたタンパク質が共局在するかを確認する。さらに、同定されたタンパク質に関して、PLRP2 遺伝子または PLA1-X 遺伝子欠失変異体細胞における局在・分布の変化を調べるとともに、神経機能への影響を解析する。OPPC 膜ドメインと同様に、DHAPPC 膜ドメインに特定の tSNARE タンパク質が局在化するかに注目する。

4. 研究成果

1) mAb10G9 エピトープを生合成する sn-1 位リモデリング酵素 PLA1 の同定

mAb10G9 エピトープの生合成に関与するホスホリパーゼ A1 (PLA1) を同定するため、NGF 処理した PC12 細胞から mAb10G9 エピトープを含む細胞内小胞を部分精製し、質量分析を用いたプロテオミクス解析により、リパーゼやホスホリパーゼが属する α/β ヒドロラーゼファミリーメンバーの一つである ABHD-X を同定した。

CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集により、ABHD-X 欠失 PC12 細胞の作成を何度も試みたが、何故か欠失株は死滅してしまい得ることができなかった。

ABHD-X に対する抗体を用いた免疫組織染色により、ABHD-X と mAb10G9 エピトープがニューロン軸索軸部に共局在することを確認した。

ゲノム編集技術を用いて、PLRP2 遺伝子と ABHD-X 遺伝子について、それぞれ別個に脳特異的ノックアウトマウスを作製した。現在、両遺伝子の欠失による脳神経機能への影響を解析中である。

2) OPPC および mAb10G9 エピトープを含む膜ドメインに集積する膜タンパク質群の同定と機能解明

NGF 処理した PC12 細胞に、mAb#15 と mAb10G9 を別々に反応させ、つづいて HRP で標識した二次抗体を反応させた後、EMARS 反応で標識試薬のチラミドをフェノキシラジカルに変換させ、OPPC あるいは DHAPPC の近傍分子をタグの FITC で標識した。ここまでの実験を繰り返し、試料をストックしておく。集めた細胞の細胞膜を中性界面活性剤と超音波を用いて可溶化し、抗 FITC 抗体固相化ビーズを用いて FITC 標識されたタンパク質を濃縮単離した。単離したタンパク質をトリプシン消化した後、nano-LC-ESI-MS/MS を用いてペプチドを同定した。

同定したタンパク質群の抗体を用いた免疫組織染色により、mAb (mAb#15 と mAb10G9) 認識部位と、一部の同定されたタンパク質が共局在することを確認した。さらに、PLRP2 遺伝子欠失細胞においてこのタンパク質の局在性が消滅することを確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kotani Norihiro, Araki Tomoyuki, Miyagawa-Yamaguchi Arisa, Amimoto Tomoko, Nakano Miyako, Honke Koichi	4. 巻 679
2. 論文標題 Proximity Labeling and Proteomics: Get to Know Neighbors	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Methods Enzymol	6. 最初と最後の頁 131 ~ 162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/bs.mie.2022.07.031	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 Dustin E., McQuiston A. R., Honke K., Palavicini J. P., Han X., Dupree J. L.	4. 巻 71
2. 論文標題 Adult onset depletion of sulfatide leads to axonal degeneration with relative myelin sparing	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 2285 ~ 2303
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/glia.24423	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 Nakashima Keiko, Hirahara Yukie, Koike Taro, Tanaka Susumu, Gamo Keizo, Oe Souichi, Hayashi Shinichi, Seki-Omura Ryohei, Nakano Yousuke, Ohe Chisato, Yoshida Takashi, Kataoka Yosky, Tsuda Masayuki, Yamashita Tatsuyuki, Honke Koichi, Kitada Masaaki	4. 巻 63
2. 論文標題 Sulfatide with ceramide composed of phytosphingosine (t18:0) and 2-hydroxy FAs in renal intercalated cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Lipid Research	6. 最初と最後の頁 100210 ~ 100210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jlr.2022.100210	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 Kaneda Hisako, Ida Yui, Kuwahara Ryusuke, Sato Izumi, Nakano Takanari, Tokuda Haruhiko, Sato Tsuyoshi, Murakoshi Takayuki, Honke Koichi, Kotani Norihiro	4. 巻 20
2. 論文標題 Proximity Proteomics Has Potential for Extracellular Vesicle Identification	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Proteome Research	6. 最初と最後の頁 3519 ~ 3531
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jproteome.1c00149	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 Yesmin Farhana, Bhuiyan Robiul H., Ohmi Yuhsuke, Yamamoto Satoko, Kaneko Kei, Ohkawa Yuki, Zhang Pu, Hamamura Kazunori, Cheung Nai-Kong V., Kotani Norihiro, Honke Koichi, Okajima Tetsuya, Kambe Mariko, Tajima Oriie, Furukawa Keiko, Furukawa Koichi	4. 巻 23
2. 論文標題 Ganglioside GD2 Enhances the Malignant Phenotypes of Melanoma Cells by Cooperating with Integrins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 423 ~ 423
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23010423	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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