

千葉大学審査学位論文

ジアシルグリセロールキナーゼ $\delta$ 欠損  
による強迫性障害様行動惹起の分子  
機構の解明

2020年1月

千葉大学大学院 融合理工学府  
先進理化学専攻 化学コース

陸 強

## 【目次】

- 目次 2
  
- 略号 3~4
  
- 要約 5
  
- 第 1 章 ジアシルグリセロールキナーゼ $\delta$ の欠損はセロトニン神経系の機能低下を惹起する
  - 1-1 緒言 7
  - 1-2 試薬・実験手法 10~12
  - 1-3 結果 13~23
    - 1-3-1 脳特異的 DGK $\delta$ 欠損マウスの大脳皮質における SERT タンパク質量の減少
    - 1-3-2 DGK $\delta$ と SERT との相互作用及び共局在
    - 1-3-3 DGK $\delta$ 欠損マウスの大脳皮質における TPH-2 タンパク質量の減少と MAO-A
    - 1-3-4 DGK $\delta$ 欠損マウスの大脳皮質における 5-HT 量の低下
  - 1-4 考察 24~26
  
- 第 2 章 ジアシルグリセロールキナーゼ $\delta$ はセロトニントランスポーターのユビキチン化を亢進しそのタンパク質量を制御する
  - 2-1 緒言 28
  - 2-2 試薬・実験手法 29~31
  - 2-3 結果 32~65
    - 2-3-1 DGK $\delta$ 2 は活性依存的に SERT のタンパク質量を負に制御する
    - 2-3-2 DGK $\delta$ 2 は SERT の C 末端と相互作用する
    - 2-3-3 DGK $\delta$ 2 は N 末端触媒サブドメイン-a およびコイルドコイル構造含有領域を介して SERT と結合する
    - 2-3-4 DGK $\delta$ 2 は SERT のユビキチン程度を促進する
    - 2-3-5 DGK $\delta$ 2 が Praja-1 E3 ユビキチン-タンパク質リガーゼの作用を介して SERT のユビキチン化と分解を促進する
    - 2-3-6 DGK $\delta$ 2 が選択産生する 40:6PA が Praja-1 E3 ligase 活性を促進する
  - 2-4 考察 66~68
  
- 参考文献 68~69
  
- 謝辞 71

## 【略号】

Chol : コレステロール  
Cre マウス : cre<sup>-loxP</sup> の遺伝子を持つ DGK $\delta$  マウス  
DAT : ドパミントランスポーター  
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  
FBS : ウシ胎仔血清  
5-HT : セロトニン  
IP : 免疫沈降  
KD : Kinase dead  
KO : knockout  
LC : 液体クロマトグラフィー  
LoxP マウス : cre<sup>-loxP</sup> の遺伝子を持つ DGK $\delta$  マウス  
MAGE-D1 : メラノーマ抗原遺伝子-D1  
MAO-A : モノアミン酸化酵素 A  
mRNA : messenger RNA  
MS : 質量分析  
OCD : 強迫性障害  
PA : ホスファチジン酸  
PBS : Phosphate buffered saline  
PC : ホスファチジルコリン  
PG : ホスファチジルグリセロール  
PKC : Protein kinase C  
PS : ホスファチジルセリン  
RT-PCR : 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応  
SAM : sterile  $\alpha$  motif ドメイン  
SDS-PAGE : SDS-polyacrylamide gel electrophoresis  
SERT : セロトニントランスポーター  
siRNA : Small interfering RNA  
SSRIs : 選択的セロトニン再取り込み阻害薬  
TBS : Tris-buffered saline  
TBS-T : 0.1% Tween 含有 TBS  
TPH-2 : トリプトファンヒドロキシラーゼ 2  
WB : ウェスタンブロッティング

WT : Wild type

## 【要約】

ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) は、ジアシルグリセロール (DG) をリン酸化し、ホスファチジン酸 (PA) を産生する酵素である。現在までに、DGK は構造的特徴から 5 つのサブタイプに分類され、10 種類のアイソザイムが同定されている。また、組織局在や細胞内局在もアイソザイムごとに異なっており、様々な生理現象に関与することも明らかになっている。最近我々は、II 型 DGK に属する  $\delta$  アイソザイムがマウスの脳で最も強く発現することを報告した。また、DGK $\delta$ 脳特異的 knockout (KO) マウスを用いて、種々の行動解析により、DGK $\delta$ と強迫性障害 (OCD) と関連していることを見出した。しかしながら、それはどのようなメカニズムを介するのかについては全く明らかになっていなかった。そこで、まず、DGK $\delta$ -KO マウスを用いて、DGK $\delta$ の欠損により生じる影響を調べた。DGK $\delta$ -KO マウスの大脳皮質で、OCD との関連が報告されている 5-HT (セロトニン) の減少に加え、その合成酵素トリプトファン水酸化酵素 2 (TPH-2) mRNA の減少、及びセロトニントランスポーター (SERT) の増加が見られた。以上の結果から、DGK $\delta$  欠損は大脳皮質においてセロトニン神経系の異常を起すことを示していた。

次に、DGK $\delta$ -KO マウスの大脳皮質ではユビキチン化されている SERT の量が減少していることが明らかになった。さらに、DGK $\delta$  は E3 ユビキチンリガーゼである Praja-1 とアダプタータンパク質メラノーマ抗原遺伝子-D1 (MAGE-D1) と相互作用することが分かった。さらに、マウスの脳における DG/PA 分子種を、本研究室で開発した液体クロマトグラフィー・質量分析法によって解析した。DGK $\delta$ の欠損によって、18:0/22:6-DG (X:Y=脂肪酸の炭素数:脂肪酸の不飽和度) が顕著に増加し、18:0/22:6-PA が減少することが分かった。興味深いことに、18:0/22:6-PA が Praja-1 と強く結合し、Praja-1 活性を促進することが分かった。これらの結果から、DGK $\delta$  は Praja-1-ユビキチン-プロテアソーム系を介して、SERT のユビキチン化を促進することが強く示唆された。

以上の結果から、DGK $\delta$  によるセロトニン神経系制御の分子メカニズムの一端を解明することが出来た。また、脳特異的 DGK $\delta$ -KO マウスがユニークな OCD の動物モデルとして確立し、且つ、新しい治療法の開発にも役立つ可能性がある。

## 第 1 章

ジアシルグリセロールキナーゼ $\delta$ の欠損はセロトニン神経系の機能低下を惹起する

## 1-1 緒言

脂質代謝酵素ジアシルグリセロール (DG) キナーゼ (DGK) は DG のリン酸化を触媒してホスファチジン酸 (PA) を産生する酵素である [1-4] (図 1)。現在までに、DGK は構造的特徴から I-V の 5 つのサブタイプに分類される 10 種類のアイズォイム ( $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \eta, \kappa, \epsilon, \zeta, \iota, \theta$ ) が同定され [1-4] (図 2)、DGK の基質 DG とその産生物 PA は共に細胞内シグナル脂質であることから、DGK はこれら 2 つのメッセンジャーを代謝・制御し、生命活動のために極めて重要な生理的役割を担っている。

最近、我々は DGK $\delta$  アイズォイムがマウス脳に高発現することを明らかにした[5]ことから、DGK $\delta$  は神経機能の調節や神経疾患の発症に関与している可能性が考えられた。神経疾患において標的遺伝子改変マウスを用いた研究が多く行われている。しかしながら、以前に我々のグループは全身 DGK $\delta$ -knockout (KO) マウスを作製したが、肺の分化異常による呼吸不全を起こして、生後 24 時間以内に死亡してしまうため[6]、目的の遺伝子機能解析は困難であった。この問題を解決するため、我々は最近、全身ではなく、脳だけで標的欠損される脳特異的 conditional DGK $\delta$ -KO マウスを作製した[7]。このマウスを用いた種々の行動学的な解析により、ビー玉埋め試験において、強迫性障害 (OCD) の指標となる繰り返し行為の亢進、ならびに新規物体探索試験法による物体に対する接触回数の増加 (OCD 様行動) を示すことが明らかになった[7]。また、OCD の代表的な治療薬フルオキセチン[8,9]の投与によって、上記の試験における DGK $\delta$ -KO マウスの OCD 様行動が顕著に抑制された。

フルオキセチンはセロトニントランスポーター (SERT) を阻害することで、OCD の症状を緩和することが知られている[8]。そこで、今回は DGK $\delta$  と SERT の関連性を検証するため、まず、DGK $\delta$ -KO とコントロールマウスの大脳皮質中の SERT 発現量をウェスタンブロット (WB) 法で比較した。また、DGK $\delta$ -KO マウスの大脳皮質破砕液中から抗 DGK $\delta$  抗体を用いて、DGK $\delta$  タンパク質を免疫沈降し、SERT との相互作用を調べた。また、DGK $\delta$  と SERT を過剰発現させたマウス神経芽細胞腫由来 Neuro-2a 細胞において、DGK $\delta$  と SERT の局在を観察した。さらに、DGK $\delta$ -KO の大脳皮質で、セロトニン (5-HT) の合成酵素 TPH-2、5-HT 代謝酵素 MAO-A の発現量の変化を調べた[10]。

図 1. DG/PA の変換

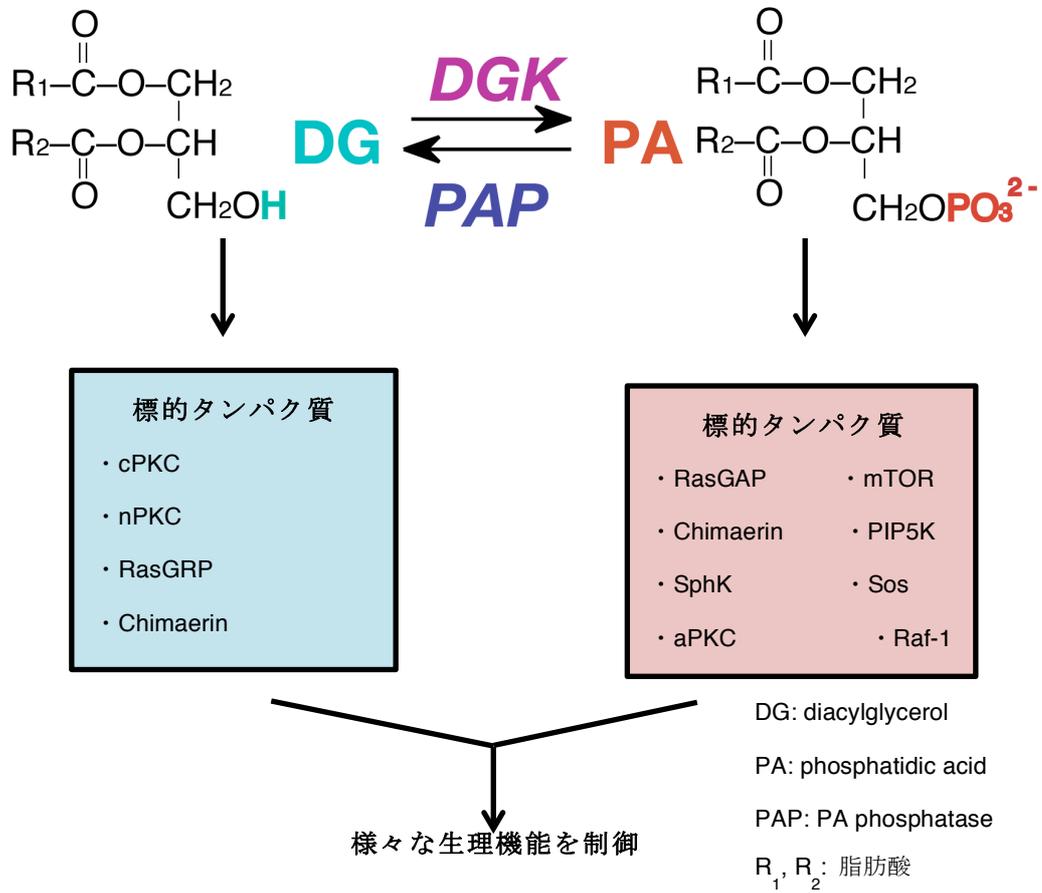
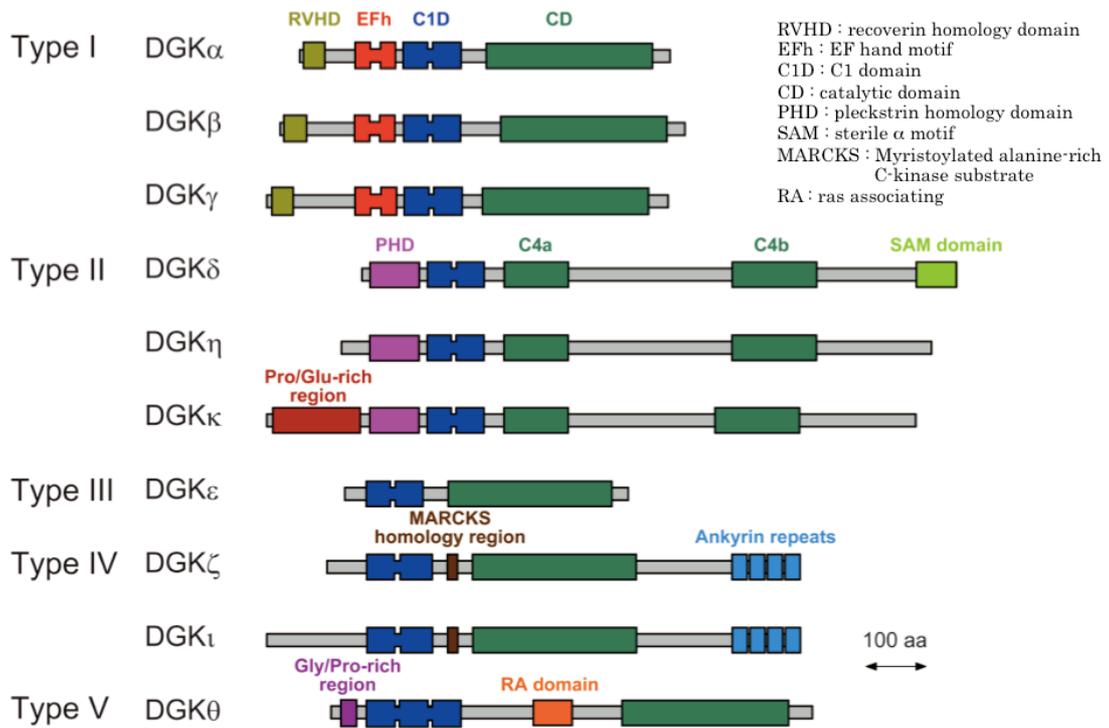


図 2. 哺乳類 DGK ファミリーの構造模式図



## 1-2 試薬と実験方法

### 1-2-1 Mice

本研究における全ての動物実験は、千葉大学の委員会（許可番号：30-185）により、承認を受け、すべての動物の飼育および処置に関する手順は「千葉大学が定めた動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」に沿って実施した。苦しみと使用するマウスの数を最小限に抑えるように努力した。マウスは  $24\pm 2^{\circ}\text{C}$  で 12 時間の明暗サイクル(7時から19時まで点灯)で飼育し、餌と水を自由に摂取できるようにした。

DGK $\delta$ -KO マウス [11] (accession no. CDB0660K: <http://www2.clst.riken.jp/arg/mutant%20mice%20list.html>)は cre-loxP system を用いて作製した。詳細は省くが、DGK $\delta$  のエクソン9に隣接する部位に LoxP を配置することにより、loxP<sup>+</sup>マウスを作製し、脳で特異的に発現する calcium/calmodulin-dependent protein kinase II  $\alpha$  の promoter と cre の遺伝子を融合した DNA を導入したマウス (cre<sup>+</sup>loxP<sup>+</sup>) と掛け合わせ、遺伝子組み換えを誘発することで、脳特異的な conditional DGK $\delta$ -KO マウス (cre<sup>+</sup>loxP<sup>+</sup>)を得た。また、cre<sup>-</sup>:loxP<sup>+</sup>同腹仔を cre<sup>-</sup>:loxP<sup>+</sup> (DGK $\delta$ -KO) マウスの対照群として使用した。

### 1-2-2 SDS-PAGE 及び Western blotting

マウスは断首を行った後、素早くマウス脳を摘出し、脳サンプルは全て氷上で扱った。すぐ使わないサンプルは $-80^{\circ}\text{C}$ に保存した。適量の lysis buffer (50 mM HEPES (pH 7.2), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, complete EDTA free, (Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 (1%), Phosphatase Inhibitor Cocktail 3 (1%))を加え、均一化するまで約 10 往復程度ゆっくりとホモジェナイズし、 $4^{\circ}\text{C}$ , 3,600 rpm で 5 分遠心した後、上清の蛋白質濃度を Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit (Thermo Scientific)を用いて測定した。各実験で得られたサンプルは 5 倍濃度の SDS (sodium dodecyl sulfate) sample buffer (0.6125 M Tris-HCl, pH 6.8, 10%(w/v) SDS, 50%(v/v)グリセロール, 0.02% (w/v) ブロムフェノールブルー) を 1/5 量加え、さらにそこに 2-メルカプトエタノールを 1/10 量加えた後に  $100^{\circ}\text{C}$ で 5 分間煮沸し、SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)用のサンプルとした。得られたサンプルの泳動は、目的のタンパク質の分子量に合わせ、6%、7.5%のアクリルアミドゲル (アクリルアミド：ビスアクリルアミド=29.2 : 0.8) を使い、100 V で 20 分間泳動することで蛋白質のバンドを濃縮した後、200 V で十分に分離されるまで泳動を行なった。SDS-PAGE で分離されたタンパク質は polyvinylidene difluoride membrane (Pall Life Sciences) にウェット式泳動装置で 1 時間のトランスファーした後、メンブレンを Skim milk (雪印乳業株式会社) を使い、ブロッキングを 1 時間行った。抗 DGK $\delta$ [9]、抗 DGK $\eta$  [12]、抗 SERT (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)、抗 dopamine transporter (DAT) (Santa Cruz Biotechnology)、抗 phospho-Thr276-SERT (Phosphosolutions, Littleton, CO, USA)、抗 phospho-Thr53-DAT (Phosphosolutions)、抗 tryptophan hydroxylase (TPH)-2 (Novus Biologicals,

Littleton, CO, USA)、抗 monoamine oxidase (MAO)-A (GeneTex, Irvine, CA, USA); 抗 bactin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)抗体用いたウェスタンブロット (WB) では、メンブレンのブロッキングに 5%スキムミルク/0.1% Tween 20 含有 Tris-buffered saline (TBS: 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl (pH7.4)) (TBS-T) 、一次抗体の希釈に 5% BSA/TBS-T、二次抗体の希釈に 5%スキムミルク/TBS-T を用いた。一次抗体は 4°Cで 16 時間インキュベートした。メンブレンの洗浄には TBS-T を用いた。ブロッキング後は、一次抗体及び二次抗体のインキュベート後は 3 分 × 5 回洗浄した。次に、HRP-融合 抗 rabbit IgG (1/10000 希釈)、抗 mouse IgG (1/10000 希釈)、抗 goat IgG (1/5000 希釈) 抗体を用い、2 時間インキュベートした後、Amersham ECL Western blotting Detection Reagent (GE Healthcare、RPN2106) を用いて 1 分間の反応の後、バンドの発光を Amersham ECL Hyper film (GE Healthcare, 28906837) で検出した。

### 1-2-3 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)

マウスの大脳皮質から抽出した mRNA サンプルとオリゴ dT primer を用いて、RT-PCR によって、各 cDNA を合成した。合成した cDNA を鋳型として、マウス SERT、TPH-2、MAO-A と glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) に特異的な primer を用いた PCR (rTaq polymerase (Toyobo, Osaka, Japan)) を行った。Primer の配列を以下に示した。

SERT: forward primer (5'-CAAGAAGATGGATTCCTC-3'), reverse primer (5'-TATTGGTGAAGATGAGCA-3');

TPH-2: forward primer (5'-CCGGAACCAGATACATGCCA-3'), reverse primer (5'-CCGAGAAGGGACGGGTAATTG-3');

MAO-A: forward primer (5'-TGGTATGTGAGGCAGTGT-3'), reverse primer (5'-ATGATGGCAGGCATTGAC-3');

GAPDH: forward primer (5'-CCGGAACCAGATACATGCCA-3'), reverse primer (5'-CCGAGAAGGGACGGGTAATTG-3')

### 1-2-4 免疫沈降 (IP)

0.5 mg のタンパク質を含むマウス大脳皮質サンプルを抗 DGK $\delta$ 、抗 SERT、または抗 FLAG (Sigma-Aldrich) 抗体および Protein A/G PLUS agarose ビーズ (Santa Cruz Biotechnology) [20] とインキュベートした。免疫沈降物を SDS サンプルバッファーで煮沸し、その後、SDS-PAGE を行った後、ウェスタンブロッティングを行った。

### 1-2-5 細胞培養

マウス神経芽細胞腫細胞株である Neuro-2a 細胞は高グルコース濃度のダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM, Wako Pure Chemical Industries) (10%ウシ胎仔血清 (FBS), 100 U/mLペニシ

リン, 100 mg/mLストレプトマイシン (Wako Pure Chemical)) で、37°CのCO<sub>2</sub>インキュベーター (5% CO<sub>2</sub>) 内で培養した。

#### 1-2-6 プラスミド導入

前継代から48時間後にトリプシン-EDTA溶液を加え、インキュベーターに5分静置することで、細胞を剥離し、トランスフェクション前日に、 $0.5 \times 10^6$  個の細胞をポリ-L-リシンでコーティングした12 well dish (IWAKI/ASAHI TECHNO GLASS株式会社) にまいた。プラスミド (pEGFP-SERT, p3xFLAGCMV-DGK $\delta$ ) はLipofectamine 2000 transfection reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) によって導入した。トランスフェクションの24時間後、20  $\mu$ Mのレチノイン酸を添加した高グルコースのダルベッコ改変イーグル培地 (2%ウシ胎仔血清 (FBS) , 100 U/mLペニシリン, 100 mg/mLストレプトマイシン) に交換した。

#### 1-2-7 細胞染色

カバーガラス上の細胞を3.7%ホルムアルデヒドで5分間固定し、0.1%Triton X-100/PBSを加え、5分間インキュベートした。次に、ブロッキングステップは室温の状態で2%ウシ血清アルブミン (BSA)/PBSで30 min間インキュベートした。一次抗体には抗FLAG抗体(F1804, Sigma-Aldrich) と抗マウスIgG二次抗体、Alexa Fluor 594 (Thermo Fisher Scientific) 各1時間、遮光室温でインキュベートし、その後、PBSで洗浄した。最後に、Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) で細胞封入した。共焦点蛍光顕微鏡 FV1000-D (Olympus) を用いて、細胞を観察した。

#### 1-2-8 5-HT enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

マウスの大脳皮質 (16週齢, オス) を溶解バッファー (50 mM HEPES, pH 7.2, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, Complete protease inhibitor cocktail (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) でホモジェナイズした。次に、5-HTを定量化するELISA kit (Abnova, Taipei, Taiwan) で定量した。100  $\mu$ Lのサンプル量を使用した。

## 1-3 結果 [10]

### 1-3-1 脳特異的 DGK $\delta$ 欠損マウスの大脳皮質における SERT タンパク質量の減少

我々のグループは最近、OCD 治療薬であるフルオキセチン (SERT inhibitor, SSRI) を DGK $\delta$ -KO マウスに投与した時、このマウスの OCD 様行動が抑制されることを明らかとしている[7]。そこで、まず、DGK $\delta$ -KO マウスの大脳皮質における SERT タンパク質量をコントロール loxP マウスと比較した。図 3 A, B に示されるように、DGK $\delta$ -KO マウスの大脳皮質における SERT タンパク質量は loxP マウスに比べ、顕著に増加した。また、SERT のリン酸化の程度も増加したが (図 3 C)、リン酸化 SERT は SERT に対する比率は、有意に変化していなかった (図 3 D)。したがって、SERT のリン酸化程度は顕著な差がなかった。さらに、SERT mRNA 量も測定したが、その mRNA 量は有意に変化していなかった (図 3 E, F)。これらの結果は、DGK $\delta$  が SERT タンパク質量を、主に翻訳または翻訳後の段階で調節していることを示唆している。

ドパミン神経系は OCD と関連することが報告されている[13]。そこで、DGK $\delta$ -KO マウスの大脳皮質におけるドパミントランスポーター (DAT) タンパク質量を loxP マウスと比較した (図 4)。DGK $\delta$ -KO マウスの大脳皮質における DAT タンパク質量とそのリン酸化程度は変化がなかった。検討した結果、2 つの神経系の中で、DGK $\delta$  は選択的にセロトニン神経系を制御することが示唆された。

図 3. マウス的大脑皮質における SERT の発現。(A) 16 週齢のマウス的大脑皮質サンプル (20 mg) を用いて、SERT タンパク質及びそのリン酸化 (Thr276) を WB により検出し、バンドの定量は Image J software で行った。(B-C) SERT、リン酸化 SERT (P-SERT) のバンド強度は  $\beta$ -Actin の量で割って補正し、または、(D) P-SERT のバンド強度は SERT 量で割って補正した。コントロールでの発現を 100% として相対量で示し、7 回の独立実験の平均値  $\pm$  標準偏差を求めて、グラフを作成した (\* $p < 0.05$  vs. control mice)。(E) 16 週齢のマウス的大脑皮質サンプルを用いて、SERT mRNA 量を RT-PCR によって検出し、(F) バンドの定量は Image J software で行った。SERT mRNA のバンド強度は GAPDH 量で割って補正した。コントロールでの発現を 100% として相対量で示し、3 回の独立実験の平均値  $\pm$  標準偏差を求めて、グラフを作成した (\* $p < 0.05$  vs. control mice)。

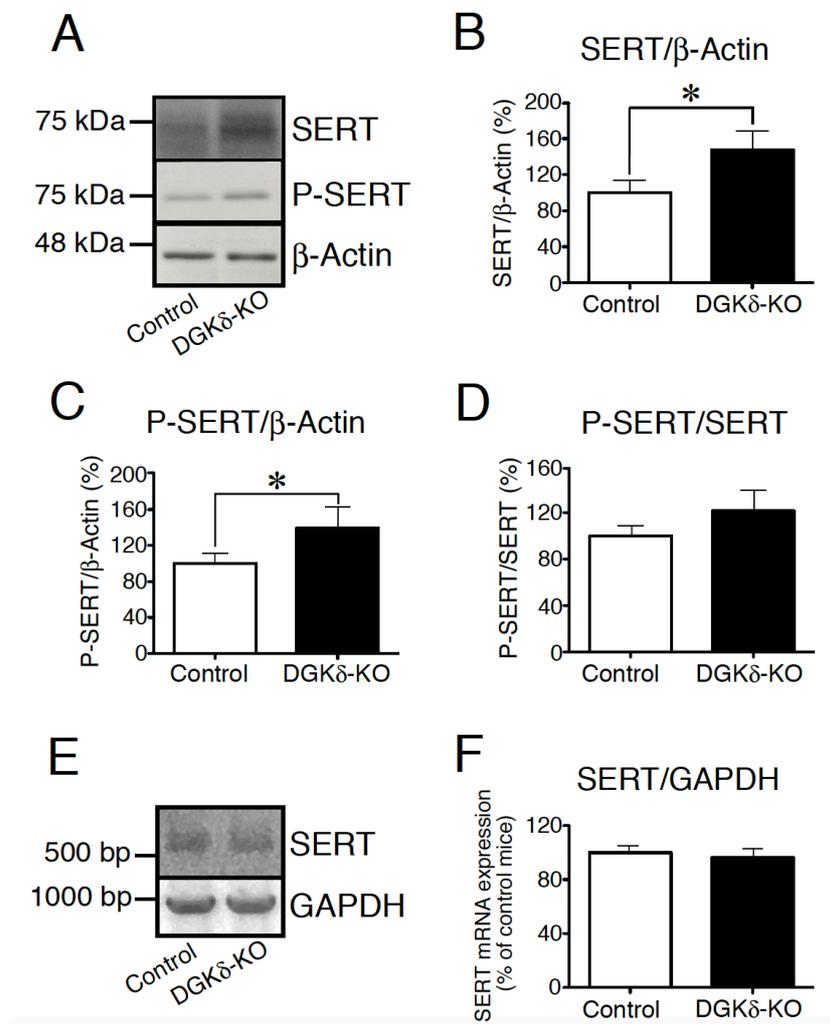
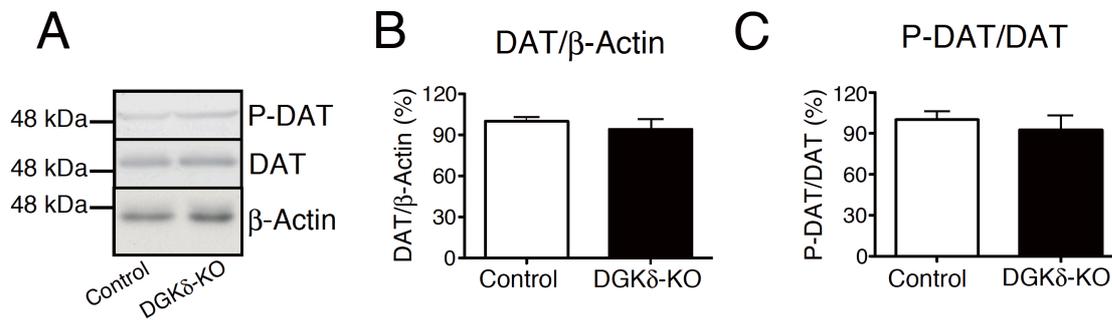


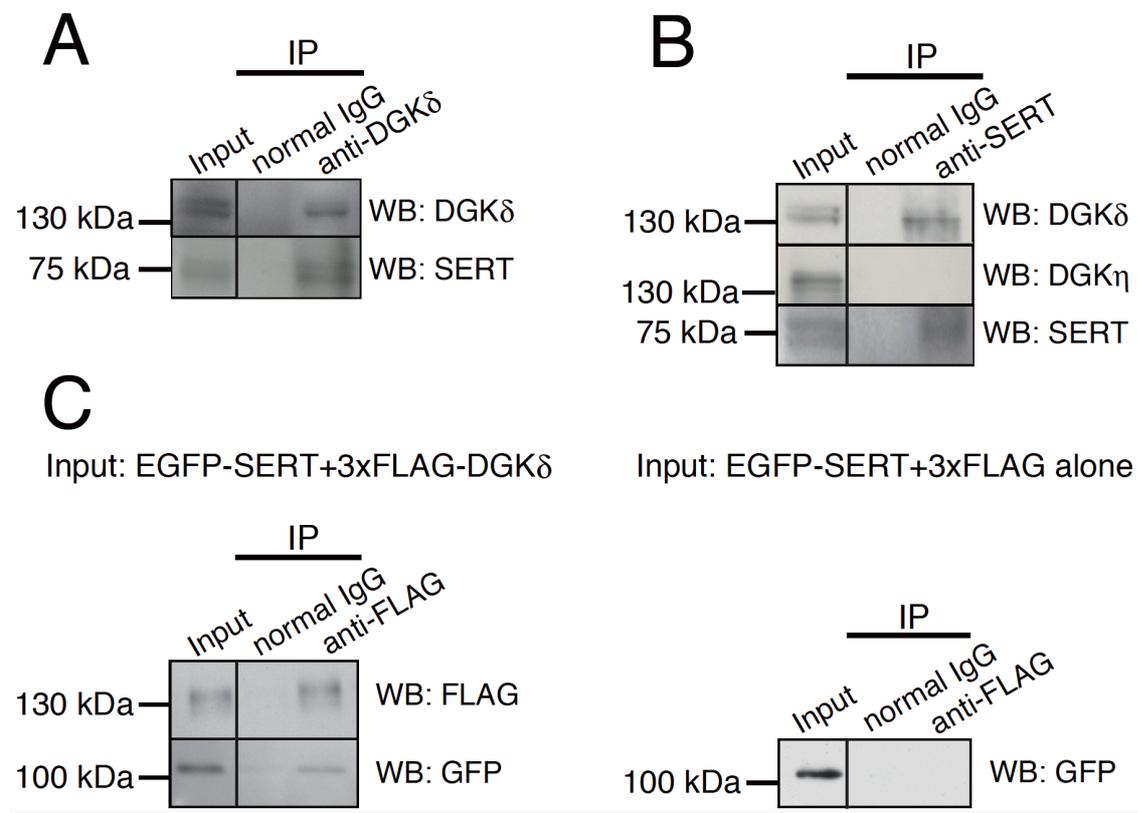
図 4. マウスの大脳皮質における SERT の発現。(A) 16 週齢のマウスの大脳皮質サンプル (20  $\mu$ g) を用いて、DAT タンパク質及びそのリン酸化 (Thr53) を WB により検出し、バンドの定量は Image J software で行った。(B) DAT のバンド強度は  $\beta$ -Actin 量で割って補正し、または、(C) リン酸化 DAT のバンド強度は DAT 量で割って補正した。コントロールでの発現を 100% として相対量で示し、4 回の独立実験の平均値  $\pm$  標準偏差を求めて、グラフを作成した。



### 1-3-2 DGK $\delta$ と SERT との相互作用及び共局在

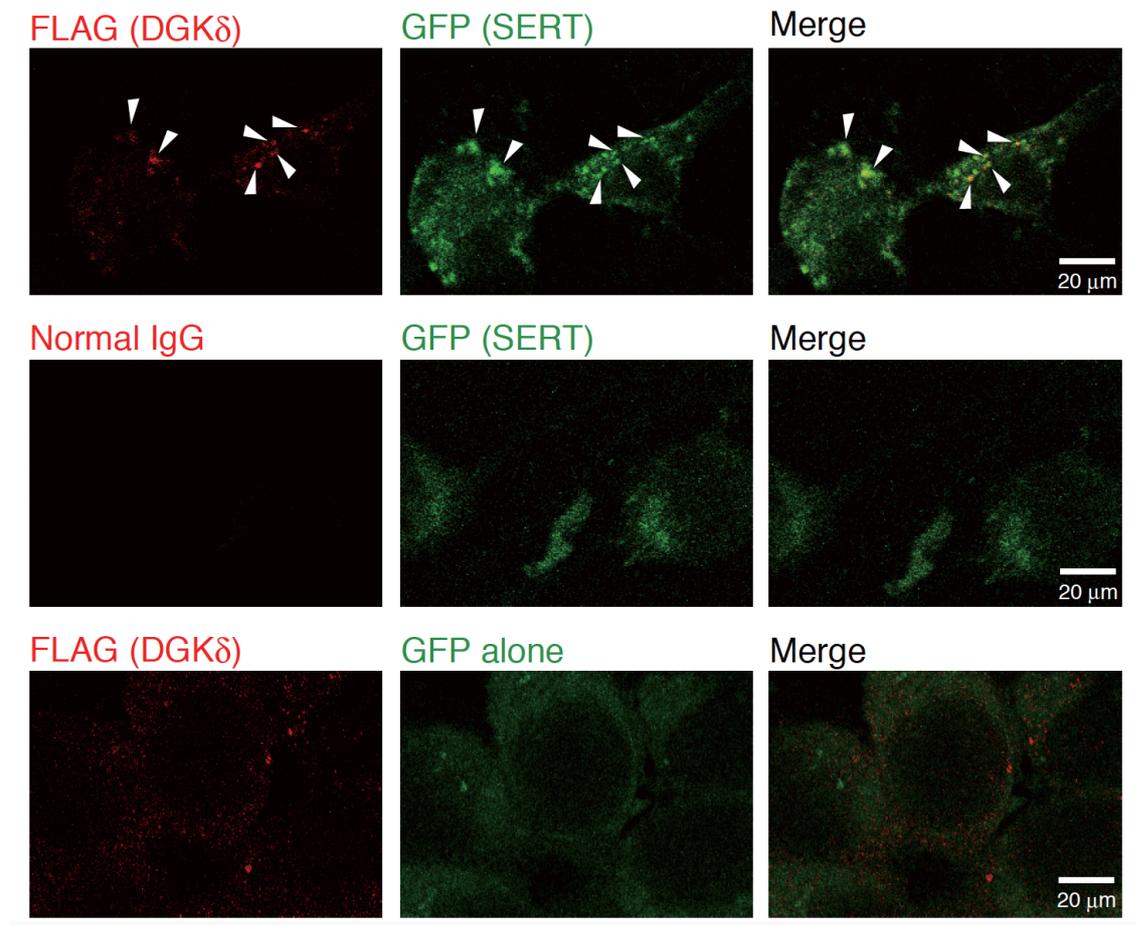
DGK $\delta$  はどのように SERT タンパク質量を制御するのかを検討するために、まずは、DGK $\delta$  と SERT と相互作用するか否かを解析した。C57BL6/N (野生型) マウスの大脳皮質破碎液中から抗 DGK $\delta$  抗体を用いて、DGK $\delta$  タンパク質を免疫沈降したところ、SERT のバンドが免疫沈降物 (IP) で検出された。コントロールである Normal IgG ではバンドは検出されなかった(図 5 A)。また、逆に抗 SERT 抗体を用いて、SERT タンパク質を免疫沈降したところ、DGK $\delta$  が共沈降することが分かった (図 5 B)。さらに、我々は DGK $\delta$  と同じに属する、DGK $\eta$ アイソザイムが脳で強く発現し [12]、双極性障害に関与することを報告している[3]。そこで、コントロール実験として、DGK $\eta$ と SERT と相互作用するかどうかを検討した。その結果、DGK $\eta$  と SERT 共沈降しなかった (図 5 B)。なお、同じ二型の DGK $\kappa$ アイソザイムはマウスの脳で発現していない[7]。

図 5. DGK $\delta$ と SERT との相互作用。(A) 16 週齢のマウスの大脳皮質サンプルを用いて、抗 DGK $\delta$  抗体、または抗 normal IgG 抗体とインキュベート後沈降し、DGK $\delta$ 及び SERT を WB により検出した。(B) 16 週齢のマウスの大脳皮質サンプルを用いて、抗 SERT 抗体、または抗 normal IgG 抗体とインキュベート後沈降し、SERT 及び DAT を WB により検出した。(C) Neuro-2a 細胞を用いて、3xFLAG-DGK $\delta$ 及び EGFP-SERT を過剰発現し、上記と同様に免疫沈降法を行った。コントロールとして、3xFLAG のみ及び EGFP-SERT を過剰発現した。



さらに、SERT と DGK $\delta$  との相互作用を確認するため、EGFP-SERT と 3xFLAG-DGK $\delta$ 2 (DGK $\delta$ 2 は脳で強く発現する[7]) をマウス神経芽細胞腫由来の Neuro-2a 細胞内で過剰発現した。次に、細胞破碎サンプルに抗 FLAG 抗体を添加し、3xFLAG-DGK $\delta$ 2 タンパク質を免疫沈降したところ、EGFP-SERT が共沈降した (図 5 C)。EGFP-SERT と 3xFLAG vector を過剰発現した細胞は EGFP-SERT が共沈降しなかった (図 5 C)。次に、EGFP-SERT と 3xFLAG-DGK $\delta$ 2 過剰発現し分化誘導した Neuro-2a 細胞における局在を解析し、共局在するかどうかを確認した。EGFP-SERT と 3xFLAG-DGK $\delta$ 2 は、分化誘導した Neuro-2a 細胞膜および細胞質における点状分布を示し、さらに、明確な共局在を示した (図 6)。

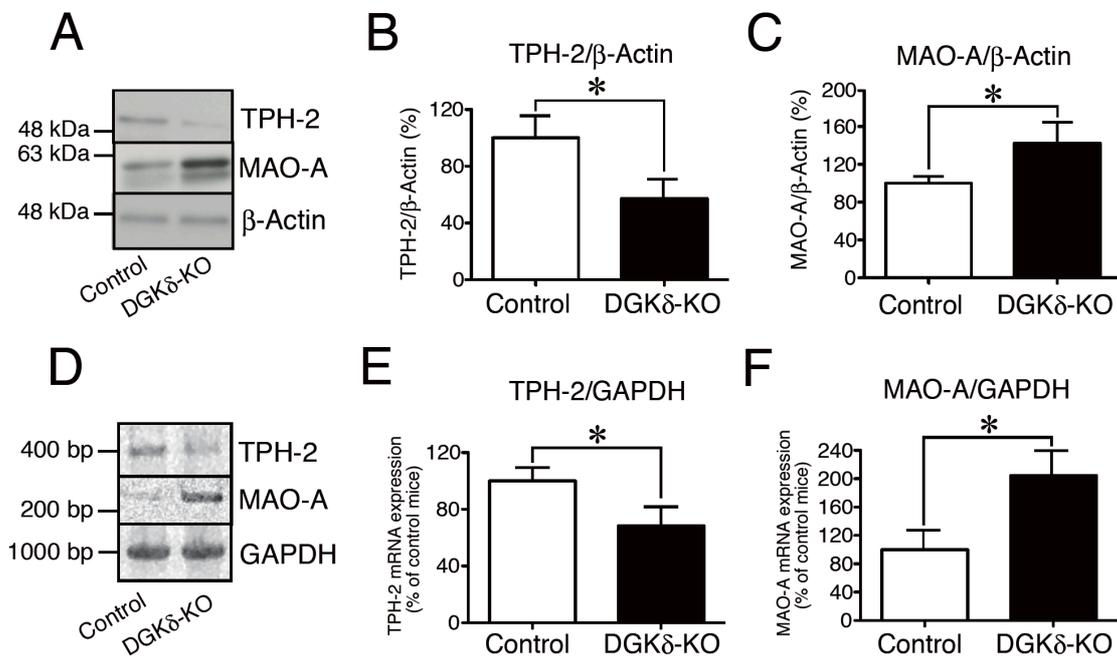
図 6. Neuro-2a 細胞における 3xFLAG-DGK $\delta$ 2 と EGFP-SERT との共局在。Neuro-2a 細胞を用いて、3xFLAG-DGK $\delta$ 2 または 3xFLAG vector と EGFP-SERT を過剰発現した。一次抗体には抗 FLAG 抗体を、二次抗体には Alexa Fluor mouse IgG 抗体 (red) を用いた。観察は共焦点蛍光顕微鏡を用いた。Bar =20  $\mu$ m。



### 1-3-3 脳特異的 DGK $\delta$ 欠損マウスの大脳皮質における TPH-2 タンパク質量の減少と MAO-A タンパク質量の増加

DGK $\delta$ -KO マウスにおける OCD 様行動の発症メカニズムを解明するため、セロトニン神経系における TPH-2 及び MAO-A タンパク質量を調べた (図 7 A)。DGK $\delta$ -KO マウスの大脳皮質における TPH-2 タンパク質量は loxP マウスに比べ、顕著に減少した (図 7 B, C)。また、MAO-A の発現量が 1.5 倍に増加することは分かった。(図 7 D) さらに、TPH-2、MAO-A mRNA 量も測定し、その mRNA 量はタンパク質量と同様に、TPH-2 mRNA 量は減少し、MAO-A mRNA 量は増加することが分かった (図 7 E, F)。これらの結果は、DGK $\delta$  が SERT タンパク質量を主に転写段階で調節していることを示唆している。

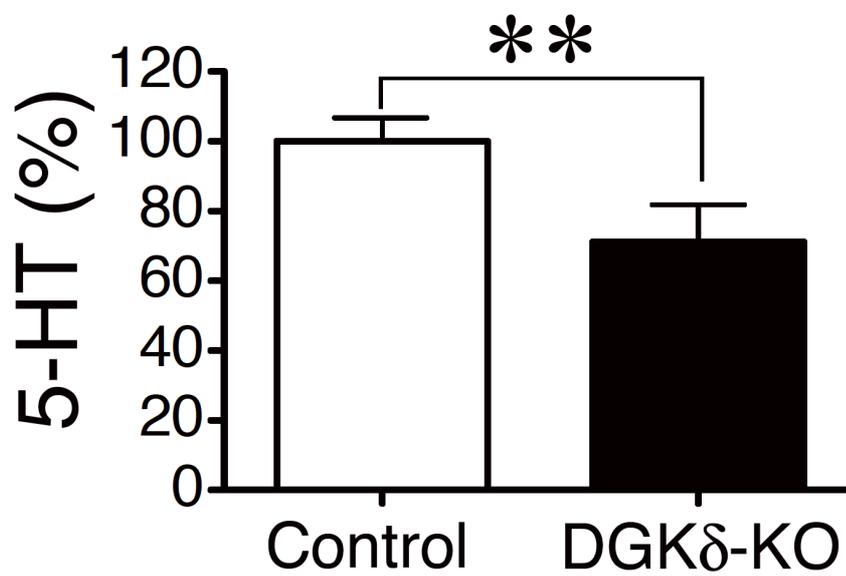
図 7. マウスの大脳皮質における TPH-2, MAO-A の発現。(A) 16 週齢のマウスの大脳皮質サンプル (20  $\mu$ g) を用いて、TPH-2 及び MAO-A のタンパク質量を WB により検出し、バンドの定量は Image J software で行った。(B-C) TPH-2, MAO-A のバンド強度は $\beta$ -Actin 量で割って補正した。コントロールでの発現を 100%として相対量で示し、7 回の独立実験の平均値 $\pm$ 標準偏差を求めて、グラフを作成した (\* $p < 0.05$  vs. control mice)。(D) 16 週齢のマウスの大脳皮質サンプルを用いて、TPH-2, MAO-A mRNA 量を RT-PCR によって検出し、(E-F) バンドの定量は Image J software で行った。TPH-2, MAO-A mRNA のバンド強度は GAPDH 量で割って補正した。コントロールでの発現を 100%として相対量で示し、3 回の独立実験の平均値 $\pm$ 標準偏差を求めて、グラフを作成した (\* $p < 0.05$  vs. control mice)。



#### 1-3-4 脳特異的 DGK $\delta$ 欠損マウスの大脳皮質における 5-HT 量の低下

1-1-3 によって、DGK $\delta$  欠損による TPH-2 の減少と MAO-A タンパク質量の増加から、5-HT レベルの低下を引き起こすことが示唆された。そこで、5-HT ELISA kit を用いて、マウス大脳皮質 5-HT レベルを測定した。予想どおり、DGK $\delta$ -KO マウスの大脳皮質における 5-HT レベルはコントロールマウスと比較して、約 30%減少した(図 8)。以上の結果から、DGK $\delta$  欠損によってセ 5-HT 機能の減弱が起こり、その結果、OCD 様行動を引き起こすことが示唆された。

図8. マウス的大脑皮質における5-HTの測定。16週齢のマウス的大脑皮質サンプルを用いて、5-HT量をELISAで測定した。コントロールでの発現を100%として相対量で示し、8回の独立実験の平均値±標準偏差を求めて、グラフを作成した (\*\*p < 0.01 vs. control mice)。



## 1-4 考察

我々は最近、脳特異的 DGK $\delta$ -KO マウスは OCD 様行動を示すことを報告している[7]。しかし、それはどのようなメカニズムを介するのかについては全くと言っていい程明らかにされてこなかった。OCD の治療薬は主に選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) であるため、シナプス間隙の 5-HT の減少が発症の原因であると考えられている[14,15]。本研究では、DGK $\delta$ -KO マウスの大脳皮質における SERT (SSRI のターゲット) の発現量が増加することが明らかにした (図 3)。また、DGK $\delta$ -KO マウスの大脳皮質における 5-HT レベルの低下が見られた (図 8)。また、TPH-2 が減少し、MAO-A が増加していた(図 7)。したがって、TPH-2 の減少と MAO-A タンパク質量の増加によって、5-HT の全体濃度が低下したと考えられる(図 9)。また、主にプレシナプスに発現する SERT の増加によってシナプス間隙の 5-HT が細胞内に取り込み、シナプス間隙の 5-HT 濃度を負に制御すると考えられる。この結果から、DGK $\delta$  欠損によってセロトニン機能の減弱が起こり、DGK $\delta$ -KO マウスの OCD 様行動を引き起こすことが強く示唆された (図 9)。

SSRIs は DGK $\delta$  欠損による SERT の活性増加 (タンパク質量の増加) を抑制し、DGK $\delta$ -KO マウスの異常行動を緩和する可能性がある[7]。SERT には結合するタンパク質(calcineurin[16]、Hic-5 (hydrogen peroxide-inducible clone 5) [17]、nNOS (neuronal nitric oxide synthase) [18]、PICK1 (protein interacting with C kinase) [19]、 $\alpha$ -synuclein [20] と SCAMP2 (secretory carrier membrane protein 2) [21]) がいくつあるが、DGK $\delta$  は唯一 SERT と結合し、且つ、SERT、TPH-2 及び MAO-A の発現量を制御する (図 3, 7)。我々は DGK $\delta$  が sterile  $\alpha$ -motif domain を介してオリゴマーを形成することを報告している[22-24]。そこで、DGK $\delta$  はオリゴマー状で SERT、または SERT 結合タンパク質と結合し、大きな複合体を形成することが予想できる。

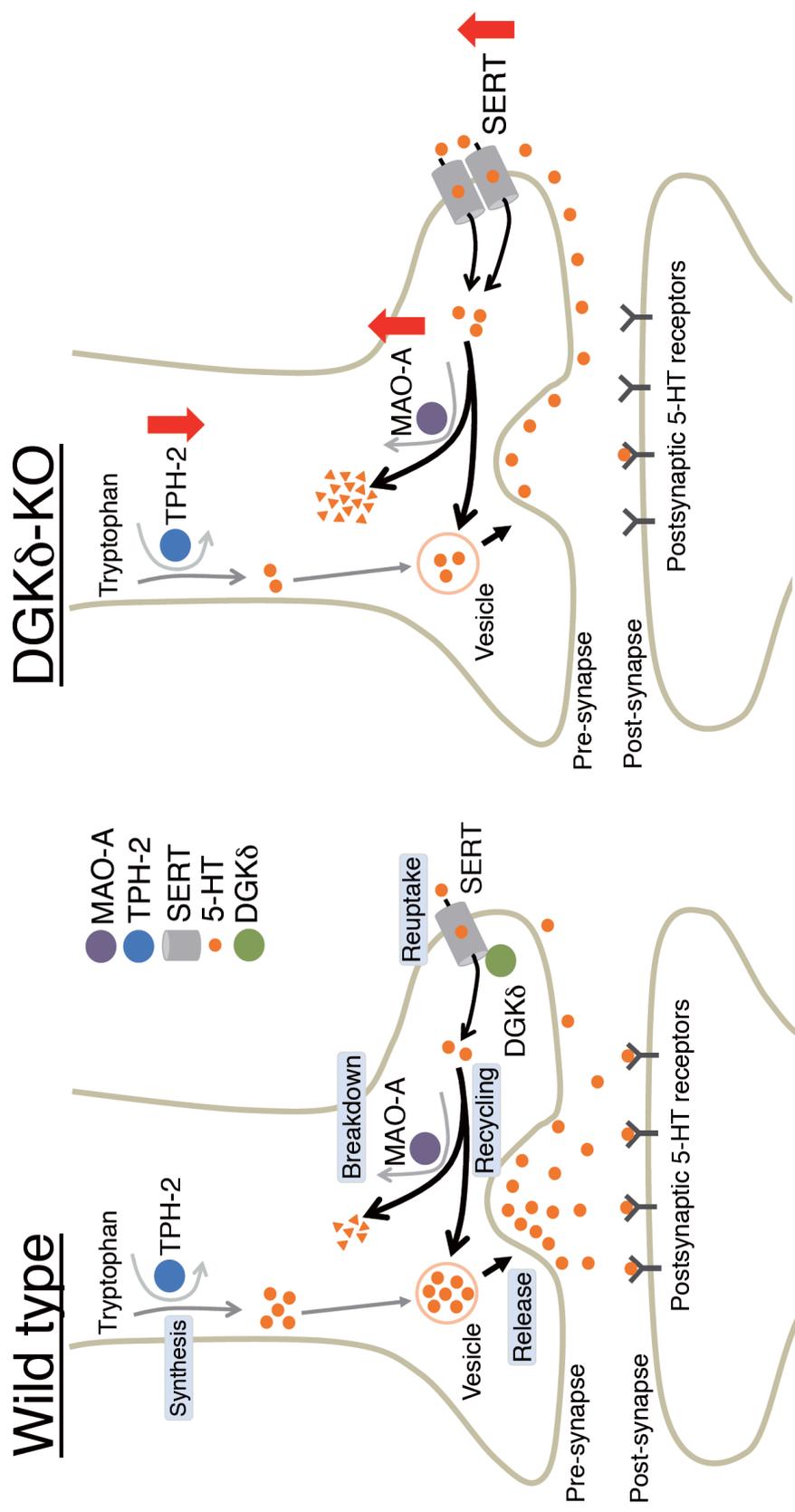
DGK $\delta$  の欠損によって SERT mRNA 量の変動はない (図 3)。このことから、DGK $\delta$  は SERT と結合して、SERT タンパク質の安定化を制御することが示唆された。また、DGK $\delta$  の欠損によって、TPH-2、MAO-A はタンパク質量だけでなく、mRNA 量も変化したことから (図 7)、DGK $\delta$  は転写段階で間接的に TPH-2、MAO-A を制御することが示唆された。また、DGK $\delta$  の欠損による SERT 発現量の増加によって、プレシナプスの 5-HT が蓄積し、フィードバック的に 5-HT の代謝誘導及び合成抑制を介して、TPH-2 と MAO-A の転写に影響することが考えられる。

Protein kinase C (PKC) の活性化によって SERT が負に制御することが明らかとなっている[25]。また、免疫沈降法によって DGK $\delta$  は PKC $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  及び PKC receptor の RACK1 と結合することが報告されている[6, 26]。しかし、DGK $\delta$  欠損によって、マウスの脳における PKC 量またはリン酸化 PKC のリン酸化程度の変化はなかった (data not shown)。また我々は、DGK $\delta$  の pleckstrin homology domain (PHD) の Ser-22 と Ser-26 のリン酸化が PKC 活性に依存し、膜からサイトゾルへの移行に関与することを報告している[27]。したがって、脳において、PKC

は DGK $\delta$  の上流分子として働く可能性がある。

上述の様に、DGK $\delta$  のセロトニン神経系における分子メカニズムの一端を解明した(図 9)。特に、SERT は OCD だけでなく、不安障害や自閉症などの精神疾患にも関与することから[28]、DGK $\delta$  による SERT の発現変動のメカニズムの更なる解明を必要とする。

图 9. 模式图



## 第2章

ジアシルグリセロールキナーゼ $\delta$ はセロトニントランスポーターのユビキチン化を亢進しそのタンパク質量を制御する

## 2-1 緒言

神経伝達物質である 5-HT は、トリプトファンから合成され、脳に広く分布している[29]。また、5-HT は不安、抑うつ、強迫、衝動性など、人間の行動や感情に強く関連していることが報告されている [30]。12 回膜貫通タンパク質である SERT は、セロトニン神経系リサイクル、または代謝分解のためにシナプス間隙の 5-HT をプレシナプスから再取り込むことが分かった [31-32]。また、いくつかの臨床的に有効な薬は、SERT を介して神経疾患を治療する。たとえば、SERT を阻害する SSRI の有効性は、OCD および大うつ病性障害[5]の治療で確立されている[31-32]。また、SERT 欠損げっ歯類（マウス、ラット）が用いた研究から SERT がうつ病、不安症、自閉症などの神経発達障害に関連していることを実証されている [33]。さらに、SERT 阻害剤に加え、強力な 5-HT<sub>2A</sub> 受容体拮抗剤とドパミン D<sub>2</sub> 受容体拮抗剤は、統合失調症の陰性症状の主な治療薬である[34]。したがって、SERT を含むセロトニン系の機能低下および機能亢進は、さまざまな精神障害を引き起こす。

以前我々は、DGK $\delta$  が大脳皮質の II~VI 層、海馬歯状回の CA1~CA3 領域、嗅球の僧帽細胞、糸球体、顆粒細胞層、小脳の顆粒層で高度に発現していることを報告した [5]。さらに、DGK $\delta$  はマウスが生まれた直後に脳に発現し、発現レベルは 1 週間から 4 週間に劇的に増加することを我々が報告している[5]。また、DGK $\delta$  遺伝子破壊を引き起こした *de novo* 平衡転座 46, X, t(X; 2) (p11.2; q37) dn の女性患者は、てんかん症状を示し、髪を引っ張り、脚をたたくななどの自傷行動を表現した [7]。特に、抜毛癖を含む自傷行動は、OCD および OC スペクトル障害などに見られる [35-36]ことから、DGK $\delta$  は OCD の発症に強く関連していると考えられる。

SERT タンパク質レベル・活性の異常は、上記のさまざまな心理障害を引き起こすため [37-39]、SERT タンパク質レベル・活性を維持することは非常に重要である。最近（前章）、我々は、DGK $\delta$  欠損が SERT タンパク質量を増加させたが、マウス大脳皮質の mRNA レベルを増加させなかったことを確認した[10]。さらに、前章の結果から、DGK $\delta$ -KO マウスにおける OCD のような行動は、SERT のレベルの増加によって引き起こされることが強く示唆された。しかし、DGK $\delta$  が SERT タンパク質レベルをどのように制御するかは不明のままである。

今回我々は、DGK $\delta$  が SERT タンパク質レベルを調節する分子機構に焦点を合わせて解析した[41]。DGK $\delta$  は、SERT、メラノーマ抗原遺伝子-D1 (MAGE-D1)、およびユビキチン-タンパク質リガーゼ E3 である Praja-1 と相互作用し、DGK 活性依存的に Praja-1 依存性ユビキチン化-プロテアソームシステムを介して SERT 分解を誘導することを実証した。我々の結果から、DGK $\delta$  関連の精神障害に病態生理・治療に関する新しい洞察を提供する。

## 2-1 試薬と実験手法

### 2-1-1 マウス

1-2-1 に示した。

### 2-1-2 Plasmid 作製

SERT 欠失変異体  $\Delta$  CTC (545~630) および CTC (1~544) (図 11 A) は、pEGFP-N3-SERT (マウス、NCBI accession no. AF013604.1) [40]からの PCR によって生成され、pEGFP vector にサブクローニングされた。

Human DGK $\delta$ 2 コンストラクトを、アミノ酸 1~1214 (Wild type DGK $\delta$ 2 (NCBI accession no. XM\_011512029.3))、1~308 (DGK $\delta$ 2-NT)、309~1214 (DGK $\delta$ 2- $\Delta$ NT)、309~466 (DGK $\delta$ 2-Cat-a)、467~761 (DGK $\delta$ 2-IM)、762~939 (DGK $\delta$ 2-Cat-b)、940~1140 (DGK $\delta$ 2-CC)、および 1141~1214 (DGK $\delta$ 2-SAM) (図 12 A)を PCR で増幅し、p3xFLAG vector の EcoRI / SalI 部位に挿入した。

マウス MAGE-D1 (NCBI accession no. NM\_019791) cDNA をマウス脳 cDNA (1-2-3)から PCR で増幅し、pAcGFP vector の EcoRI / SalI 部位および p3xFLAG vector の EcoRI / SalI 部位に挿入した。マウス Praja-1 (NCBI accession no. XM\_011247544) cDNA をマウス脳 cDNA から増幅し、pAcGFP および pDsRed monomer vector の EcoRI / SalI 部位に挿入した。

### 2-1-3 Cell culture and transfection

サル腎臓細胞である COS-7細胞は高グルコース濃度のダルベッコ改変イーグル培地(10%ウシ胎仔血清 (FBS), 100 U/mLペニシリン, 100 mg/mLストレプトマイシン) で、37°CのCO<sub>2</sub>インキュベーター (5% CO<sub>2</sub>) 内で培養した。前継代から48時間後にトリプシン-EDTA溶液を加え、インキュベーターに5分静置することで、細胞を剥離し、トランスフェクション前日に、 $0.5 \times 10^6$ 個の細胞をポリ-L-リシンでコーティングした12 well dishにまいた。pEGFP-SERTおよび欠失変異体 (pEGFP-SERT- $\Delta$ CTCおよびpEGFP-SERT-CTC)、p3xFLAG-DGK $\delta$ 2および欠失変異体 (DGK $\delta$ 2-NT、DGK $\delta$ 2-CT、DGK $\delta$ 2-Cat-a、DGK $\delta$ 2-IM、DGK $\delta$ 2-Cat-b、DGK $\delta$ 2-CCおよびDGK $\delta$ 2-SAM)を図12 Aに示す。また、pAcGFP-MAGE-D1、pAcGFP-Praja-1、およびpDsRed monomer-Praja-1もPolyFect (Qiagen, Hilden, Germany) によって導入した。

ユビキチン-プロテアソーム系を介したタンパク質分解を解析する際は、COS-7細胞を3 $\mu$ M MG-132 (Sigma-Aldrich) で6時間処理した。

RN46Aセロトニン作動性神経細胞 (European Collection of Authenticated Cell Cultures) は、高グルコースのダルベッコ改変イーグル培地で、37°CのCO<sub>2</sub>インキュベーター(5% CO<sub>2</sub>) 内で培養した。

内在性Praja-1の発現をノックダウンするため、Stealth RNAi duplexes (Invitrogen- Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) を使用した。Praja-1-siRNA:

5-GGAGUGACCAAGUGAAACCUU-3' , 5' -GGUUUCACUUGGUCACUCCUC-3' ;  
control-siRNA: 5' -UGGCACCUCUGACUCUGUAGAGGUA-3',  
5'-UAUCUUUGCAUCCAAGCCAAUGCCA-3'. pEGFP-SERT 、 Praja-1-siRNA と  
p3×FLAG-DGKδ2 (wild type) 或いは p3×FLAG vector alone を Lipofectamine 3000 (Thermo  
Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) によって導入した。

#### 2-1-4 IP

マウス大脳皮質サンプルまたは細胞サンプル (タンパク質 0.5 mg) を、抗ユビキチン (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)、抗 FLAG (Sigma-Aldrich) および Protein A/G PLUS-agarose beads (Santa Cruz Biotechnology) (前述) [27]で免疫沈降した。免疫沈降物を SDS サンプルバッファーで煮沸し、SDS-PAGE 後 WB より検出した。

#### 2-1-5 WB

50µg タンパク質をポリアクリルアミドゲルにアプライした。分離したタンパク質を polyvinylidene difluoride membrane (Millipore) に移し、次に一次抗体と 4°C で一晩インキュベートした：一次抗体は抗 DGKδ、抗 SERT (ab130130, Abcam, Cambridge, UK)、抗 MAGE-D1 (Proteintech Group, Rosemont, PA)、抗 Praja-1 (Proteintech Group)、抗 FLAG (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)、抗 GFP (Santa Cruz Biotechnology)、抗 RFP (Medical & Biological Laboratories, Nagoya, Japan)、抗 ubiquitin 抗体 (Auto-ubiquitinylation Kit) および抗β-Actin (Sigma-Aldrich) 抗体を用いた。洗浄後、膜を二次抗体溶液 (抗 Rabbit IgG-HRP (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA)、抗 Goat IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology) および抗 mouse IgG-HRP (Bethyl Laboratories, Montgomery, AL) 室温で 1 時間、続いて ECL 法を使用して検出した。

#### 2-1-6 リポソーム沈降法

各 PA 分子種 (10 mol%)をコレステロール(30 mol%) と PC (from egg yolk) (70 mol%)と混合した。窒素で溶媒を飛ばし、脂質を乾燥させた。その後、リポソーム作製バッファー(25 mM HEPES, pH 7.4, 100 mM NaCl, and 1 mM dithiothreitol) を加え、2 mM となるように溶解し、激しく混合した。さらに、超音波破碎機 (output control 3, duty constant=50%, 95°C, 20 min)を用いてリポソームを作製した。リポソーム 250µl と AcGFP-Praja-1 が過剰発現した細胞サンプルを 4°Cで 30 min 間インキュベートし、4°Cで 1 h、200,000 g で遠心した。リポソームと結合した沈殿物 (ppt) と結合していない上 (sup) に分離し、ppt と sup と同量になるように、再溶解した。Sup と ppt を SDS-PAGE で分離し、WB により検出した。

#### 2-1-7 Praja-1 活性測定

Praja-1 cDNA を pSF-CMV-Puro-NH2-GST-TEV vector に組み込み、GST-Praja-1 を COS-7 細

胞で発現させ、グルタチオンセファロース (GE Healthcare) を用いて精製した。精製した GST-Praja-1 タンパク質と PC-, 18:0/22:6-PG-, 18:1/18:1-PA-, 18:0/18:0-PA- and 18:0/22:6-PA リポソームと 4°C で 1 h インキュベートし、その後、Auto-ubiquitinylation Kit (Instruction Manual BML-UW0970; Enzo Life Sciences) を用いて、*in vitro* ubiquitination assay を行った。反応液(25  $\mu$ l final volume, 1.25  $\mu$ l 20 $\times$  E1, 1.25  $\mu$ l 20 $\times$  E 2, 2.5  $\mu$ l 10 $\times$  Ub E3 ligase buffer, 2.5  $\mu$ l 10 $\times$  ubiquitin, 0.25  $\mu$ l 100 mM DTT, 1.25  $\mu$ l Mg-ATP) を 37 °C で 1 h インキュベートし、SDS-PAGE 後抗ユビキチン抗体により検出した。

#### 2-1-8 質量分析

マウス脳サンプル (12 週齢) をから Bligh-Dyer 法により脂質を抽出し、liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) 法[42, 43]によって PA 分子種と DG 分子種を調べた。質量分析解析は当教室の村上千明氏および塚氏、臼木氏に依頼した。

#### 2-1-9 *in vitro* DGK 活性測定

DGK 活性は、octyl- $\beta$ -D-glucoside-mixed micellar assay [44]により測定し、続いて LC-MS/MS により PA 量を定量した[43]。10  $\mu$ l の免疫沈降タンパク質を使用し、150  $\mu$ l の反応混合物(final concentration of 50 mM MOPS (pH 7.4) , 20 mM NaF, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM n-octyl- $\beta$ -D-glucoside, 1 mM dithiothreitol, 1 mM (1.96 mol%) 16:0/18:1-DG (X:Y = the number of carbon atoms: the number of double bonds) (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA) and 0.2 mM ATP) を 37°C で 1 時間インキュベートし、反応後、脂質を抽出し、LC-MS/MS により 16:0/18:1-PA を検出した。

## 2-3 結果 [40]

### 2-3-1 DGK $\delta$ 2 は活性依存的に SERT のタンパク質量を負に制御する

前章の結果から、DGK $\delta$ 2 は SERT と相互作用することが明らかになった。また、DGK $\delta$  の欠損は SERT タンパク質を増加させたが、マウス大脳皮質の SERT mRNA 量は増加しなかったことを示した[10]。これらの結果は、SERT タンパク質が相互作用を介して DGK $\delta$ 2 によって不安定化されたことを示唆している。脳で強く発現する DGK $\delta$ 2 (DGK $\delta$ 1 は弱くしか発現しない) と SERT の相互作用および SERT タンパク質量に対する DGK $\delta$ 2 の影響をより詳細に分析するために、COS-7 細胞を用いて、DGK $\delta$ 2 と SERT の両方を発現する細胞モデル系を確立した (図 10)。

COS-7 細胞で 3 $\times$ FLAG-DGK $\delta$ 2 および EGFP-SERT の発現を確認した (図 10)。予想どおり、抗 FLAG 抗体によって EGFP-SERT と 3 $\times$ FLAG-DGK- $\delta$ 2 は共免疫沈降した (図 10 C)。また、p3 $\times$ FLAG vector のみをトランスフェクトした細胞では、EGFP-SERT は抗 FLAG 抗体と共免疫沈降しなかった(data not shown)。これらの結果は、DGK $\delta$ 2 と SERT の間の相互作用を細胞モデル系で検出できることを示している。さらに、3 $\times$ FLAG-DGK $\delta$ 2 過剰発現細胞では、3 $\times$ FLAG vector のみをトランスフェクトした細胞と比べ、EGFP-SERT タンパク質の減少が確認された (図 10 C, D)。DGK $\delta$ による SERT タンパク質の制御も細胞モデル系で測定できることが示された。以上によって、細胞モデル系における DGK $\delta$ 2 と SERT の相互作用および SERT タンパク質の減少を再現した[10]。

また、DGK $\delta$ 2 の触媒活性が SERT との相互作用および SERT タンパク質量の低下に必要かどうかを調べた。DGK $\delta$ 2 の触媒的に不活性な変異体 (DGK $\delta$ 2-KD)(図 10 A) を発現させた場合、SERT との相互作用強度は野生型 DGK $\delta$ 2 (DGK $\delta$ 2-WT)(図 10 C, D)とほぼ同じであった。しかし、興味深いことに、SERT と DGK $\delta$ 2-KD と共過剰初させた時では、SERT タンパク質量は有意に減少しなかった (図 10 C, D)。したがって、これらの結果は、DGK $\delta$ 2 の触媒活性が SERT タンパク質量の低下に必要なことを示し、SERT との相互作用には必要ではないことを示している。

図 10. DGK $\delta$ 2 は、細胞モデル系において触媒活性依存的に SERT のタンパク質量を低下させる。(A) DGK $\delta$ 2 および KD (Kinase dead) 変異体と SERT の構造の模式図。(B) COS-7 細胞に、3 $\times$ FLAG vector alone、3 $\times$ FLAG-DGK $\delta$ 2 (WT) または 3 $\times$ FLAG-DGK $\delta$ 2-KD それぞれを過剰発現した。3 $\times$ FLAG-DGK $\delta$ 2 および 3 $\times$ FLAG-DGK $\delta$ 2-KD を抗 FLAG 抗体で免疫沈降させた。免疫沈降した 3 $\times$ FLAG-DGK $\delta$ 2 および 3 $\times$ FLAG-DGK $\delta$ 2-KD は、WB によって検出された。免疫沈降した 3 $\times$ FLAG-DGK $\delta$ 2 および 3 $\times$ FLAG-DGK $\delta$ 2-KD の DGK 活性を、LC-MS/MS によって測定した。コントロール (3 $\times$ FLAG-DGK $\delta$ 2) での発現を 100% として相対量で示し、4 回の独立実験の平均値 $\pm$ 標準偏差を求めて、グラフを作成した (\*\*\* $p$  < 0.005 vs. control)。

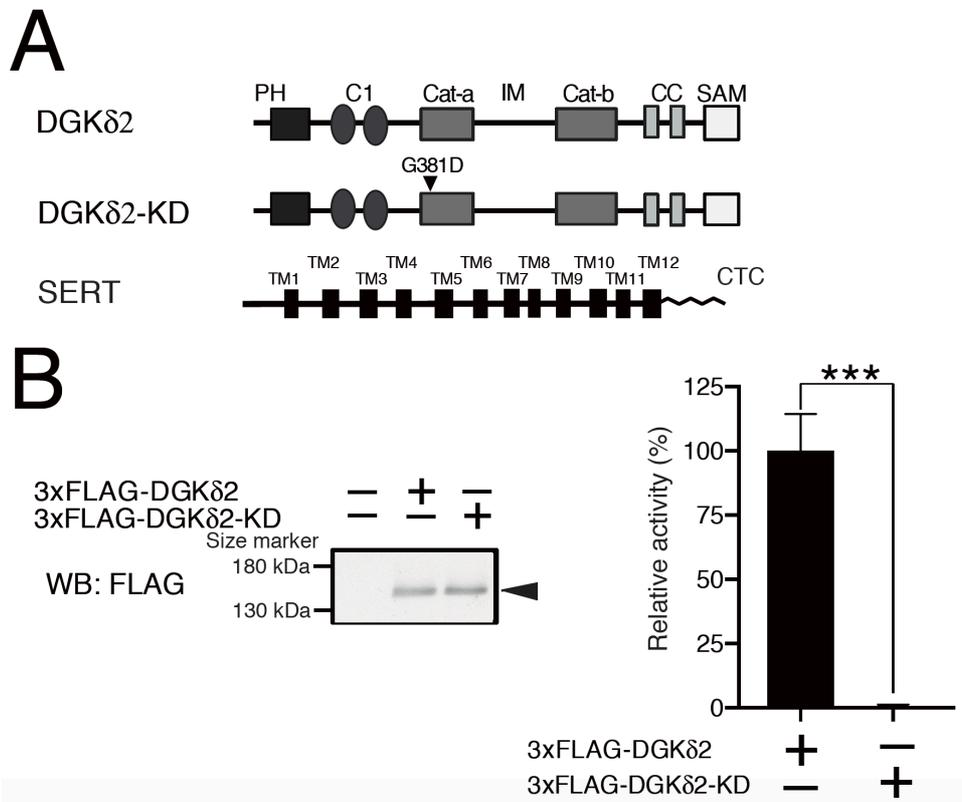
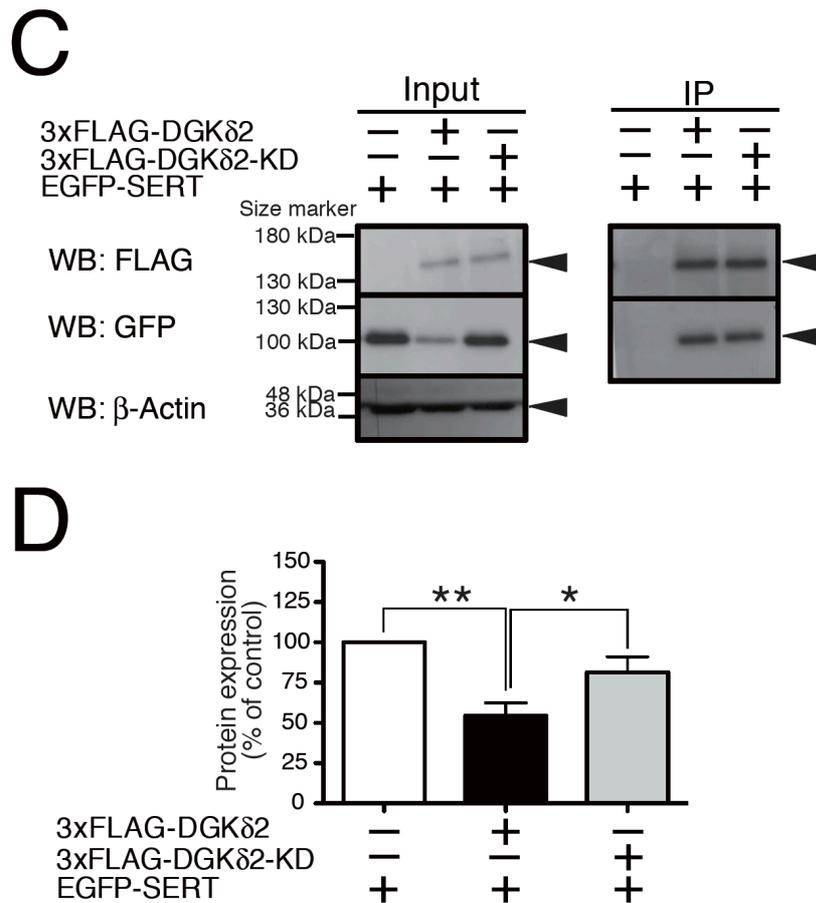


図 10. (C) COS-7 細胞に、3×FLAG vector alone、3×FLAG-DGKδ2 (WT) または 3×FLAG-DGKδ2-KD のいずれかを EGFP-SERT と共過剰発現した。細胞ライセットから、抗 FLAG、抗 GFP および抗β-Actin 抗体によって目的バンドが検出された。抗 FLAG 抗体で免疫沈降し、抗 FLAG 抗体および抗 GFP 抗体を用いた WB で検出した。(D) コントロール (EGFP-SERT 単独発現) での発現を 100% として相対量で示し、5 回の独立実験の平均値±標準偏差を求めて、グラフを作成した (\*p < 0.05 vs. control)。



### 2-3-2 DGK $\delta$ 2 は SERT の C 末端と相互作用する

SERT の相互作用領域を同定するために、C 末端細胞質領域のみ(SERT-CTC) を含む変異体、CTC 欠失変異体 (SERT- $\Delta$ CTC) を構築した (図 11 A)。図 11 B に示されるように、SERT-CTC は 3 $\times$ FLAG-DGK $\delta$ 2 と共免疫沈降した (図 11 B)。しかしながら、SERT-CTC と 3 $\times$ FLAG vector が過剰発現した細胞では共沈降しなかった (図 11 B)。SERT-CTC とは対照的に、SERT- $\Delta$ CTC は DGK $\delta$ 2 と共沈しなかった (図 11 B)。さらに、SERT-CTC のタンパク質レベルは DGK $\delta$ 2 共発現細胞で有意に減少したが、SERT- $\Delta$ CTC 発現量は変化がなかった (図 11 C, D)。これらの結果は、SERT の CTC が DGK $\delta$ 2 との相互作用および DGK $\delta$ 2 による SERT の不安定化に不可欠であることを示している。

図 11. DGK $\delta$ 2 は、細胞モデル系において触媒活性依存的に SERT の C 末端 (SERT-CTC) のタンパク質量を低下させる。(A) SERT 全長および欠損体の模式図。

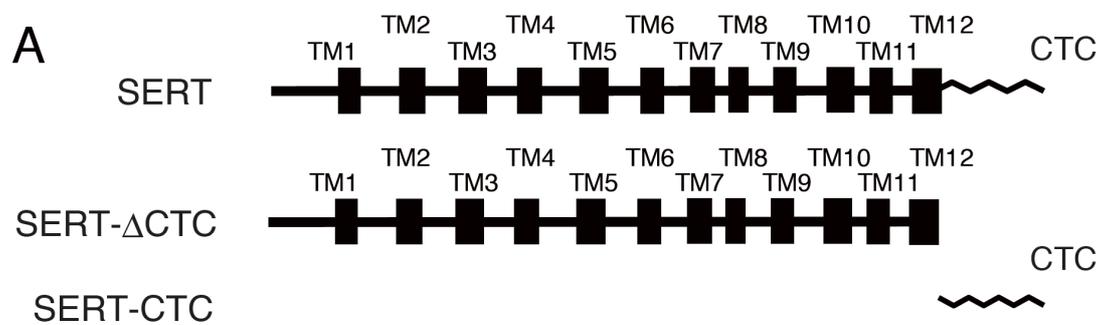


図 11. (B) COS-7 細胞に、3×FLAG-DGK $\delta$ 2 と EGFP-SERT-CTC または EGFP-SERT- $\Delta$ CTC のいずれかを共過剰発現した。コントロールとして 3×FLAG alone と EGFP-SERT-CTC を共過剰発現した。3×FLAG-DGK $\delta$ 2 を抗 FLAG 抗体で免疫沈降させ、抗 FLAG および抗 GFP 抗体を用いて、IP された画分中のタンパク質を確認した。

**B**

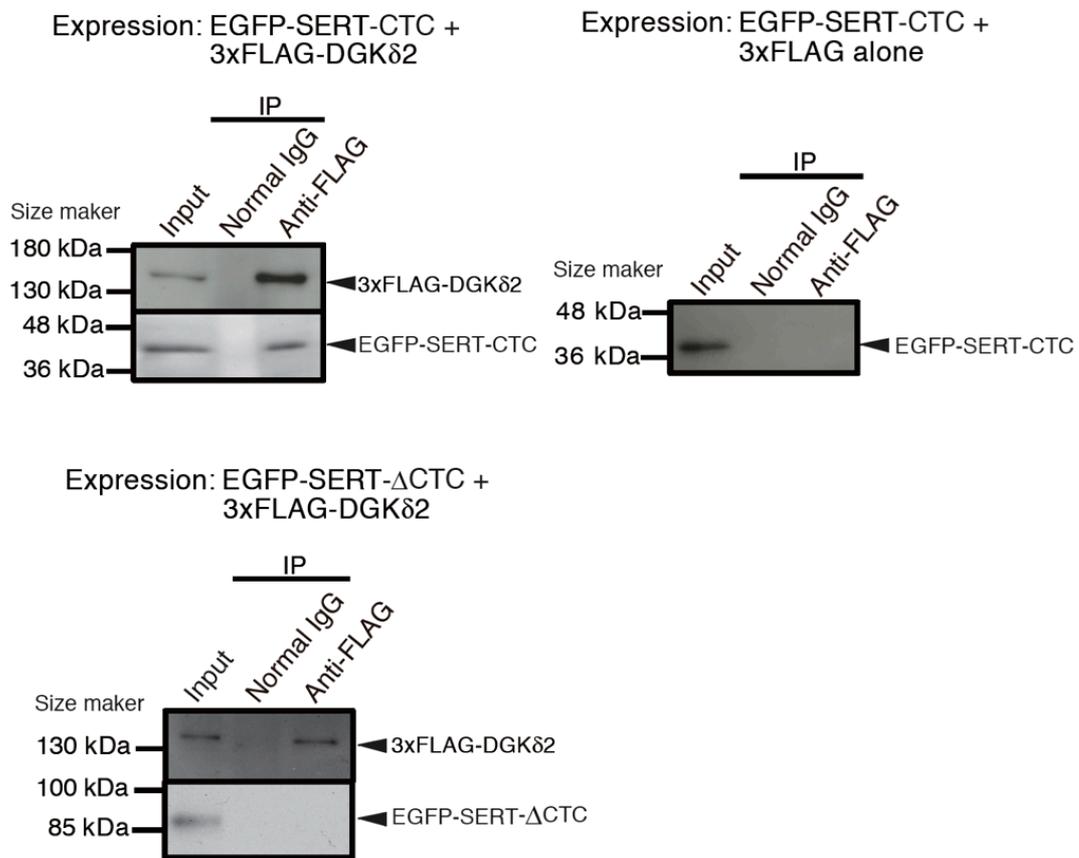
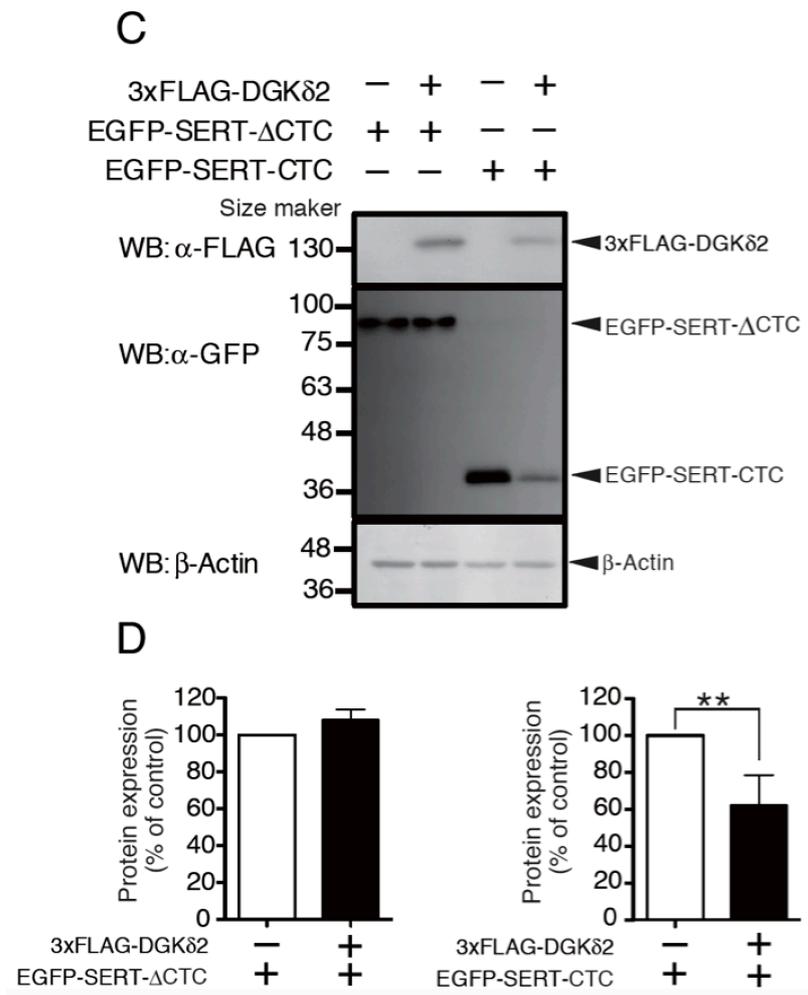


図 11. (C) EGFP-SERT-CTC または EGFP-SERT- $\Delta$ CTC を、COS-7 細胞で 3 $\times$ FLAG-DGK $\delta$ 2 と共過剰発現した。コントロールとして 3 $\times$ FLAG alone と EGFP-SERT-CTC を共過剰発現した。抗 FLAG、抗 GFP、および抗 $\beta$ -Actin 抗体を用いた WB によって解析した。(D) WB の定量分析。コントロールでの発現を 100%として相対量で示し、6 回の独立実験の平均値  $\pm$  標準偏差を求めて、グラフを作成した (\*\*p < 0.01 vs. control)。



### 2-3-3 DGK $\delta$ 2はN末端触媒サブドメイン-aおよびコイルドコイル構造含有領域を介してSERTと結合する

DGK $\delta$ 2の相互作用領域を同定するために、次の欠失変異体を構築した：PH および C1ドメイン(C1)を含むN末端領域(DGK $\delta$ 2-NT)、およびC末端領域(CT)触媒サブドメイン-a (Cat-a)、触媒サブドメイン間の中間領域(IM)、触媒サブドメイン-b (Cat-b)、コイルドコイル構造含有領域(CC) および Sterile  $\alpha$  motif (SAM) (図 12 A)。次に、SERT-CTCとの相互作用を分析した。まず、図 12 Bに示されるように、SERT-CTCはDGK $\delta$ 2- $\Delta$ NTと共免疫沈降し、DGK $\delta$ 2-NTはSERT-CTCと共沈降しなかった。さらに、DGK $\delta$ 2- $\Delta$ NTはSERT-CTCのタンパク質レベルを著しく低下させたが、DGK $\delta$ 2-NTは低下しなかった(図 12 B)。DGK $\delta$ 2-KDはSERT-CTCと相互作用し、また、DGK $\delta$ 2-KDによってSERT-CTCタンパク質レベルが低下しないことを確認した(図 12 B)。

DGK $\delta$ 2の相互作用領域をさらに絞り込むために、DGK $\delta$ 2-CTに含まれる一連の欠失変異体、DGK $\delta$ 2-Cat-a、DGK $\delta$ 2-IM、DGK $\delta$ 2-Cat-b、DGK $\delta$ 2-CC、およびDGK $\delta$ 2-SAM(図 12 A)とSERT-CTCと免疫沈降を行った。その中で、DGK $\delta$ 2-Cat-a および DGK $\delta$ 2-CCはSERT-CTCと明らかに共沈降した(図 12 C)。このことは、DGK $\delta$ 2はN末端触媒サブドメイン-aおよびコイルドコイル構造含有領域を介してSERTと結合することを示している。

図 12. DGK $\delta$ 2 は触媒サブドメイン C4-a とコイルドコイル領域 CC を介して SERT の C 末端細胞質可溶性部位 (CTC) と相互作用する (A) DGK $\delta$ 2 および SERT 欠損変異体

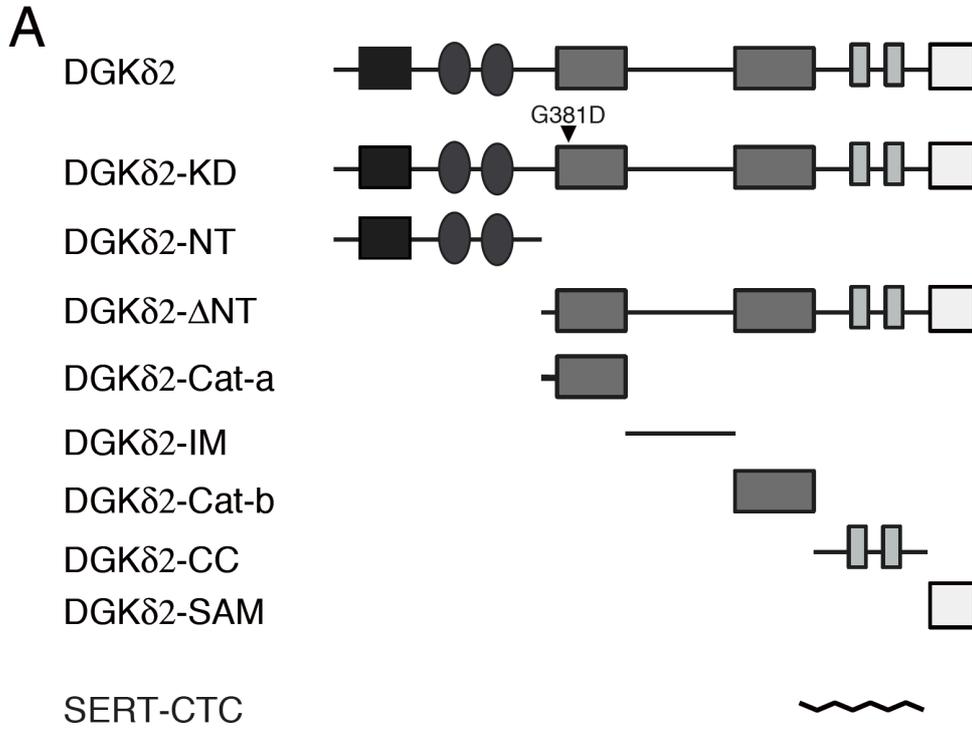


図 12. (B) SERT- $\Delta$ NT と DGK $\delta$ 2-NT との相互作用。IP (抗 FLAG 抗体) 後の WB により解析した。

B

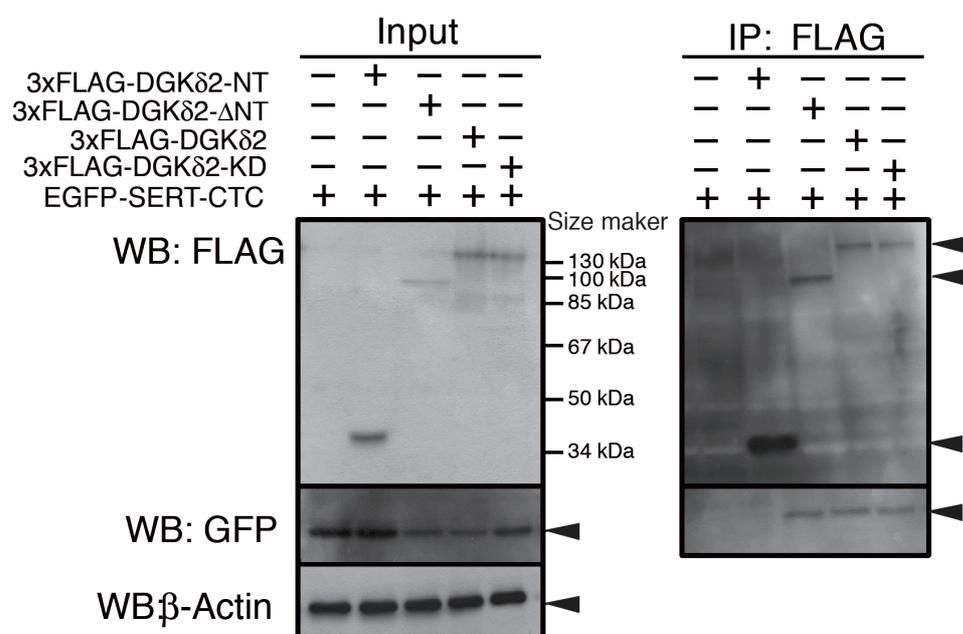
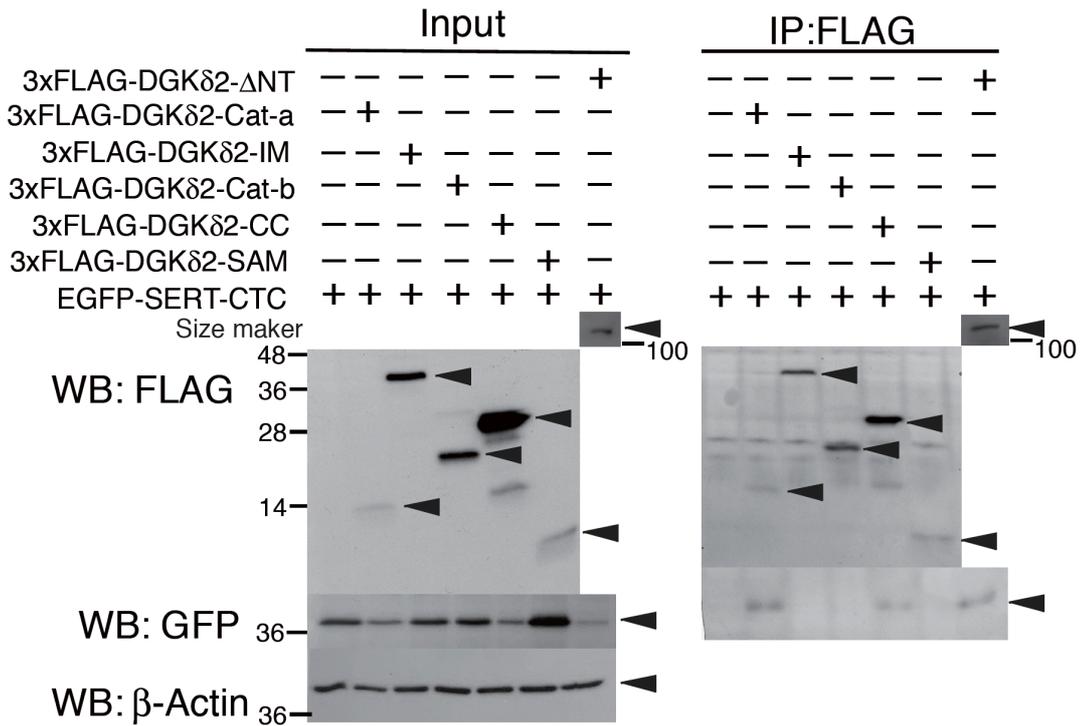


図 12. (C) SERT- $\Delta$ NT と各種 DGK $\delta$ 2 変異体 (DGK $\delta$ 2-Cat-a, DGK $\delta$ 2-IM, DGK $\delta$ 2-Cat-b, DGK $\delta$ 2-CC, DGK $\delta$ 2-SAM) との相互作用を IP (抗 FLAG 抗体) 後の WB により解析した。

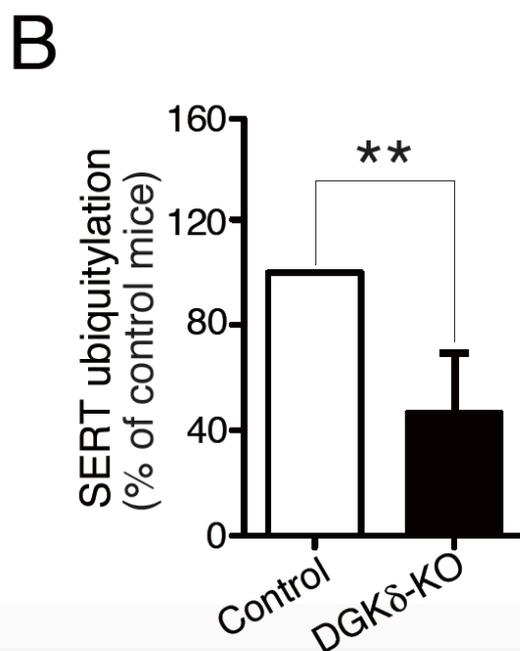
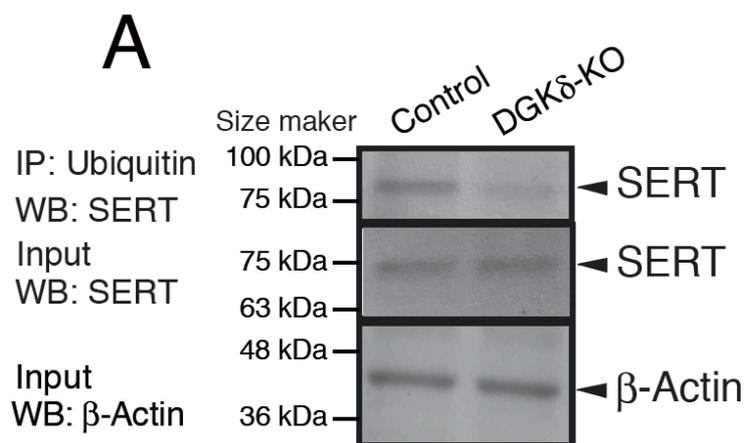
C



#### 2-3-4 DGK $\delta$ 2 は SERT のユビキチン化の程度を促進する

ユビキチン-プロテアソーム系は主要なタンパク質分解経路であるため、SERT タンパク質の減少のメカニズムを調べるために、脳特異的 DGK $\delta$ -KO マウスの大脳皮質における SERT のユビキチン化レベルを調べた。図 13 A, B に示されるように、DGK $\delta$  欠損マウス大脳皮質における SERT のユビキチン化レベルは有意に減少した。ユビキチン化タンパク質は、非ユビキチン化タンパク質よりも大きくなる (ユビキチンの分子量: ~10 kDa) と想定されているが、実際に約 85 kDa (SERT 75 kDa + 10 kDa) の位置 SERT のバンドが検出された。

図 13. DGK $\delta$ -KO マウス大脳皮質におけるユビキチン化 SERT タンパク質の減少。(A) DGK $\delta$ -KO およびコントロールマウスの脳 (大脳皮質) におけるユビキチン化 SERT を抗ユビキチン抗体で免疫沈降し、SERT 抗体で検出した。(B) 定量分析。コントロールの発現を 100%として相対量で示し、6つの独立した実験の平均値 $\pm$ SEMとして示した。(\*\* P < 0.01, \*\*P < 0.01 versus control)



次に、前述の細胞モデル系における SERT のユビキチン化レベルを調べた (図 14 A)。  
DGK $\delta$ 2 の発現は、SERT タンパク質レベルを明らかに低下させ (図 14 A, B)、そのユビ  
キチン化を促進した (図 14 A, C)。また、DGK $\delta$ 2 発現細胞の SERT タンパク質レベル  
は、プロテアソーム阻害剤である MG-132 によって著しく増加した (図 14 A, B)。さら  
に、DGK $\delta$ 2 の存在下での SERT ユビキチン化レベルは MG-132 によって増強された (図  
14 A, C)。一方、DGK $\delta$ 2 タンパク質レベルは MG-132 によって有意に変化しなかった (図  
14 A)。

図 14. 細胞モデル系におけるユビキチン化 SERT タンパク質の減少。(A) EGFP-SERT は、COS-7 細胞で 3×FLAG-DGKδ2 と共過剰発現し、MG-132 (3 μM) で 6 時間処理した。

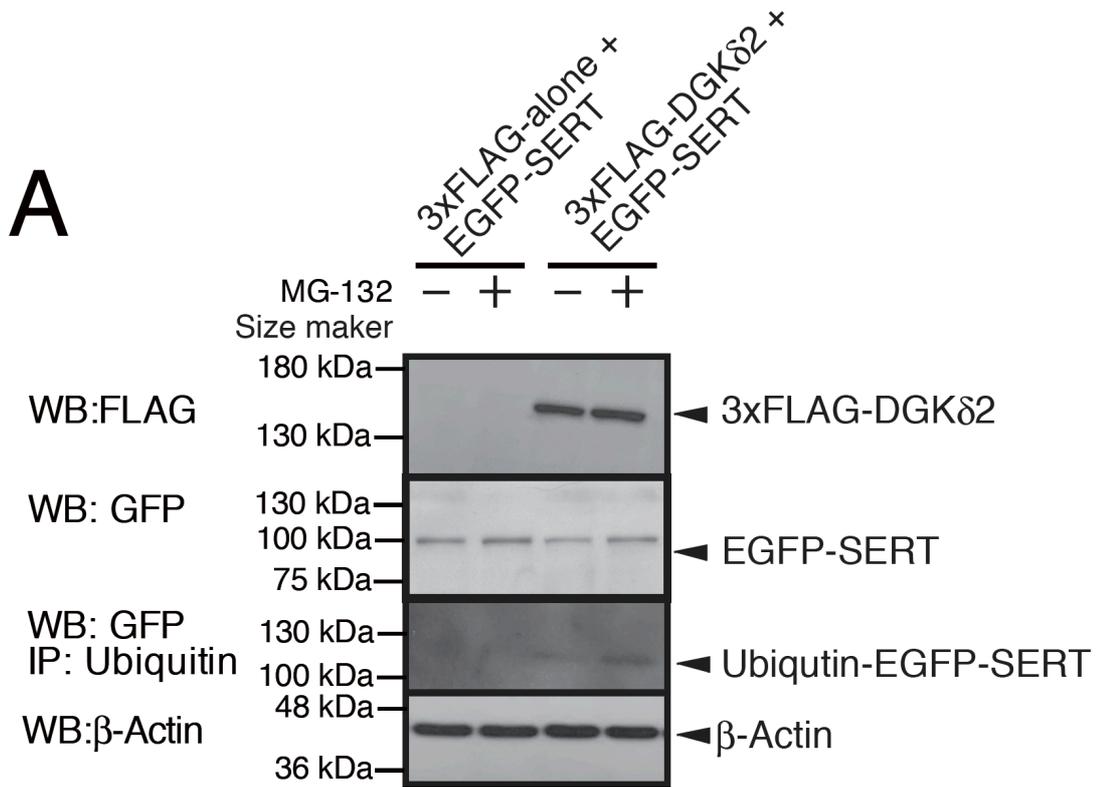
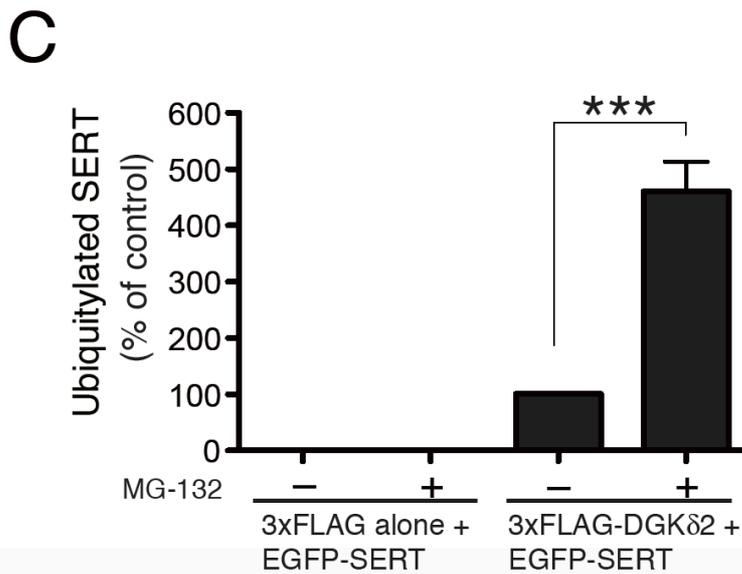
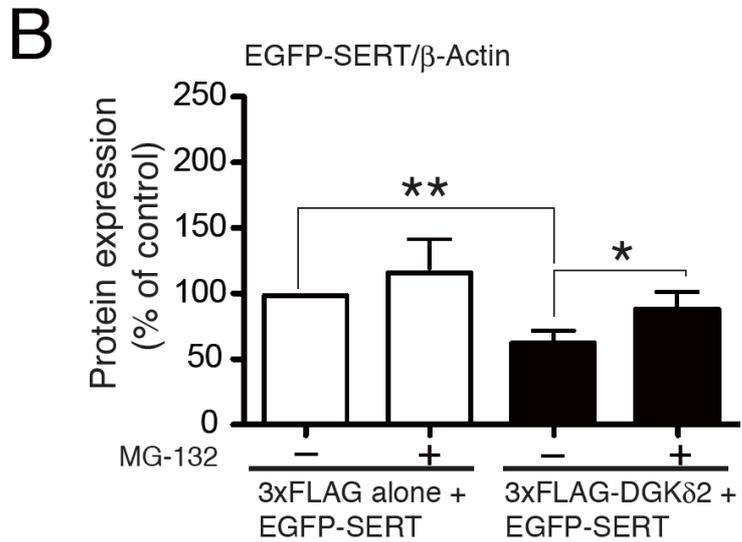


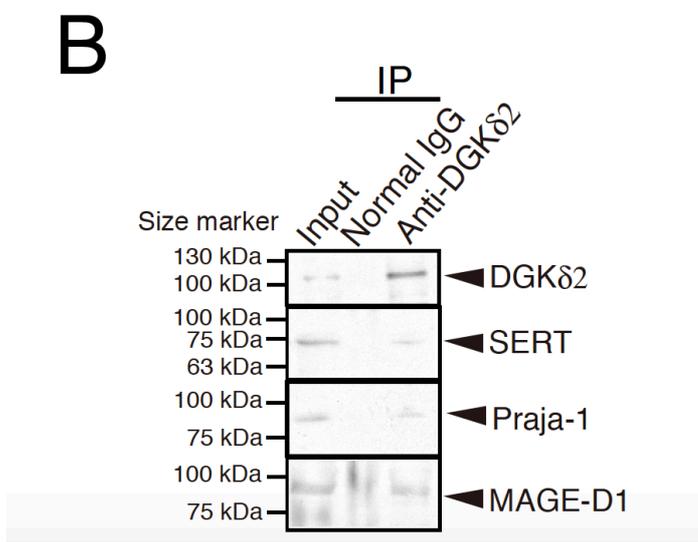
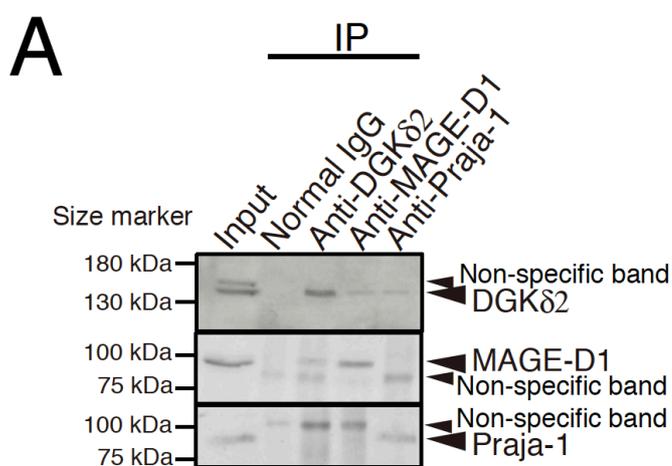
図 14. (B, C)コントロールの値 (MG-132 なし/ 3×FLAG-DGKδ2 なし) を 100%として相対量で示し、6つの独立した実験の平均値±SEMとして示した。(\* P < 0.05、\*\* P < 0.01 versus control)



### 2-3-5 DGK $\delta$ 2 は Praja-1 E3 ユビキチン-タンパク質リガーゼの作用を介して SERT のユビキチン化と分解を促進する

神経発達に重要な役割を果たすユビキチン依存性分解のアダプタータンパク質である MAGE-D1 は、SERT のユビキチン化を調節することが報告されている[40]。また、MAGE-D1 は Praja-1 E3 ユビキチンタンパク質リガーゼと相互作用することが示されている[41]。そこで、脳内の内在性 DGK $\delta$ 2 と MAGE-D1/Praja-1 との相互作用を解析した。図 15 A に示されるように、脳 (大脳皮質) では、DGK $\delta$ 2 は MAGE-D1 および Praja-1 と共免疫沈降し、DGK $\delta$ 2 は脳内の MAGE-D1 および Praja-1 と相互作用していることが示された。また、DGK $\delta$ 2、SERT、MAGE-D1、および Praja-1 が同じ神経細胞に存在するかどうかを調べた。図 15 B に示されるように、DGK $\delta$ 2、SERT、MAGE-D1 および Praja-1 は RN46A セロトニン作動性神経細胞で発現することが分かった。さらに、SERT、MAGE-D1 および Praja-1 が DGK $\delta$ 2 と共免疫沈降することを確認した (図 15 B)。

図 15. (A) マウス脳（大脳皮質）サンプルを用いて、抗 DGK $\delta$ 、抗 MAGE-D1、および抗 Praja-1 抗体または Normal IgG で免疫沈降した。免疫沈降した内在性 DGK $\delta$ 2、MAGE-D1、および Praja-1 は、それぞれ抗 DGK $\delta$ 、抗 MAGE-D1、および抗 Praja-1 抗体によって検出した。(B) RN46A 細胞サンプルを、図に示されるように抗 DGK $\delta$ 抗体または Normal IgG で免疫沈降した。それぞれ抗 DGK $\delta$ 、抗 SERT、抗 MAGE-D1 および抗 DGK $\delta$ 抗体で内在性 DGK $\delta$ 2、SERT、MAGE-D1 および Praja-1 を検出した。

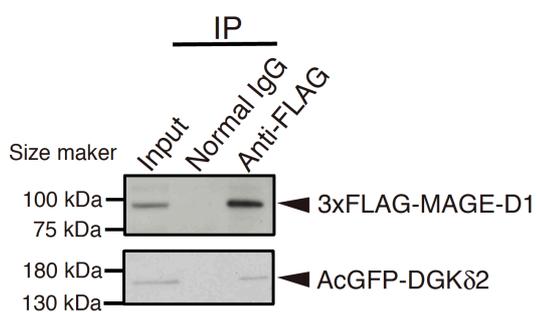


次に、前述のこれらのタンパク質を発現する細胞モデル系における DGK $\delta$ 2 と MAGE-D1 の相互作用を検証した (図 16)。MAGE-D1 は DGK $\delta$ 2 の免疫沈降物で検出された (図 16 A)。さらに、MAGE-D1 は、核周囲顆粒において DGK $\delta$ 2 と明らかに共局在した (図 16 B)。これらの結果は、DGK $\delta$ 2 が MAGE-D1 と相互作用していることをさらに示した。

図 16. (A) COS-7 細胞に、AcGFP-DGK $\times$ 2 と 3 $\times$ FLAG-MAGE-D1 または 3 $\times$ FLAG alone を過剰発現した。過剰発現した細胞サンプルは、抗 FLAG 抗体で免疫沈降し、沈降画分中の AcGFP-DGK $\times$ 2 および 3 $\times$ FLAG-MAGE-D1 を、抗 GFP および抗 FLAG 抗体によって検出した。

**A**

Expression: AcGFP-DGK $\delta$ 2 +  
3xFLAG-MAGE-D1



Expression: AcGFP-DGK $\delta$ 2 +  
3xFLAG alone

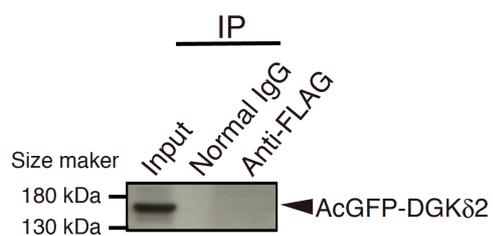
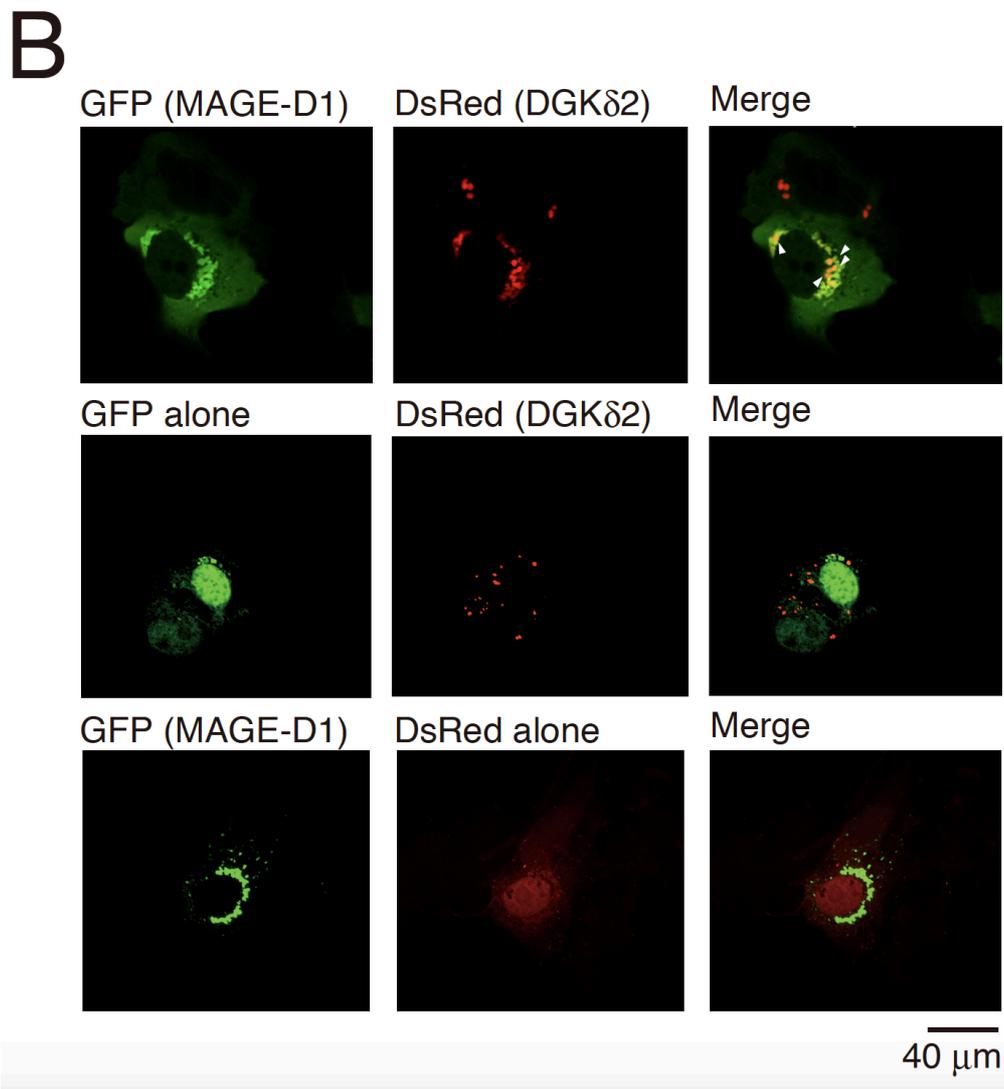


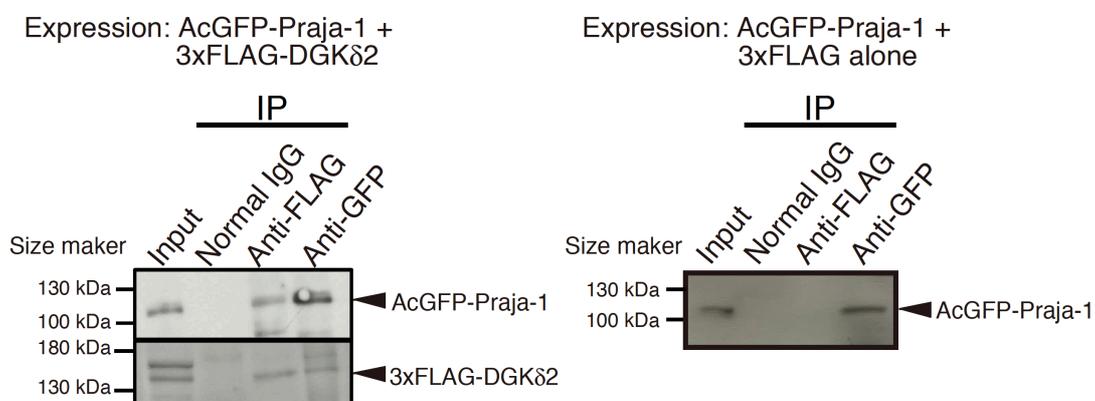
図 16. (B) DsRed monomer-DGK $\delta$ 2 と AcGFP-MAGE-D1 の共局在。COS-7 細胞に DsRed monomer-DGK $\delta$ 2 と AcGFP-MAGE-D1 と共過剰発現し、共焦点顕微鏡で観察した。Bar = 40  $\mu$ m.



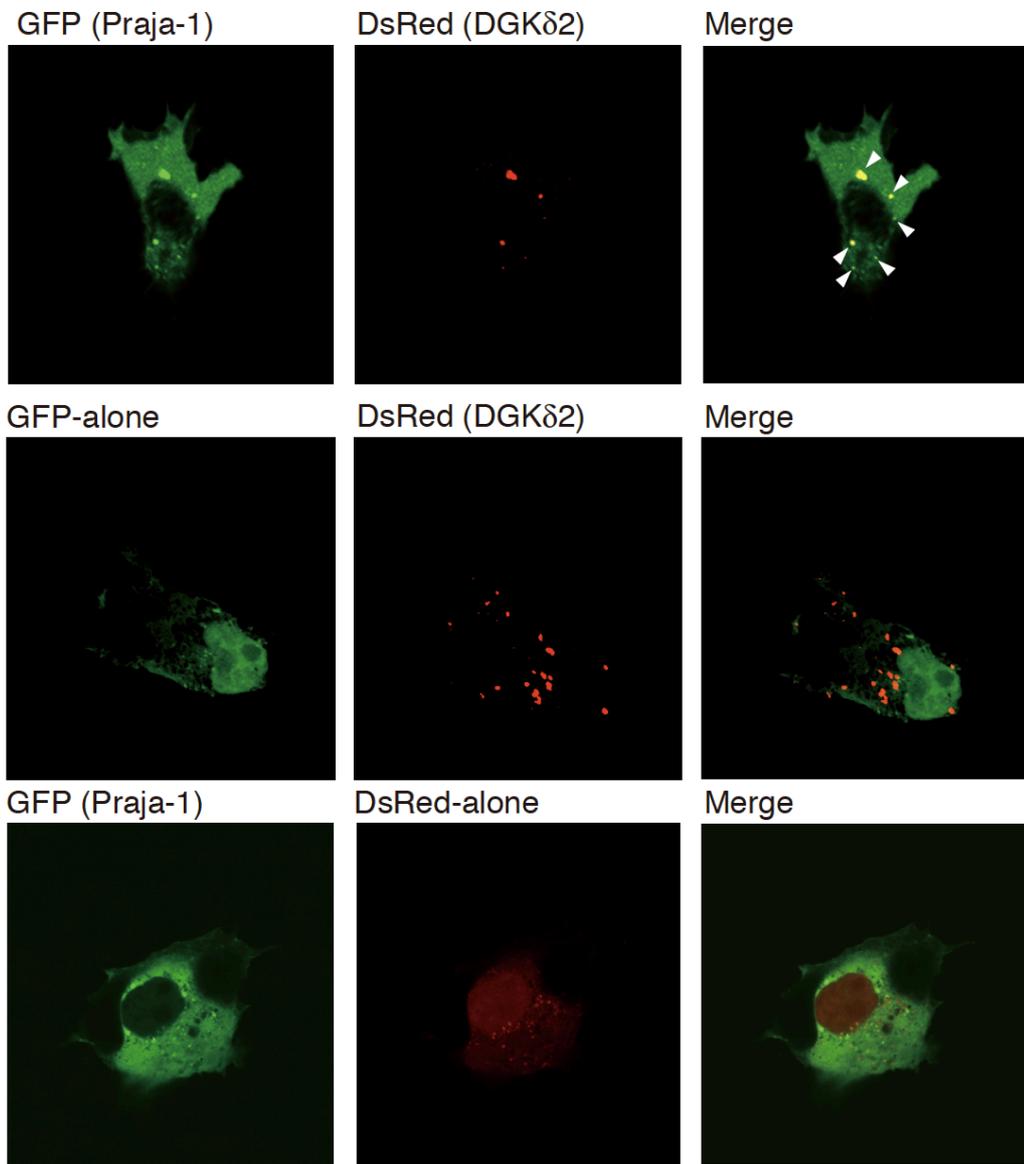
次に、これらのタンパク質を発現する細胞モデル系での DGK $\delta$ 2 と Praja-1 の相互作用を分析した (図 17)。 DGK $\delta$ 2 と Praja-1 は共免疫沈降した (図 17 A)。さらに、DGK $\delta$ 2 は、核周囲顆粒の Praja-1 と明らかに共局在していた (図 17 B)。これらの結果は、DGK $\delta$ 2 と Praja-1 が相互作用することをさらに示している。

図 17. COS-7 細胞に、AcGFP-Praja-1 と 3×FLAG-DGKδ2 または 3xFLAG alone を過剰発現した。過剰発現した細胞サンプルは、抗 FLAG または抗 GFP 抗体で免疫沈降し、沈降画分中の AcGFP-Praja-1 および 3×FLAG-DGKδ2 を、抗 GFP および抗 FLAG 抗体によって検出した。(B) DsRed monomer-DGKδ2 と AcGFP-Praja-1 の共局在。COS-7 細胞に DsRed monomer-DGKδ2 と AcGFP-Praja-1 と共過剰発現しし、共焦点顕微鏡で観察した。Bar = 40 μm.

**A**



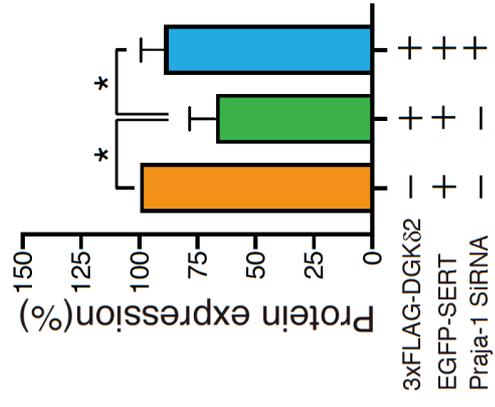
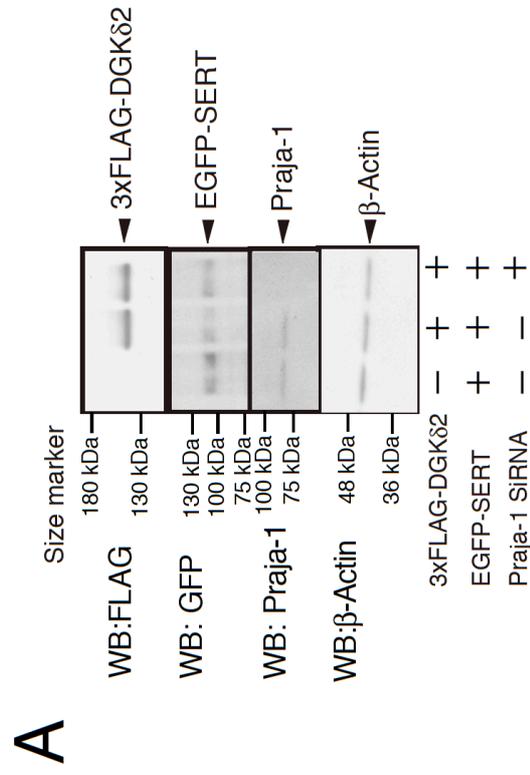
**B**



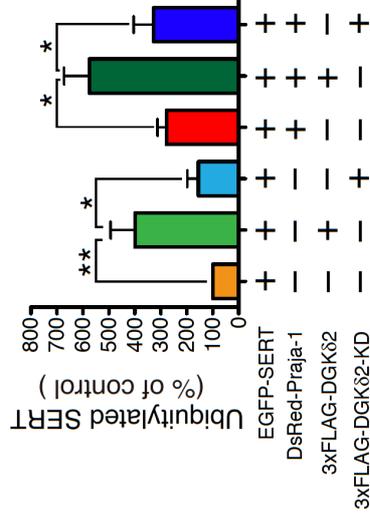
40  $\mu$ m

DGK $\delta$ 2 が Praja-1 を介して SERT のユビキチン化を増強するかどうかを解析した。まずは、DGK $\delta$ 2 の過剰発現が SERT タンパク質量を低下させたが、SERT レベルは Praja-1 をノックダウンすることによって (図 18 A, B) 顕著に増加した。逆に、Praja-1 過剰発現細胞では、SERT のユビキチン化が有意に増加し (図 18 C, D)、SERT タンパク質レベルが同時に著しく低下した (図 18 C, E)。特に、DGK $\delta$ 2 の発現は、SERT のユビキチン化をさらに促進し(図 18. C, D)、Praja-1 の存在下で SERT タンパク質レベルを低下させた (図 18. C, E)。さらに、SERT タンパク質あたりのユビキチン化程度 (ユビキチン化 SERT のバンド強度/ SERT タンパク質のバンド強度)も示した (図 18 F)。SERT タンパク質あたりのユビキチン化の程度は、Praja-1 の発現と DGK $\delta$ 2 の発現によって相乗的に増加した (図 18. C, F)。しかし、DGK $\delta$ 2-KD はこのような変化を示さなかった (図 18 F)。これらの結果は、DGK $\delta$ 2 が Praja-1 E3 ユビキチン-タンパク質リガーゼの作用を介して SERT のユビキチン化と分解を促進し、且つ、それは DGK 触媒活性 (PA の増加および/または DG の減少) 依存的に制御することを強く示唆している (図 18)。

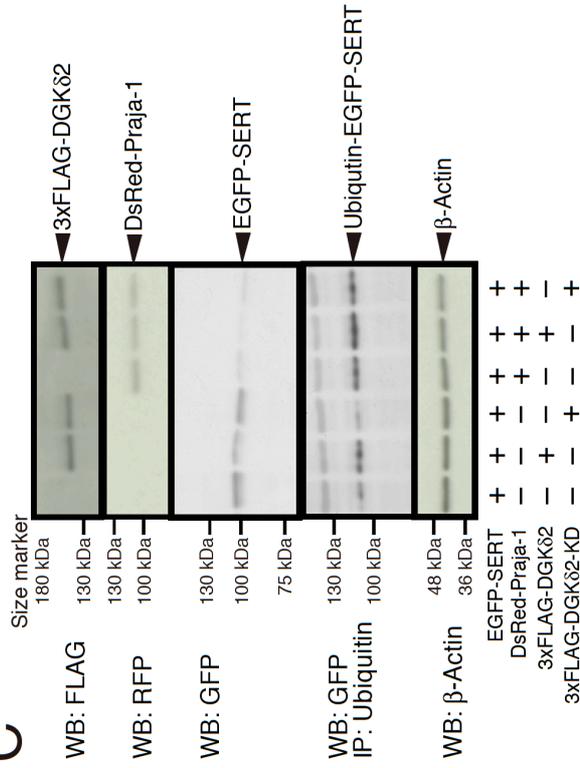
図 18. (A) COS-7 細胞に、pEGFP-SERT、DsRed monomer-Praja-1、p3xFLAG-DGK $\delta$ 2 および Praja-1 siRNA を同時にトランスフェクトした。48 時間後に細胞を回収し、EGFP-SERT、DsRed monomer-Praja-1、および p3xFLAG-DGK $\delta$ 2 のタンパク質レベルを、抗 GFP、抗 RFP (DsRed) および抗 FLAG 抗体を用いた WB により検出した。(B) バンド強度を Image-J を用いて定量した。コントロール値 (pEGFP-SERT のみトランスフェクション) を 100 に設定した。これらの値は、3 回の独立した実験の平均値  $\pm$  SEM として示した。\* P < 0.05。(C) COS-7 細胞に、図に示されるように、pEGFP-SERT と DsRed monomer-Praja-1、および p3xFLAG-DGK $\delta$ 2 (WT) または p3xFLAG-DGK $\delta$ 2 (KD) を共過剰発現した。抗ユビキチン抗体によってユビキチン化された EGFP-SERT を免疫沈降し、抗 GFP 抗体を用いた WB により検出された。pEGFP-SERT、DsRed monomer-Praja-1 および p3xFLAG-DGK $\delta$ 2 のタンパク質レベルを、それぞれ抗 GFP、抗 RFP (DsRed) および抗 FLAG 抗体を用いた WB により検出した。(D、E、F) バンド強度を Image-J を用いて定量した。コントロール値 (pEGFP-SERT のみトランスフェクション) を 100 に設定した。値は、3 つの独立した実験の平均値  $\pm$  SEM として示した。(\* P < 0.05、\*\* P < 0.01、\*\*\* P < 0.005)



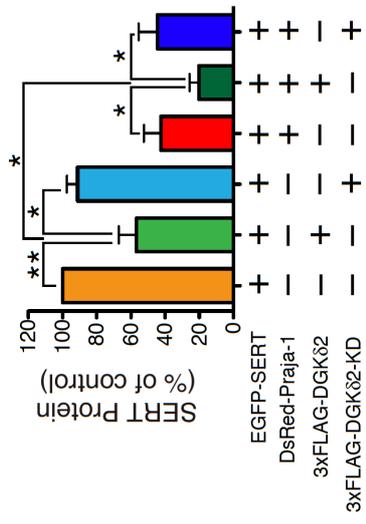
**D**



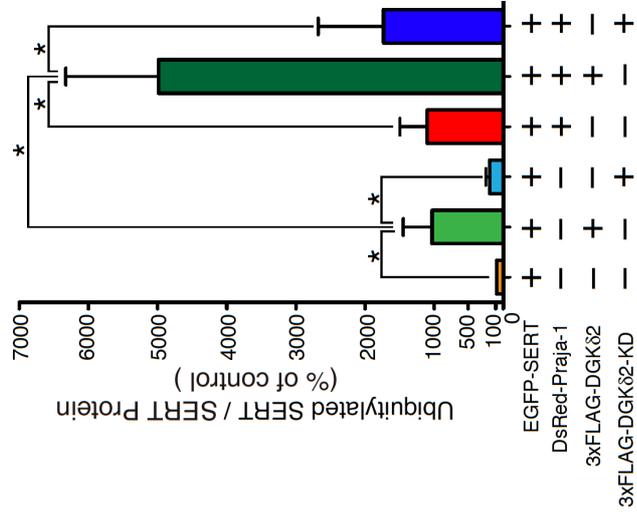
**C**



**E**



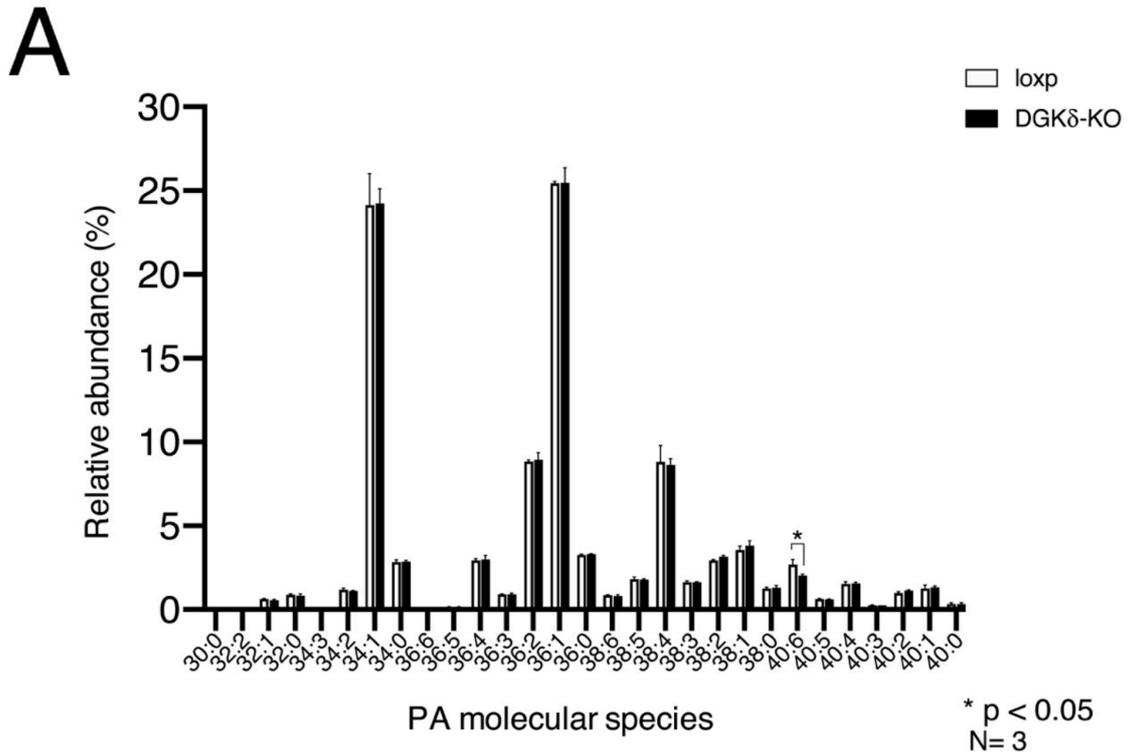
**F**



#### 2-3-6 DGK $\delta$ 2 が選択産生する 40:6PA が Praja-1 E3 ligase 活性を促進する

DGK $\delta$ -KO マウス大脳皮質と LC-MS/MS を用いた解析により、DGK $\delta$  を欠損すると PA 分子種の中 18:0/22:6-PA 量のみが有意に減少し、(図 19 A)、逆に、18:0/22:6-DG 量のみが有意に増加した(図 19 B)。このことはマウス脳において、DGK $\delta$  が選択的に 18:0/22:6-PA を産生することを示している。そこで、まず、18:0/22:6-PA が E3 ligase である Praja-1 と結合するの否かを調べるために、AcGFP-Praja-1 を過剰発現した細胞サンプルと各リポソームとの結合を解析した。その結果、18:0/22:6-PA リポソームと Praja-1 が最も強く結合した (図 20)。次に、18:0/22:6-PA が Praja-1 の活性を制御するの否かを調べた。GST タグ融合 Praja-1 (GST-Praja-1) を発現・精製し、各リポソームとインキュベートした後、Auto-ubiquitinylation Kit を用いて、ユビキチン化度を測定した。図 21 に示されるように、コントロールとして、GST-Praja-1 添加していない時 (PC リポソームあり) はユビキチンのバンドが検出できなかった (図 21 A Lane 1)。18 : 0/22 : 6-PA リポソームの添加によって GST-Praja-1 のユビキチン化度 (180kDa~) が顕著に増加した (図 21 B)。しかし、他の脂質 (18:0/22:6-PG, 18:1/18:1-PA, 18:0/18:0-PA) ではこのような亢進効果は認められなかった。

図 19. DGK $\delta$ -KO マウス脳のパロイタ酸 (PA) および DG 分子種。DGK $\delta$ -KO マウス脳のパロイタ酸 (A) および DG (B) 分子種 (PA : n = 3、DG : n = 4)。実験の平均値 $\pm$ SEM として示した。 \*p < 0.05。



# B

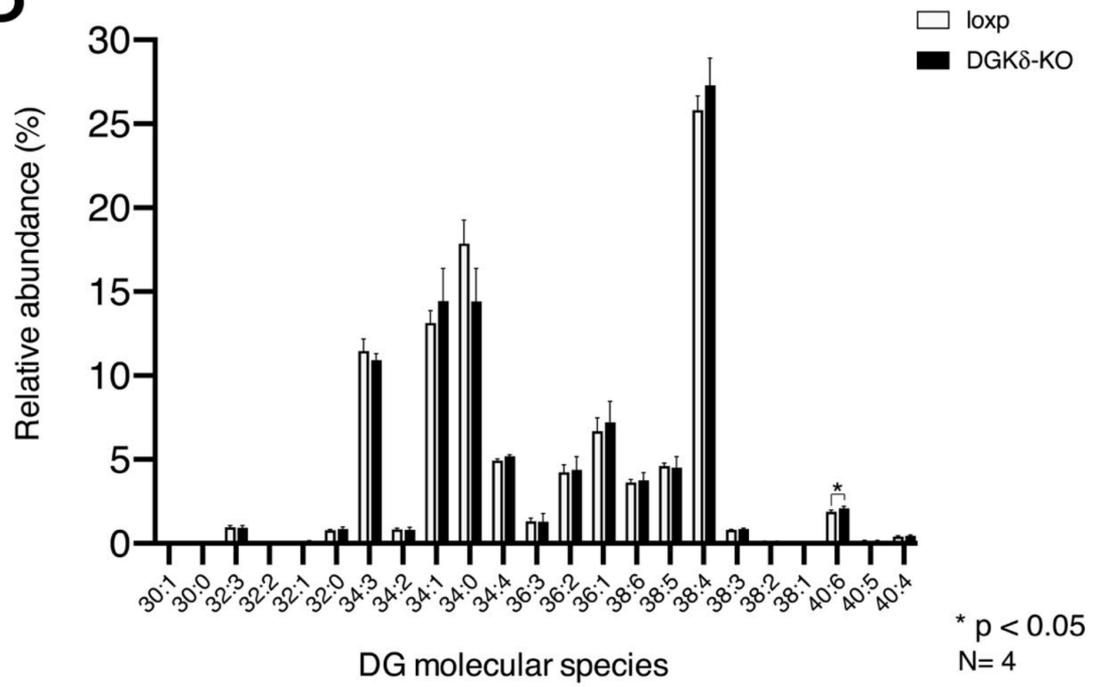


図 20. (A) COS-7 細胞に AcGFP-Praja-1 を過剰発現し、48 時間のインキュベーション後、細胞を回収し、細胞溶解物を図に示すように、PC-, 18:0/22:6-PG-, 18:1/18:1-PA-, 18:0/18:0-PA-および 18:0/22:6-PA リポソームとインキュベートし、その後超遠心分離により分離した。また AcGFP alone をコントロールとしてトランスフェクトし、細胞溶解液を PC または 18:0/22:6-PA リポソームとインキュベートした (左パネル)。AcGFP-Praja-1 は、抗 GFP 抗体を用いた WB により検出した (右パネル)。(B) 上清 (S) および沈降画分 (P) の AcGFP-Praja-1 タンパク質の量を、ImageJ により定量した。結合活性は、総バンド強度と比較した沈殿バンド強度の割合として計算した。3 回の独立した実験の平均値 ± SD として表示した。\*\*\*P < 0.005 versus コントロールリポソーム。

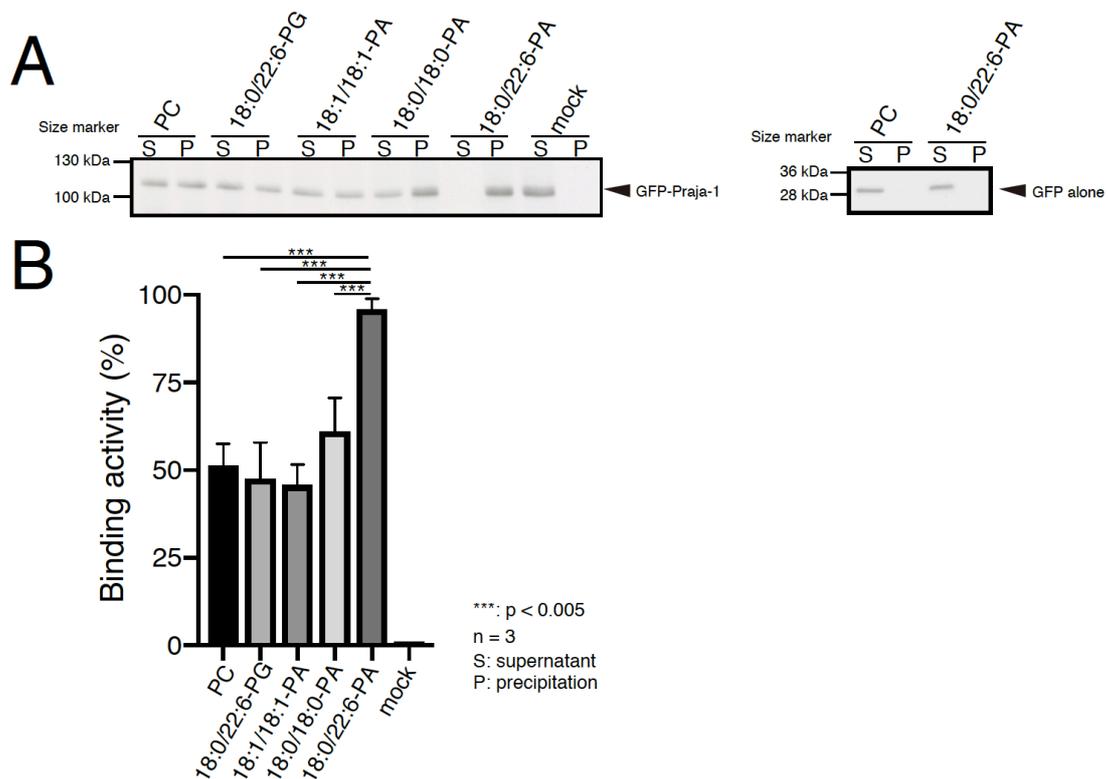
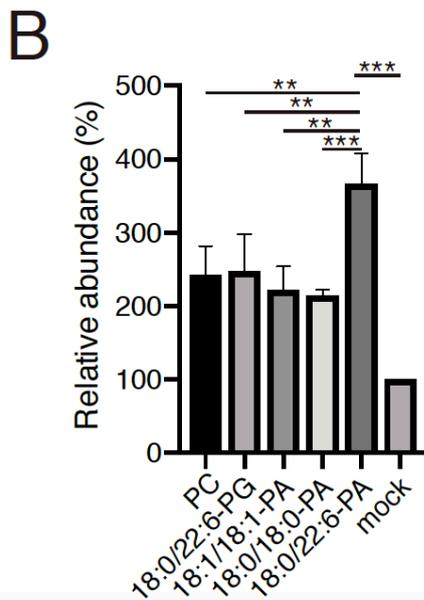
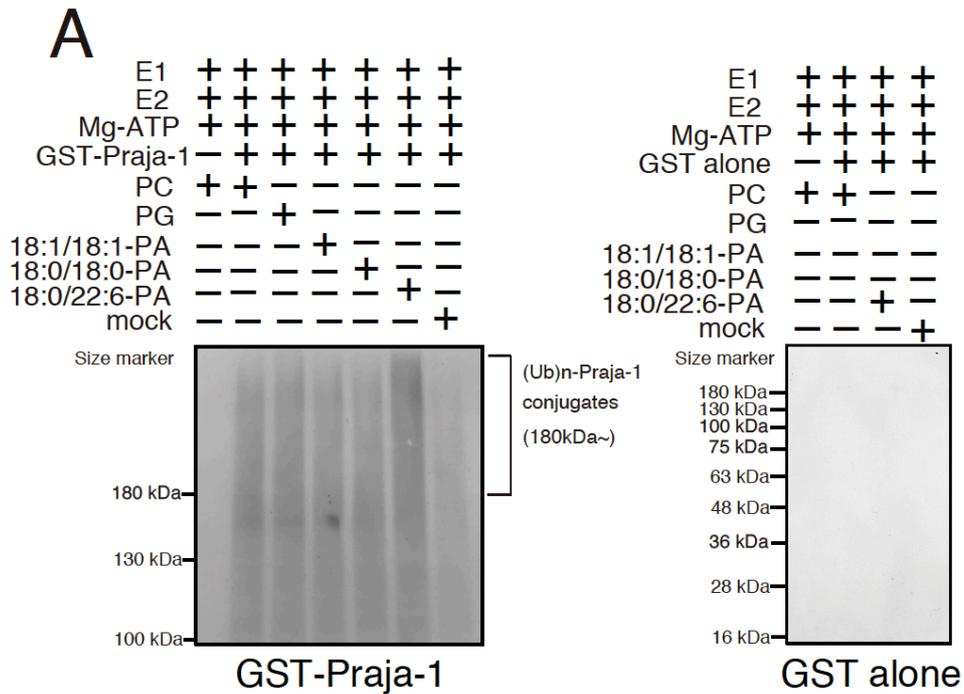


図 21. (A) 精製 GST-Praja-1 融合タンパク質を図に示すように PC-, 18:0/22:6-PG-, 18:1/18:1-PA-, 18:0/18:0-PA-および 18:0/22:6-PA リポソーム、および E1、E2、ATP、およびユビキチンとインキュベートした。抗ユビキチン抗体を用いた WB により検出した。(B) ImageJ により、GST-Praja-1 ユビキチン化度 (> 180kDa) を定量した。3 回の独立した実験の平均値±SD として表示した。\*\*\*、P <0.005。



## 2-4 考察 [40]

SERTは神経機能において非常に重要な役割を果たしており、OCD、大うつ病性障害、自閉症などのいくつかの精神障害に関連している[37-38]。しかし、SERTタンパク質レベルがどのように調節されているかはほとんど分かっていない。本研究では、脂質代謝酵素であるDGK $\delta$ がSERTと相互作用し(図3)た。また、DGK活性(PAの増加および/またはDGの減少)依存的に、ユビキチン-MAGE-D1-Praja-1プロテアソーム系を介してSERT分解を誘導することがわかった。(図22)

アダプタータンパク質であるMAGE-D1は、SERTと相互作用し、ユビキチン化を調節することが報告されている[44]。また、MAGE-D1はPraja-1 E3ユビキチンタンパク質リガーゼと相互作用することが報告されている[45]。本研究では、SERTに加えて、DGK $\delta$ がMAGE-D1およびPraja-1とも相互作用していることを示した(図15, 16, 17)。さらに、DGK $\delta$ の発現は、SERTのユビキチン化に対するPraja-1の機能を相乗的に促進した(図18)。したがって、DGK $\delta$ 、SERT、MAGE-D1およびPraja-1は機能的複合体を形成していると考えられる。

DGK $\delta$ は、アダプターとしてのMAGE-D1及びMAGE-D1の作用により、SERTのユビキチン化および分解を促進する可能性がある(図18)。SERTは、カルシニューリン[46]、Hic-5(過酸化水素誘導性クローン5)[47]、nNOS(ニューロン一酸化窒素シンターゼ)[48]、PICK1(PKCと相互作用するタンパク質)[49]、 $\alpha$ -シヌクレイン[50]およびSCAMP2(分泌担体膜タンパク質2)[51]を含む多くのタンパク質と相互作用することが知られている。そこで、これらのタンパク質はDGK $\delta$ によっても制御されている可能性がある。

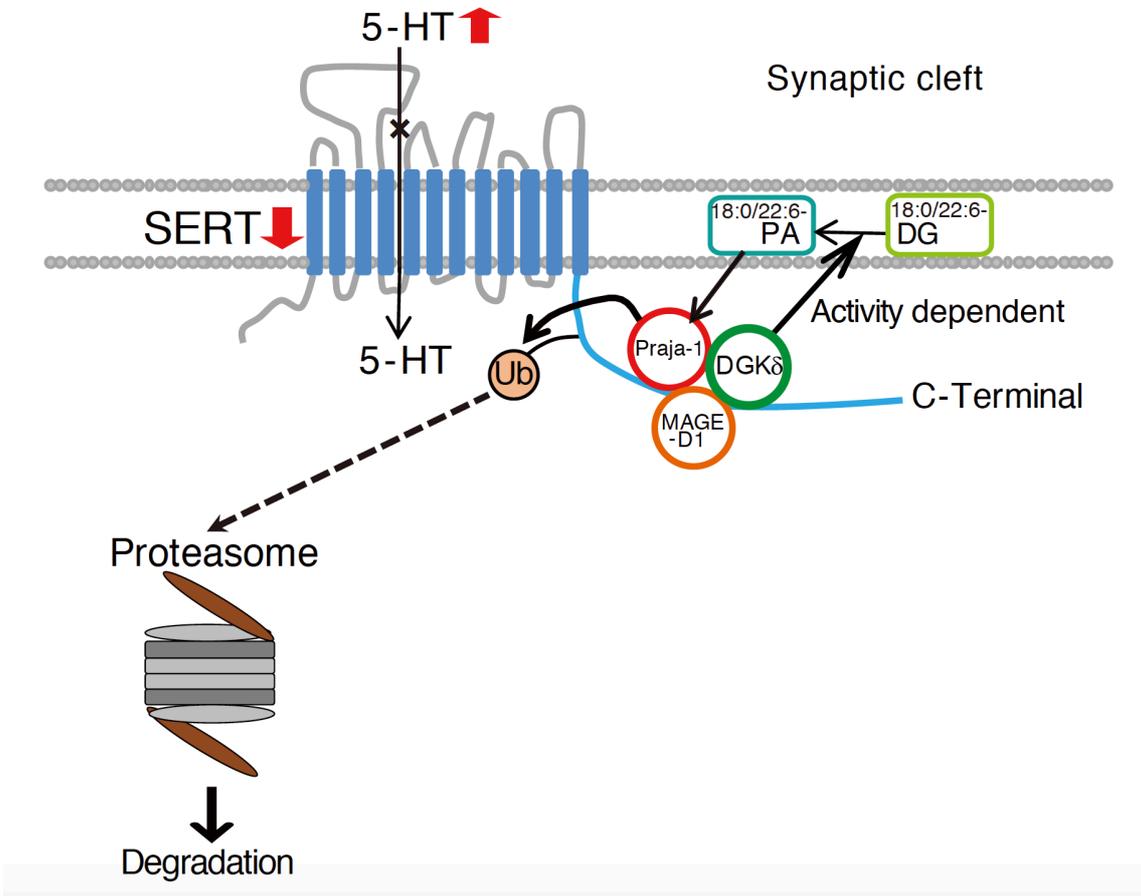
我々の結果は、DGK $\delta$ がDGK触媒活性依存的にPraja-1 E3ユビキチンタンパク質リガーゼの作用を介してSERTのユビキチン化と分解を促進することを示した(図22)。したがって、DGの減少および/またはPAの増加は、Praja-1活性に影響を与え、SERTの分解に重要な役割を果たす可能性がある(図20, 21)。我々は、LC-MS/MSによって、エイコサペンタエン酸を含む18:0/22:6-DGがDGK $\delta$ -KOマウスの脳に蓄積されたことを示した。このことは、DGK $\delta$ が脳において選択的に18:0/22:6-DGをリン酸化して、18:0/22:6-PAを産生することを強く示唆している(図19)。さらに、興味深いことに、DGK $\delta$ が産生する18:0/22:6-PAは、Praja-1と結合し(図20)、直接的にPraja-1 E3リガーゼ活性を亢進することを示した(図21)。PI代謝回転で生成されるホスファチジルイノシトール4,5-ビスリン酸が、脳に非常に重要だと考えられてきた。しかし、本研究の結果は、ホスファチジルイノシトール4,5-ビスリン酸塩に加え、PAやDGなどの構造

的に単純な脂質も中枢神経系で重要な役割を果たすことを示唆した。

大うつ病と OCD は、SERT 阻害剤である SSRI によって治療される[37-39]。したがって、過剰な SERT タンパク質/活性は、これらの障害の病因に関連している。また、SERT は不安と自閉症に関連している[52]。5-HT の機能亢進は、統合失調症患者の脳で観察されたため、統合失調症の陰性症状にも関連している[34]。特に、強力な 5-HT<sub>2A</sub> 受容体拮抗薬と弱いドパミン D<sub>2</sub> 受容体拮抗薬は、統合失調症（陰性症状）に対する主要な薬物である[5]。したがって、我々の新しい発見は、これらの精神障害の病因と治療戦略の分子メカニズムの新しい視点を提供する。さらに、DGK $\delta$ 2 活性を調節する化合物は、これらの精神疾患の新薬として機能する可能性がある。

上述の様に、ユビキチン-MAGE-D1-Praja-1-プロテアソーム系を介した SERT の不安定化における脂質代謝酵素 DGK $\delta$ 2 およびその産生物である 18:0/22:6-PA の生理学的役割を同定した (図 14) [42]。これらの結果は、OCD、大うつ障害、不安、自閉症、統合失調症など、5-HT / SERT および DGK $\delta$ に関連する精神障害の根底にある分子メカニズムに関する新しい視点を提供し、新しい治療法の開発に貢献する可能性がある。

图 22. 模式图 Ub, ubiquitin



【参考文献】

- [1] Goto, K. *et al. Advances in enzyme regulation*, **46**, 192-202. (2006)
- [2] Merida, I. *et al. Biochem. J.* **409**, 1-18. (2008)
- [3] Sakane, F. *et al. Biochim. Biophys. Acta.* **1771**, 793-806. (2007)
- [4] Topham, M.K. *et al. Biochim. Biophys. Acta.* **1790**, 416-24. (2009)
- [5] Usuki, T. *et al. J. Histochem. Cytochem.* **63**, 57-68. (2015)
- [6] Crotty, T. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **103**, 15485-15490. (2006)
- [7] Usuki, T. *et al. Brain Res.* **1648**, 193-201. (2016)
- [8] Joel, D. *Prog, Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry* **30**, 374-88. (2006)
- [9] Yadin, E. *et al. Pharmacol. Biochem. Behav.* **40**, 311-315. (1991)
- [10] Lu, Q. *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.* **497**, 1031-1037. (2018)
- [11] Sakane, F. *et al. J. Biol. Chem.* **277**, 43519-43526. (2002)
- [12] Isozaki, T. *et al. J. Neurochem.* **138**, 448-456. (2016)
- [13] Szechtman, H. *et al. Neurosci. Biobehav. Rev.* **76**, 254-279. (2017)
- [14] Murphy, D.L. *et al. Brain Res. Bull* **56**, 487-494. (2001)
- [15] Ozaki, N. *et al. Mol. Psychiatry* **8**, 933-936. (2003)
- [16] Seimandi, M. *et al. J. Neurosci.* **33**, 16189-99. (2013)
- [17] Carneiro, A.M. *et al. J. Biol. Chem.* **281**, 24769-80. (2006).
- [18] Chanrion, B. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **104**, 8119-24. (2007)
- [19] Torres, G.E. *et al. Neuron* **30**, 121-34. (2001)
- [20] Wersinger, C. *et al. Eur. J. Neurosci.* **24**, 55-64. (2006)
- [21] Muller, H.K. *et al. J. Biol. Chem.* **281**, 28901-9. (2006)
- [22] Harada, B.T. *et al. Structure* **16**, 380-7. (2008)
- [23] Imai, S. *et al. J. Biol. Chem.* **277**, 35323-35332. (2002)
- [24] Knight, M.J. *et al. Biochemistry* **49**, 9667-9676. (2010)
- [25] Qian, Y. *et al. J. Neurosci.* **17**, 45-57. (1997)
- [26] Imai, S. *et al. Biochim. Biophys. Acta.* **1791**, 246-253. (2009)
- [27] Imai, S. *et al. Biochem. J.* **382**, 957-966. (2004)
- [28] Kalueff, A.V. *et al. Neurosci. Biobehav. Rev.* **34**, 373-86. (2010)
- [29] B.L. Jacobs, *et al. Physiol. Rev.* **72**, 165-229. (1992)
- [30] A. Meneses, *et al. Rev. Neurosci.* **23**, 543-553. (2012)
- [31] D. Joel, *et al. Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, **30**, 374-388. (2006)

- [32] E. Yadin, *et al. Pharmacology, biochemistry, and behavior*, **40**, 311-315. (1991)
- [33] C.B. Nemeroff, *et al. J. Clin. Psychopharmacol*, **13**, 10S-17S. (1993)
- [34] H.Y. Meltzer, *et al. Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, **27**, 1159-1172. (2003)
- [35] A.M. Graybiel, *et al. Neuron*, **33**, 1-2, (2002)
- [36] J.M. Greer, *et al. Neuron*, **33**, 23-34, (2002)
- [37] D. Joel, *et al. Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, **30**, 374-388. (2006)
- [38] E. Yadin, *et al. Pharmacology, biochemistry, and behavior*, **40**, 311-315, (1991)
- [39] C.B. Nemeroff, *et al. J. Clin. Psychopharmacol*, **13**, 10S-17S, (1993)
- [40] L. Qiang, *et al. Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Biol. Lipids*, **1865**, 158608, (2020)
- [41] Murakami, C. *et al. Anal. Biochem.* **526**, 43-49, (2017)
- [42] S. Honda, *et al. Lipids*, in press DOI: 10.1002/lipd.12201. (2019)
- [43] M. Sato, *et al. Pharmacology*, **92**, 99-107. (2013)
- [44] A. Mouri, *et al. J. Neurosci.* **32**, 4562-4580. (2012)
- [45] A. Sasaki, *et al. J. Biol. Chem.* **277**, 22541-22546. (2002)
- [46] M. Seimandi, *et al. J. Neurosci.* **33**, 16189-16199. (2013)
- [47] A.M. Carneiro, *et al. J. Biol. Chem.* **281**, 24769-24780. (2006)
- [48] B. Chanrion, *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **104**, 8119-8124. (2007)
- [49] G.E. Torres, *et al. Neuron*, **30**, 121-134. (2001)
- [50] C. Wersinger, *et al. Eur. J. Neurosci.* **24**, 55-64. (2006)
- [51] H.K. Muller, *et al. J. Biol. Chem.* **281**, 28901-28909. (2006)
- [52] A.V. Kalueff, *et al. Neurosci. Biobehav. Rev.* **34**, 373-386. (2010)

## 【謝辞】

本研究を行うにあたり、終始熱心なご指導を頂いた坂根郁夫教授に心より感謝いたします。また、博士3年の村上千明君から多くのアドバイスを得ることができました。また、高橋大輔助教には、日頃から研究の進み具合を気にかけていただき、優しい言葉で私を励まして下さいました。有り難うございます。本研究にあたっては、生体化学研究室の学部生を始め、多くの方々のご協力を頂き、本当にありがとうございました。