

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11636

研究課題名（和文）脂質・鉄代謝異常の変化に着目した神経変性疾患の新規病態発症メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of Novel Pathogenesis Mechanisms of Neurodegenerative Diseases Focusing on Alterations in Lipid and Iron Metabolism

研究代表者

松本 直樹 (Naoki, Matsumoto)

帝京大学・薬学部・助教

研究者番号：40447834

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：脂質代謝酵素であるDDHD1は内因性カンナビノイドの産生酵素であり、ある特定の種類の神経変性疾患の原因遺伝子である。今回の研究では、DDHD1がリン酸化修飾を受けるタンパク質であり、そのリン酸化がDDHD1の機能を調節することを明らかにした。また、修飾酵素をいくつか同定し、その標的部位を特定した。DDHD1が鉄代謝とクロストークする新たな現象もいくつか見つけている。一例として、鉄の蓄積がDDHD1の機能低下をもたらすことを明らかにした。DDHD1の機能調節異常は脂質代謝の恒常性破綻を引き起こし、様々な神経変性疾患の発症や病態の増悪につながると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢社会の到来により、神経変性疾患を含む加齢関連疾患はますます増加の途をたどっている。本研究は、神経変性疾患の病態発現に関わる脂質代謝酵素の新しい機能制御機構を明らかにした。また、この脂質代謝酵素が鉄代謝とクロストークすることを初めて示した。脂質や鉄の代謝異常に着目して、神経変性疾患などの病態発症メカニズムの一端を理解することは、治療や発症予防の対策を講じる上で、極めて有用な情報・知識の集積をもたらす。究極的には健康寿命の延伸につながり、医療費の削減に貢献することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：DDHD1, a lipid-metabolizing enzyme, is an endogenous cannabinoid-producing enzyme and the causative gene for certain types of neurodegenerative diseases. In this study, we showed that DDHD1 is a phosphorylated protein, and that its phosphorylations change DDHD1 function. We identified several responsible kinase and phosphatase, and their targeted phosphorylation sites. We also found several new phenomena in which DDHD1 is associated with iron metabolism. As an example, we found that iron ions reduce the PLA1 activity of DDHD1, and that dysregulation of DDHD1 function leads to a disruption of lipid metabolism homeostasis, leading to the development and exacerbation of various neurodegenerative diseases.

研究分野：生化学

キーワード：脂質代謝 鉄代謝 神経変性疾患 ホスホリパーゼ 翻訳後修飾 機能調節

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ホスホリパーゼ A1 (PLA1) は細胞膜を構成するグリセロリン脂質の 1 位のエステル結合を切断する酵素であり、膜脂質の再構成や生理活性脂質の産生に参与する。PLA1 は細胞外型と細胞内型の 2 つのファミリーに分類され、哺乳動物の細胞内型 PLA1 は 3 種類 (DDHD1, DDHD2, p125) が存在する。

DDHD1 は初めホスファチジン酸 (PA) をよい基質として好む細胞内型 PLA1 (PA-PLA1) として同定された。その後、幅広い基質特異性が確認され、私たちは DDHD1 がカンナビノイド受容体 GPR55 の内在性リガンド (リゾホスファチジルイノシトール) の産生酵素として働くことを見いだした。また、DDHD1 は神経変性疾患である遺伝性痙性対麻痺 SPG28 亜種の原因遺伝子であることを明らかにした。その変異や活性制御異常による機能低下は、様々な神経変性疾患の発症や病態の進展に関わると考えられる。しかし、病態発現に至る過程や、DDHD1 の機能を制御する機構はわかっていない。

2. 研究の目的

本研究課題では、DDHD1 の機能がどのような分子機構により調節されるか明らかにする。最終的には、DDHD1 の機能異常がどのように脳・神経系に影響を及ぼし神経変性疾患の病態発現に導くか解明する。そのため、以下の項目を検討した。

- (1) DDHD1 の翻訳後修飾とその修飾部位の同定
- (2) DDHD1 のリン酸化が機能に与える影響、病態との関係
- (3) DDHD1 の責任キナーゼ及びホスファターゼの同定、その標的部位の同定
- (4) 鉄代謝が DDHD1 の機能に及ぼす影響、病態との関係

3. 研究の方法

- (1) DDHD1 が代表的な翻訳後修飾であるリン酸化を受けるか検討するため、DDHD1 を過剰発現させた HEK293 細胞の抽出液を、非リン酸化型とリン酸化型を分離できる Phos-tag SDS-PAGE に展開し解析した。
- (2) DDHD1 のリン酸化部位を同定するため、ホスファターゼ阻害剤 (オカダ酸) で処理した細胞から精製した DDHD1 由来のリン酸化ペプチドを、IMAC 法や TiO_2 、 ZrO_2 により濃縮し、MALDI-TOF MS/MS に供して解析した。リン酸化部位候補をアラニンに置換した非リン酸化変異体を作製し、Phos-tag SDS-PAGE を用いて、野生型と泳動パターンを比較することより、標準的な培養条件下 (10% FBS, 25 mM glucose) で修飾を受けている主要なリン酸化部位を特定した。
- (3) DDHD1 のリン酸化が PLA1 活性に与える影響を検討するため、主要なリン酸化部位をグルタミン酸に置換したリン酸化模倣変異体を作製した。グリセロホスホエタノールアミンを基質として活性を測定し野生型と比較した。
- (4) DDHD1 のリン酸化が細胞内局在に与える影響を検討するため、非リン酸化変異体とリン酸化模倣変異体 (あるいは野生型) を COS-7 細胞に人為的に共局在させ共焦点顕微鏡にて解析した。
- (5) DDHD1 の責任キナーゼを同定するため、発現・精製したキナーゼ候補を脱リン酸化した DDHD1 と混和し *in vitro* kinase assay を行った。反応産物を Phos-tag SDS-PAGE により解析しリン酸化の有無を確認した。同定したい部位以外のリン酸化部位をすべてアラニンに置換した部分的な非リン酸化変異体を作製し、キナーゼによりリン酸化されるか検討することで標的部位を特定した。
- (6) 脳・神経系で発現が高いホスファターゼが DDHD1 を脱リン酸化するか、ホスファターゼとリン酸化型 DDHD1 を混和し *in vitro* phosphatase assay を行い、Phos-tag SDS-PAGE にて解析した。(5) と同様の方法により標的部位も特定した。
- (7) 生体内微量元素が DDHD1 の PLA1 活性に影響を与えるか検討するため、6 種類の二価金属イオン存在下、細胞内型 PLA1 (DDHD1, DDHD2) の酵素活性を測定した。
- (8) 鉄および亜鉛の細胞内型 PLA1 における活性阻害 (機能低下) がどのように起こるのか検討するため、オリゴマー形成への影響を共免疫沈降法により解析した。亜鉛においてはタンパク質の凝集の可能性が疑われたため、PROTEOSTAT[®] タンパク質凝集測定アッセイにより確認した。
- (9) 鉄と相互作用する DDHD1 のアミノ酸を特定するため、候補となる残基の一アミノ酸置換体を作製し、鉄による阻害率を野生型と比較した。

4. 研究成果

- (1) Phos-tag SDS-PAGE はアクリルアミドと共重合した Phos-tag がリン酸化タンパク質を捕捉し、移動度の違いにより非リン酸化体とリン酸化体を分離する手法である。DDHD1 がリン酸化修飾を受けるか検討したところ、DDHD1 は複数のバンドとして観察され、さらにホスファターゼ阻害剤であるオカダ酸によりバンドが大きく上方へシフトすることから、DDHD1 が複数の部位でリン酸化修飾を受けるタンパク質であることが判明した。
- (2) MALDI-TOF MS/MS を用いて、DDHD1 のリン酸化部位を同定したところ、10 ヶ所以上のセリン及びスレオニン残基をリン酸化部位の候補として同定した。非リン酸化変異体を用いた解析では、8 番目、11 番目、727 番目のセリンをアラニンに置換した変異体 (S8A, S11A, S727A) のバンドが野生型と比べ下方に現れたことから、これらの部位でリン酸化が起こることがわかった。標準的な培養条件下 (10% FBS, 25 mM glucose) HEK293 細胞、HeLa 細胞、HepG2 細胞、PANC-1 細胞において、8 番目、11 番目、727 番目のセリンが DDHD1 の主要なリン酸化部位であることを明らかにした。
- (3) DDHD1 のリン酸化が PLA1 活性に与える影響を検討したところ、11 番目と 727 番目のセリンを、リン酸化セリンに類似構造をもつグルタミン酸に置換した変異体 (S11E, S727E, S11/727E) は野生型と比較し、PLA1 活性の有意な低下が観察された。野生型、置換体の活性測定は HEK293 細胞に発現・精製したものをを用いているが、ラムダプロテインホスファターゼで脱リン酸化した場合においても、多少の程度の減弱は認められたものの、S11E, S727E, S11/727E で活性の低下が観察された。この 2 ヶ所のリン酸化が、他のリン酸化部位と協調して、DDHD1 の PLA1 活性を負に制御する可能性が示唆された。
- (4) DDHD1 のリン酸化が細胞内局在に与える影響を検討するため、まずは COS-7 細胞に DDHD1 を発現させたところ、細胞質に一樣に分布するだけでなく、部分的にパキシリン a (接着点のマーカ―) と共局在することがわかった。PLA1 活性の制御にも関わるリン酸化模倣変異体 (S11/727E) と非リン酸化変異体 (S11/727A) を共発現させたところ、S11/727E は S11/727A より明らかに多く接着点へ局在していることが確認された。S11/727A と野生型 DDHD1 (11 番目と 727 番目のセリンの大半はリン酸化されている) の細胞内局在の比較においても、同様の傾向が観察されたことから、DDHD1 のこの 2 ヶ所のリン酸化は細胞内における自身の接着点への局在を促進することが判明した。
- (5) DDHD1 のリン酸化部位周辺の配列から、作用が予測される 20 種類程度を責任キナーゼの候補として選定し、脱リン酸化した DDHD1、ATP とともに反応させた。CDK1, CDK5, CK2a1 を含む 5 種類以上で、DDHD1 のシフトアップバンド (リン酸化された DDHD1) を観察し、これらのキナーゼが DDHD1 の責任キナーゼであることが判明した。部分的な非リン酸化変異体を用いてシフトアップバンドが現れるか解析を行い、これらのキナーゼの DDHD1 における標的部位を特定した。そのほとんどは 8 番目、11 番目、727 番目のセリンであったが、CK2a1 はマイナーなリン酸化部位である 104 番目のセリンをリン酸化することがわかった。また CDK5 活性の上昇は神経変性疾患における神経細胞死と関連が知られているが、共免疫沈降法により DDHD1 との生理的な相互作用を確認するとともに、CDK5 は 11 番目と 727 番目のセリンをリン酸化し、*in vitro* ではあるが、PLA1 活性を軽度抑制する可能性が示唆された。未だ責任キナーゼが未同定のリン酸化部位も存在するため、引き続き研究を進める予定である。
- (6) ヒトの脳で高く発現する主要な 4 種類のセリン/スレオニンホスファターゼ (PP1, PP2A, PP2B, PP2C) が DDHD1 を脱リン酸化するか検討したところ、PP2C を除く 3 種類のホスファターゼが関与することを明らかにした。また、脱リン酸化する部位の特定を試みたところ、ホスファターゼ抵抗性の部位が 3 種類のホスファターゼに共通して存在することを見つけた。このテーマに関しては、別のホスファターゼによる反応やアイソフォームの違いにより変化はあるか、また DDHD1 は細胞内で大部分がリン酸化体として存在するため、*in vivo* において検証も可能であり、引き続き研究を進める予定である。
- (7) 6 種類の生体内微量元素イオンによる PLA1 活性への影響を評価したところ、DDHD1 は濃度に依存して鉄と亜鉛により活性が抑制された。一方、DDHD2 は銅と亜鉛により著しい酵素活性の抑制を認め、ニッケルにより活性が促進された。同じ細胞内型 PLA1 でも金属イオンにより反応性が異なることが判明した。DDHD2 は PLA1 活性に加え、トリアシルグリセロール (TG) やジアシルグリセロールを加水分解するリパーゼ活性をもつことが報告されている。DDHD2 の TG に対するリパーゼ活性は、亜鉛でのみ強い阻害作用が認められ、PLA1 活性に及ぼす金属イオンの影響とは異なることがわかった。

- (8) DDHD1 及び DDHD2 の酵素複合体形成における金属イオンの影響をみたところ、共免疫沈降法にて両酵素ともに亜鉛が凝集を引き起こしている可能性が示唆された。そこで、PROTEOSTAT[®] タンパク質凝集測定アッセイにより確認したところ、亜鉛でのみタンパク質凝集体に由来する蛍光を検出した。亜鉛による強力な活性阻害作用（DDHD1 の PLA1 活性、DDHD2 の PLA1 活性、DDHD2 のリパーゼ活性）はタンパク質の凝集によることが判明し、鉄や銅による活性阻害とはメカニズムが異なることがわかった。細胞内においても亜鉛が高濃度に存在すると DDHD1 が凝集するか検出する系を現在構築中であり、引き続き研究を進める予定である。
- (9) DDHD1 の N 末端側の 347 アミノ酸を欠く変異体はある程度の活性を保持しており、鉄による活性阻害の程度に大きな変化はみられなかったことから、特に C 末端側のアミノ酸が鉄と相互作用する可能性が高いと考えられた。DDHD1 及び DDHD2 の C 末端側に存在する DDHD ドメインは金属イオンとの相互作用に関わると考えられている。そこで、その中心的な役割を果たす 4 つのアミノ酸残基が鉄の阻害効果に必須であるか検討したが、大きな差は認められず、関与は小さいと考えられた。しかしながら、1 つのアミノ酸に関してはどの一アミノ酸置換体においても活性が完全に失われたため、活性阻害を指標にした比較ができなかった。この代替不可能なアミノ酸に対して鉄の相互作用が確認できれば、活性へ与える影響は非常に大きいと考えられる。現在、このアミノ酸をターゲットとした複数の置換体の鉄に対する結合親和性を測定し野生型と比較することを検討している。
- 鉄による活性阻害は、神経変性疾患の病態発現に関わる同じ細胞内型 PLA1 の DDHD2 には認められない特徴である。DDHD2 のアミノ酸配列との比較により、相同でない C 末端側のシステインとヒスチジン（中性領域で金属イオンが配位結合する代表的なアミノ酸）を標的として、DDHD1 の一アミノ酸置換体を作製し、活性阻害の程度を指標に相互作用を検討したところ、5 カ所において可能性が感じられた。そこで、5 カ所すべてを置換した変異体を作製し比較を試みたが、期待したほどの相加あるいは相乗効果は得られなかった。現在までのところ、鉄と特異的に強く相互作用する単一のアミノ酸部位の同定までは至っておらず、引き続き検討を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakajima Keisuke, Oka Saori, Tanikawa Takashi, Nemoto-Sasaki Yoko, Matsumoto Naoki, Ishiguro Hiroki, Arata Yoichiro, Sugiura Takayuki, Yamashita Atsushi	4. 巻 23
2. 論文標題 Lysophosphatidylinositol Induced Morphological Changes and Stress Fiber Formation through the GPR55-RhoA-ROCK Pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 10932 ~ 10932
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms231810932	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 Matsumoto Naoki, Yamashita Atsushi, Nemoto-Sasaki Yoko, Oka Saori, Arai Seisuke, Wada Ikuo	4. 巻 675
2. 論文標題 Phosphorylation and subcellular localization of human phospholipase A1, DDHD1/PA-PLA1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Methods in Enzymology	6. 最初と最後の頁 235 ~ 273
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/bs.mie.2022.07.011	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 Matsumoto Naoki, Nemoto-Sasaki Yoko, Oka Saori, Arai Seisuke, Wada Ikuo, Yamashita Atsushi	4. 巻 297
2. 論文標題 Phosphorylation of human phospholipase A1 DDHD1 at newly identified phosphosites affects its subcellular localization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100851 ~ 100851
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2021.100851	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 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松本直樹、原恭平、佐竹勝行、鈴木亜深、矢崎智大、佐々木洋子、山下純
2. 発表標題 細胞内型ホスホリパーゼA1のリン酸化・脱リン酸化酵素とその標的部位の同定
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 佐々木洋子, 林康広, 吉川慶美, 吉田裕香子, 石本奈保, 田中万結, 佐々木紀彦, 松本直樹, 岡沙織, 入村達郎, 山下純
2. 発表標題 肝転移性の異なる大腸がん細胞株におけるホスファチジルコリンおよびホスファチジルエタノールアミン含有量の比較
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 松本 直樹, 浦山 和香子, 除川 杏実, 佐々木 洋子, 山下 純
2. 発表標題 細胞内型ホスホリパーゼA1の酵素活性に対する鉄及び亜鉛の阻害機構の解析
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 結城桜, 菅野愛奈, 森田祐基, 山本滉大, 松本直樹, 佐々木洋子, 岡沙織, 荒井齊祐, 和田郁夫, 山下純
2. 発表標題 ホスホリパーゼA1 DDHD1のアフィニティプローブによる検出とリン酸化による細胞内局在の解析
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐々木洋子, 林康広, 佐々木紀彦, 松本直樹, 岡沙織, 入村達郎, 山下純
2. 発表標題 マウス大腸がん細胞株と肝高転移性の垂株におけるホスファチジルコリンおよびホスファチジルエタノールアミン含有量の比較
3. 学会等名 第82回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松本直樹、佐々木洋子、岡沙織、荒井育祐、和田郁夫、山下純
2. 発表標題 細胞内型ホスホリパーゼA1の機能制御
3. 学会等名 第6回帝京大学研究交流シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 結城桜、菅野愛奈、森田祐基、山本滉大、松本直樹、佐々木洋子、岡沙織、荒井育祐、和田郁夫、山下純
2. 発表標題 ホスホリパーゼA1 DDHD1のアフィニティプローブによる検出とリン酸化による細胞内局在の解析
3. 学会等名 第23回Pharmacology-Hematologyシンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山下純、松本直樹、結城桜、菅野愛菜、森田祐基、山本滉大、佐々木洋子、岡沙織、荒井育祐、和田郁夫
2. 発表標題 細胞内型ホスホリパーゼA1 DDHD1はリン酸化により接着点 (Focal adhesion) へ局在する
3. 学会等名 第65回日本脂質生化学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松本直樹、除川杏実、浦山和香子、佐々木洋子、山下純
2. 発表標題 細胞内型ホスホリパーゼA1の酵素活性に対する二価金属イオンの反応性の相違と相互作用の解析
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐々木洋子、林康広、佐々木紀彦、松本直樹、岡沙織、入村達郎、山下純
2. 発表標題 大腸がん細胞株の親株と肝高転移性の亜株におけるリゾホスファチジルコリンアシルトランスフェラーゼ (LPCAT) 発現量の比較
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松本 直樹、佐々木 洋子、岡 沙織、荒井 育祐、和田 郁夫、山下 純
2. 発表標題 ヒト細胞内型ホスホリパーゼA1のリン酸化は細胞内局在の制御に関わる
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松本 直樹、佐々木 洋子、岡 沙織、荒井 育祐、和田 郁夫、山下 純
2. 発表標題 細胞内型ホスホリパーゼA1の機能制御
3. 学会等名 第5回帝京大学研究交流シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松本 直樹、佐々木 洋子、岡 沙織、荒井 育祐、和田 郁夫、山下 純
2. 発表標題 細胞内型ホスホリパーゼA1 のリン酸化と細胞内局在の変化
3. 学会等名 第64回日本脂質生化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松本直樹、佐々木洋子、岡沙織、荒井斉祐、和田郁夫、山下純
2. 発表標題 ヒト細胞内型ホスホリパーゼA1のリン酸化が細胞内局在に与える影響
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松本直樹、佐々木洋子、岡沙織、荒井斉祐、和田郁夫、山下純
2. 発表標題 ヒト細胞内型ホスホリパーゼA1のリン酸化が細胞内局在に与える影響
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松本 直樹、遠田 由希乃、鈴木 健太、瀧本 苗、濱野 優輝、高橋 彩香、浦山 和香子、佐々木 洋子、山下 純
2. 発表標題 ヒトDDHD1のリン酸化と責任キナーゼの同定
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

帝京大学薬学部ホームページ
<http://www.pharm.teikyo-u.ac.jp/>
 帝京大学薬学部ホームページ
<http://www.pharm.teikyo-u.ac.jp/>

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