

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07946

研究課題名(和文)細胞内ホスホリパーゼA1の新しい機能の探索と病態への関与

研究課題名(英文)Novel functions and relevance to the diseases of intracellular phospholipase A1

研究代表者

山下 純 (Yamashita, Atsushi)

帝京大学・薬学部・教授

研究者番号：80230415

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：DDHD1(PA-PLA1)およびその活性変異酵素(S537A)を膵臓癌細胞に発現した。発現により、膵臓癌細胞の増殖や生存が低下した。DDHD1、活性変異酵素を発現により、ミトコンドリアの呼吸(電子伝達系)が亢進した。膵臓癌細胞は抗癌剤に耐性であるが、DDHD1および活性変異酵素の発現により、抗癌剤の感受性が増加した。癌細胞はミトコンドリア呼吸が低く保たれ、解糖系でエネルギーを賄うこと、ミトコンドリア活性が低いことが不利な環境での生存に繋がることが知られている。DDHD1や活性変異酵素の発現亢進によるエネルギー代謝のミトコンドリアへのシフトが細胞増殖・生存の低下に繋がることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated the effects of DDHD1/ PA-PLA1 on the proliferation and survival of pancreatic cancer cells. DDHD1/ PA-PLA1 and its non-catalytic mutant (S537A) were expressed in the pancreatic cancer cells by the recombinant retrovirus system. The expression of DDHD1/ PA-PLA1 and S537A mutant significantly reduced the proliferation of PANC-1 cells with normal growth medium. The cell cycle analysis revealed that the expression of DDHD1/ PA-PLA1 and S537A mutant significantly decreased the G0/G1 cells and increased G2/M cells, suggesting that the expression caused the G2/M cell cycle arrest. The expression of DDHD1/ PA-PLA1 and S537A mutant significantly increased the mitochondrial respiration and membrane potential. Our results suggest that DDHD1/ PA-PLA1 is involved in the regulation of G2/M cell cycle transition and mitochondrial function and the dysregulation of DDHD1/ PA-PLA may be lead to the reduced cell proliferation of pancreatic cancer cells.

研究分野：生化学、脂質生物学、分子生物学、細胞生物学

キーワード：ホスホリパーゼA 細胞増 細胞周期 細胞の生存 アポトーシス ミトコンドリア リゾリン脂質 リン脂質

1. 研究開始当初の背景

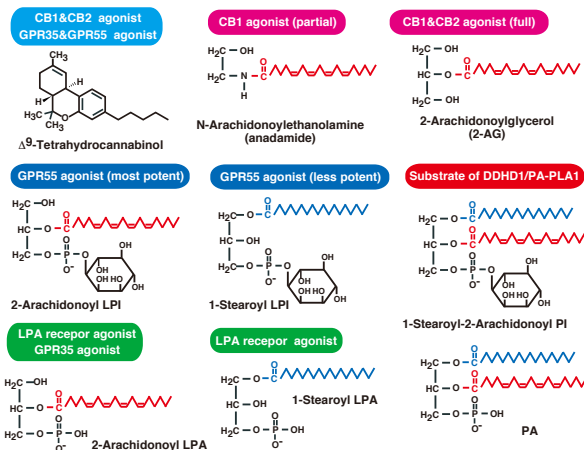
マリファナを摂取すると、時間感覚・空間感覚の混乱、多幸感、記憶の障害、痛覚の低下、幻覚など多彩な精神神経反応がみられる。一方、免疫系が抑制されることも知られ、その結果、マリファナ常習者は感染症や癌になりやすいと考えられている。マリファナの作用の作用は、CB1 受容体と CB2 受容体を介して引き起こされる。しかし、最近、マリファナの生物活性が、CB1 受容体と CB2 受容体だけでは説明できないことが指摘されており、第3、第4の受容体の存在が想定されていた。

最近、第3のレセプターとして、これまでリガンド未知のレセプターとして登録されていた G タンパク質共役型レセプター GPR55 が同定された。GPR55 は CB1 および CB2 に相同性は低く、Non-EDG タイプの LPA 受容体と近縁であった。

私たちは GPR55 の内因性アゴニストの探索に取組み、リゾリン脂質の一種であるリゾホスファチジルイノシトールがアゴニストであることを発見した。

リゾホスファチジルイノシトールの構造・活性相関を検討したところ、グリセロール骨格の2位にアラキドン酸を持つ LPI が最も効率よいアゴニストであることを見いだした。

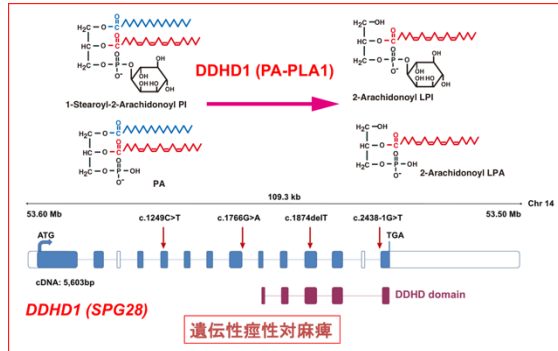
ホスファチジルイノシトール (PI) の構成脂肪酸は特徴的で、sn-1 位にステアリン酸、sn-2 位にアラキドン酸を持つものが多く存在する。最も活性が高い 2-アラキドノイル LPI は、PI がホスホリパーゼ A1 (PLA1) の作用を受けたときに生じることが考えられる。私たちは、2-アラキドノイル LPI の産生に参与する PLA1 の探索を行い、細胞内型 PLA1 である DDHD/PA-PLA1 が LPI 産生に参与することを明らかにした。



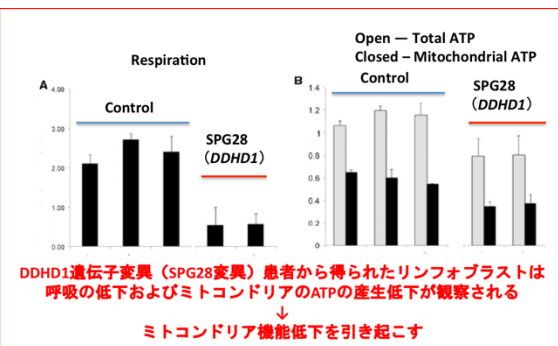
2. 研究の目的

DDHD1 の 2-アラキドノイル LPI の産生における役割を検討する過程で、DDHD1 の変異が関与する遺伝病の発見した。DDHD1 遺伝子に変異が存在する家系を見だし、DDHD1 が欠損すると遺伝性痙性対麻痺 (hereditary spastic paraplegia, HSP) となることを明らかにした。遺伝性痙性対麻痺

HSP は下肢の痙縮と筋力低下を呈する神経変性疾患である。遺伝性痙性対麻痺 HSP の原因遺伝子は様々なものがあり、SPG 亜型として分類されている。DDHD1 の変異は SPG28 と分類された。3つの家系を見だし、変異はエクソン4または 10 の途中にストップコドンを生じるもの、エクソン7と11の後にスプライシング異常を起こすものであった。



SPG28 患者からのリンフォブラストは、健康人からのものに比べて、酸素消費およびミトコンドリア ATP 産生の低下が観察された。DDHD1 の変異により、ミトコンドリア機能が低下することが示唆された。



DDHD1 遺伝子変異 (SPG28 変異) 患者から得られたリンフォブラストは呼吸の低下およびミトコンドリアの ATP の産生低下が観察される
↓
ミトコンドリア機能低下を引き起こす

3. 研究の方法

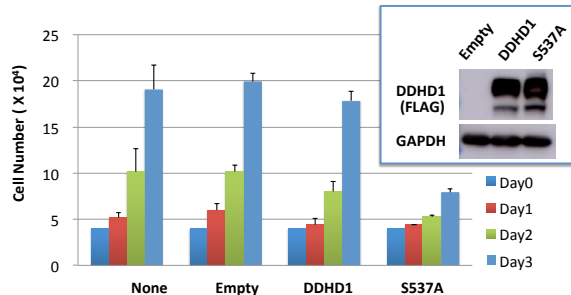
組換えレトロウイルスベクター発現系を用いて、DDHD1/PA-PLA1 または活性セリン残基をアラニンに置換した S537A 変異酵素を発現した膵臓癌細胞 PANC-1 細胞を樹立した。

4. 研究成果

1) DDHD1 の細胞増殖に対する影響

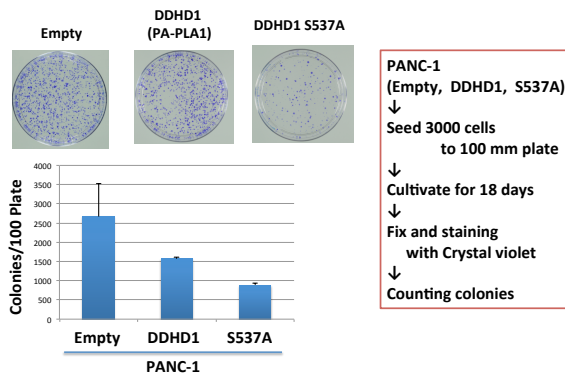
増殖性の細胞すなわち膵臓癌細胞に DDHD1/PA-PLA1 およびその活性変異体 (S537A) を導入して、細胞増殖に対する影響を調べた。DDHD1 およびその活性変異体 (S537A) の発現により、細胞増殖や細胞の生存が低下することが明らかになった。特に活性変異体 (S537A) を導入した際に、増殖の低下効果が大きかった。

Effects of DDHD1/PA-PLA1 and S537A Mutant on Growth of PANC-1 Cells



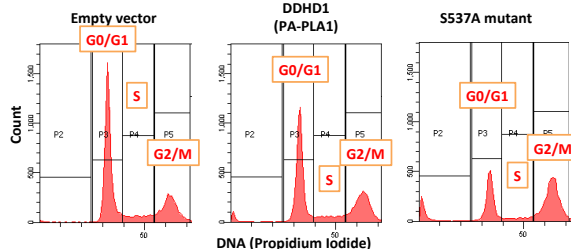
細胞を低密度で播種しコロニーの形成を調べると、DDHD1 発現細胞はコロニー形成の低下が見られた。また、S537A 変異酵素を発現した細胞で、コロニー形成の顕著な低下が観察された。DDHD1、特に S537A 変異酵素の発現により、膵臓癌細胞の増殖および生存が低下することを示唆した。

Effects of DDHD1/PA-PLA1 and S537A Mutant on Colony Formation of PANC-1 Cells



ヨウ化プリピジウムにより DNA を染色し、細胞周期を解析すると、活性変異体 (S537A) を導入により、細胞周期が G2/M 期で停止すること (G2/M アレスト) が示唆された。

Flow Cytometric Analysis of Cell Cycle with Propidium Iodide DNA Staining

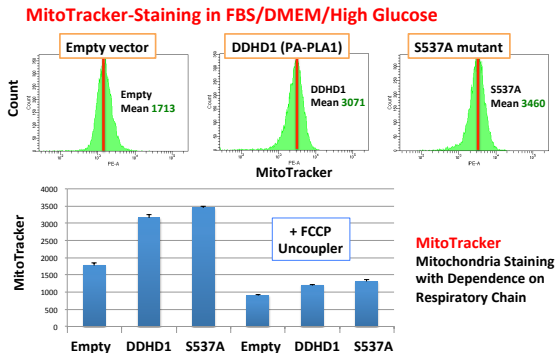


2) DDHD1 のミトコンドリア呼吸に対する影響

DDHD1 の変異 (SPG28) 患者のリンフォブラストはミトコンドリア呼吸が低下していたので、DDHD1 の発現により、ミトコンドリアの活性が変化するかどうかを調べた。MitoTracker は呼吸に依存したミトコンドリア染色プローブである。MitoTracker の取り込みを測定することにより、呼吸活性を評価

すると、プローブの取り込みは、DDHD1/PA-PLA1 およびその活性変異体 (S537A) の発現により増加し、ミトコンドリアの呼吸が亢進することが示された。

Expression of DDHD1/PA-PLA1 and S537A Mutant Augmented Mitochondria Respiratory Chain in PANC-1 Cells



まとめ DDHD1 は膵臓癌細胞のミトコンドリアの機能を調節し、細胞の増殖・生存を低下させることが考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

1) [Yasuhiro Hayashi](#), [Yoko Nemoto-Sasaki](#), [Naoki Matsumoto](#), [Takashi Tanikawa](#), [Saori Oka](#), [Yusuke Tanaka](#), [Seisuke Arai](#), [Ikuro Wada](#), [Takayuki Sugiura](#), and [Atsushi Yamashita](#),

Carboxyl-terminal tail-mediated homodimerizations of sphingomyelin synthases are responsible for efficient ER export. *J. Biol. Chem.* **292**, 1122-1141. 2017.

2) [Atsushi Yamashita](#), [Yasuhiro Hayashi](#), [Naoki Matsumoto](#), [Yoko Nemoto-Sasaki](#), [Saori Oka](#), [Takashi Tanikawa](#), [Takanori Koizumi](#), [Yusuke Inagaki](#), and [Takayuki Sugiura](#),

Coenzyme-A-independent transacylation system; Possible involvement of phospholipase A2 in transacylation. *Biology (Basel)* **6**, pii: E23. 2017.

[学会発表] (計 33 件)

1) [林 康広](#), [佐々木 洋子](#), [松本 直樹](#), [光武 進](#), [杉浦 隆之](#), [山下 純](#)
スフィンゴミエリン合成酵素 2 は HIV-1 の膜融合を促進する
脂質生化学研究 Vol. 57, p244-246, 2015
第 57 回日本脂質生化学会・研究集会 (平成 27 年 5 月 28 日、29 日、東京)

2) [林 康広](#), [佐々木 洋子](#), [松本 直樹](#), [荒井 齊祐](#), [和田 郁夫](#), [杉浦 隆之](#), [山下 純](#)
スフィンゴミエリン合成酵素オリゴマー形成領域の解析

BMB2015「第 38 回日本分子生物学会年会、
第 88 回日本生化学会大会 合同大会」
(2015 年 12 月 1~4 日、神戸)

3) 谷川 尚、岡 沙織、中島 圭佑、山下 純、
杉浦 隆之

マウス T 細胞及び B 細胞における G タンパク
質共役型受容体 GPR55 の発現

BMB2015「第 38 回日本分子生物学会年会、
第 88 回日本生化学会大会 合同大会」
(2015 年 12 月 1~4 日、神戸)

4) Yasuhiro Hayashi, Yoko Nemoto-Sasaki,
Naoki Matsumoto, Takayuki Sugiura, and
Atsushi Yamashita

SPHINGOMYELIN SYNTHASE 2 IS
INVOLVED IN HIV-1
ENVELOPE-MEDIATED MEMBRANE
FUSION

第 63 回日本ウイルス学会学術集会 (平成 27
年 11 月 22 日 (日) ~24 日 (火)、福岡)

5) 小泉昂範、稲垣雄介、馬場沙弥佳、松本直
樹、林 康広、佐々木洋子、杉浦 隆之、
山下 純

細胞内ホスホリパーゼ A1 の膵臓癌細胞の増
殖、生存への影響

日本薬学会第 136 年会 (2016 年 3 月 26 日 ~
29 日、横浜)

6) 中島 圭佑、谷川 尚、山下 純、渡邊真知
子、杉浦 隆之、岡 沙織

各種 1-アシル型および 2-アシル型リゾホス
ファチジルイノシトール(LPI)の調製と生物
活性の比較

日本薬学会第 136 年会 (2016 年 3 月 26 日 ~
29 日、横浜)

7) 谷川 尚、岡 沙織、中島圭佑、山下 純、
杉浦 隆之

G タンパク質共役型受容体 GPR55 のマウス
免疫系細胞における発現及び機能について

日本薬学会第 136 年会 (2016 年 3 月 26 日 ~
29 日、横浜)

8) 林 康広、佐々木洋子、松本直樹、荒井齊
祐、和田郁夫、杉浦隆之、山下 純

スフィンゴミエリン合成酵素の C 末端を介
したホモオリゴマー形成はゴルジ体への輸
送に重要である

脂質生化学研究 Vol. 58, p183-186, 2016

第 58 回日本脂質生化学会・研究集会 (平成
28 年 6 月 9 日、10 日、秋田)

9) 谷川和也、林 康広、中村康宏、原田史子、
山下 純、野尻久雄、唐澤 健

巨核芽球形白血病細胞株: CMK-7 の分化に
おける PAF の関与

脂質生化学研究 Vol. 58, p122-124, 2016

第 58 回日本脂質生化学会・研究集会 (平成

28 年 6 月 9 日、10 日、秋田)

10) 林康広、佐々木洋子、松本直樹、荒井齊
祐、和田郁夫、杉浦隆之、山下 純

スフィンゴミエリン合成酵素のオリゴマー
形成には C 末端が重要である

第 11 回スフィンゴセラピー (STC) 研究会【私
立大学戦略的研究基盤形成事業共催】

平成 28 年 7 月 14 日 (木) ~16 日 (土)、石
川県加賀市

11) 林 康広、佐々木洋子、松本直樹、光武 進、
杉浦隆之、山下 純

スフィンゴミエリン合成酵素 2 は HIV-1 の膜
融合を促進する

第 17 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム
(2016 年 9 月 3 日 (土) ~4 日 (日)、東京)

12) 稲垣雄介、小泉昂範、馬場沙弥佳、坂本
沙祐里、松岡瑛里加、松本直樹、林 康広、
佐々木洋子、杉浦隆之、山下 純

細胞内ホスホリパーゼ A1 の膵臓癌細胞の増
殖、生存への影響

第 17 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム
(2016 年 9 月 3 日 (土) ~4 日 (日)、東京)

13) 小泉昂範、稲垣雄介、馬場沙弥佳、坂本
沙祐里、松岡瑛里加、松本直樹、林 康広、
佐々木洋子、杉浦隆之、山下 純

細胞内ホスホリパーゼ A1 の膵臓癌細胞のミ
トコンドリア機能への影響

第 17 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム
(2016 年 9 月 3 日 (土) ~4 日 (日)、東京)

14) Yasuhiro Hayashi, Yoko Nemoto-Sasaki,
Naoki Matsumoto, Takashi Tanikawa, Saori Oka,
Yusuke Tanaka, Seisuke Arai, Ikuo Wada,
Takayuki Sugiura, and Atsushi Yamashita

Carboxyl-terminal tail-mediated
homodimerizations of sphingomyelin synthases
are responsible for efficient ER export

48th Asia-Pacific Academic Consortium for
Public Health Conference, Teikyo University,
Tokyo, Japan, September 16-19, 2016

15) Takanori Koizumi, Yusuke Inagaki, Naoki
Matsumoto, Yasuhiro Hayashi, Yoko
Nemoto-Sasaki, Takashi Tanikawa, Saori Oka,
Takayuki Sugiura, Atsushi Yamashita

Effects of intracellular phospholipase A1 on cell
proliferation of pancreatic cancer cells.

48th Asia-Pacific Academic Consortium for
Public Health Conference, Teikyo University,
Tokyo, Japan, September 16-19, 2016

16) 小泉 昂範、稲垣 雄介、松本直樹、林 康
広、佐々木洋子、杉浦隆之、山下 純

細胞内ホスホリパーゼ A1 の膵臓癌細胞増殖
に対する影響

第 89 回日本生化学会大会 (2016 年 9 月 25 日 (日) ~27 日 (火)、仙台)

17) 林 康広、佐々木洋子、松本直樹、荒井 齊祐、和田郁夫、杉浦隆之、山下 純

スフィンゴミエリン合成酵素の C 末端を介したホモオリゴマー形成はゴルジ体への輸送に関与する

第 89 回日本生化学会大会 (2016 年 9 月 25 日 (日) ~27 日 (火)、仙台)

18) 岡 沙織、谷川 尚、山下 純、渡邊真知子、杉浦 隆之、中島 圭佑

GPR55 リガンドとしての各種 1-アシル型および 2-アシル型リゾホスファチジルイノシトール(LPI)の生物活性の比較

第 89 回日本生化学会大会 (2016 年 9 月 25 日 (日) ~27 日 (火)、仙台)

19) 谷川 尚、岡 沙織、中島 圭佑、山下 純、杉浦 隆之

マウスリンパ球における G タンパク質共役型受容体 GPR55 の機能

第 89 回日本生化学会大会 (2016 年 9 月 25 日 (日) ~27 日 (火)、仙台)

20) 小泉 昂範、稲垣 雄介、松本 直樹、林 康広、佐々木 洋子、杉浦 隆之、山下 純

細胞内ホスホリパーゼ A1 の培養臍臓癌細胞のミトコンドリア機能への影響

日本薬学会第 137 年会、仙台 2017 年 3 月 25 日~27 日

21) 小泉 昂範、林 康広、松本 直樹、佐々木 洋子、杉浦 隆之、山下 純

細胞内型ホスホリパーゼによる CoA 非依存性トランスアシルーション反応

日本薬学会第 137 年会、仙台 2017 年 3 月 25 日~27 日

22) 林 康広、佐々木洋子、松本直樹、土屋 亮人、杉浦隆之、山下 純

スフィンゴミエリン合成酵素 2 は HIV-1 の膜融合を促進する

第 27 回抗ウイルス療法学会学術集会・総会 (2017 年 5 月 18 日~20 日、熊本県 くまもと県民交流館パレア)

23) 林康広、佐々木洋子、松本直樹、濱弘太郎、小泉昂範、横山和明、荒田洋一郎、杉浦隆之、山下 純

セラミドグルコシルトランスフェラーゼとスフィンゴミエリン合成酵素 1 のヘテロ複合体形成の解析

脂質生化学研究 Vol. 59, p142-145, 2017.

第 59 回日本脂質生化学会・研究集会 (平成 29 年 6 月 15 日、16 日、京都)

24) 濱弘太郎、藤原優子、山下 純、横山和明
ABCD1 ノックアウト細胞における極長鎖脂

肪酸 CoA の定量

脂質生化学研究 Vol. 59, p132-134, 2017.

第 59 回日本脂質生化学会・研究集会 (平成 29 年 6 月 15 日、16 日、京都)

25) 濱弘太郎、藤原優子、山下 純、横山和明
ABCD1 ノックアウト細胞における極長鎖脂

肪酸 CoA の定量

第 42 回日本医用マスメクトル学会年会 (平成 29 年 9 月 14 日 (木)・15 日 (金)、一橋講堂 (学術総合センター2F) 東京)

26) 濱弘太郎、藤原優子、山下 純、横山和明
ABCD1 欠損細胞中の極長鎖脂肪酸 CoA の定量

第 59 回日本先天代謝異常学会総会 (2017 年 10 月 12 日 (木) ~14 日 (土)、川越)

27) 小泉昂範、加納莉夏、稲垣雄介、松本直樹、林康広、佐々木洋子、荒田洋一郎、杉浦隆之、山下 純

細胞内ホスホリパーゼ A1 の細胞増殖およびミトコンドリア機能に及ぼす影響

ConBio2017 生命科学系学会合同年次大会 (第 90 回日本生化学会大会)

(2017 年 12 月 6 日 (水) ~9 日 (土)、兵庫県 神戸市)

28) 松本直樹、林 康広、佐々木洋子、小泉昂範、杉浦隆之、山下 純

細胞内ホスホリパーゼ A1 のリン酸化修飾による活性の制御

ConBio2017 生命科学系学会合同年次大会 (第 90 回日本生化学会大会)

(2017 年 12 月 6 日 (水) ~9 日 (土)、兵庫県 神戸市)

29) 林 康広、佐々木洋子、松本直樹、小泉昂範、川上紗英、野水 旭、濱 弘太郎、横山和明、山下 純

スフィンゴミエリン合成酵素 1 の SAM 領域はセラミドグルコシルトランスフェラーゼとのヘテロ複合体形成に関わる

ConBio2017 生命科学系学会合同年次大会 (第 90 回日本生化学会大会)

(2017 年 12 月 6 日 (水) ~9 日 (土)、兵庫県 神戸市)

30) 谷川 尚、岡 沙織、中島圭佑、山下 純、荒田洋一郎、杉浦 隆之

G タンパク質共役型受容体 GPR55 リガンドのリンパ球に及ぼす影響

ConBio2017 生命科学系学会合同年次大会 (第 90 回日本生化学会大会)

(2017 年 12 月 6 日 (水) ~9 日 (土)、兵庫県 神戸市)

31) 濱弘太郎、藤原優子、山下 純、横山和明
ABCD1 ノックアウト細胞における極長鎖脂

肪酸 CoA の定量

ConBio2017 生命科学系学会合同年次大会
(第90回日本生化学会大会)
(2017年12月6日(水)～9日(土)、兵庫県神戸市)

32) Yasuhiro Hayashi, Yoko Nemoto-Sasaki, Naoki Matsumoto, Atsushi Yamashita
Sphingomyelin synthase 1 forms a complex with glucosylceramide synthase that is involved in the regulation of selective ceramide usage.
Gordon Research Conference
The Biochemistry, Biophysics and Physiology of Glycolipid and Sphingolipid Biology
February 11 - 16, 2018, Galveston, TX, US

33) 松本直樹、林 康広、佐々木洋子、小泉昂範、杉浦隆之、山下 純
細胞内ホスホリパーゼ A1 のリン酸化修飾による活性の制御
日本薬学会第138年会(2018年3月25日(日)～28日(水)、石川県 金沢市)

34) 谷川 尚、岡 沙織、中島 圭佑、山下 純、荒田 洋一郎、杉浦 隆之
カンナビノイド CB2 受容体の免疫系細胞における発現及び機能について
日本薬学会第138年会(2018年3月25日(日)～28日(水)、石川県 金沢市)

[その他] ホームページ

<http://www.e-campus.gr.jp/staffinfo/public/staff/detail/460/16>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 純 (YAMASHITA ATSUSHI)

帝京大学・薬学部・教授

研究者番号：80230415

(2) 連携研究者

佐々木 洋子 (NEMOTO-SASAKI YOKO)

帝京大学・薬学部・講師

研究者番号：90324110

林 康広 (HAYASHI YASUHIRO)

帝京大学・薬学部・助教

研究者番号：70582857

松本 直樹 (MATSUMOTO NAOKI)

帝京大学・薬学部・助教

研究者番号：40447834