

神経細胞で産生される
ホスファチジン酸分子種の同定
とその機能の解析

千葉大学大学院 理学研究科
基盤理学専攻 化学コース

水野悟

【目次】

●目次 [2-3 ページ]

●要約 [4 ページ]

●略号 [5 ページ]

●第1章: 神経分化誘導で産生されるホスファチジン酸分子種及び産生酵素の同定とその機能の解析

1-1 緒言 [7 ページ]

1-2 試薬と実験手法 [8-12 ページ]

1-2-1 試薬及び実験機器・器具

1-2-2 細胞培養、分化誘導、トランスフェクション、逆転写 PCR (RT-PCR)

1-2-3 Bligh&Dyer 法による細胞からの総脂質の抽出

1-2-4 PA 分子種の測定

1-2-5 DG 分子種の測定

1-2-6 細胞形態変化の観察

1-2-7 統計処理

1-3 結果 [13-48 ページ]

1-3-1 RA による神経分化誘導で産生される PA 分子種の解析

1-3-2 血清飢餓による神経分化誘導で産生される PA 分子種の解析

1-3-3 ホスホリパーゼ D (PLD) の阻害による 32:0-PA 産生酵素の探索

1-3-4 DGK δ の発現抑制による 32:0-PA 産生酵素の探索

1-3-5 DGK ζ の発現抑制による 32:0-PA 産生酵素の探索

1-3-6 DGK ζ の過剰発現による 32:0-PA 産生への影響

1-3-7 DGK ζ の発現抑制による神経突起形成への影響

1-3-8 神経分化誘導時の DG 分子種の解析

1-4 考察 [49-51 ページ]

●第2章: ホスファチジン酸分子種の α -シヌクレインとの結合能の解析及び2次構造と凝集能への影響

2-1 緒言 [53 ページ]

2-2 試薬と実験手法 [54-56 ページ]

2-2-1 試薬

2-2-2 リポソームの調製

- 2-2-3 PA 結合蛋白質としての α -シヌクレインの同定
- 2-2-4 α -シヌクレインのクローニング及び 6×His タグ融合 α -シヌクレインの精製
- 2-2-5 脂質結合試験
- 2-2-6 CD スペクトル解析
- 2-2-7 PK 耐性試験
- 2-2-8 統計処理
- 2-3 結果 [57–74 ページ]
 - 2-3-1 マウス脳からの 16:0/16:0-PA 結合蛋白質の同定
 - 2-3-2 α -シヌクレインのクローニング及び 6×His タグ融合 α -シヌクレインの精製
 - 2-3-3 精製 α -シヌクレインを用いた PA 分子種別結合試験
 - 2-3-4 α -シヌクレインの 18:1/18:1-PA 及び 18:1/18:1-PS との結合強度の比較
 - 2-3-5 α -シヌクレインの 2 次構造への 18:1/18:1-PA リポソームの影響
 - 2-3-6 精製 α -シヌクレインを用いた PA 結合による凝集能への影響の評価
- 2-4 考察 [75–77 ページ]
- 参考文献 [78–80 ページ]
- 謝辞 [81 ページ]

【要約】

ホスファチジン酸 (PA) は、細胞膜を構成するグリセロ脂質の一つで、細胞の分裂・遊走・分化などの様々な細胞機能に関与している。PA はグリセロール骨格の 1 位と 2 位に脂肪酸を結合した構造を有し、2 つの脂肪酸の組み合わせから 50 種以上の分子種が存在する。しかしながら、細胞刺激に応答して産生される PA 分子種はほとんど分かっていない。本研究では、神経細胞で産生される PA 分子種を同定し、その機能を調べることを目的とした。

神経分化誘導を行った Neuro-2a 細胞 (マウス神経芽細胞腫) 中の PA 分子種量を、最近我々が開発した高感度・高再現性の液体クロマトグラフィー・質量分析法を用いて測定した。その結果、分化誘導によって 16:0/16:0-PA (X:Y=脂肪酸の炭素数:脂肪酸の不飽和度) が顕著に増加すること、その増加は分化初期にみられること、ジアシルグリセロールキナーゼ ζ (DGK ζ) によってその一部が産生されることが分かった。また、DGK ζ の発現抑制によって神経突起の形成が抑制された。

PA 分子種別の結合蛋白質スクリーニングを行い、PA の相互作用因子として α -シヌクレインを同定した。 α -シヌクレインはその異常凝集がパーキンソン病発症の原因の一つであると考えられている。興味深いことに、18:1/18:1-PA が他の PA 分子種と比較して、 α -シヌクレインに対して顕著に強い結合親和性及び凝集促進能を示すことが分かった。

16:0/16:0-PA が神経突起形成に、18:1/18:1-PA が α -シヌクレインの凝集にそれぞれ関与することは、異なる PA 分子種が神経細胞内でそれぞれ重要な生命現象の調節因子として働いていることを示唆している。

【略号】

CBB, クマシーブリリアントブルー

CD, 円二色性

Chol, Cholesterol

DG, ジアシルグリセロール

DGK, ジアシルグリセロールキナーゼ

DMEM, ダルベッコ改変イーグル培地

DMSO, ジメチルスルホキシド

FBS, ウシ胎仔血清

FIPI, 5-Fluoro-2-indolyl deschlorohalopemide

HE, ヘマトキシリン・エオジン

IPTG, Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside

KD, Kinase dead

LC, 液体クロマトグラフィー

MS, 質量分析

PA, ホスファチジン酸

PBS, Phosphate buffered saline

PC, ホスファチジルコリン

PRMT8, Protein arginine methyltransferase 8

PLD, ホスホリパーゼ D

PS, ホスファチジルセリン

siRNA, Small interfering RNA

WT, Wild type

第 1 章

神経分化誘導で産生される
ホスファチジン酸分子種及び
産生酵素の同定とその機能の解析

1-1 緒言

ホスファチジン酸 (PA) は細胞膜を構成するリン脂質のひとつで、セカンドメッセンジャーとして細胞分裂 [1]・遊走 [2]・分化 [3] などの様々な生理機能を調節している。これまでに、PA は phosphatidylinositol-4 phosphate 5 kinase (4, 5)、mammalian target of rapamycin [1]、atypical protein kinase C [6]、p21 activated kinase [7, 8] などのシグナル分子を調節することが報告されている。細胞内シグナル脂質としての PA は、ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) によるジアシルグリセロール (DG) のリン酸化 [9-12] やホスホリパーゼ D (PLD) によるホスファチジルコリン (PC) の加水分解 [13-15] によって産生される。

PA はグリセロール骨格の 1 位と 2 位に脂肪酸が結合した構造を有し、その種類や組み合わせから細胞内には 50 種以上の PA 分子種が存在する。しかしながら、PA は微量成分で、且つ液体クロマトグラフィー (LC) 上で他の主要なリン脂質からの分離が難しく、再現性よく高感度な分析が困難であった。そのため、細胞内シグナル伝達でどのような PA 分子種が産生されるのかはほとんどわかっていない。我々は最近、移動相中のアンモニア濃度を高くし、他の主要なリン脂質よりもシリカカラムからの溶出を遅くすることで、高感度・高再現性の LC-質量分析法 (MS) を開発した [16]。本手法を用いた研究から、マウス細胞障害性 T 細胞である CTLL-2 細胞のインターロイキン-2 刺激によって 36:1-, 40:6-, 40:5-PA (X:Y=2 つの脂肪酸の炭素数の総和:2 つ脂肪酸の不飽和度の総和) が産生されること (16)、マウス骨格筋芽細胞である C2C12 細胞の高濃度グルコース刺激によって 30:0-, 30:1-, 32:0-, 32:1-, 34:0-, 34:1-PA が産生されること [17] を見出している。本研究 [18] では、同手法を用いて神経細胞で産生される PA 分子種を同定し、その機能を解析することを目的とした。

1-2 試薬と実験手法

1-2-1 試薬及び実験機器・器具

試薬

- ・ ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) (Wako, 044-29765)
- ・ ウシ胎仔血清 (FBS)
- ・ ペニシリン・ストレプトマイシン (Wako, 168-23191)
- ・ レチノイン酸 (RA) (Sigma Aldrich, 186-01114)
- ・ 高速液体クロマトグラフィー用クロロホルム (Wako, 039-08633)
- ・ LC/MS 用メタノール (Wako, 134-14523)
- ・ 高速液体クロマトグラフ用ヘキサン (Wako, 084-03421)
- ・ 試薬特級アンモニア水 (Wako, 016-03146)
- ・ 酢酸アンモニウム (Wako, 018-21041)
- ・ 5-Fluoro-2-indolyl deschlorohalopemide (FIPI) (Calbiochem)

実験機器・器具

- ・ 100 mm/Tissue Culture Dish (IWAKI, 3020-100)
- ・ トーマ血球計算盤 (サンリード硝子, A105)
- ・ ねじ付き試験管 (IWAKI, TST SCR 16-125)
- ・ ねじ付き試験管 (IWAKI, TST SCR 13-100)
- ・ キャップ TF ライナー付 (IWAKI, 84-0262)
- ・ キャップ TF ライナー付 (IWAKI, 84-0261)
- ・ 試験管ミキサーTRIO (High Type) (アズワン, 1-4611-11)
- ・ 短型バイオピペット (アズワン, 1-8575-01)
- ・ バイオピペット (アズワン, 1-8621-03)
- ・ ピペットポンプ (アズワン, 2-3018-03)
- ・ アイボトル (短型) (アズワン, 1-4567-13)
- ・ メディウム瓶 (PYREX®オレンジキャップ付) (アズワン, 1-4993-06)
- ・ オートクレーバブルボトルトップディスペンサー DISPET EX (NICHIRYO, 00-DPX-50)
- ・ パスツールピペット 9" ディスポーザブル (IWAKI, IK-PAS-9P)
- ・ ラボランスクリュウ管瓶 (9 mL) (アズワン, 9-852-05)
- ・ ラボランスクリュウ管瓶 (2 mL) (アズワン, 9-852-01)
- ・ マイクロシリンジ (HAMILTON, 20785-U)
- ・ 0.2 mL Sc-Vial トウメイ TopSert (ジーエルサイエンス, 1030-51028)
- ・ Blue screw tp, pre-slit PTFE/Si septa (Agilent Technologies, 5183-2076)

- Unison UK-Silica column (3 μ m, 150 $\times$ 2.0 mm, Imtakt, UKS25)
- Unison UK-C18 column (3 μ m, 150 $\times$ 2.0 mm, Imtakt, UK035)
- Accela LC Systems (Thermo Fisher Scientific)
- Exactive Orbitrap MS (Thermo Fisher Scientific)

1-2-2 細胞培養、分化誘導、トランスフェクション、逆転写 PCR (RT-PCR)

細胞培養

マウス神経芽細胞腫である Neuro-2a 細胞は European Collection of Authenticated Cell Cultures から取得した。Neuro-2a 細胞は、増殖用培地 (10% FBS、100 U/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシンを含む DMEM) で培養した。継代では 8.0×10^5 cells/100-mm dish となるように播種し、CO₂ インキュベータ内で 48 時間培養した。

RA による神経分化誘導

Neuro-2a 細胞を 100-mm dish に 5×10^5 cells/dish で播種して 24 時間培養し、RA (20 μ M) を添加した分化誘導用培地 (2% FBS、100 U/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシンを含む DMEM) へ置換して 24~72 時間培養した。コントロールの細胞は、ジメチルスルホキシド (DMSO) (0.1% v/v) を添加した分化誘導用培地で同様に培養した。

血清飢餓による神経分化誘導

Neuro-2a 細胞を 100-mm dish に 5×10^5 cells/dish で播種して 24 時間培養し、100 U/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシンを含む DMEM へ置換して 24 時間培養した。コントロールは、10% FBS、100 U/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシンを含む DMEM で 24 時間培養した。

Small interfering RNA (siRNA) のトランスフェクション

Neuro-2a 細胞を phosphate buffered saline (PBS) で 2 回洗浄し、 1×10^7 cells/mL となるように Neuro-2a 細胞を Opti-MEM で懸濁した。細胞懸濁液 800 μ L に対して 800 pmol の siRNA (GC Medium Duplex #2, DGK δ -siRNA, DGK ζ -siRNA #1, DGK ζ -siRNA #2) を加え、4 mm キュベット (ネッパジーン) に移した。siRNA の導入は Gene Pulser XcellTM electroporation system (Bio-Rad Laboratories) を用いたエレクトロポレーション法 (350 V, 300 μ F) により行った。細胞は増殖用培地に懸濁し、100 mm dish へと播種した。

DNA プラスミドのトランスフェクション

Neuro-2a 細胞を PBS で 2 回洗浄し、 1×10^7 cells/mL となるように Neuro-2a 細胞を DMEM に懸濁した。細胞懸濁液 570 μ L に対して 30 μ L の DNA プラスミド (1 μ g/ μ L) を

加え、4 mm キュベットに移した。プラスミドの導入は Gene Pulser Xcell™ electroporation system を用いたエレクトロポレーション法 (250 V, 400 μ F) により行った。細胞は増殖用培地に懸濁後、低速遠心 (1500 rpm, 3 min, 室温) にてエレクトロポレーションで破碎されてしまった細胞を除去し、再び増殖用培地に再懸濁し、100-mm dish へと播種した。

RT-PCR

Neuro-2a 細胞内及びマウス脳から mRNA を抽出し、オリゴ dT プライマーを用いた RT-PCR により各 cDNA を得た。これらの cDNA を鋳型として、DGK α ~ θ に特異的なプライマー (Table 1) を用いた PCR を行った。

Table 1. RT-PCR に用いたプライマーの配列

Gene	Foward primer	Reverse primer
DGK α	5'-GATGGCCAAAGAGAAGGGCC-3'	5'-GTCTTCTGGCCGGCCACC-3'
DGK β	5'-CCATGACAAACCAGGAAAAATGG-3'	5'-CCTCGGGTCTTCTCTTTTCG-3'
DGK γ	5'-GATGAGCGAAGAACAATGGG-3'	5'-CCTGAGGTCGCCCGGTC-3'
DGK δ	5'-GATCAGGCAACATCTGTAGCTCT-3'	5'-AGGCTGTCCCGGCTTCTCTGTA-3'
DGK η	5'-GGGAATTCCGGGAGCTACTACAGAGATC-3'	5'-GGGGGTCGACCTCCACAGAGTGTAAAGGCAC-3'
DGK κ	5'-GGGAATTCACCTTGGGCAACTACAGTGTT-3'	5'-GGGGGTCGACGGGTCACTTAGAGGTCGAGT-3'
DGK ϵ	5'-TGCCCCTGTGCTCTTACTGT-3'	5'-TCTCCAGCATAGCCTGTACC-3'
DGK ζ	5'-TCTGAGGAGCAGATCCAGAG-3'	5'-TTGCTGGCCTTGAGGGTGTT-3'
DGK ι	5'-TTCCTGTGGCTAACGGTCCA-3'	5'-TGCAGCATGAAGCAGGTCCAC-3'
DGK θ	5'-TCCAGCTGATTGAGGTGCTC-3'	5'-TAGCTCAAAGACCTGGTGCG-3'

1-2-3 Bligh&Dyer 法による細胞からの総脂質の抽出

細胞からの総脂質の抽出には Bligh&Dyer 法を用いた [19]。氷冷した PBS で細胞を洗浄し、1.5 mL チューブに移した。PBS に懸濁したサンプル 700 μ L をメタノール/クロロホルム/3N 塩酸 (2:1:0.1 (vol.)) に加えて、試験管ミキサーで 15 秒間攪拌し、30 分間室温で静置した。1 mL のイオン交換水と 1 mL のクロロホルムを加えた後に、試験管ミキサーで 30 秒間攪拌した。遠心後 (3000 rpm, 10 min, 室温)、下層のみを新しい試験管に移し、窒素気流で乾固し、クロロホルム/メタノール (2:1 (vol.)) の混合液を加えてラボランスクリー管瓶 (2 mL) に移し濃縮した。再び窒素気流で乾固し、窒素封入して -80°C で保存した。

1-2-4 PA 分子種の測定

細胞から抽出した総脂質に内部標準試料 (I.S.) として 300 ng の 14:0/14:0-PA を加えて、窒素気流下で乾固させた後、シリンジを用いて 75 μ L のクロロホルム/メタノール (2:1) を加えた。そのうち 10 μ L を UK-silica column (3 μ m, 150 $\times$ 2.0 mm) を連結した Accela LC Systems によって分離した。移動相として極性の低い溶媒 A (クロロホルム/メタノール/28%アンモニア水 = 89:10:1) と比較的極性の高い溶媒 B (クロロホルム/メタノール/28%アンモニア水/水 = 55:39:1:5) を用いた。溶媒 A と溶媒 B の比率を、0 – 5 min A:B (80:20), 5 – 25 min A:B (80:20 $\rightarrow$ 40:60), 25 – 30 min A:B (40:60 $\rightarrow$ 30:70), 30 – 40 min A:B (30:70) となるようにグラジエントをかけた。クロマトグラフィーは流速を 0.3 mL/min、25 $^{\circ}$ Cで行った。サンプルは 4 $^{\circ}$ C にしたトレイ上で測定まで保管した。Accela LC Systems で分離した試料を Exactive Orbitrap MS でイオン化及び検出を行った。イオン化法は高極性物質に適しており、フラグメントイオンをほとんど生成しない ESI を用いた。イオンスプレー電圧は、ネガティブイオンモードは -5.0 kV、ポジティブイオンモードは 5.0 kV に設定した。脱溶媒のため、キャピラリー温度は 300 $^{\circ}$ C に設定した。他のパラメーターは製造元の推奨に従い設定した。分離したリン脂質を分解能 50,000 の Orbitrap Fourier Transform MS で m/z 450~1100 のネガティブイオンとポジティブイオンとして測定した。検出されたイオンは Xcalibur software によって解析した。MS ピークは mass/charge (m/z) 比に基づいて同定し、これらの脂質の m/z 値は X:Y の形で表記した。X はリン脂質の 2 つの脂肪酸の炭素数の総和を、Y は 2 つの脂肪酸の不飽和度の総和を表している。30:0-, 32:0-, 34:0-PA の脂肪酸組成の同定は、MS/MS 解析により行った。35 eV の衝突エネルギーによりフラグメントイオンを得た。

1-2-5 DG 分子種の測定

細胞から抽出した総脂質に I. S. として 300 ng の 12:0/12:0-DG を加えて、窒素気流下で乾固させた後、シリンジを用いて 75 μ L のクロロホルム/メタノール (2:1 (vol.)) を加えた。そのうち 10 μ L を UK-C18 column (3 μ m, 150 $\times$ 2.0 mm) を連結した Accela LC Systems によって分離した。移動相として比較的極性の高い溶媒 C (ヘキサン/クロロホルム/メタノール/水/1 M 酢酸アンモニウム = 20:70:200:50:0.34) と極性の低い溶媒 D (ヘキサン/クロロホルム/メタノール/水/1 M 酢酸アンモニウム = 50:100:150:20:0.32) を用いた。溶媒 C と溶媒 D の比率を、0 – 4 min C:D (40:60 $\rightarrow$ 25:75), 4 – 8 min C:D (25:75), 8 – 13 min C:D (25:75 $\rightarrow$ 20.8:79.2), 13 – 18 min C:D (20.8:79.2 $\rightarrow$ 40:60), 18 – 20 min C:D (40:60) となるようにグラジエントをかけた。クロマトグラフィーは流速を 0.2 mL/min、25 $^{\circ}$ Cで行った。サンプルは 4 $^{\circ}$ C にしたトレイ上で測定まで保管した。Accela LC Systems で分離した試料を Exactive Orbitrap MS でイオン化及び検出を行った。イオン化法は高極性物質に適しており、フラグメントイオンをほとんど生成しない ESI を用いた。イオンスプレー電圧は 5.5 kV に設定した。脱溶媒のため、キャピラリー温度は 300 $^{\circ}$ C に設定

した。他のパラメーターは製造元の推奨に従い設定した。分離した脂質を分解能 50,000 の Orbitrap Fourier Transform MS で m/z 300~900 のポジティブイオンとして測定した。検出されたイオンは Xcalibur software によって解析した。MS ピークは m/z 比に基づいて同定した。

1-2-6 細胞形態変化の観察

細胞形態の観察はヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色により行った。Neuro-2a 細胞を 60-mm dish に播種し、培養および分化誘導処理を施した。培地を除き、PBS で洗浄した後、3.7%パラホルムアルデヒド/PBS で 15 分間処理して固定化した。PBS で洗浄した後、55°C に加温したマイヤーヘマトキシリン溶液で 5 分間処理し、55°C に加温した PBS で数回洗浄することで色出しを行った。次に、エオジン溶液で 5 分間処理し、PBS で 2 回洗浄した。マウント剤を滴下し、カバーガラスで封入した。

細胞形態は位相差顕微鏡を用いて観察した。各条件で 200 個以上の細胞を観測し、細胞体に対して 2 倍以上の突起を有する細胞を神経様細胞へと分化した Neuro-2a 細胞としてカウントした。

1-2-7 統計処理

統計処理は Student's *t*-test を用いて行った。

1-3 結果

1-3-1 RA による神経分化誘導で産生される PA 分子種の解析

Neuro-2a 細胞は、RA 処理及び血清飢餓によって神経様細胞へと分化するため、神経分化の研究で広く用いられている細胞株である。我々は、最初に Neuro-2a 細胞の神経分化誘導によって PA が増加するかどうか調べた。分化誘導のために、2% FBS 及び 20 μ M RA を含む分化誘導用培地で Neuro-2a 細胞を 24 時間培養した。コントロールとして、2% FBS 及び RA の溶媒である DMSO (0.1% (v/v)) を含む培地で同様に培養した。細胞形態を観察したところ、コントロール細胞は球形をしていたが、RA を添加した細胞ではその多くが長い神経突起を有しており、分化誘導が確認された (Fig. 1)。細胞から総脂質を抽出し、LC-MS で PA 分子種を測定した。DMSO と比較して、RA による分化誘導で総 PA 量は 2.0 倍に増加した (Fig. 2)。PA 分子種別の量的変動では、飽和脂肪酸を含有する PA 分子種が増加しており、一方で不飽和脂肪酸を含む PA 分子種は減少する傾向にあった (Fig. 3)。特に、32:0-PA が RA 処理によって 6.8 倍へと顕著に増加していた (Fig. 3)。

次に 32:0-PA が神経分化のどのタイミングで産生されるのかを調べた。2% FBS 及び 20 μ M RA を含む分化誘導用培地で Neuro-2a 細胞を 1~3 日間培養し、細胞内 32:0-PA 量を解析した。細胞形態を観察したところ、分化誘導をかけていない細胞は球状をしていたが、1~3 日間分化誘導をかけた細胞は長い神経突起を有していた (Fig. 4)。特に、分化 3 日目では枝分かれをしている突起を有する細胞が観測された。32:0-PA 産生量についてみると、分化 1~2 日目で顕著に増加し、分化 3 日目では分化 2 日目と比べて減少していた (Fig. 5)。

RA による神経分化誘導時に主に増加していた 30:0-, 32:0-, 34:0-PA について、MS/MS 解析によりその脂肪酸組成を調べた。その結果、30:0-PA は 14:0/16:0-PA が 100%であった (Table 2)。32:0-PA は 95%が 16:0/16:0-PA で、5%が 14:0/18:0-PA であった。34:0-PA は 100%が 16:0/18:0-PA であった。従って、RA による神経分化誘導では共通してパルミチン酸 (16:0) を含む PA 分子種が増加していることが分かった。

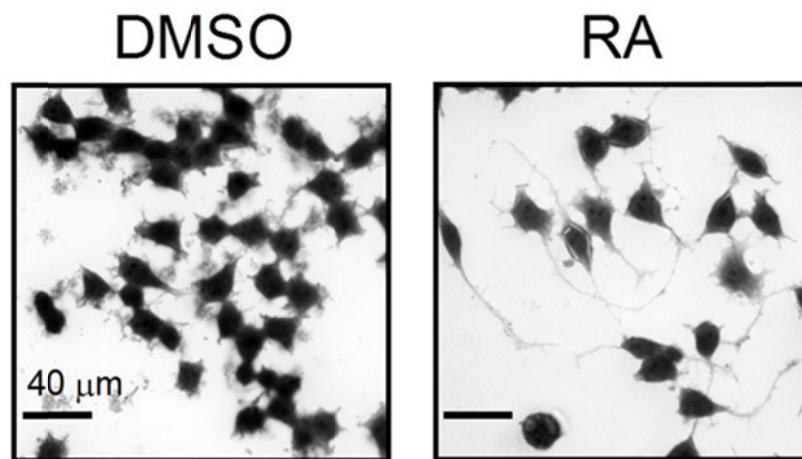


Fig. 1. RA による分化誘導時の細胞形態変化

RA (20 μ M) を添加した 2% FBS 含有培地で 24 時間培養することで、Neuro-2a 細胞の分化誘導を行った。コントロールとして、RA の溶媒である DMSO を同量 (0.1% (v/v)) 加えた 2% FBS 含有培地で培養を行った。その後、ホルムアルデヒドで細胞を固定し、HE 染色を行った。細胞形態は位相差顕微鏡で観察した。

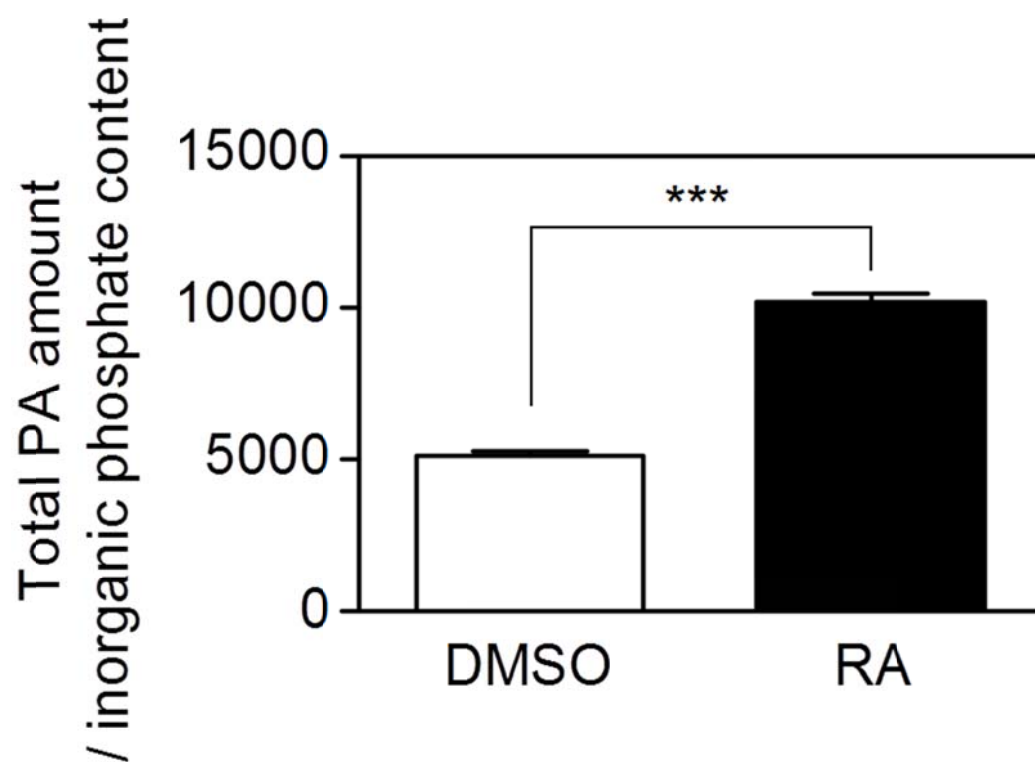


Fig. 2. RA による分化誘導時の総 PA 量の変化の解析

RA 及び DMSO 存在下で Neuro-2a 細胞を 24 時間培養し、氷冷した PBS で細胞を回収した。総脂質を抽出し、LC-MS を用いて PA 量を測定した (n=3)。統計処理は Student's *t*-test を用いて行った。*** $p < 0.005$

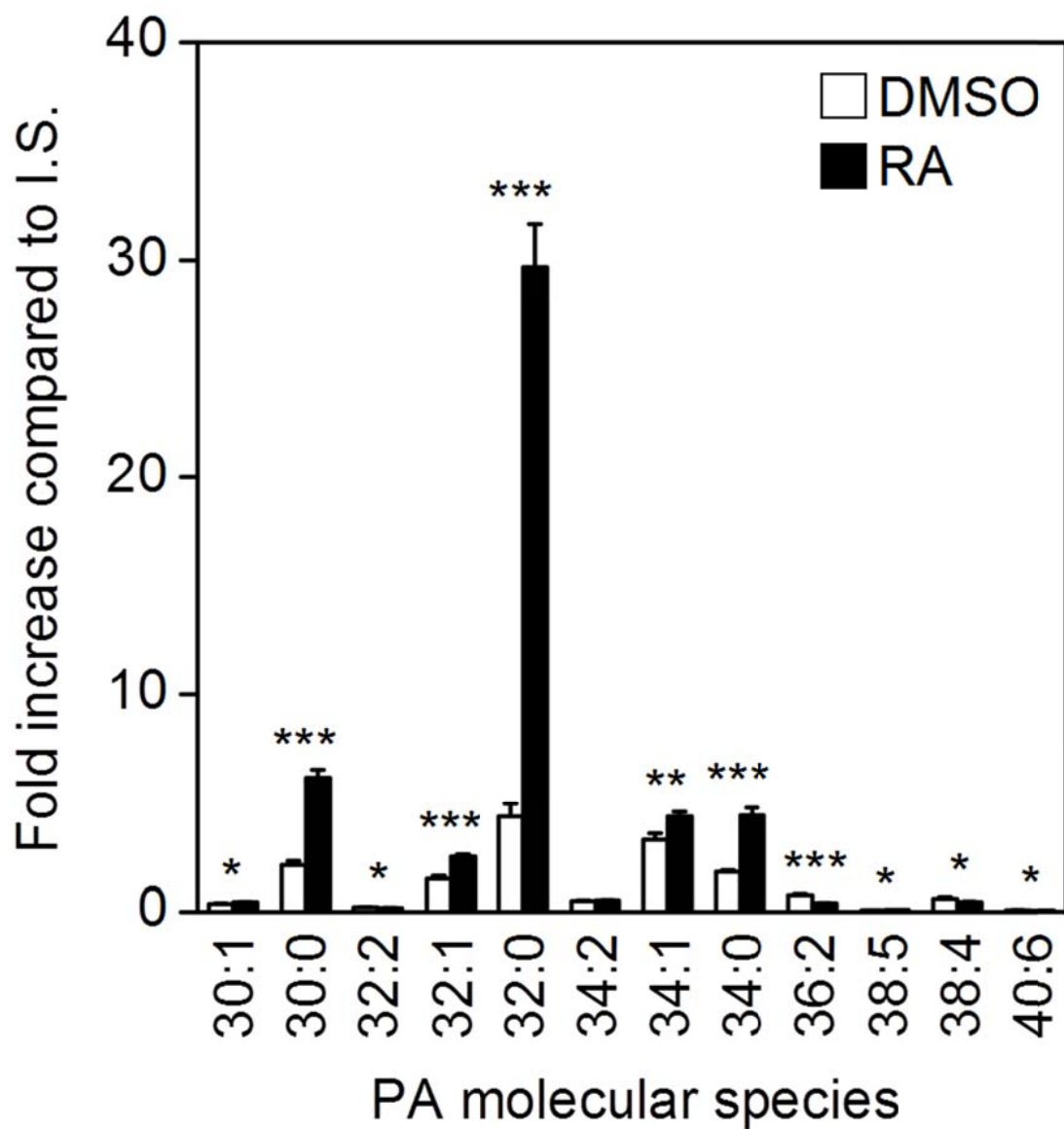


Fig. 3. RA による分化誘導時の PA 分子種の量的変動の解析

RA 及び DMSO 存在下で Neuro-2a 細胞を 24 時間培養し、氷冷した PBS で細胞を回収した。総脂質を抽出し、LC-MS を用いて PA 分子種を測定した (n=3)。統計処理は各 PA 分子種の DMSO 添加時の値に対する RA 添加時の値に対して Student's *t*-test を用いて行った。* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.005$

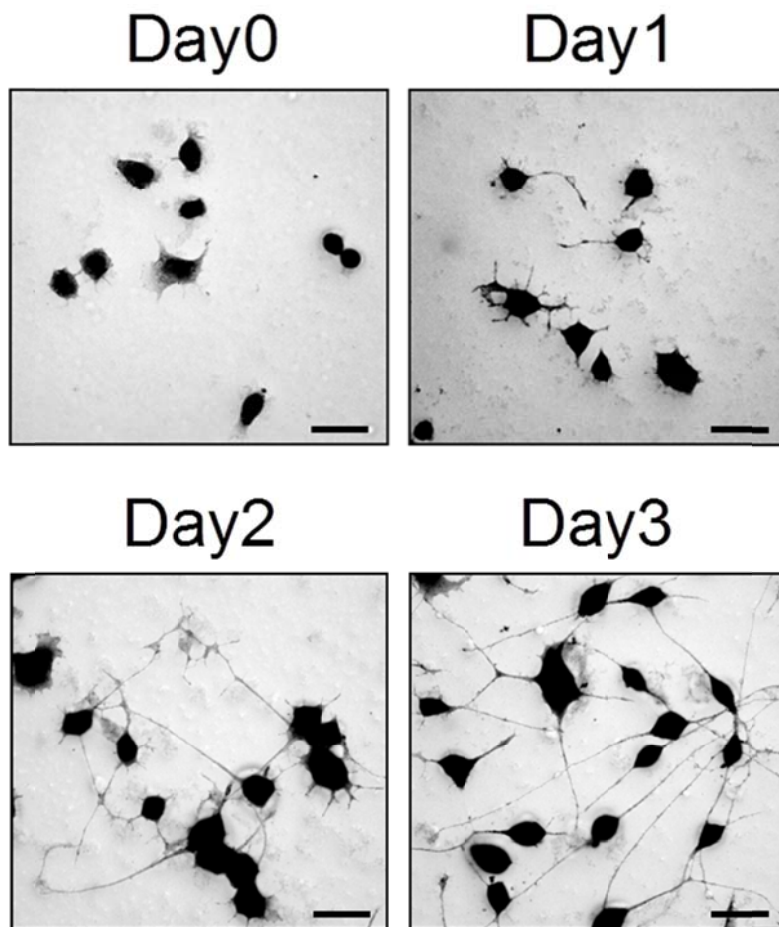


Fig. 4. RA での分化誘導による細胞形態の変化

RA (20 μ M) を添加した 2% FBS 含有培地で 0~3 日間培養することで、Neuro-2a 細胞の分化誘導を行った。コントロールとして、RA の溶媒である DMSO を同量 (0.1% v/v) 加えた 2% FBS 含有培地で培養を行った。その後、ホルムアルデヒドで細胞を固定し、HE 染色を行った。細胞形態は位相差顕微鏡で観察した。スケールバーは 40 μ m を示している。

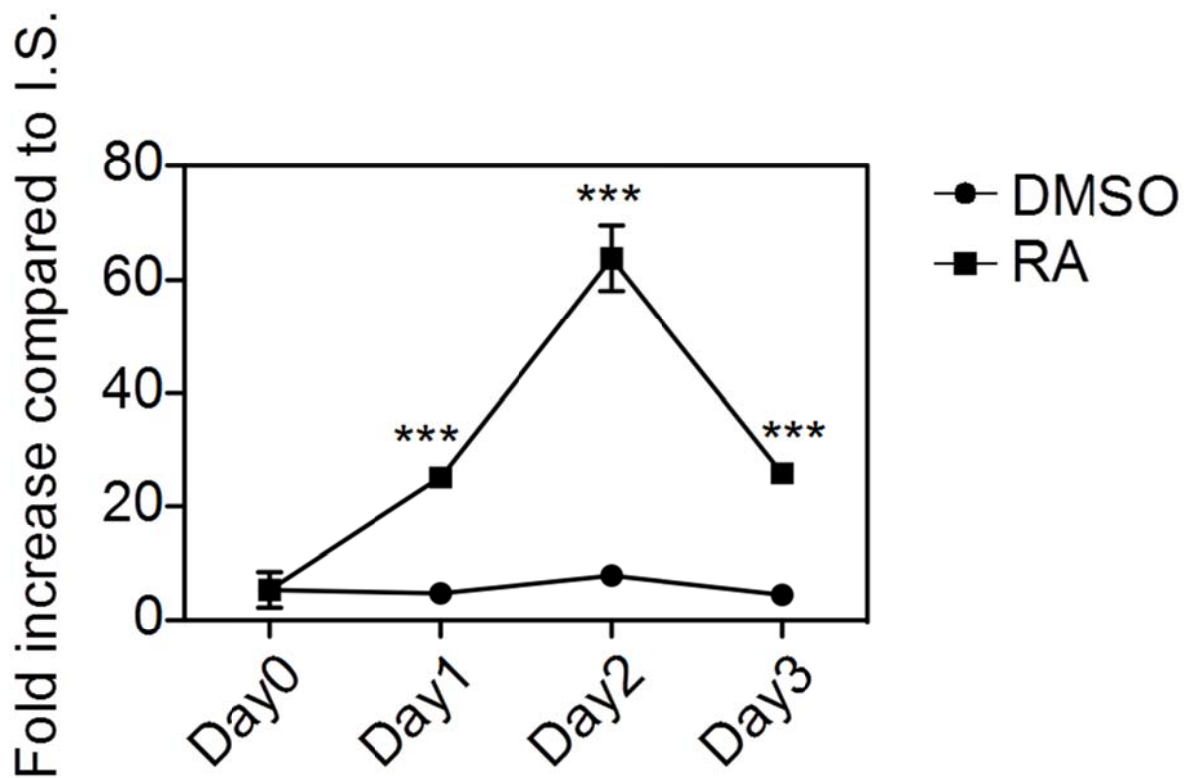


Fig. 5. 32:0-PA の RA 添加による経時的量的変動の解析

RA 及び DMSO 存在下で Neuro-2a 細胞を 0~3 日間培養し、氷冷した PBS で細胞を回収した。総脂質を抽出し、LC-MS を用いて PA 分子種を測定した (n=3)。統計処理は DMSO 添加時の値に対する RA 添加時の値に対して Student's *t*-test を用いて行った。*** $p < 0.005$

Table 2. RA による神経分化誘導時の 30:0-, 32:0-, 34:0-PA の脂肪酸組成の解析

RA 存在下で Neuro-2a 細胞を 24 時間培養し、氷冷した PBS で細胞を回収した。総脂質を抽出し、LC により PA 画分を単離した。PA 画分を濃縮した後、MS/MS 解析により 30:0-, 32:0-, 34:0-PA の脂肪酸組成を調べた。

PA 分子種	脂肪酸組成 (%)	
30:0-PA	14:0/16:0 (100%)	
32:0-PA	16:0/16:0 (95.0%)	14:0/18:0 (5.0%)
34:0-PA	16:0/18:0 (100%)	

1-3-2 血清飢餓による神経分化誘導で産生される PA 分子種の解析

次に、RA 添加で見られた現象が分化誘導時に一般的に見られるか否かを探るために、血清飢餓による神経分化誘導を行った時に、RA と同様に 32:0-PA が増加するのか否か確かめた。分化誘導のために、FBS を含まない分化誘導用培地 (0% FBS) で Neuro-2a 細胞を 24 時間培養した。コントロールとして、FBS を含む培地 (10% FBS) で同様に培養した。細胞形態を観察したところ、コントロール細胞は球形をしていたが、血清飢餓にさらした細胞ではその多くが長い神経突起を有していた (Fig. 6)。細胞から総脂質を抽出し、LC-MS で PA 分子種を測定した。コントロールと比較して、血清飢餓による分化誘導で総 PA 量は 2.6 倍に増加した (Fig. 7)。PA 分子種別の量的変動では、RA による分化誘導時と同様に、飽和脂肪酸を含有する PA 分子種が増加しており、一方で不飽和脂肪酸を含む PA 分子種は減少する傾向にあった (Fig. 8)。特に、32:0-PA が RA 処理によって 7.2 倍と顕著に増加していた。

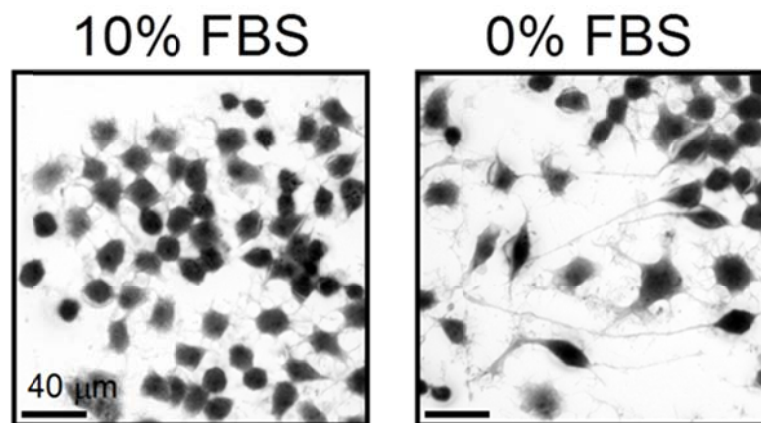


Fig. 6. 血清飢餓による分化誘導時の細胞形態変化

FBS を含まない培地 (0% FBS) で 24 時間培養することで、Neuro-2a 細胞の分化誘導を行った。コントロールとして、10% FBS 含有培地で培養を行った。その後、ホルムアルデヒドで細胞を固定し、HE 染色を行った。細胞形態は位相差顕微鏡で観察した。

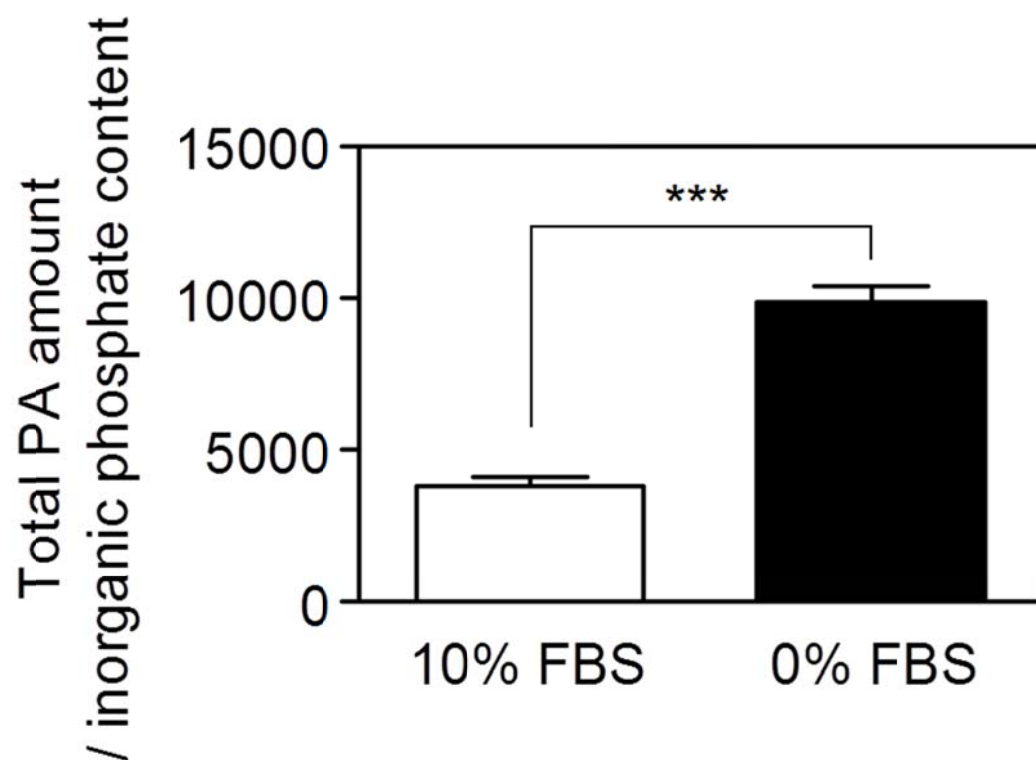


Fig. 7. 血清飢餓による分化誘導時の PA 総量の変化の解析

FBS を含まない培地 (0% FBS) または 10% FBS 含有培地で Neuro-2a 細胞を 24 時間培養し、氷冷した PBS で細胞を回収した。総脂質を抽出し、LC-MS を用いて PA 量を測定した (n=3)。統計処理は Student's *t*-test を用いて行った。*** $p < 0.005$

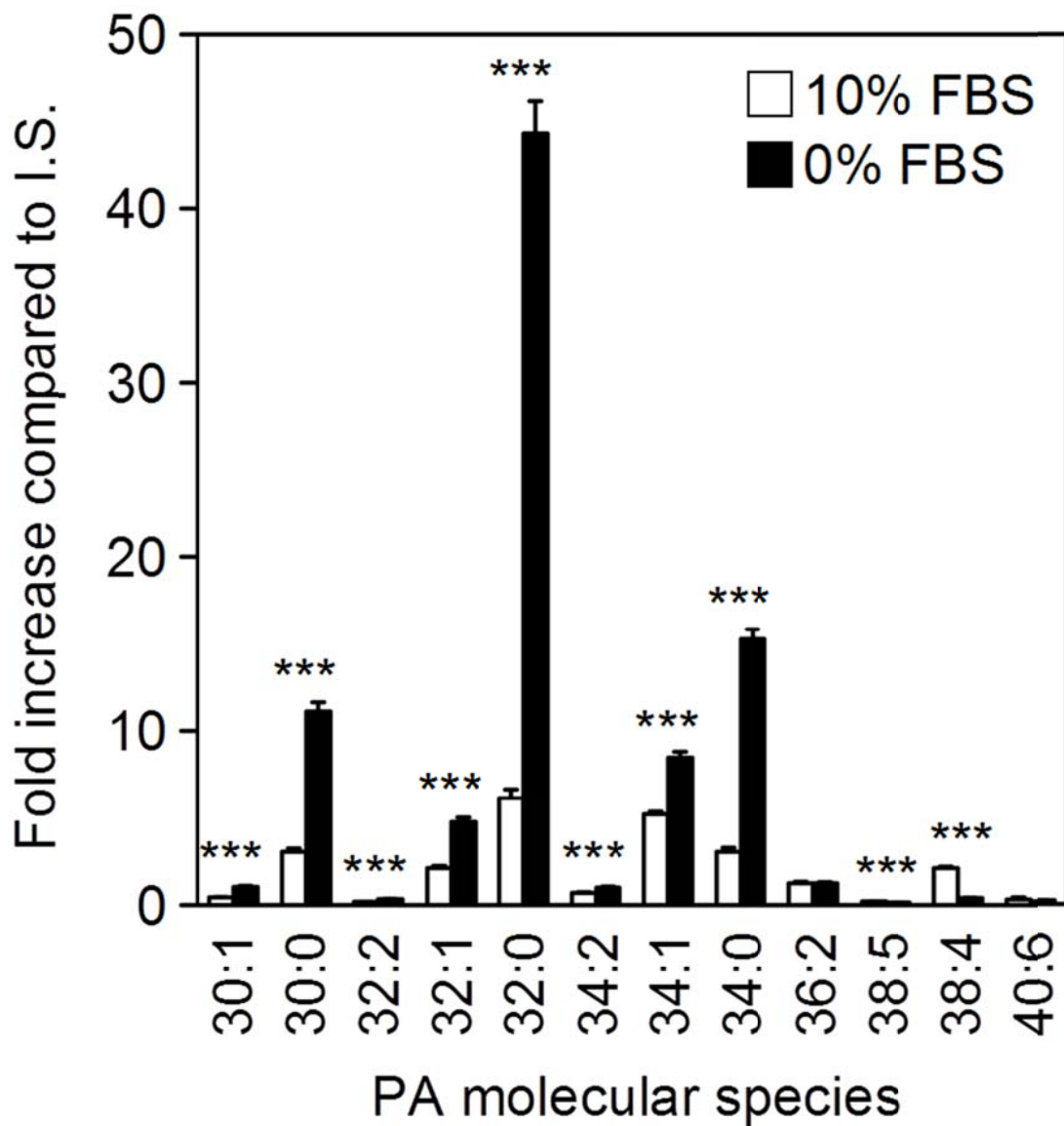


Fig. 8. 血清飢餓による分化誘導時の PA 総量の変化の解析

FBS を含まない培地 (0% FBS) または 10% FBS 含有培地で Neuro-2a 細胞を 24 時間培養し、氷冷した PBS で細胞を回収した。総脂質を抽出し、LC-MS を用いて PA 量を測定した (n=3)。統計処理は各 PA 分子種の 10% FBS の値に対する 0% FBS の値に対して Student's *t*-test を用いて行った。*** $p < 0.005$

1-3-3 ホスホリパーゼ D (PLD) の阻害による 32:0-PA 産生酵素の探索

細胞内で、PA は主に 2 つの経路から産生される。ホスファチジルコリン (PC) から PLD を介して産生される経路 (Fig. 9) とジアシルグリセロール (DG) から DG キナーゼ (DGK) を介して産生される経路 (Fig. 10) である。そこで、阻害剤又は siRNA を用いて神経分化誘導時の 32:0-PA 産生に関与する酵素の同定を試みた。

PLD は哺乳動物で PLD1、PLD2、mitoPLD が同定されている。FIPI は PLD1 と PLD2 の阻害剤であり、*in vitro* 及び細胞で PLD1 と PLD2 を 10–100 nM で阻害する [20, 21]。32:0-PA 産生に対する PLD の寄与を調べるために、PLD 阻害剤である FIPI を用いた解析を行った。Neuro-2a 細胞を 1 μ M FIPI 存在下もしくは非存在下で 24 時間の分化誘導を行った。その後、LC-MS で PA 分子種を測定し、FIPI の 32:0-PA 産生に対する阻害効果を評価した。

RA による分化誘導時に FIPI を添加したところ、PLD 阻害による 32:0-PA 産生量の有意な減少は認められなかった (Fig. 11)。同様に血清飢餓による分化誘導を行った場合でも、PLD 阻害による 32:0-PA 産生量の有意な減少は認められず、逆に増加傾向が認められた (Fig. 12)。

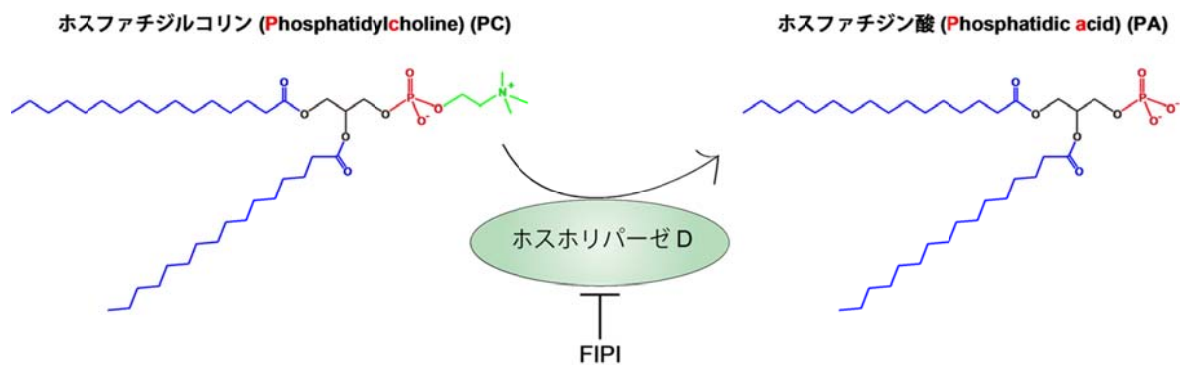


Fig. 9. PLD 阻害による 32:0-PA 産生酵素の探索

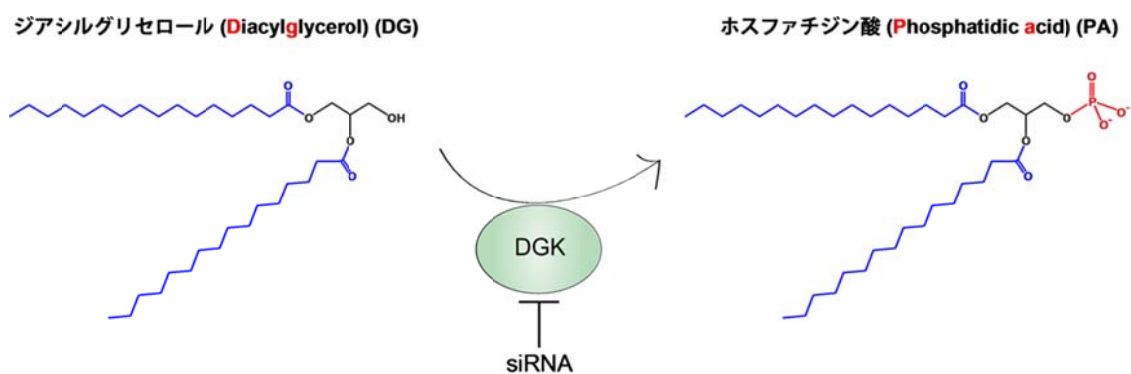


Fig. 10. DGK 発現抑制による 32:0-PA 産生酵素の探索

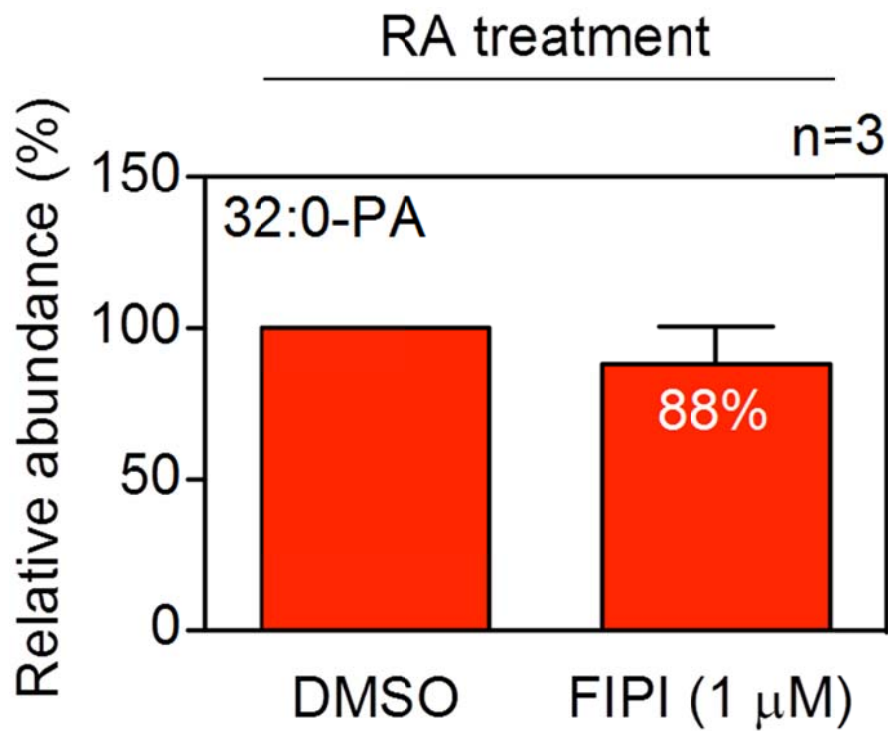


Fig. 11. RA による 32:0-PA 産生に対する PLD 阻害剤の効果

FIPI (1 μM) 存在下もしくは非存在下で、Neuro-2a 細胞に対して 24 時間の RA による分化誘導を行った。細胞を氷冷した PBS で回収し、総脂質を抽出した後、LC/MS を用いて PA 分子種を測定した (n=3)。阻害効果は、(RA (+)/FIPI (-) の値 - RA (-)/FIPI (-) の値) に対する (RA (+)/FIPI (+) の値 - RA (-)/FIPI (+) の値) の相対値 (%) で評価した (n=3)。統計処理は Student's *t*-test を用いて行った。

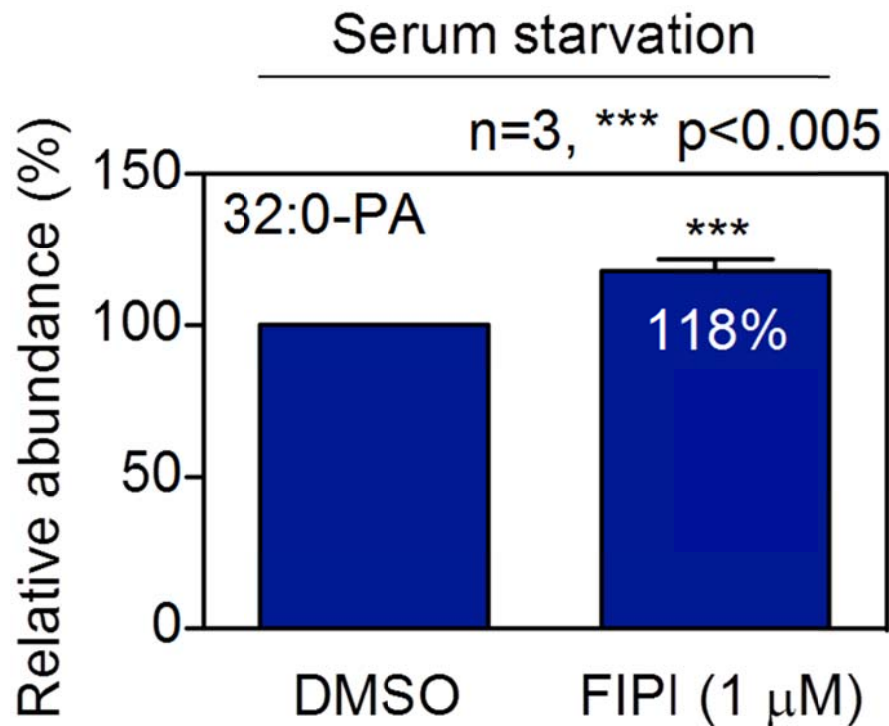


Fig. 12. 血清飢餓による 32:0-PA 産生に対する PLD 阻害剤の効果

FIPI (1 μM) 存在下もしくは非存在下で、Neuro-2a 細胞に 24 時間の血清飢餓 (SS) による分化誘導を施した。細胞を氷冷した PBS で回収し、総脂質を抽出した後、LC/MS を用いて PA 分子種を測定した (n=3)。阻害効果は、(SS (+)/FIPI (-) の値 - SS (-)/FIPI (-) の値) に対する (SS (+)/FIPI (+) の値 - SS (-)/FIPI (+) の値) の相対値 (%) で評価した (n=3)。統計処理は Student's *t*-test を用いて行った。*** p<0.005

1-3-4 DGK δ の発現抑制による 32:0-PA 産生酵素の探索

次に、32:0-PA 産生に対する DGK の寄与を解析した。現在、哺乳動物では 10 種の DGK アイソザイムが同定されており、その構造的特徴から 5 つのサブタイプに分類されている (Fig. 13) [9–12]。しかしながら、現在市販されている DGK 阻害剤はそのすべてを阻害するものではなく、また、単独のアイソザイムを特異的に阻害するものもない。当研究室の研究により、*in vitro* で DGK 阻害剤 R59022 (30 μ M) は DGK α , DGK ϵ , DGK θ を、DGK 阻害剤 R59949 (20 μ M) は DGK α , DGK γ , DGK δ , DGK κ を有意に阻害することを明らかにしている [22]。そこでまず、32:0-PA 産生酵素の候補となる DGK アイソザイムを探すために、Neuro-2a 細胞内で発現している DGK アイソザイムを調べた。Neuro-2a 細胞から mRNA を抽出し、RT-PCR により cDNA を作製した。各 DGK アイソザイムに対するプライマーに関しては、確かにワークすることはマウス脳から得た cDNA を用いて確かめた (Fig. 14)。Neuro-2a 細胞の cDNA に対して RT-PCR を行ったところ、DGK α , DGK δ , DGK η , DGK ϵ , DGK ζ , DGK ι , DGK θ が発現しており、一方で DGK β , DGK γ , DGK κ は検出限界未満であることが明らかになった (Fig. 14)。特に、DGK δ と DGK ζ の mRNA 発現量が多かったため、この 2 つの DGK アイソザイムに焦点を当て、以下の実験を行った。

まず、最も発現の高かった DGK δ について、32:0-PA 産生に寄与するかどうかを検証した。DGK δ -mRNA を認識する siRNA を Neuro-2a 細胞にエレクトロポレーション法を用いて導入し、RA 及び血清飢餓による分化誘導を行い、DGK δ の発現及び 32:0-PA の産生量を解析した。DGK δ の発現量は抗 DGK δ 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより定量し、DGK δ -siRNA により DGK δ の発現が顕著に抑制されていることを確認した (Fig. 15)。RA による分化誘導時の 32:0-PA 産生量に対する DGK δ -siRNA の影響を解析したところ、DGK δ 発現抑制による 32:0-PA 産生の変化は認められなかった (Fig. 16)。血清飢餓による分化誘導でも同様に、DGK δ 発現抑制による 32:0-PA 産生への影響は認められなかった (Fig. 17)。

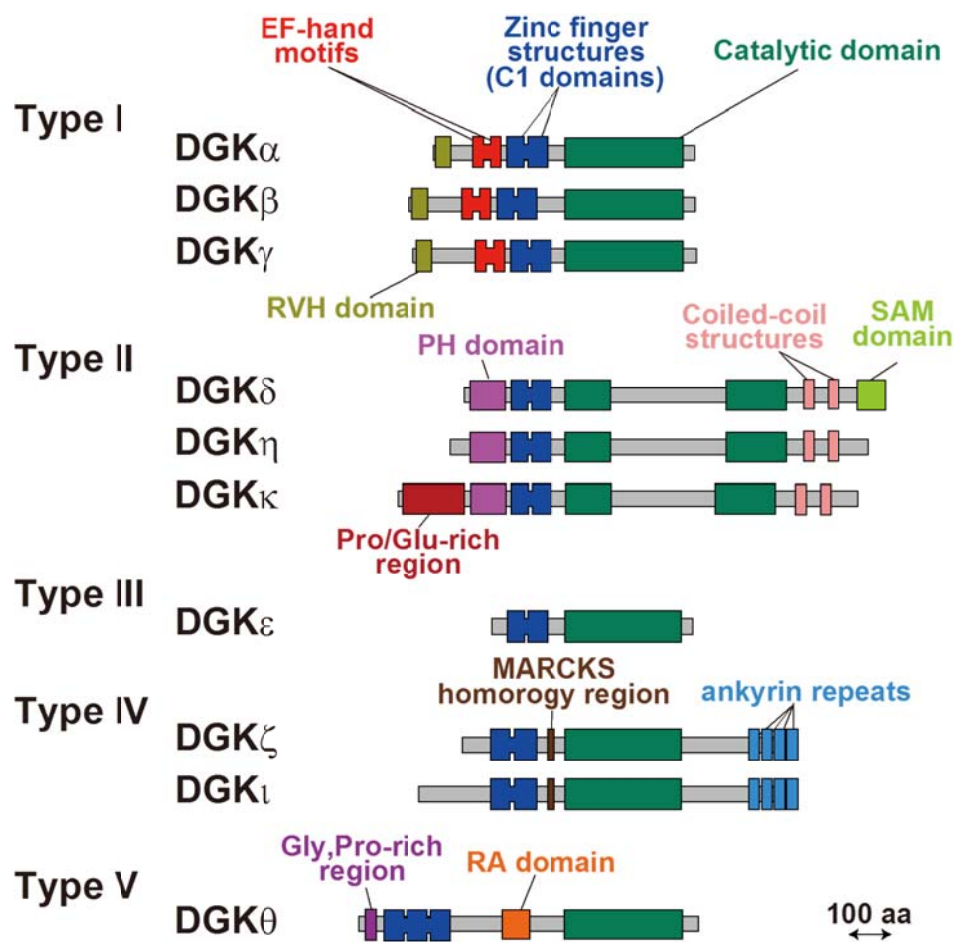


Fig. 13. 哺乳動物で同定されている 10 種の DGK アイソザイム

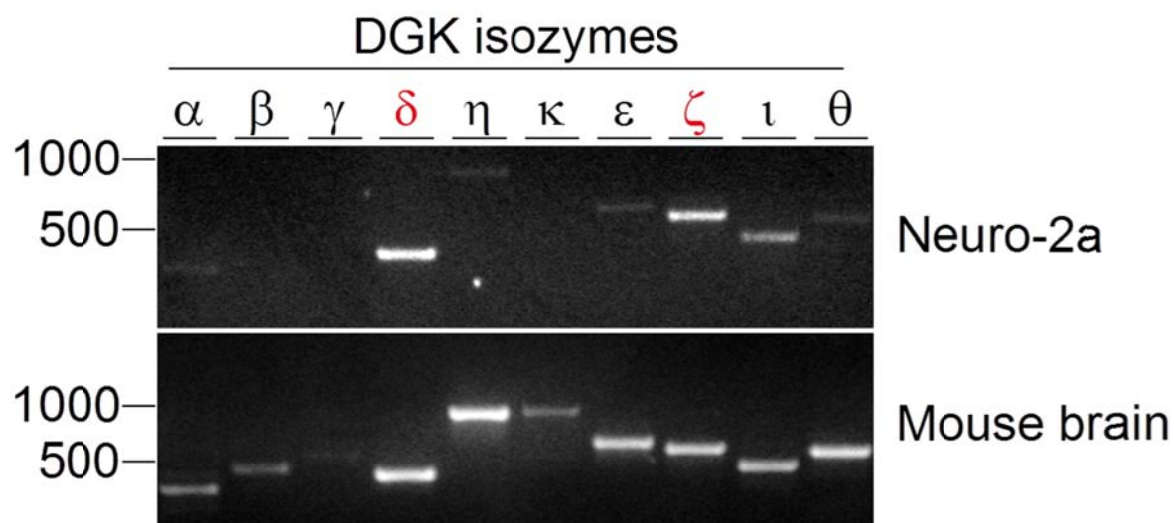


Fig. 14. Neuro-2a 細胞内で発現している DGK アイソザイムの確認

Neuro-2a 細胞及びマウス脳を QIAzol Lysis Reagent を用いて回収し、mRNA を抽出した後、RT-PCR により cDNA を作製した。各 DGK アイソザイムに対するプライマー (Table 1) を用いた PCR で目的配列を増幅し、アガロース電気泳動により確認した。各 DGK アイソザイムの目的配列の塩基対数 (bp) は以下の通りである。DGK α , 343 bp; DGK β , 453 bp; DGK γ , 523 bp; DGK δ , 406 bp; DGK η , 828 bp; DGK κ , 843 bp; DGK ϵ , 592 bp; DGK ζ , 545 bp; DGK ι , 451 bp; DGK θ , 533 bp

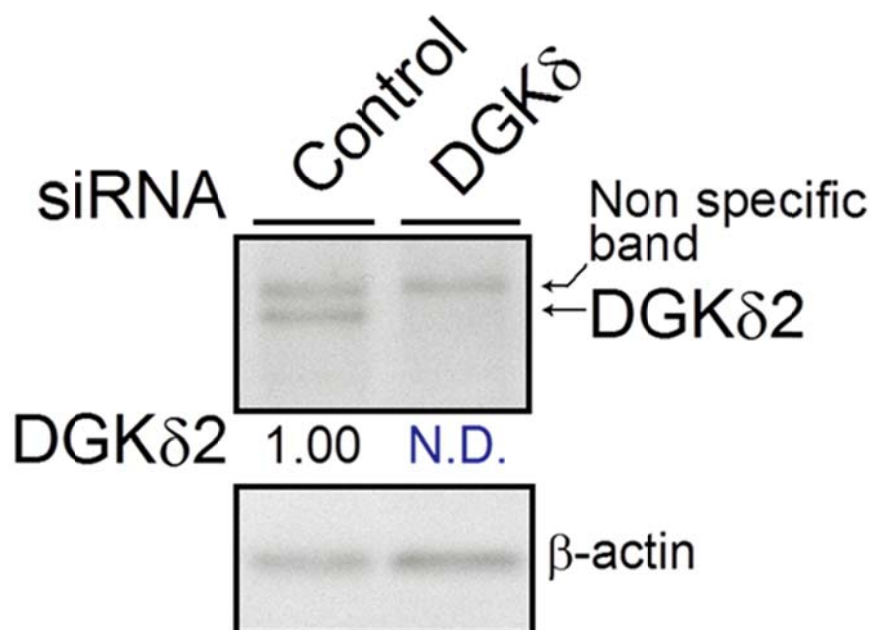


Fig. 15. DGKδ-siRNA による DGKδ発現抑制の確認

Neuro-2a 細胞にエレクトロポレーション法を用いて control siRNA または DGKδ-siRNA を導入し、増殖用培地で 48 時間培養した。DGKδの発現は抗 DGKδ抗体を用いたウェスタンブロッティングにより検出した。DGKδの発現量はβ-actin の発現量で補正し、control を 1 とした相対値で表した。N. D. = not detectable

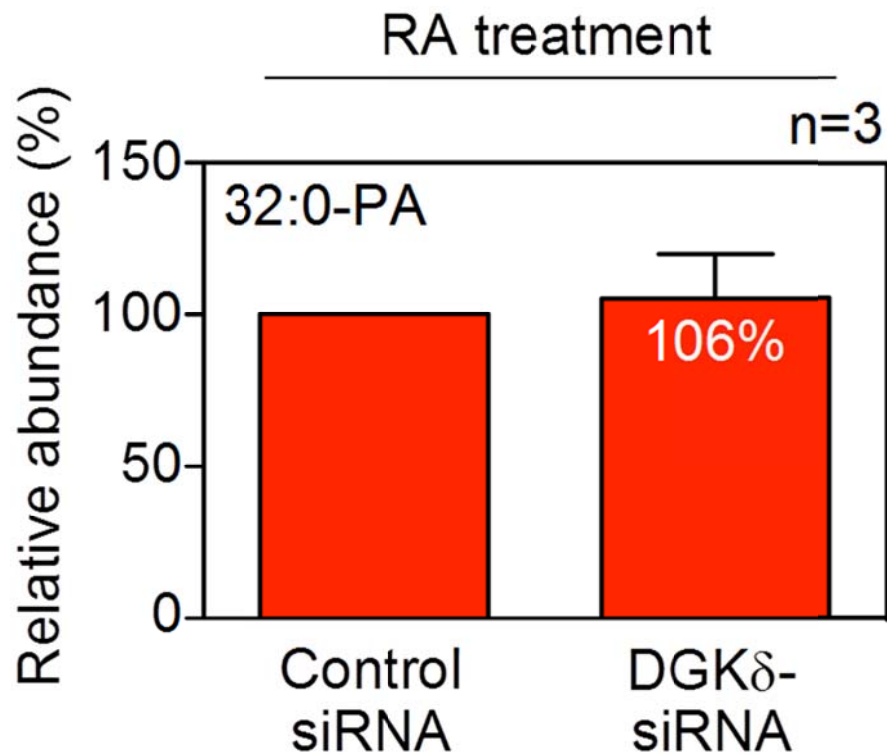


Fig. 16. RA による神経分化誘導時の 32:0-PA 産生に対する DGK δ 発現抑制の影響

Neuro-2a 細胞にエレクトロポレーション法を用いて control siRNA または DGK δ -siRNA を導入し、24 時間の RA による分化誘導を行った。DGK δ -siRNA の 32:0-PA 産生に対する効果は、(RA (+)/siDGK δ (-) の値 - RA (-)/siDGK δ (-) の値) に対する (RA (+)/siDGK δ (+) の値 - RA (-)/siDGK δ (+) の値) の相対値 (%) で評価した (n=3)。統計処理は Student's *t*-test を用いて算出した。

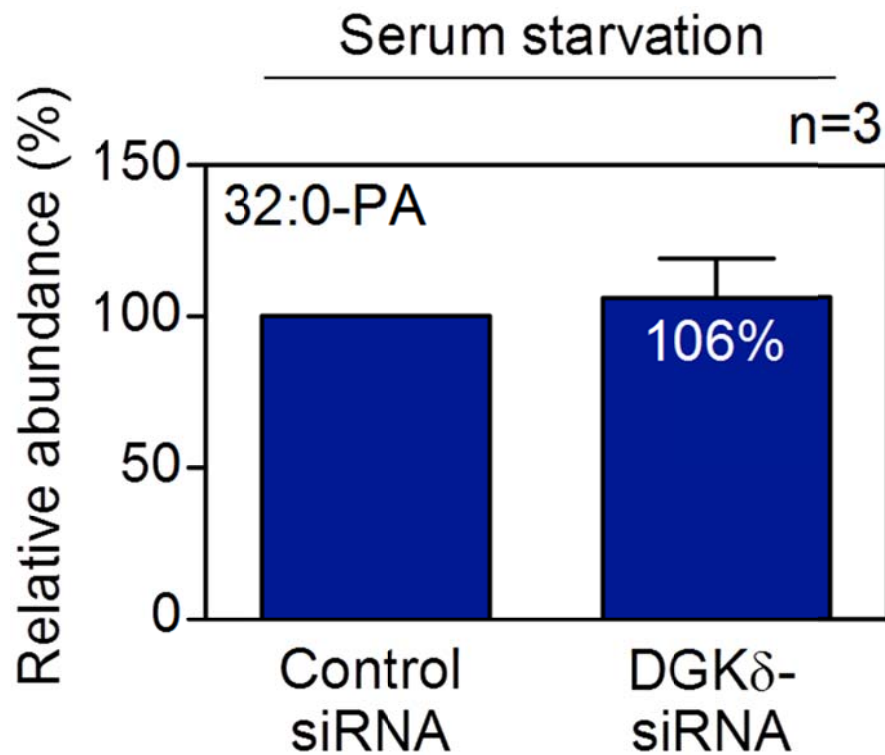


Fig. 17. 血清飢餓による神経分化誘導時の 32:0-PA 産生に対する DGK δ 発現抑制の影響

Neuro-2a 細胞にエレクトロポレーション法を用いて Control siRNA または DGK δ -siRNA を導入し、24 時間の血清飢餓 (SS) による分化誘導を行った。DGK δ -siRNA の 32:0-PA 産生に対する効果は、(SS (+)/siDGK δ (-) の値 - SS (-)/siDGK δ (-) の値) に対する (SS (+)/siDGK δ (+) の値 - SS (-)/siDGK δ (+) の値) の相対値 (%) で評価した (n=3)。統計処理は Student's *t*-test を用いて行った。

1-3-5 DGK ζ の発現抑制による 32:0-PA 産生酵素の探索

次に、もう一つの Neuro-2a 細胞で発現量が多い DGK アイソザイムである DGK ζ (Fig. 14) について 32:0-PA 産生に対する影響を検証した。DGK ζ は DGK ζ 1 (130 kDa) と DGK ζ 2 (104 kDa) の 2 つのスプライスバリエントが同定されている [23, 24]。山形大学の後藤教授から譲渡して頂いた抗 DGK ζ 抗体を用いたウェスタンブロッティングによって Neuro-2a 細胞内で発現している DGK ζ を確認したところ、Neuro-2a 細胞では DGK ζ 1 と DGK ζ 2 の両方の発現が確認できた (Fig. 18)。DGK ζ -mRNA に対する認識配列の異なる 2 つの siRNA (DGK ζ -siRNA #1, DGK ζ -siRNA #2) を Neuro-2a 細胞に導入し、DGK ζ 1 及び DGK ζ 2 の発現量を確認した。その結果、DGK ζ -siRNA #1 では DGK ζ の発現量が約 80%、DGK ζ -siRNA #2 では約 90% 抑制されていた (Fig. 18)。RA による分化誘導時の 32:0-PA 産生量を解析したところ、DGK ζ 発現抑制により 32:0-PA 産生量は有意に減少していた (Fig. 19)。血清飢餓による分化誘導でも同様に、DGK ζ 発現抑制により 32:0-PA 産生量は有意に減少していた (Fig. 20)。32:0-PA 産生の抑制効果はより DGK ζ の発現を抑制していた DGK ζ -siRNA #2 で高く、神経分化誘導による 32:0-PA の産生を半分以上抑制していた (Fig. 19 と Fig. 20)。

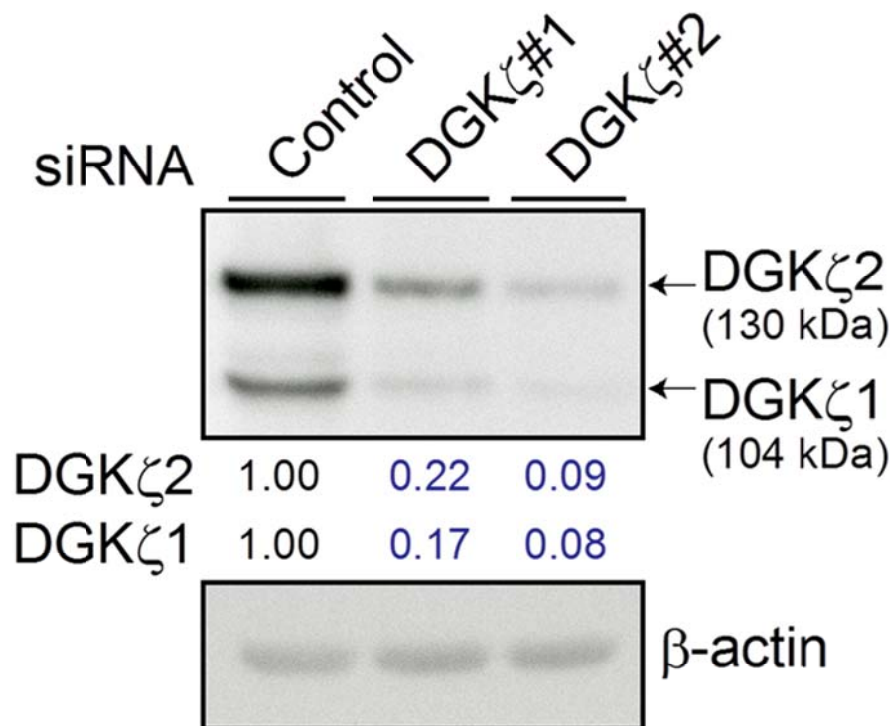


Fig. 18. DGKζ-siRNA による DGKζ発現抑制の確認

Neuro-2a 細胞にエレクトロポレーション法を用いて Control siRNA または DGKζ-siRNA (#1, #2) を導入し、増殖用培地で 48 時間培養した。DGKζの発現は抗 DGKζ抗体を用いたウエスタンブロッティングにより検出した。DGKζの発現量はβ-actin の発現量で補正し、control を 1 とした相対値で表した。

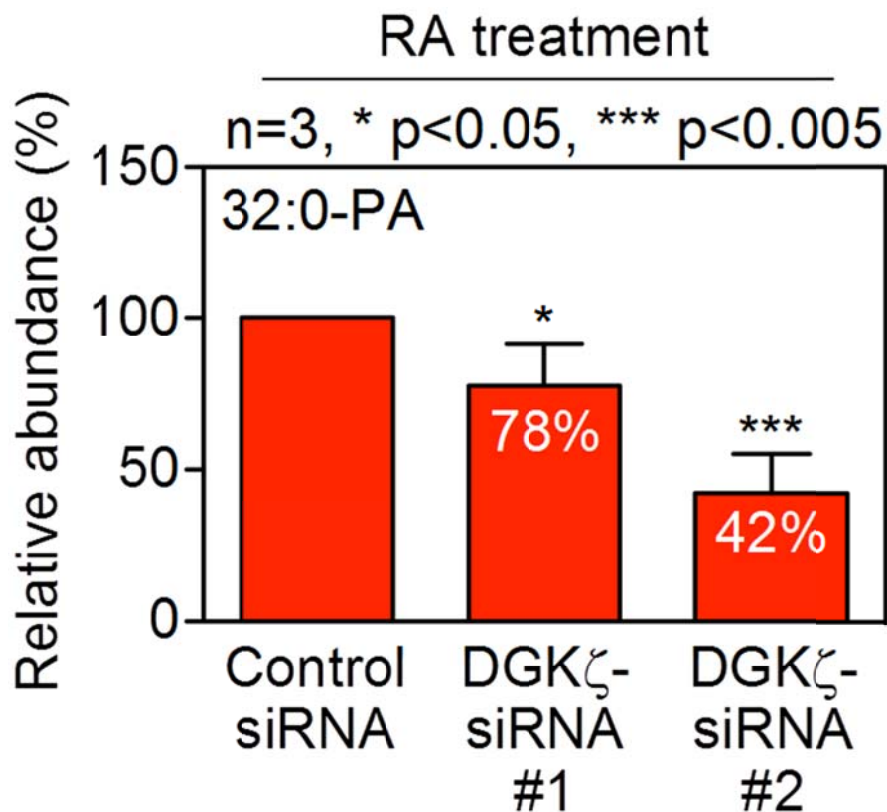


Fig. 19. RA による神経分化誘導時の 32:0-PA 産生に対する DGK ζ 発現抑制の影響

Neuro-2a 細胞にエレクトロポレーション法を用いて Control siRNA または DGK ζ -siRNA (#1, #2) を導入し、24 時間の RA による分化誘導を施した。DGK ζ -siRNA の 32:0-PA 産生に対する効果は、(RA (+)/siDGK ζ (-) の値 - RA (-)/siDGK ζ (-) の値) に対する (RA (+)/siDGK ζ (+) の値 - RA (-)/siDGK ζ (+) の値) の相対値 (%) で評価した (n=3)。統計処理は Student's *t*-test を用いて行った。* $p<0.05$, *** $p<0.005$

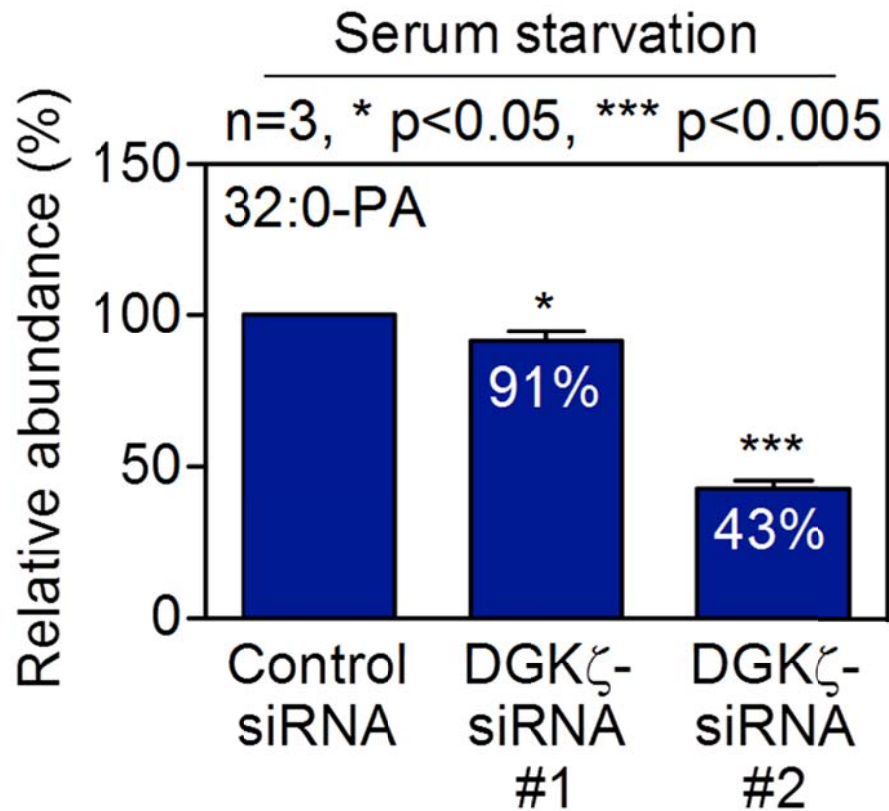


Fig. 20. 血清飢餓による神経分化誘導時の 32:0-PA 産生に対する DGK ζ 発現抑制の影響

Neuro-2a 細胞にエレクトロポレーション法を用いて Control siRNA または DGK ζ -siRNA (#1, #2) を導入し、24 時間の血清飢餓 (SS) による分化誘導を施した。DGK ζ -siRNA の 32:0-PA 産生に対する効果は、(SS (+)/siDGK ζ (-) の値 - SS (-)/siDGK ζ (-) の値) に対する (SS (+)/siDGK ζ (+) の値 - SS (-)/siDGK ζ (+) の値) の相対値 (%) で評価した (n=3)。統計処理は Student's *t*-test を用いて行った。* p<0.05, *** p<0.005

1-3-6 DGK ζ の過剰発現による 32:0-PA 産生への影響

DGK ζ の発現抑制により、RA 及び血清飢餓による 32:0-PA の産生は有意に抑制されていた。しかしながら、この 32:0-PA の産生が DGK ζ のキナーゼ活性によるものかどうかは確かではない。そこで、次に DGK ζ の過剰発現による 32:0-PA 産生への影響を調べた。

Neuro-2a 細胞内では DGK ζ 2 (130 kDa) が主に発現していた (Fig. 18)。そこで、マウス脳 cDNA を鋳型とした PCR により DGK ζ 2 の翻訳領域 (137 – 3508 bp) を増幅した。PCR 産物を精製し、*EcoRI* と *SalI* で処理した。同様に、AcGFP-C1 vector を *EcoRI* と *SalI* で処理した。制限酵素処理した PCR 産物及び AcGFP-C1 vector はゲル精製した後、ライゲーション反応により DGK ζ 2 翻訳領域を AcGFP-C1 vector へと導入した。更に、作製した DNA コンストラクト (AcGFP-DGK ζ 2-WT (Wild type)) を鋳型として、550 番目のグリシンをアスパラギン酸へと点変異させたキナーゼ活性欠失型 (AcGFP-DGK ζ 2-KD (Kinase dead)) を作製した。実際に AcGFP-DGK ζ 2-KD が DGK 活性を失っていることを確認した (Data not shown)。AcGFP vector、AcGFP-DGK ζ 2-WT、AcGFP-DGK ζ 2-KD をエレクトロポレーション法により Neuro-2a 細胞へと導入し、増殖用培地で 24 時間培養した後、RA 処理により 48 時間の分化誘導を行った。抗 DGK ζ 抗体を用いたウェスタンブロッティングを行ったところ、AcGFP-DGK ζ 2 は内在性 DGK ζ 2 と同等以上発現していることが確認できた (Fig. 21)。RA による分化誘導時の 32:0-PA 産生量を解析したところ、AcGFP-DGK ζ 2-WT の過剰発現により 32:0-PA 産生は有意に増加していた (Fig. 22A)。32:0-PA の産生が DGK ζ のキナーゼ活性依存的か否かを確かめるために AcGFP-DGK ζ -KD と比較したところ、AcGFP-DGK ζ のバンド強度あたりの 32:0-PA の産生量は AcGFP-DGK ζ -WT の方が有意に高かった (Fig. 22B)。しかしながら、AcGFP alone と比較すると AcGFP-DGK ζ -KD の過剰発現においても 32:0-PA の産生は一部促進されていた。

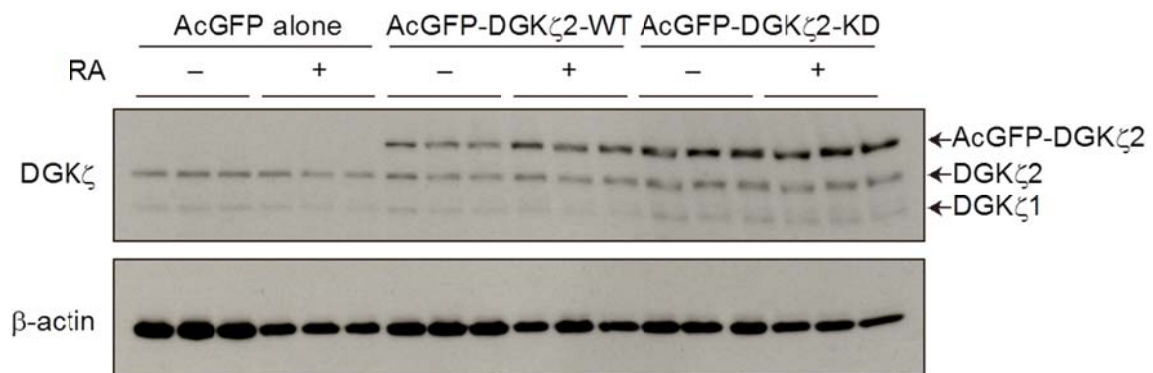


Fig. 21. ウェスタンブロッティングによる DGK ζ の過剰発現の確認

Neuro-2a 細胞にエレクトロポレーション法を用いて AcGFP vector または AcGFP-DGK ζ 2 (WT, KD) を導入し、48 時間の RA による分化誘導を行った。内在性 DGK ζ (DGK ζ 1, DGK ζ 2) 及び AcGFP-DGK ζ 2 (WT, KD) の発現は抗 DGK ζ 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより検出した。

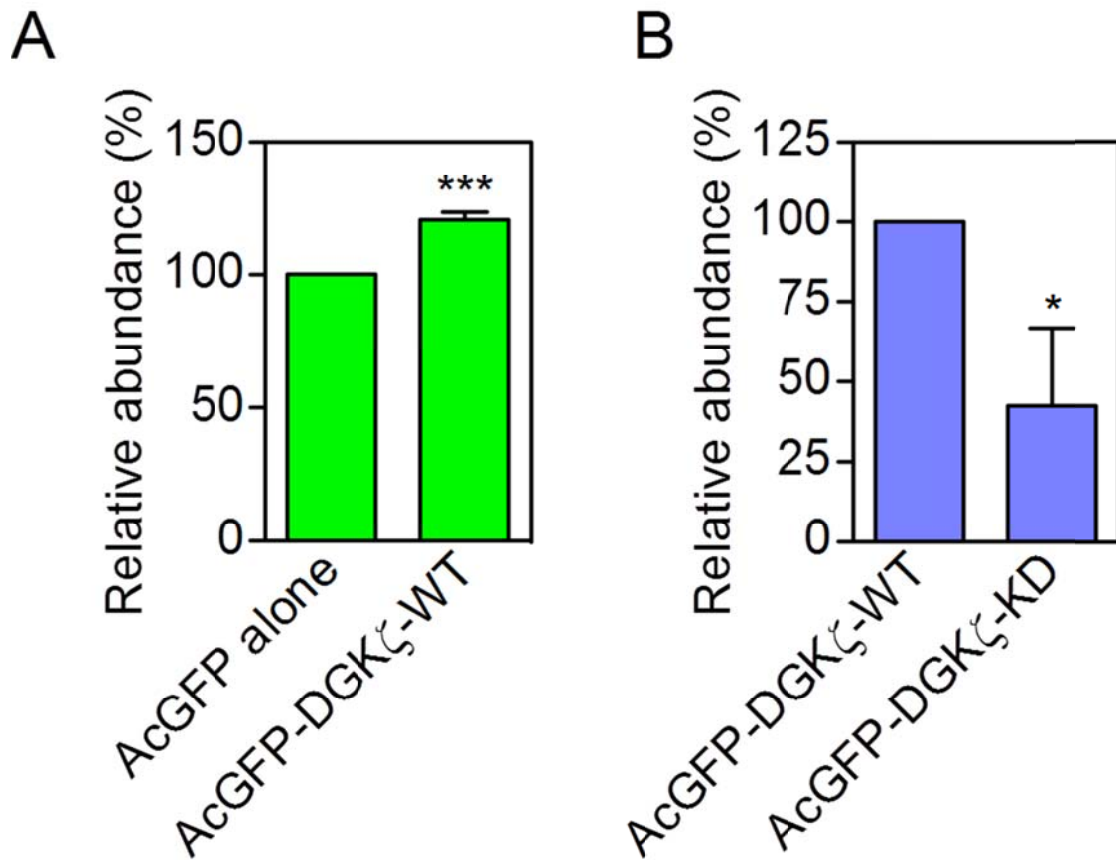


Fig. 22. RA 処理による 32:0-PA 産生に対する DGK ζ 過剰発現の影響

Neuro-2a 細胞にエレクトロポレーション法を用いて AcGFP vector または AcGFP-DGK ζ (WT, KD) を導入し、48 時間の RA による分化誘導を行った。(A) AcGFP-DGK ζ -WT の 32:0-PA 産生に対する効果は、(RA (+)/AcGFP alone の値 - RA (-)/AcGFP alone の値) に対する (RA (+)/AcGFP-DGK ζ の値 - RA (-)/AcGFP-DGK ζ の値) の相対値 (%) で評価した (n=3)。(B) 32:0-PA 産生に対する DGK ζ のキナーゼ活性への影響は、((RA (+)/AcGFP-DGK ζ -WT の値 - RA (+)/AcGFP alone の値) $\div$ AcGFP-DGK ζ -WT のバンド強度の値) に対する (RA (+)/AcGFP-DGK ζ -KD の値 - RA (+)/AcGFP alone の値) $\div$ AcGFP-DGK ζ -KD のバンド強度の値) の相対値 (%) で評価した (n=3)。各 DGK ζ のバンド強度の値は、各 β -actin のバンド強度の値で補正した数値を用いた。統計処理は Student's t-test を用いて行った。* p<0.05, *** p<0.005

1-3-7 DGK ζ 発現抑制による神経突起形成への影響

DGK ζ の発現もしくはそのキナーゼ活性が神経分化誘導時の 32:0-PA 産生に関わることが分かった。そこで、次に DGK ζ の神経突起形成への影響を調べた。

Control siRNA もしくは DGK ζ -siRNA #2 をトランスフェクションした Neuro-2a 細胞を poly-L-lysine コートした 60-mm dish へ 1×10^4 cells となるように播種した。37°C で 24 時間培養した後、RA による 24 時間の分化誘導を行った。その後、HE 染色により細胞形態を観察した (Fig. 23)。神経突起を形成した細胞 (Fig. 23、アローヘッド) をカウントし、control siRNA と DGK ζ -siRNA #2 を比較したところ、突起を形成した細胞の割合は DGK ζ の発現抑制により有意に減少していた (Fig. 24)。同様にして、血清飢餓による分化誘導を行い、細胞形態を観察したところ (Fig. 25)、血清飢餓による突起形成も DGK ζ の発現抑制により有意に減少していた (Fig. 26)。

以上の結果より、DGK ζ は Neuro-2a 細胞の RA 及び血清飢餓による神経分化誘導で、神経突起形成を正に制御することが示唆された。

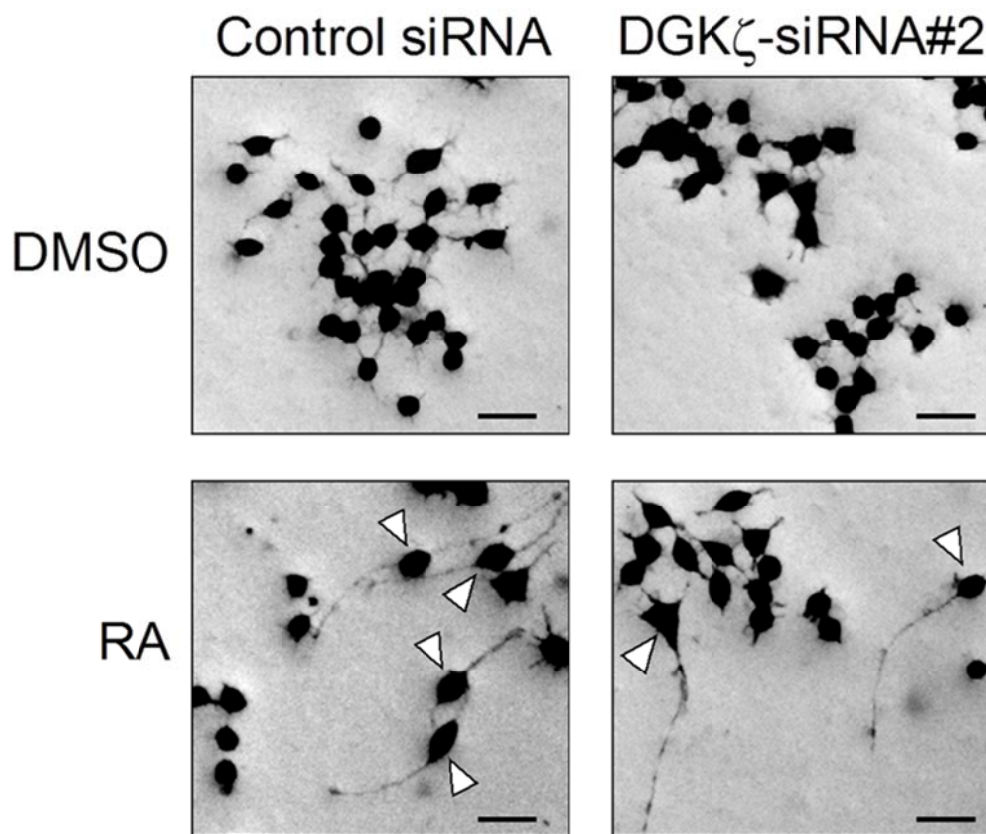


Fig. 23. RA による神経分化時の神経突起形成への DGK ζ 発現抑制の影響

Neuro-2a 細胞にエレクトロポレーション法を用いて control siRNA または DGK ζ -siRNA #2 を導入し、24 時間の RA による分化誘導を行った。その後、ホルムアルデヒドで細胞を固定し、HE 染色を行った。細胞形態は位相差顕微鏡で観察した。細胞体に対して 2 倍以上の長さの神経突起を持つ細胞をアローヘッドで示している。スケールバーは 40 μm を表している。

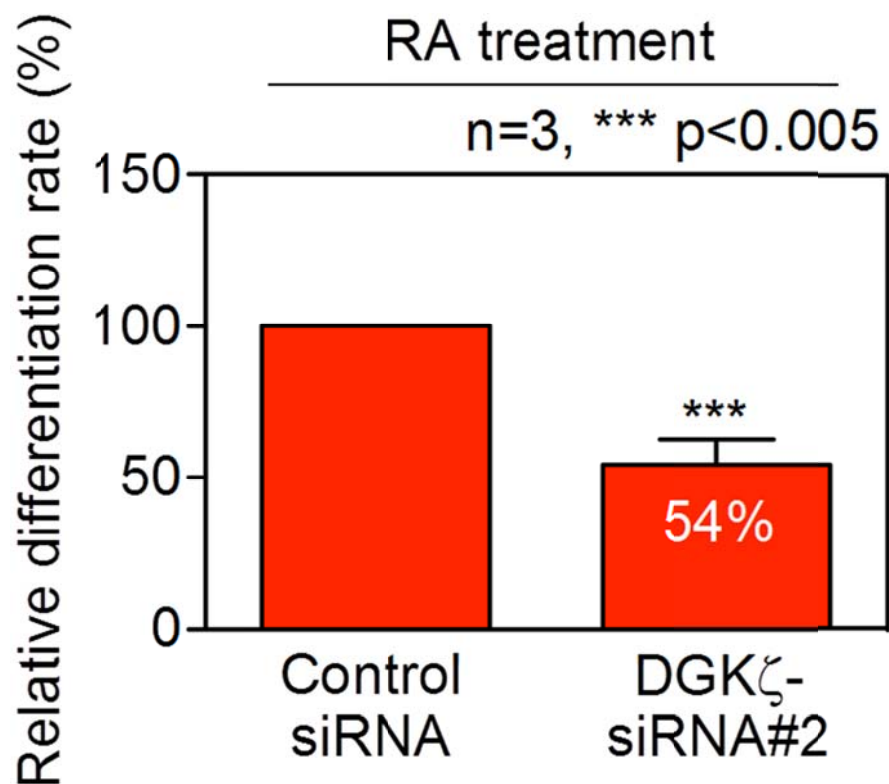


Fig. 24. RA による神経分化時の神経突起形成への DGK ζ 発現抑制の影響

Neuro-2a 細胞にエレクトロポレーション法を用いて control siRNA または DGK ζ -siRNA #2 を導入し、24 時間の RA による分化誘導を行った。DGK ζ -siRNA の神経突起形成に対する効果は、(RA (+)/siDGK ζ (-) の値 - RA (-)/siDGK ζ (-) の値) に対する (RA (+)/siDGK ζ (+) の値 - RA (-)/siDGK ζ (+) の値) の相対値 (%) で評価した (n=3)。統計処理は Student's t-test を用いて行った。* p<0.05, *** p<0.005

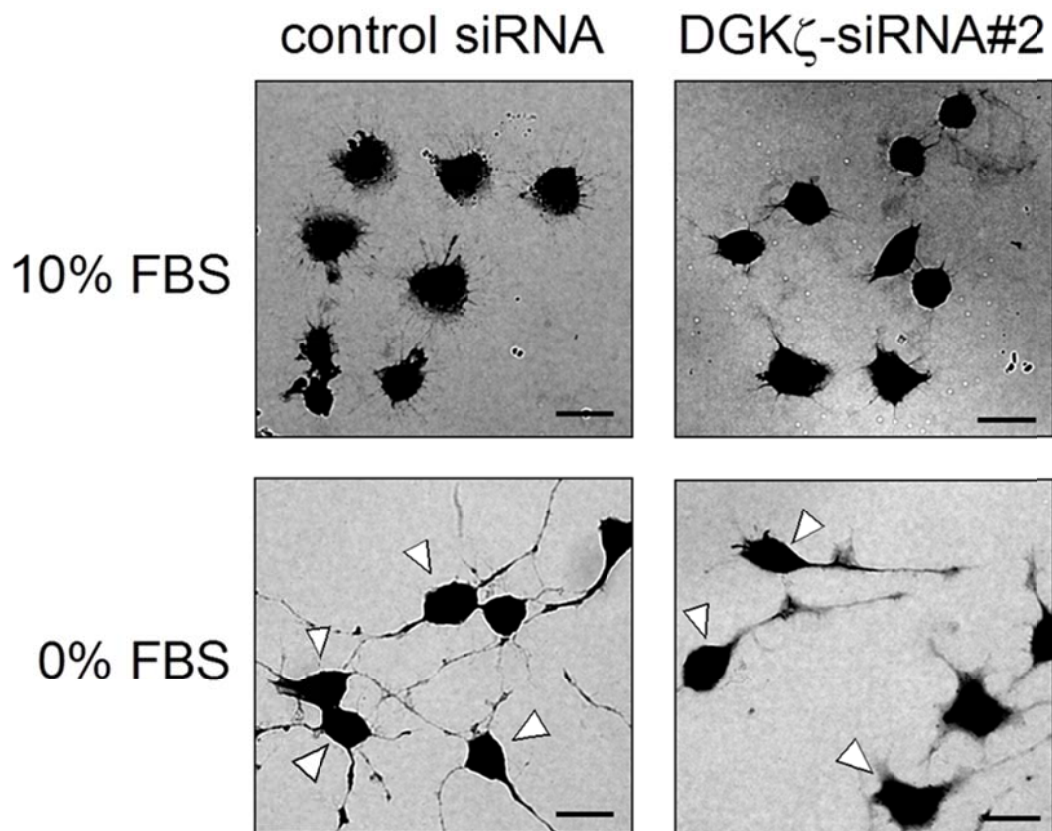


Fig. 25. 血清飢餓による神経分化時の神経突起形成への DGK ζ 発現抑制の影響

Neuro-2a 細胞にエレクトロポレーション法を用いて control siRNA または DGK ζ -siRNA #2 を導入し、24 時間の血清飢餓による分化誘導を行った。その後、ホルムアルデヒドで細胞を固定し、HE 染色を行った。細胞形態は位相差顕微鏡で観察した。細胞体に対して 2 倍以上の長さの神経突起を持つ細胞をアローヘッドで示している。スケールバーは 40 μ m を表している。

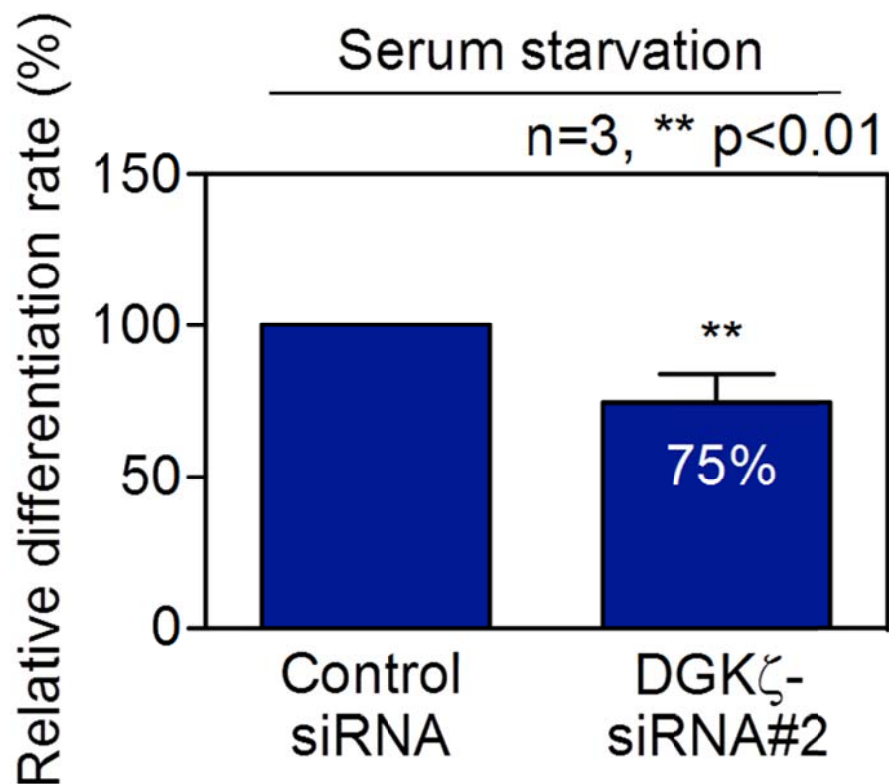


Fig. 26. 血清飢餓による神経分化時の神経突起形成への DGK ζ 発現抑制の影響

Neuro-2a 細胞にエレクトロポレーション法を用いて control siRNA または DGK ζ -siRNA #2 を導入し、24 時間の血清飢餓 (SS) による分化誘導を行った。DGK ζ -siRNA の神経突起形成に対する効果は、(SS (+)/siDGK ζ (-) の値 - SS (-)/siDGK ζ (-) の値) に対する (SS (+)/siDGK ζ (+) の値 - SS (-)/siDGK ζ (+) の値) の相対値 (%) で評価した (n=3)。統計処理は Student's *t*-test を用いて行った。** p<0.01

1-3-8 神経分化誘導時の DG 分子種の解析

DGK は DG を基質としたリン酸化反応により PA を産生する脂質代謝酵素である。そこで、最後に基質 DG 分子種の神経分化での量的変動を LC-MS を用いて解析した。

Neuro-2a 細胞に RA もしくは血清飢餓で 24 時間の分化誘導を行った。総脂質を Bligh-Dyer 法により抽出し、LC-MS により DG 分子種を測定した。RA による神経分化誘導時では、32:0-DG が未分化細胞と比較して有意に増加していた (Fig. 27)。一方で、他の DG 分子種は大きな量的変動は認められなかった。血清飢餓による神経分化誘導では、30:0-, 32:0-, 34:0-DG などの DG 分子種が未分化細胞と比較して有意に増加していた (Fig. 28)。一方で、38:5-, 38:4-, 40:6-DG は分化誘導によって減少していた。これらの結果から、Neuro-2a 細胞の神経分化では共通して 32:0-DG が増加することが分かった。

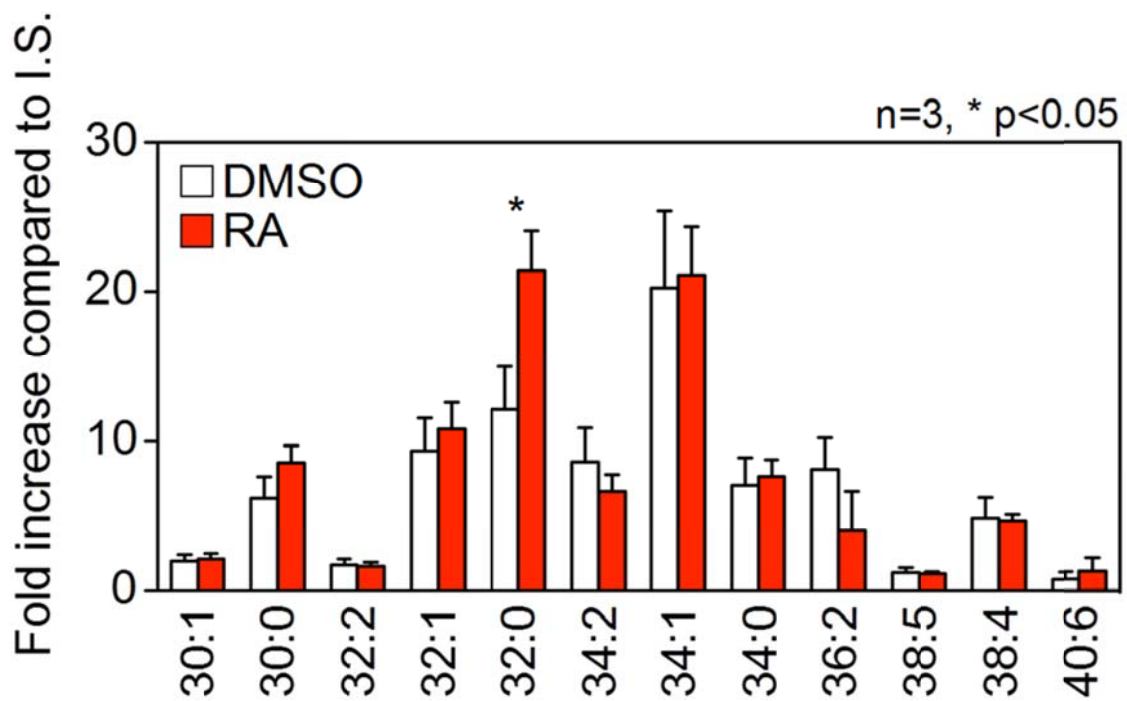


Fig. 27. RA による神経分化誘導時に産生される DG 分子種の解析

RA 及び DMSO 存在下で Neuro-2a 細胞を 24 時間培養し、氷冷した PBS で細胞を回収した。総脂質を抽出し、LC-MS を用いて DG 分子種を測定した (n=3)。統計処理は各 DG 分子種の DMSO 添加時の値に対する RA 添加時の値から Student's *t*-test を用いて行った。

* $p < 0.05$

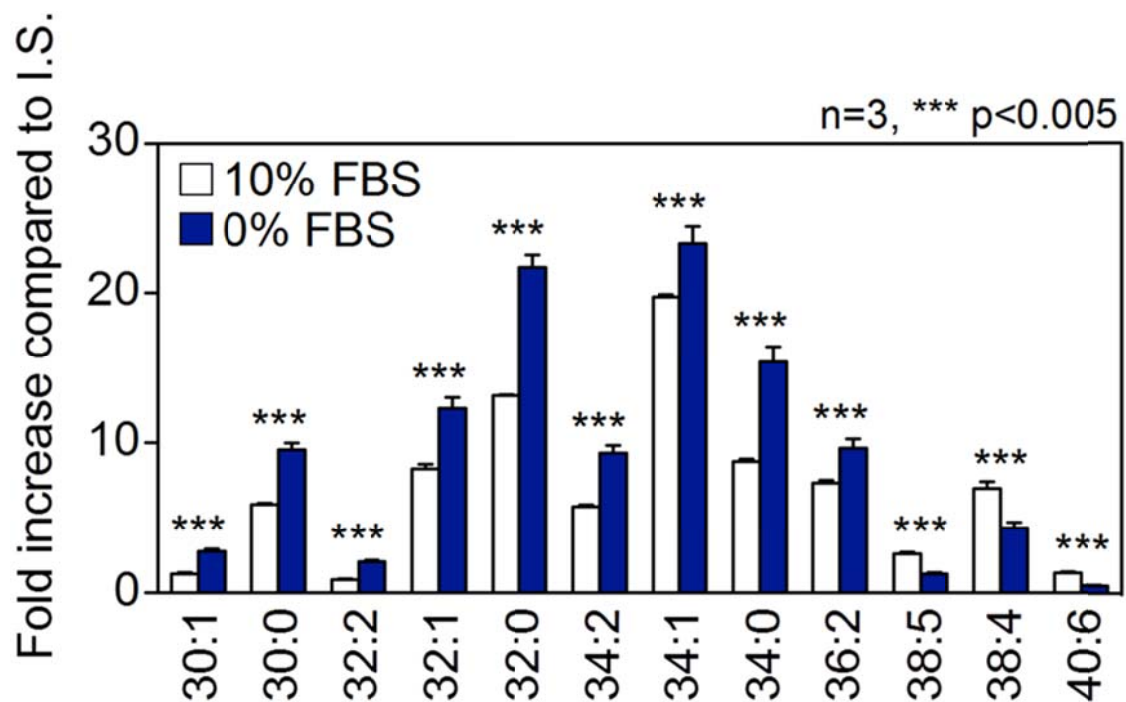


Fig. 28. 血清飢餓による神経分化誘導時に産生される DG 分子種の解析

FBS を含まない培地 (0% FBS) または 10% FBS 含有培地で Neuro-2a 細胞を 24 時間培養し、氷冷した PBS で細胞を回収した。総脂質を抽出し、LC-MS を用いて DG 量を測定した (n=3)。統計処理は各 DG 分子種の 10% FBS の値に対する 0% FBS の値から Student's *t*-test を用いて行った。*** $p < 0.005$

1-4 考察

PA が神経分化で増加することは知られていたが、今までどの PA 分子種が増加するのかは不明であった [25, 26]。主な理由としては、PA が微量成分であり、従来の LC-MS 手法ではその定量が困難であったためである。しかしながら、我々は最近、PA の解析に特化した高感度・高再現性の LC-MS を用いた分析手法を開発した [16]。第 1 章では、本手法を用いて Neuro-2a 細胞の RA (Fig. 3) と血清飢餓 (Fig. 8) による神経分化誘導で 16:0/16:0-PA が顕著に産生されることを初めて明らかにした。更に、RA による神経分化での経時変化解析から、16:0/16:0-PA の産生が分化 1~2 日目に顕著に見られることが分かった (Fig. 5)。この分化初期では、神経突起・軸索の出芽、突起形成、経路探索、枝分かれ、分極などが起こる時期であることから [27]、16:0/16:0-PA はこれらの生理現象に重要である可能性がある。

神経分化における 16:0/16:0-PA 産生酵素の探索を行ったところ、DGK ζ が 16:0/16:0-PA の産生に関与していることが明らかとなった (Fig. 19, Fig. 20, Fig. 22)。データでは示していないが、RA による分化 1~2 日で、DGK ζ 2 の発現量は 30%程度増加し、DGK ζ 1 の発現量は 20%程度減少していたが、DGK ζ の発現量の変化では 16:0/16:0-PA の劇的な増加を説明できない。しかし、興味深いことに、DGK ζ の基質となる 32:0-DG は Neuro-2a 細胞の神経分化誘導によって有意に増加していた (Fig. 27, Fig. 28)。従って、16:0/16:0-PA 産生は DG 供給経路の活性化によって制御されている可能性がある。

Neuro-2a 細胞内では、16:0/16:0-PA 産生酵素であった DGK ζ に加えて、DGK δ も mRNA レベルで強く発現していた (Fig. 14)。しかしながら、16:0/16:0-PA の産生は DGK δ の発現抑制により影響を受けなかったため (Fig. 16, Fig. 17)、DGK δ の神経分化における PA 産生への寄与は小さいと言える。一方で、当研究室の研究で、DGK δ が C2C12 骨格筋芽細胞の高濃度グルコース刺激によって 30:0-, 30:1-, 32:0-, 32:1-, 34:0-, 34:1-PA を産生することを明らかにしている [17]。30:0-, 32:0-, 34:0-PA は Neuro-2a 細胞の神経分化でも共通して増加していた分子種である (Fig. 3, Fig. 8)。C2C12 骨格筋芽細胞では、DGK δ は PC 特異的ホスホリパーゼ C によって産生される DG 分子種を基質として利用している [17]。データは示していないが、PC 特異的ホスホリパーゼ C 阻害剤である D609 は神経分化における 16:0/16:0-PA の産生を阻害しなかった。従って、神経分化において、DGK ζ は C2C12 骨格筋芽細胞での DGK δ とは異なる DG 供給経路を利用していると考えられる。

また、DGK アイソザイムの 1 つである DGK ϵ は、*in vitro* で 2 位にアラキドン酸 (20:4) を持つ DG 分子種に基質選択性を示す [28–30]。ホスファチジルイノシトール-4,5-ビスリン酸 (PI(4,5)P₂) 分子種はそのほとんどが 18:0/20:4-PI(4,5)P₂ で構成されており [31, 32]、DGK ϵ は 18:0/20:4-PI(4,5)P₂代謝産物である 18:0/20:4-DG (38:4-DG) から 18:0/20:4-PA (38:4-PA) を主に産生する [33]。Neuro-2a 細胞の RA による神経分化では 38:4-PA が減

少しており (Fig. 3)、38:4-DG は増加していなかった (Fig. 27)。また、Neuro-2a 細胞の血清飢餓による神経分化では 38:4-PA と 38:4-DG はともに有意に減少していた (Fig. 8 と Fig. 28)。従って、神経分化において、DGK ζ は DGK ϵ とも異なる DG 供給経路を利用していると考えられる。

CTLL-2 細胞のインターロイキン-2 刺激は DGK α を活性化することが分かっており [34, 35]、我々は DGK 阻害剤である R59949 がインターロイキン-2 刺激に応答した 36:1-, 40:5-, 40:6-PA の産生を抑制することを明らかにしている [16]。これらは Neuro-2a 細胞の神経分化誘導によって産生される PA 分子種とは全く異なっており、DGK ζ が DGK α とは異なる DG 供給経路を利用していることを示唆している。本研究では、16:0/16:0-DG 供給経路の同定にまでは至らなかったが、Neuro-2a 細胞の神経分化では新規の DG 供給経路が働いている可能性が示唆された。

DGK ζ の発現量は DGK ζ -siRNA #2 により 90%以上抑制されていたにも関わらず、神経分化による 16:0/16:0-PA 産生をそれぞれ 58%と 57%しか抑えなかった (Fig. 19、Fig. 20)。つまり、Neuro-2a 細胞の神経分化では、DGK ζ 以外の酵素も 16:0/16:0-PA の産生に関与していると考えられる。例えば、DGK ι は DGK ζ とよく似た構造的特徴を有し (Fig. 13)、Neuro-2a 細胞で比較的強く発現している (Fig. 14)。従って、DGK ι も 16:0/16:0-PA の産生に関与する可能性がある。

PLD2 により産生される PA は神経成長因子による神経突起伸長を促進することが報告されているが [36, 37]、ノックアウトマウスを用いた研究から PLD2 は 32:1-PA や 38:4-PA を産生することが示唆されている [38]。Neuro-2a 細胞の神経分化では 32:1-PA は僅かに増加していたが、38:4-PA は逆に減少していた (Fig. 3、Fig. 8)。実際に、PLD1/2 阻害剤である FIPI は 16:0/16:0-PA の産生を阻害しなかった (Fig. 11、Fig. 12)。逆に、Neuro-2a 細胞の血清飢餓による神経分化では、16:0/16:0-PA の産生が PLD の阻害 (1 μ M FIPI) によって有意に増加していた (Fig. 12)。アフリカミドリザル腎細胞である BSC-1 細胞の PLD 阻害 (750 nM FIPI) では DGK 依存的ネガティブフィードバックによって PA が増加することが示唆されている [39]。従って、血清飢餓時の PLD 阻害による 16:0/16:0-PA の増加も同様の機構が働いている可能性がある。これらの結果は、Neuro-2a 細胞の神経分化での 16:0/16:0-PA 産生における PLD2 の寄与は小さいことを示唆している。一方で、protein arginine methyltransferase 8 (PRMT8) が PLD 活性を有することが最近報告されたが [40]、PRMT8 が FIPI 非感受性かどうかは不明である。更に、mitoPLD は FIPI 非感受性であることが分かっているため [41]、PRMT8や mitoPLD は 16:0/16:0-PA の産生に関与する可能性がある。

DGK ζ によって産生される PA は p21 activated kinase 1 を活性化し、結果として神経突起の伸展に重要な Rac1 を活性化させることが報告されている [8]。更に、DGK ζ は NIE-115 細胞の神経突起伸長をキナーゼ活性非依存的に促進することが報告されている [42]。RA による 16:0/16:0-PA 産生は、DGK ζ のキナーゼ活性によって促進されることが

示されたが (Fig. 22)、DGK ζ -KD でも 16:0/16:0-PA の産生は一部認められた (Fig. 22B)。DGK ζ -KD で 16:0/16:0-PA の産生が促進された理由として、DGK ζ -KD が PDZ ドメインを介した分子間相互作用により内在性 DGK ζ を活性化する可能性が考えられ [42]、今回も同様の機構で 16:0/16:0-PA の産生が促進されたと考えられる。従って、これらの知見から、DGK ζ により産生される 16:0/16:0-PA は Rac1 の活性化を介して神経突起の伸長を正に制御していると考えられる。実際に、DGK ζ の発現抑制によって神経分化誘導に応答した神経突起形成は有意に抑制された (Fig. 24、Fig. 26)。また、DGK ζ は PA 産生を介してスパインの安定性増加にも寄与している [43]。DGK ζ はおそらく PA 分子種の量的調節を介して、神経突起形成とスパイン形成の両方で重要な役割を果たしていると考えられる。しかしながら、リン脂質は膜透過性が低く、Neuro-2a 細胞に 16:0/16:0-PA を導入することは技術的に困難であったため、神経突起形成能に対する 16:0/16:0-PA の直接的な効果は解析出来なかった。

第 1 章では、16:0/16:0-PA のようなパルミチン酸を含む PA 分子種が RA や血清飢餓による Neuro-2a 細胞の神経分化で劇的に増加することを初めて見出し、DGK ζ が 16:0/16:0-PA の産生に関わるとともに神経突起形成を正に促進することを明らかとした。神経細胞での 16:0/16:0-PA 特異的ターゲット蛋白質の同定は、神経分化の分子メカニズムを理解する上で重要な知見となり得るため、今後の更なる研究が期待される。

第 2 章

ホスファチジン酸分子種の α -シヌクレインとの結合能の解析 及び 2 次構造と凝集能への影響

2-1 緒言

我々は最近 PA 分子種の測定に特化した LC/MS 分析条件を確立し [16, 17]、Neuro-2a 細胞の神経分化誘導で 16:0/16:0-PA が顕著に産生されることを見出した [18]。本研究で、我々はリポソーム沈降法と MS 解析を用いたスクリーニングで、マウス脳から 16:0/16:0-PA 結合蛋白質を同定した。更に、興味深いことに、我々は α -シヌクレインが 16:0/16:0-PA と結合することを見出した。

α -シヌクレインは脳に豊富に存在する蛋白質で、特にシナプス前終末に豊富に存在しており [44, 45]、その生理機能は不明である。しかしながら、 α -シヌクレインはパーキンソン病やレビー小体認知症で見られるレビー小体の主成分であるため、パーキンソン病に関連すると考えられている [46]。パーキンソン病の 95%は孤発性であるが、家族性パーキンソン病では α -シヌクレインに変異がみられるものが多い。 α -シヌクレインは異常凝集によって神経毒性を示すため、パーキンソン病の発症原因のひとつであると考えられている。興味深いことに、 α -シヌクレインはホスファチジルセリン (PS) [48] や PA [47, 49] などの酸性リン脂質を含む小胞に結合することが報告されている。 α -シヌクレインは保存された KTKEGV モチーフのリピートを持ち [50]、そのリジン残基は酸性リン脂質との相互作用に重要である [51]。しかしながら、これらの研究では、一般的に脳に豊富に存在している 16:0/18:1-PA のみを用いている。従って、PA 分子種のアシル鎖の違いによる α -シヌクレインとの相互作用への影響はほとんどわかっていない。本研究 [52] では、16:0/16:0-, 16:0/18:1-, 18:1/18:1-, 18:0/18:0-, 18:0/20:4-PA を用いて、 α -シヌクレインの結合活性を調べた。加えて、PA 分子種による α -シヌクレインの 2 次構造変化と凝集についても解析した。

2-2 試薬と実験手法

2-2-1 試薬

セラムチューブインナーキャップ (住友ベークライト株式会社)

1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (16:0/18:1-PC) (Sigma Aldrich)

L- α -phosphatidylcholine from egg yolk (egg yolk-PC) (Sigma Aldrich)

1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphate (16:0/16:0-PA) (Avanti Polar Lipids)

1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphate (16:0/18:1-PA) (Avanti Polar Lipids)

1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphate (18:1/18:1-PA) (Avanti Polar Lipids)

1,2-distearoyl-*sn*-3-phosphate (18:0/18:0-PA) (Avanti Polar Lipids)

1-stearoyl-2-arachidonoyl-*sn*-glycero-3-phosphate (18:0/20:4-PA) (Avanti Polar Lipids)

1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoserine (18:1/18:1-PS) (Avanti Polar Lipids)

Cholesterol (Chol) (Wako Pure Chemical Industries)

2-2-2 リポソームの調製

マウス脳からの 16:0/16:0-PA 結合蛋白質の同定には以下の組成のリポソームを用いた： 16:0/16:0-PS リポソーム (egg yolk-PC (80 mol%), 16:0/16:0-PS (20 mol%)); 16:0/16:0-PA リポソーム (egg yolk-PC (80 mol%), 16:0/16:0-PA (20 mol%))。1.5 mL チューブに上述した比率になるように総量 200 ng の脂質を加え、窒素気流下で乾固させた。形成された脂質フィルムに HEPES buffer (25 mM HEPES, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol) を加えて、ボルテックスで 1 分間攪拌した後、Branson Sonifier 450 を用いた超音波処理 (出力 3、サイクル 100%、水浴温度 50°C、2 分間) にてリポソームを調製した。

α -シヌクレインの性質解析には以下の組成のリポソームを用いた： コントロールリポソーム (Chol (50 mol%), 16:0/18:1-PC (50 mol%)); PA リポソーム (Chol (50 mol%), 16:0/18:1-PC (35 mol%), 各 PA 分子種 (15 mol%))。セラムチューブインナーキャップに上述した比率になるように総量 800 ng の脂質を加え、窒素気流下で乾固させた。形成された脂質フィルムに脂質結合アッセイやプロテインキナーゼ K (PK) アッセイに用いる場合には HEPES-buffer (25 mM HEPES, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol) を、円二色性 (CD) スペクトル測定に用いる場合には 25 mM HEPES (pH 7.4) をそれぞれ加えた。75°C の水浴で 10 分間攪拌した後、ボルテックスで 1 分間攪拌し、Branson Sonifier 450 を用いた超音波処理 (出力 3、サイクル 50%、水浴温度 75°C、20 分間) にてリポソームを調製した。

2-2-3 PA 結合蛋白質としての α -シヌクレインの同定

マウス脳 (female, 26 week-old) は HEPES-buffer (50 mM HEPES, pH 7.2, 150 mM NaCl,

50 mM MgCl₂, complete protease inhibitor cocktail (Roche Applied Science)) でホモジェナイズした。マウス脳ホモジェネートは 16:0/16:0-PS リポソームと 4°C で 30 分間インキュベーションし、200,000×*g* で 1 時間遠心することで非特異的結合蛋白質を除去した。同様の操作を合計 3 回行った。その後、16:0/16:0-PS もしくは 16:0/16:0-PA リポソームと 4°C で 30 分間インキュベーションし、200,000×*g* で 1 時間遠心した。沈殿物は HEPES-buffer で再溶解した。16:0/16:0-PA 結合蛋白質は SDS-PAGE にて分離し、銀染色にて検出した。19 kDa 付近のバンドのゲル内消化及び質量分析による蛋白質の同定は以前の手法を用いた [53]。

2-2-4 α -シヌクレインのクローニング及び 6×His タグ融合 α -シヌクレインの精製

マウス脳 cDNA より フォワードプライマー (5'-GGGCTCGAGATGGATGTGTTTCATGAAAGGA-3') と リバープライマー (5'-GGGCTCGAGTTAGGCTTCAGGCTCATAGTC-3') を用いて α -シヌクレインの翻訳領域を増幅し、PCR 産物は *Xho* I で制限酵素処理した。ゲル精製をした後、T4 DNA Ligase (タカラバイオ) を用いたライゲーション反応で pET-14b vector (Novagen) へと導入した。作製したコンストラクトは Rosetta 2 (DE3) (Novagen) へと形質転換した。6×His タグ融合 α -シヌクレインの発現は isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG) (0.1 mM) (Wako Pure Chemical Industries) を添加し、37 °C で 3 時間培養することで誘導した。菌体は溶解バッファー (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA (Dojindo), 1 mM dithiothreitol, 20 μ g/ml aprotinin (Wako Pure Chemical Industries), 20 μ g/ml leupeptin (Nacalai Tesque), 20 μ g/ml pepstatin (Nacalai Tesque), 20 μ g/ml soybean trypsin inhibitor (Wako Pure Chemical Industries), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (Wako Pure Chemical Industries)) で再懸濁し、超音波で破碎した。不溶性画分は遠心 (12,000 rpm) により除去した。可溶性画分中の 6×His タグ融合 α -シヌクレインは Ni Sepharose 6 fast flow column (GE Healthcare) を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。透析用バッファーは、脂質結合試験や PK 耐性試験に用いるサンプルには HEPES バッファー (25 mM HEPES, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol) を用い、CD スペクトル解析に用いるサンプルには 25 mM HEPES (pH 7.4) を用いた。蛋白質濃度は BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。

2-2-5 脂質結合試験

精製した α -シヌクレイン (3 μ M) をコントロールリポソームもしくは各 PA 分子種を含むリポソームと 25°C で 1 時間インキュベーションした。その後、CS100GX II 遠心機 (Hitachi Koki) と S100AT3 アングルローター (Hitachi Koki) を用いて 200,000×*g* で 1 時間遠心した。沈殿は HEPES バッファー (25 mM HEPES, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol) で再懸濁した。

2-2-6 CD スペクトル解析

精製した α -シヌクレイン (20 μ M) をコントロールリポソームもしくは各 PA 分子種を含むリポソームと 25°C で 1 時間インキュベーションした。CD 測定は JASCO J-805 スペクトロメーター (Jasco Analytical Instruments) と 0.2-mm 石英キュベット (Starna Scientific) を用いて行った。各測定結果は 5 回の積算から求めた。蛋白質の 2 次構造は DichroWeb [54, 55] のインターフェース上で CDSSTR アルゴリズム [56] を用いて算出した。

2-2-7 PK 耐性試験

以前に報告された手法 [57] を参考にして行った。精製した α -シヌクレインをコントロールリポソーム、16:0/18:1-PA リポソーム、18:1/18:1-PA リポソームと 37°C で 14 日間インキュベーションした。その後、PK を 0~10 μ g/mL になるように添加し、37°C で 20 分間 処理した。分解されていない α -シヌクレインは SDS-PAGE で分離した後、抗 α -シヌクレイン抗体 (Santa Cruz Biotechnologies) を用いたウエスタンブロッティングにより検出した。 α -シヌクレインのバンド強度は Image-J を用いて定量した。

2-2-8 統計処理

統計処理は Student's *t*-test もしくは one-way ANOVA と Tukey 法を用いて行った。

2-3 結果

2-3-1 マウス脳からの 16:0/16:0-PA 結合蛋白質の同定

第 1 章にて、マウス神経芽腫細胞である Neuro-2a 細胞の神経分化で 16:0/16:0-PA が劇的に産生されることを明らかにした [18]。従って、我々はマウス脳から 16:0/16:0-PA 結合蛋白質を探索した。16:0/16:0-PS リポソームとのインキュベーションにより非特異的結合蛋白質を除去したマウス脳ホモジェネートと 16:0/16:0-PA リポソームをインキュベーションし、超遠心分離により 16:0/16:0-PA リポソーム結合性画分を得た。また、同様の操作からコントロールとして 16:0/16:0-PS リポソーム結合性画分を得た。上記のリポソーム結合性画分中の蛋白質を SDS-PAGE で分離し、銀染色により検出したところ、約 19 kDa の位置に 16:0/16:0-PA 結合蛋白質と思われるバンドが認められた (Fig. 29)。更に、ゲル内消化と MS 解析の結果、約 19 kDa のバンドから 16:0/16:0-PA 結合蛋白質候補として α -シヌクレイン及びプロトルルーディンを得た (Table 3)。

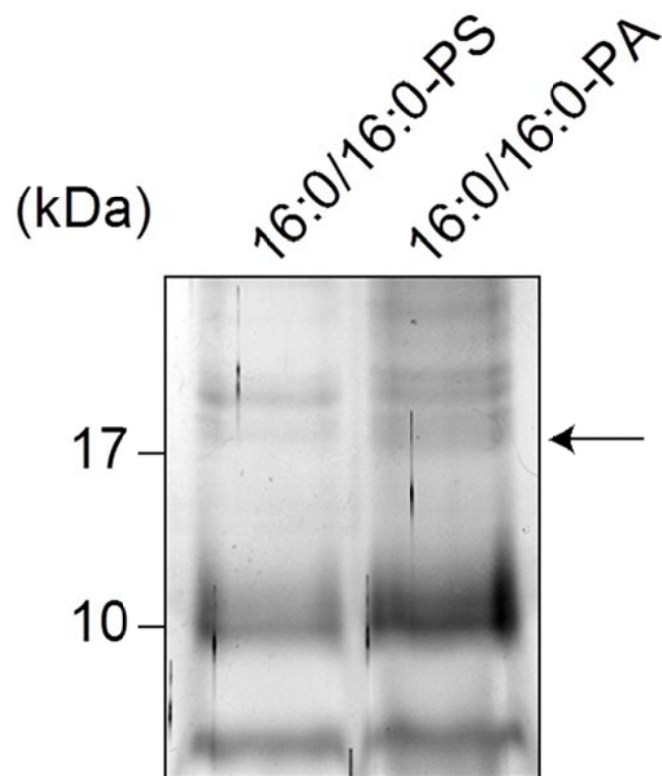


Fig. 29. 16:0/16:0-PA 結合蛋白質の探索

16:0/16:0-PS リポソームとのインキュベーションにより非特異的結合蛋白質を除去したマウス脳ホモジェネートと 16:0/16:0-PA リポソームをインキュベーションし、超遠心分離によりリポソーム結合性画分を得た。また、同様の操作からコントロールとして 16:0/16:0-PS リポソーム結合性画分を得た。SDS-PAGE で分離し、銀染色によりリポソーム結合性蛋白質を検出した。

Table 3. 16:0/16:0-PA リポソームを用いた PA 結合蛋白質のスクリーニング

16:0/16:0-PS リポソームとのインキュベーションにより非特異的結合蛋白質を除去したマウス脳ホモジェネートと 16:0/16:0-PA リポソームをインキュベーションし、超遠心分離によりリポソーム結合性画分を得た。銀染色により検出された約 19 kDa のバンドをゲル内消化し、MS 解析による蛋白質同定を行った。

SYUA_MOUSE Mass: 14476 Score: 41 Queries matched: 1 emPAI: 0.24									
Alpha-synuclein OS=Mus musculus GN=Sncb PE=1 SV=2									
Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
59	476.2608	950.5070	950.5073	-0.26	0	41	0.00016	1	K.EGVLYVGSK.T
Proteins matching the same set of peptides:									
SYUB_MOUSE Mass: 14043 Score: 41 Queries matched: 1									
Beta-synuclein OS=Mus musculus GN=Sncb PE=1 SV=1									

ZFY27_MOUSE Mass: 46172 Score: 33 Queries matched: 1 emPAI: 0.07									
Protrudin OS=Mus musculus GN=Zfyve27 PE=1 SV=2									
Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
13	394.2429	786.4713	786.4712	0.16	1	33	0.0017	1	R.LTERLR.K

2-3-2 α -シヌクレインのクローニング及び 6×His タグ融合 α -シヌクレインの精製

マウス脳 cDNA を鋳型とした PCR により α -シヌクレインの翻訳領域 (51 – 473 bp) を増幅した。PCR 産物を精製し、*Xho* I で処理した。同様に、pET-14b vector を *Xho* I で処理した。制限酵素処理した PCR 産物及び pET-14b vector はゲル精製した後、ライゲーション反応により α -シヌクレイン翻訳領域を pET-14b vector へと導入した。作製したコンストラクトは Rosetta 2 (DE3) へと形質転換し、IPTG (0.1 mM) による発現誘導を行い、可溶性画分から Ni アフィニティークロマトグラフィーにより α -シヌクレインを精製した (Fig. 30)。

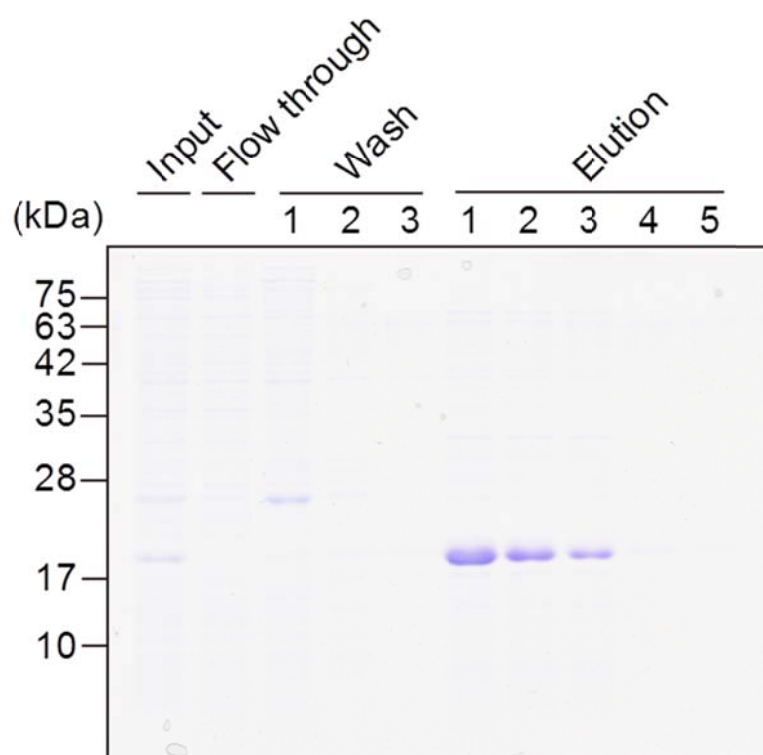


Fig. 30. 6×His タグ融合α-シヌクレインの精製

pET-14b-α-シヌクレインを Rosetta 2 (DE3) へと形質転換し、IPTG (0.1 mM) による発現誘導を行った (37°C、3 時間)。菌体を破碎した後、遠心分離によって可溶性画分を得た (Input)。可溶性画分を Ni アフィニティーカラムに通し (Flow through)、20 mM イミダゾールバッファー (pH 7.5) で洗浄後 (Wash 1 – 3)、500 mM イミダゾールバッファー (pH 7.5) で溶出した (Elution 1 – 5)。蛋白質は SDS-PAGE で分離し、クマシーブリリアントブルー (CBB) 染色で検出した。

2-3-3 精製 α -シヌクレインを用いた PA 分子種別結合試験

16:0/18:1-PA はマウス脳での主要 PA 分子種であるため、16:0/18:1-PA のみが α -シヌクレインの結合アッセイに一般的に用いられている [47, 49, 58]。従って、PA の脂肪酸組成の違いの α -シヌクレインとの相互作用への影響は分かっていない。我々は 5 つの PA 分子種 (16:0/16:0-, 16:0/18:1-, 18:1/18:1-, 18:0/18:0-, 18:0/20:4-PA) と α -シヌクレインとの結合活性を比較した。精製した α -シヌクレインと各 PA 分子種を含むリポソームとをインキュベーションし、超遠心分離によりリポソーム非結合画分 (S: Supernatant) とリポソーム結合画分 (P: Precipitate) とに分けた。蛋白質は SDS-PAGE で分離し、CBB 染色で検出した (Fig. 31)。結合活性は S と P のバンド強度の合計に対する P のバンド強度の割合から求めた。その結果、16:0/16:0-PA はコントロールと比較して 6.5 倍強く結合した (Fig. 32)。興味深いことに、16:0/18:1-, 18:1/18:1-, 18:0/20:4-PA はコントロールと比較して有意に強く α -シヌクレインと結合した。特に、18:1/18:1-PA との結合強度は最も強く、16:0/18:1-PA と比較して 2.9 倍も強く α -シヌクレインと結合していた。

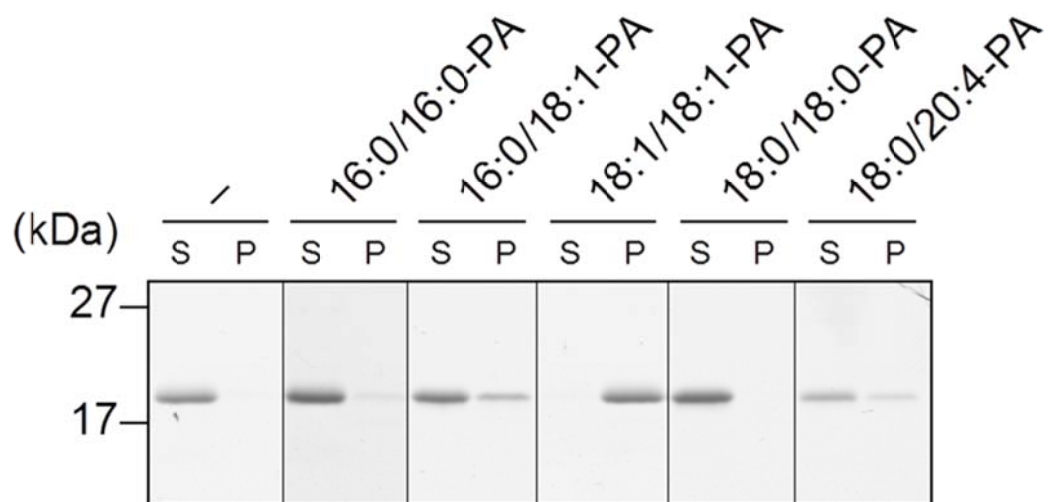


Fig. 31. PA の脂肪酸組成の違いによる α -シヌクレインとの結合強度の比較

精製した α -シヌクレインをコントロールリポソーム及び各 PA 分子種を含むリポソームと 25°C で 1 時間インキュベーションし、超遠心分離によりリポソーム非結合画分 (S: Supernatant) とリポソーム結合画分 (P: Precipitant) とに分けた。その後、蛋白質を SDS-PAGE で分離し、CBB 染色により検出した。

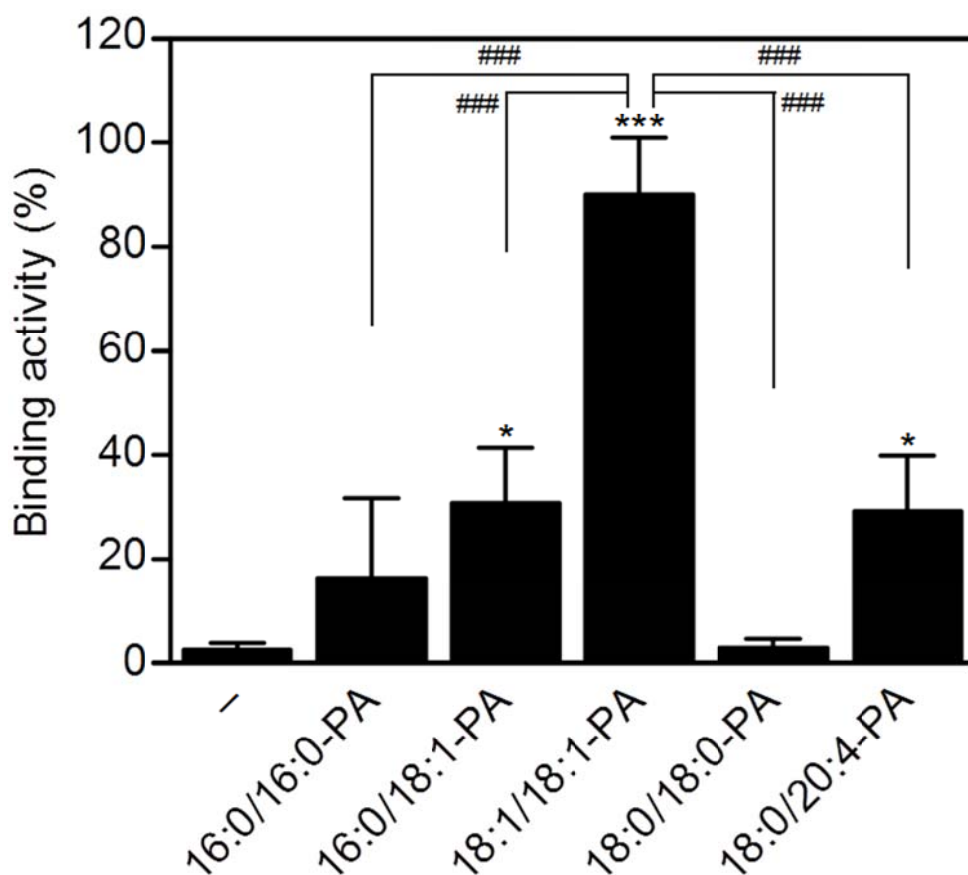


Fig. 32. PA の脂肪酸組成の違いによるα-シヌクレインとの結合強度の比較

精製したα-シヌクレインをコントロールリボソーム及び各 PA 分子種を含むリボソームと 25°C で 1 時間インキュベーションし、超遠心分離によりリボソーム非結合画分 (S: Supernatant) とリボソーム結合画分 (P: Precipitant) とに分けた。その後、蛋白質を SDS-PAGE で分離し、CBB 染色により検出した (Fig. 31)。結合活性は、 $P \div (P + S) \times 100$ の計算式より求めた (n=4, mean ± SD)。統計処理は one-way ANOVA と Tukey 法を用いて行った。* p<0.05, *** p<0.005 (vs Control); ### p<0.005 (vs 18:1/18:1-PA)

2-3-4 α -シヌクレインの 18:1/18:1-PA 及び 18:1/18:1-PS との結合強度の比較

16:0/18:1-PS は 16:0/18:1-PA と同等程度に α -シヌクレインと結合することが報告されている [49]。従って、我々は次に 18:1/18:1-PA 及び 18:1/18:1-PS の α -シヌクレインとの結合活性を比較し、この脂肪酸組成でも同様の結果となるのかどうか検証した。

精製した α -シヌクレインをコントロールリポソーム、18:1/18:1-PA リポソーム、18:1/18:1-PS リポソームと 25°C で 1 時間インキュベーションし、超遠心分離によりリポソーム非結合画分 (S: Supernatant) とリポソーム結合画分 (P: Precipitant) とに分けた。その後、蛋白質を SDS-PAGE で分離し、CBB 染色により検出した。その結果、コントロールと比較して 18:1/18:1-PA と 18:1/18:1-PS は α -シヌクレインと結合した (Fig. 30)。 α -シヌクレインに対する 18:1/18:1-PS の結合活性は 16:0/18:1-PA とのそれとほぼ同等であった (Fig. 28、Fig. 30)。しかしながら、18:1/18:1-PA の結合活性は 18:1/18:1-PS のそれよりも 2.4 倍も高かった (Fig. 30)。

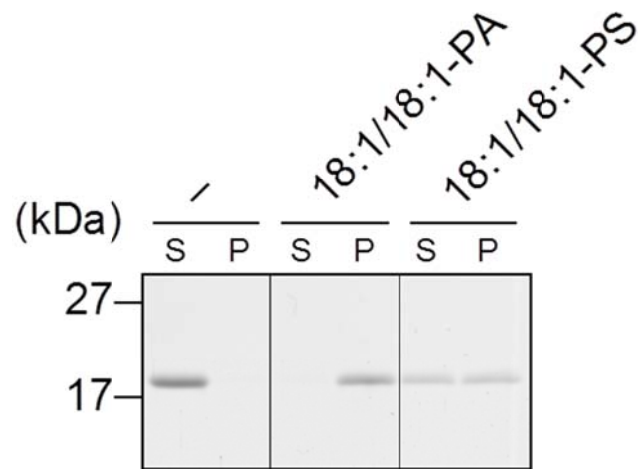


Fig. 33. 18:1/18:1-PA と 18:1/18:1-PS の α -シヌクレインとの結合強度の比較

精製した α -シヌクレインをコントロールリポソーム及び各 PA 分子種を含むリポソームと 25°C で 1 時間インキュベーションし、超遠心分離によりリポソーム非結合画分 (S: Supernatant) とリポソーム結合画分 (P: Precipitant) とに分けた。その後、蛋白質を SDS-PAGE で分離し、CBB 染色により検出した。

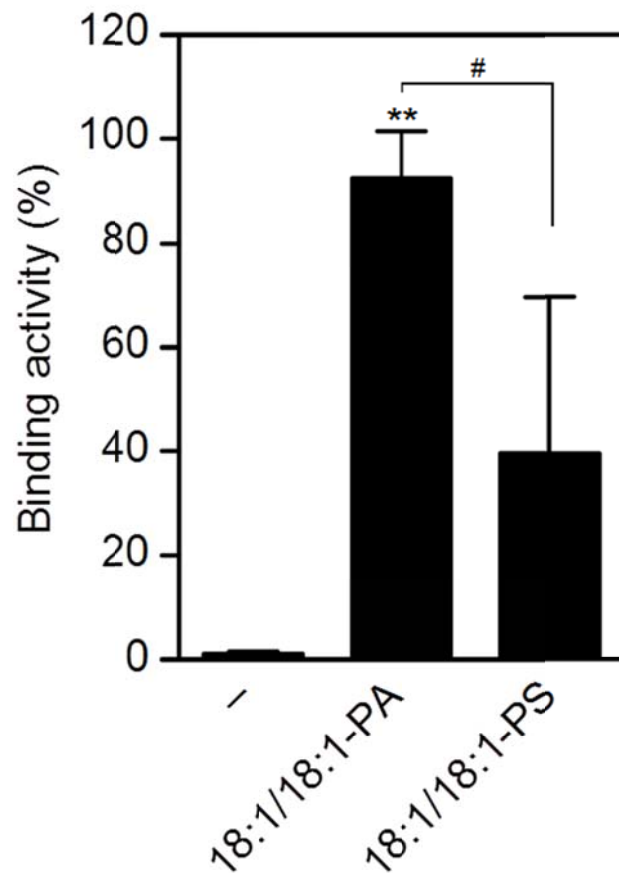


Fig. 34. 18:1/18:1-PA と 18:1/18:1-PS の α -シヌクレインとの結合強度の比較

リポソーム非結合画分 (S: Supernatant) とリポソーム結合画分 (P: Precipitant) の α -シヌクレインのバンド強度を Image-J で算出し、 $P \div (S+P) \times 100$ の計算式より結合活性 (%) を求めた (n=3, mean $\pm$ SD)。統計処理は one-way ANOVA と Tukey 法を用いて行った。

** p<0.01 (vs Control); # p<0.05 (vs 18:1/18:1-PA)

2-3-5 α -シヌクレインの2次構造への18:1/18:1-PA リポソームの影響

酸性リン脂質を含むリポソーム膜に結合した α -シヌクレインは α -ヘリックスを形成するので [58, 59]、18:1/18:1-PA 存在下での α -シヌクレインの α -ヘリックス構造の形成を CD スペクトル解析により検証した。

精製した α -シヌクレイン (20 μ M) はコントロールリポソーム、16:0/18:1-PA リポソーム、18:1/18:1-PA リポソームと 25°C で 1 時間インキュベーションした。その後、190 – 260 nm の波長での CD スペクトルを測定した。データは α -シヌクレインを含まない溶液との差スペクトルで示した (Fig. 35)。 α -シヌクレインは 200 nm 付近に負の極大を持っていたが、これはランダムコイルの特徴的スペクトルである。コントロールリポソームは α -シヌクレインの CD スペクトルに影響を与えなかったが、16:0/18:1-PA リポソーム及び 18:1/18:1-PA リポソームは CD スペクトルを劇的に変化させた。16:0/18:1-PA リポソーム及び 18:1/18:1-PA リポソームは 208 nm と 222 nm 付近の負の極大を増加させたが、これらは α -ヘリックスの特徴的スペクトルである。興味深いことに、このスペクトルの変化は 18:1/18:1-PA の方が 16:0/18:1-PA よりも 1.5 倍大きかった

次に、CDSSTR というアルゴリズム [56] を用いて 2 次構造の解析を行い、2 次構造変化を確認した。その結果、 α -シヌクレインは 71%がランダムコイル (Unordered form) であり、 α -ヘリックスはわずか 4%であった (Fig. 36)。コントロールリポソームは、 α -シヌクレインとほとんど同様に、ランダムコイルが 73%で α -ヘリックスが 5%であり、リポソームによる 2 次構造への影響は見られなかった。一方で、16:0/18:1-PA リポソームと 18:1/18:1-PA リポソームは α -ヘリックスが顕著に増加しており、それぞれ 38%と 53%であった。 β -ストランドや β -ターンへのこれらのリポソームの影響は認められなかった。これらのデータは、ランダムコイルから α -ヘリックスへの 2 次構造変化の促進能は、16:0/18:1-PA よりも 18:1/18:1-PA の方が高いことを示している。

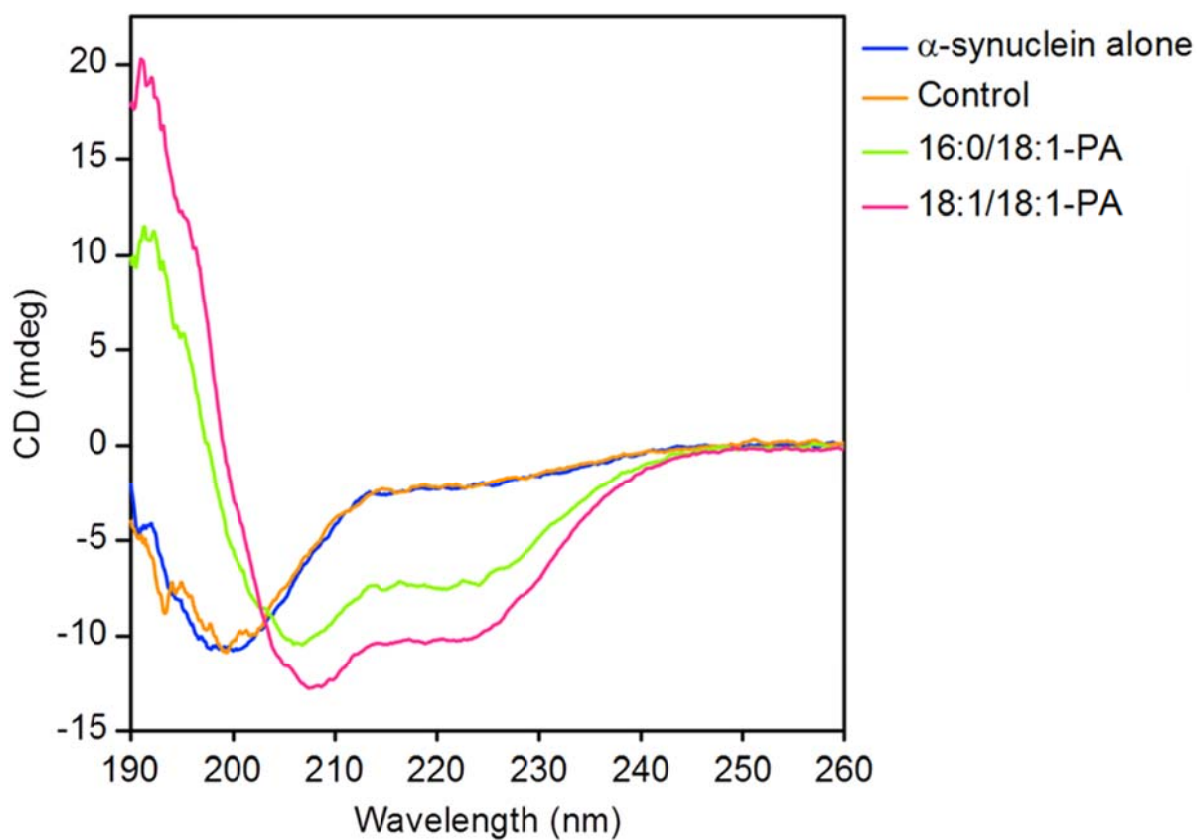


Fig. 35. α -シヌクレインの CD スペクトルとリポソーム添加による影響

精製した α -シヌクレイン (20 μ M) はコントロールリポソーム、16:0/18:1-PA リポソーム、18:1/18:1-PA リポソームと 25°C で 1 時間インキュベーションした。その後、190 – 260 nm の波長での CD スペクトルを測定した。データは α -シヌクレインを含まない溶液との差スペクトルで示した。

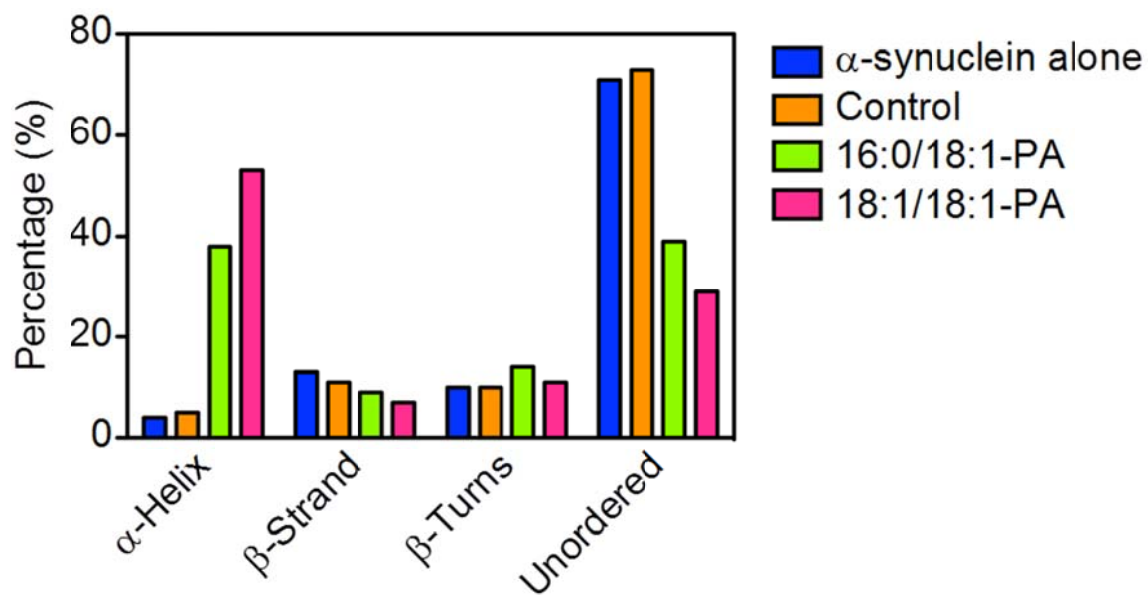


Fig. 36. α -シヌクレインの2次構造解析

CD スペクトル測定から得られた差スペクトルを用いて DichroWeb インターフェース上で CDSSTR アルゴリズムによる2次構造解析を行った。

2-3-6 精製 α -シヌクレインを用いた PA 結合による凝集能への影響の評価

凝集した α -シヌクレインを含むレビー小体の蓄積はパーキンソン病の特徴である [46]。加えて、酸性脂質を含む小胞は *in vitro* で α -シヌクレインの凝集及びフィブリル化を引き起こすとされている [60]。従って、我々は 18:1/18:1-PA リポソームが 16:0/18:1-PA リポソームと比較して α -シヌクレインの凝集をより強く引き起こすのか否かを、オリゴマー形成や PK 耐性をみることで検討した。

精製した α -シヌクレインをコントロールリポソーム、16:0/18:1-PA リポソーム、18:1/18:1-PA リポソームと 37°C で 14 日間インキュベーションした。その後、0~10 $\mu\text{g/ml}$ の PK で処理し、抗 α -シヌクレイン抗体を用いたウエスタンブロッティングで α -シヌクレインを検出した (Fig. 37)。 α -シヌクレインの SDS 耐性オリゴマー形成は、PK 処理なしのモノマー (~19 kDa) とオリゴマー (~38 kDa, ~76 kDa) のバンド強度の比から評価した (Fig. 38)。その結果、SDS 耐性のオリゴマー形成はコントロールリポソームと比較して 16:0/18:1-PA リポソーム (3.8 倍) や 18:1/18:1-PA リポソーム (6.5 倍) で有意に増加していた (Fig. 33)。更に、18:1/18:1-PA リポソームは 16:0/18:1-PA リポソームよりも 1.7 倍強く α -シヌクレインのオリゴマー形成を促進していた。

α -シヌクレインを 0.01 $\mu\text{g/ml}$ の PK で処理したとき、分解されていない α -シヌクレインの相対量はコントロールリポソームと 16:0/18:1-PA リポソーム及び 18:1/18:1-PA リポソームとでほとんど差異はなかった (Fig. 39)。しかしながら、 α -シヌクレインを 0.1 $\mu\text{g/ml}$ の PK で処理したとき、18:1/18:1-PA リポソームはコントロールリポソームと比較してより強く PK 耐性の α -シヌクレイン形成を促進した。一方で、16:0/18:1-PA リポソームは PK 耐性の α -シヌクレイン形成に対して有意な効果は示さなかった。これらの結果は、16:0/18:1-PA と比較して、18:1/18:1-PA がより強く α -シヌクレインの異常凝集を促進することを示唆している。

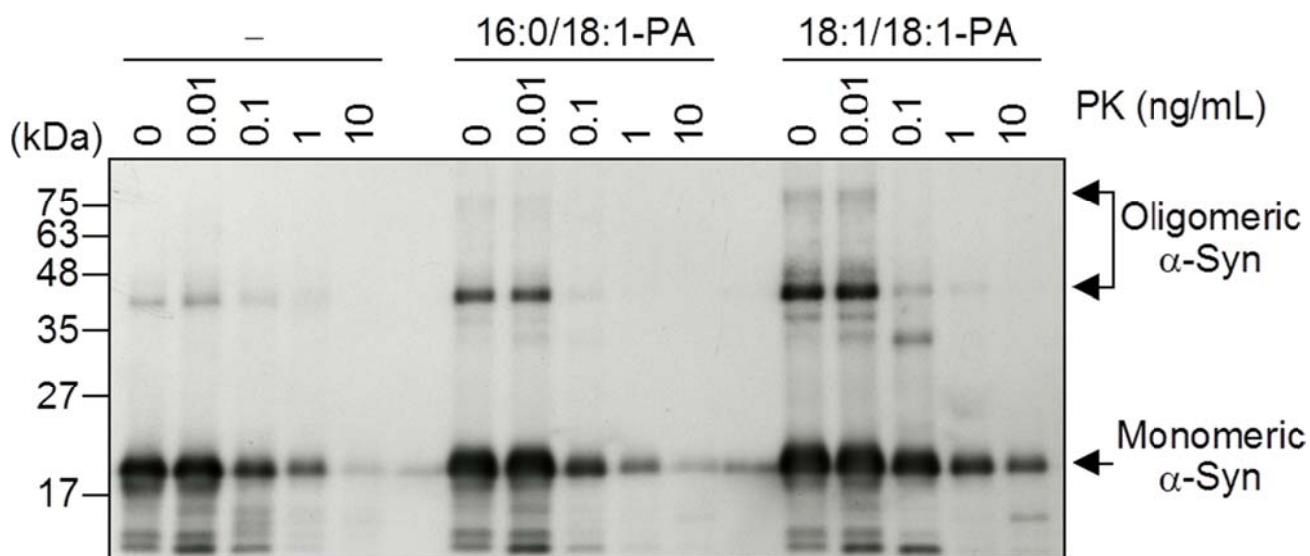


Fig. 37. ウェスタンブロッティングによる PK 処理後の α -シヌクレインの検出

精製した α -シヌクレインをコントロールリポソーム、16:0/18:1-PA リポソーム、18:1/18:1-PA リポソームと 37°C で 14 日間インキュベーションした。その後、0~10 μ g/ml の PK で処理し、抗 α -シヌクレイン抗体を用いたウェスタンブロッティングで α -シヌクレインを検出した。

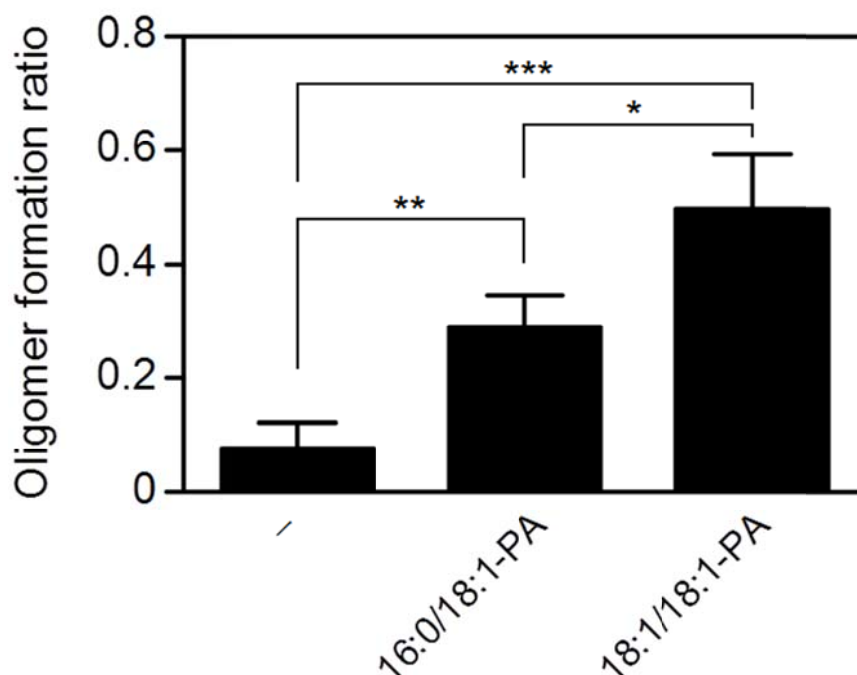


Fig. 38. α -シヌクレインの SDS 耐性オリゴマー形成の評価

精製した α -シヌクレインをコントロールリポソーム、16:0/18:1-PA リポソーム、18:1/18:1-PA リポソームと 37°C で 14 日間インキュベーションした。分解されていない α -シヌクレインは抗 α -シヌクレイン抗体を用いたウェスタンブロッティングで検出した (Fig. 37)。モノマー (~19 kDa) とオリゴマー (~38 kDa, ~76 kDa) のバンド強度を Image-J で算出した (n=3, mean $\pm$ SD)。SDS 耐性オリゴマー形成能はオリゴマーに対するモノマーのバンド強度の比率から求めた。統計処理は one-way ANOVA と Tukey 法を用いて行った。* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.005

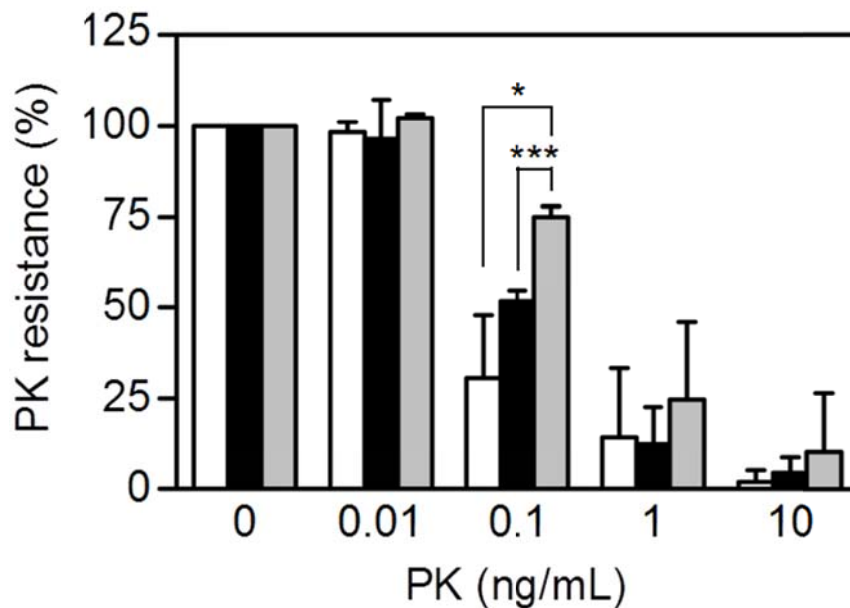


Fig. 39. α -シヌクレインの PK 耐性能の評価

精製した α -シヌクレインをコントロールリポソーム、16:0/18:1-PA リポソーム、18:1/18:1-PA リポソームと 37°C で 14 日間インキュベーションした。その後、0~10 μ g/ml の PK で処理し、抗 α -シヌクレイン抗体を用いたウエスタンブロッティングで α -シヌクレインを検出した (Fig. 37)。PK 耐性能はモノマーの α -シヌクレインのバンド強度を Image-J を用いて算出し、PK 処理なしに対する相対値 (%) で示した (n=3, mean $\pm$ SD)。統計処理は Student's *t*-test を用いて行った。* $p < 0.05$, *** $p < 0.005$

2-4 考察

第 2 章では、第 1 章で神経分化誘導に顕著に産生されることが明らかになった 16:0/16:0-PA を用いた 16:0/16:0-PA 結合蛋白質のスクリーニングを行い、候補蛋白質として α -シヌクレインとプロトルーディンを得た (Table 3)。 α -シヌクレインは酸性リン脂質を含む小胞に結合することが報告されている [49]。第 1 章でも述べたように、PA はグリセロール骨格の 1 位と 2 位に結合する脂肪酸の種類や組み合わせから 50 種以上の分子種が存在する。しかしながら、PA の脂肪酸組成の違いによる生理機能に及ぼす影響の差異はほとんど分かっていない。特に、 α -シヌクレインとの結合試験には脳内の主要 PA 分子種である 16:0/18:1-PA のみが共通して用いられてきた [47, 49, 58]。そこで、スクリーニングに用いた 16:0/16:0-PA と他の研究で用いられている 16:0/18:1-PA を含む 5 つの PA 分子種 (16:0/16:0-, 16:0/18:1-, 18:1/18:1-, 18:0/18:0-, 18:0/20:4-PA) を用いて結合試験を行ったところ、意外にも 18:1/18:1-PA が α -シヌクレインと最も強く結合する PA 分子種であることが分かった (Fig. 32)。 α -シヌクレインは 16:0/16:0-PA を用いたスクリーニングにより同定されたが、コントロールと比較して 6.5 倍の結合活性を示したものの有意差は認められなかった。有意な結合活性を示した PA 分子種は 16:0/18:1-, 18:1/18:1-, 18:0/20:4-PA の 3 つで、これらは共通して一価不飽和脂肪酸や多価不飽和脂肪酸を含んでいた。 α -シヌクレインと最も強く結合した 18:1/18:1-PA は不飽和脂肪酸鎖を 2 本有するが、16:1/18:1-PA や 18:0/20:4-PA は 1 本のみである。これは 2 つの不飽和脂肪酸を有することが α -シヌクレインとの結合に重要であることを示唆しており、膜流動性の上昇により α -シヌクレインとの結合に適した膜環境が形成されている可能性が考えられる。

また、 α -シヌクレインは他の酸性リン脂質である PS と最も強く結合し、 α -シヌクレインに対する結合活性は 16:0/18:1-PS と 16:0/18:1-PA とで同程度であることが報告されている [49]。18:1/18:1-PA の α -シヌクレインとの結合活性は 16:0/18:1-PA の 2.9 倍 (Fig. 32) で 18:1/18:1-PS の 2.4 倍 (Fig. 34) であった。従って、16:0/18:1-PS と 18:1/18:1-PS は同程度の結合活性であると推察され、脂肪酸組成の違いによる影響は大きくないと考えられる。つまり、18:1/18:1-PA が α -シヌクレインと最も強く結合する酸性リン脂質であると言える。

α -シヌクレインは酸性リン脂質を含む小胞に結合することでランダムコイル構造から α -ヘリックス構造へと構造変化し、最終的に凝集して線維化することが知られている [60]。CD スペクトル測定による 2 次構造変化解析の結果、16:0/18:1-PA と 18:1/18:1-PA によって CD スペクトルは劇的に変化し、 α -ヘリックスの特徴である 208 nm と 222 nm 付近に負の極大が見られた (Fig. 35)。CDSSTR アルゴリズムを用いた解析により、16:0/18:1-PA では α -ヘリックス含量が 5%から 38%に、18:1/18:1-PA では 53%にまで増加し、18:1/18:1-PA がより強く α -シヌクレインの構造変化を促すことが分かった (Fig. 36)。

更に、凝集の指標として SDS 耐性オリゴマー形成と PK 耐性を試験したところ、16:0/18:1-PA より 18:1/18:1-PA の方が強い促進効果を示した (Fig. 38、Fig. 39)。これらの結果は、 α -シヌクレインと各 PA 分子種との相互作用の強さの違いを反映しているように見える。つまり、18:1/18:1-PA が最も強く α -シヌクレインの異常凝集を促す酸性リン脂質であると考えられる。

パーキンソン病は約 9 割が孤発性であり、孤発性パーキンソン病では、「老化」が最も大きな発症要因であると考えられている [61]。興味深いことに、PA は高齢の雄マウス (48 – 56 週齢) で増加し、PS は逆に減少するという報告がある [62]。この知見はパーキンソン病の発症率が女性と比べて男性の方が 1.5 倍高いという統計的解析 [63, 64] とも相関しており、PA 量の増加がパーキンソン病発症に関連している可能性がある。本研究では、18:1/18:1-PA が α -シヌクレインの SDS 耐性オリゴマー形成 (Fig. 38) と PK 耐性 (Fig. 39) を強く促進することを見出した。これらの現象は α -シヌクレインの異常凝集に類似しており、18:1/18:1-PA がレビー小体形成の要因である可能性を示している。18:1/18:1-PA は脳内の PA 分子種の中では主要分子種であり、16:0/18:1-PA の約半分程度存在している [62]。従って、老化に伴い 18:1/18:1-PA が蓄積することで α -シヌクレインの異常凝集が促進される可能性がある。

PA は細胞内で様々な経路により合成される。*de novo* 経路では、LysoPA からアシルトランスフェラーゼにより合成され、リン脂質合成の出発点として働く [65]。リモデリング経路では、DGK や PLD によって産生され (第 1 章参照)、シグナル脂質として機能する。興味深いことに、ゲノムワイド関連解析から DGKQ (DGK θ の遺伝子) の一塩基多型 (rs1564282, rs11248060) がパーキンソン病の発症リスクと連関することが示唆されている [66–68]。しかしながら、これらの変異とパーキンソン病との分子生物学的な関係性は明確ではない。DGK θ は V 型に属す DGK アイソザイムであり、脳内では大脳や小脳に高発現している [69]。また、DGK θ の過剰発現により 18:1/18:1-PA が増加することから [70]、DGK θ が脳内で 18:1/18:1-PA を産生することで α -シヌクレインの異常凝集を引き起こす可能性がある。

第 2 章では、16:0/16:0-PA 結合蛋白質のスクリーニングを行い、候補として α -シヌクレインとプロトルーディンを得た (Table 3)。 α -シヌクレインは、パーキンソン病患者の黒質ニューロンに特徴的なレビー小体の主成分であり、本章から 18:1/18:1-PA と強く結合して異常凝集することが明らかとなった。また、プロトルーディンは 2006 年に同定された蛋白質であり、神経突起伸長への関与が報告されている [71]。従って、第 1 章で神経分化誘導時に産生されることが同定された 32:0-PA (16:0/16:0-PA) の下流因子である可能性が考えられる。このように脂質の脂肪酸組成にまで着目した解析を行い、実際に細胞内で起こっている生命現象を再現することで、より緻密で正確な分子メカニズムが明らかになることが期待される。本章では、 α -シヌクレインが 18:1/18:1-PA 存在下

で異常凝集が最も強く促進されるという重要な知見を得た。

【参考文献】

- [1] Y. Fang *et al*, *Science*, **294**, 1942-1945 (2001)
- [2] D. Zhou *et al*, *J. Biol. Chem.*, **270**, 25549-25556 (1995)
- [3] J. O. Jin *et al*, *J. Cell Biochem.*, **100**, 191-203 (2007)
- [4] A. Moritz *et al*, *J. Biol. Chem.*, **267**, 7207-7210 (1992)
- [5] G. H. Jenkins *et al*, *J. Biol. Chem.*, **269**, 11547-11554 (1994)
- [6] C. Limatola *et al*, *Biochem. J.*, **304**, 1001-1008 (1994)
- [7] G. M. Bokoch *et al*, *J. Biol. Chem.*, **273**, 8137-8144 (1998)
- [8] H. Abramovici *et al*, *Mol. Biol. Cell*, **20**, 2049-2059 (2009)
- [9] F. Sakane *et al*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1771**, 793-806 (2007)
- [10] K. Goto *et al*, *J. Exp. Med.*, **214**, 199-212 (2008)
- [11] I. Merida *et al*, *Biochem. J.*, **409**, 1-18 (2008)
- [12] M. K. Topham and R. M. Epand, *Biochim. Biophys. Acta*, **1790**, 416-424 (2009)
- [13] X. Peng and M. A. Frohman, *Acta Physiol. (Oxf.)*, **204**, 219-226 (2012)
- [14] R. C. Bruntz *et al*, *Pharm. Rev.*, **66**, 1033-1079 (2014)
- [15] M. A. Frohman, *Trends Pharm. Sci.*, **36**, 137-144 (2015)
- [16] S. Mizuno *et al*, *FEBS Open Bio*, **2**, 267-272 (2012)
- [17] H. Sakai *et al*, *J. Biol. Chem.*, **289**, 26607-26617 (2014)
- [18] S. Mizuno *et al*, *Biochem. Biophys. Rep.*, **8**, 352-359 (2016)
- [19] E. G. Bligh and W. J. Dyer, *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911-917 (1959)
- [20] W. Su *et al*, *Mol. Pharm.*, **75**, 437-446 (2009)
- [21] R. Ganesan *et al*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1851**, 261-272 (2015)
- [22] M. Sato *et al*, *Pharmacology*, **92**, 99-107 (2013)
- [23] M. Bunting *et al*, *J. Biol. Chem.*, **271**, 10230-10236 (1996)
- [24] I. Ding *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**, 5519-5524 (1997)
- [25] A. E. Traynor *et al*, *J. Neurochem.*, **39**, 1677-1683, (1982)
- [26] A. E. Traynor, *Brain Res.*, **316**, 205-210 (1984)
- [27] J. S. da Silva and C. G. Dotti, *Nat. Rev. Neurosci.*, **3**, 694-704 (2002)
- [28] S. Thirugnanam *et al*, *Biochemistry*, **40**, 10607-10613 (2001)
- [29] S. B. Milne *et al*, *Biochemistry*, **47**, 9372-9379 (2008)
- [30] S. E. Zulian *et al*, *Neurochem. Int.*, **58**, 330-336 (2011)
- [31] B. J. Holub and A. Kuksis, *J. Biochem.*, **49**, 1347-1356 (1971)
- [32] R. R. Baker and W. Thompson, *Biochim. Biophys. Acta*, **270**, 489-503 (1972)
- [33] Y. V. Shulga *et al*, *FEBS Lett.*, **585**, 4025-4028 (2011)
- [34] I. Flores *et al*, *J. Biol. Chem.*, **271**, 10334-10340 (1996)

- [35] I. Flores *et al*, *J. Immunol.*, **163**, 708-714 (1999)
- [36] H. Watanabe *et al*, *J. Biol. Chem.*, **279**, 37870-37877 (2004)
- [37] H. Watanabe *et al*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **413**, 288-293 (2011)
- [38] T. G. Oliveira *et al*, *J. Neurosci.*, **30**, 16419-16428 (2010)
- [39] C. N. Antonescu *et al*, *Mol. Biol. Cell*, **21**, 2944-2952 (2010)
- [40] J. D. Kim *et al*, *Sci. Adv.*, **1**, e1500615 (2015)
- [41] W. Su *et al*, *Future Oncol.*, **5**, 1477-1486 (2009)
- [42] Y. Yakubchuk *et al*, *Mol. Cell Biol.*, **25**, 7289-7302 (2005)
- [43] K. Kim *et al*, *EMBO J.*, **28**, 1170-1179 (2009)
- [44] A. Iwai *et al*, *Neuron*, **14**, 467-754 (1995)
- [45] L. Maroteaux and R. H. Scheller, *Mol. Brain Res.*, **11**, 335-343 (1991)
- [46] V. Ruiperez *et al*, *Prog. Lipid Res.*, **49**, 420-428 (2010)
- [47] Z. Jiang *et al*, *J. Phys. Chem. B*, **119**, 4812-4823 (2015)
- [48] S. Kubo *et al*, *J. Biol. Chem.*, **280**, 31664-31672 (2005)
- [49] W. S. Davidson *et al*, *J. Biol. Chem.*, **273**, 9443-9449 (1998)
- [50] R. Jakes *et al*, *FEBS Lett.*, **345**, 27-32 (1994)
- [51] Y. Zarbiv *et al*, *Neurobiol. Dis.*, **70**, 90-98 (2014)
- [52] S. Mizuno *et al*, *FEBS Lett.*, under revision
- [53] M. Satoh *et al*, *Pancreas*, **42**, 475-482 (2013)
- [54] L. Whitmore and B. A. Wallace, *Nucleic. Acids Res.*, **32**, W668-673 (2004)
- [55] L. Whitmore and B. A. Wallace, *Biopolymers*, **89**, 392-400 (2008)
- [56] N. Screerama and R. W. Woody, *Anal. Biochem.*, **287**, 252-260 (2000)
- [57] M. Suzuki *et al*, *Hum. Mol. Genet.*, **24**, 6675-6686 (2015)
- [58] R. Bussell Jr. and D. Eliezer, *Biochemistry*, **43**, 4810-4818 (2004)
- [59] R. J. Perrin *et al*, *J. Biol. Chem.*, **275**, 34393-34398 (2000)
- [60] C. Galvagnion *et al*, *Nat. Chem. Biol.*, **11**, 229-234 (2015)
- [61] A. Reeve *et al*, *Ageing Res. Rev.*, **14**, 19-30 (2014)
- [62] I. Rappley *et al*, *J. Neurochem.*, **111**, 15-25 (2009)
- [63] G. F. Wooten *et al*, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **75**, 637-639 (2004)
- [64] K. S. Taylor *et al*, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **78**, 905-906 (2007)
- [65] A. Yamashita *et al*, *Biology*, **3**, 801-830 (2014)
- [66] N. Pankrats *et al*, *Hum. Genet.*, **124**, 593-605 (2009)
- [67] J. Simon-Sacchez *et al*, *Eur. J. Hum. Genet.*, **19**, 655-661 (2011)
- [68] Y. P. Chen *et al*, *J. Clin. Neurosci.*, **20**, 880-883 (2013)
- [69] B. Houssa *et al*, *J. Biol. Chem.*, **272**, 10422-10428 (1997)
- [70] C. Zhang *et al*, *J. Biol. Chem.*, **290**, 3519-3528 (2015)

[71] M. Shirane *et al*, *Science*, **314**, 818-821 (2006)

【謝辞】

本研究を行うにあたり、終始熱心な御指導を頂いた坂根郁夫教授に深く感謝致します。また、LC-MS を使用するにあたり熱心に御指導して下さいった同学共通機器センターの荷堂清香氏、MS/MS による蛋白質同定にあたり御協力して下さいった同学医学部附属病院の佐藤守客員准教授、本研究を遂行するにあたり抗 DGK ζ 抗体を提供して下さいった山形大学医学部の後藤薫教授に心より感謝致します。本研究の研究費の一部は日本学術振興会特別研究員科研費 (MEXT/JSPS KAKENHI Grant Number 15J05821) により支援されました。

最後に、これまで有意義な議論と適切な助言を下さり、精神的に支えて下さった、生体機能化学研究室のメンバーならびに OB・OG の皆様と、大学院博士課程まで通わせて下さり、常に励まして下さった両親にこの場を借りて御礼申し上げます。