

微量生理活性脂質ホスファチジン酸の
分子種別の標的同定とその機能制御
—脂質分子種多様性の生理的意義に迫る—

2022年 2月提出

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・先進科学プログラム
生体機能化学研究室

星野 史規

(千葉大学審査学位論文)

微量生理活性脂質ホスファチジン酸の
分子種別の標的同定とその機能制御
—脂質分子種多様性の生理的意義に迫る—

2022年 2月提出

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・先進科学プログラム
生体機能化学研究室

星野 史規

【目次】

目次	2
論文概要	5
略語	7
法令等の遵守への対応	10

第1章

Creatine kinase muscle type は飽和脂肪酸および/または一価不飽和脂肪酸を含有するホスファチジン酸分子種と相互作用し活性化される

概要	12
緒言	13
手法	15
結果	20
Figures	24
考察	32
参考文献	35

第2章

L-lactate dehydrogenase A は多価不飽和脂肪酸を含有するホスファチジン酸分子種と相互作用して不活性化される

概要	39
緒言	40
手法	43

結果	49
Figures	55
考察	73
参考文献	77

第3章

Synaptojanin-1 は多価不飽和脂肪酸を含有するホスファチジン酸分子種と相互作用して活性化される

概要	86
緒言	87
手法	89
結果	95
Figures	102
考察	114
参考文献	118

第4章

Clathrin coat assembly protein AP180 は多価不飽和脂肪酸を含有するホスファチジン酸分子種と相互作用して機能的に制御される

概要	123
緒言	124
手法	126
結果	129
Figures	133

考察	141
参考文献	144
謝辞	148

論文概要

ホスファチジン酸 (PA) はリン脂質の一つであり、細胞内シグナル伝達の二次メッセンジャーとして様々な生理機能の制御に関与する。また、PA は脂肪酸組成の違いで約 50 種類の分子種を有する。しかし、PA 分子種毎の標的タンパク質や生理機能はほとんど不明である。そこで、本研究では PA 分子種の特異的標的タンパク質のスクリーニング系を確立し、マウス骨格筋や脳から以下 4 つのタンパク質を同定し、その機能解析を行った。

(1) Creatine kinase muscle type (CKM) は骨格筋で creatine と phosphocreatine の交換反応を触媒し、エネルギー貯蔵・供給を行う酵素である。CKM は調べたリン脂質の中で、飽和脂肪酸/一価不飽和脂肪酸含有 PA 分子種 (SFA/MUFA-PA) にのみ強く結合し、SFA/MUFA-PA により活性化された。(2) L-lactate dehydrogenase A (LDHA) は lactate と pyruvate の交換反応を触媒し、嫌気性条件下でエネルギーを供給する酵素であり、がん細胞の増殖を促進する。LDHA は多価不飽和脂肪酸含有 PA 分子種 (PUFA-PA) との選択的結合によって二次構造が変化し、活性が減弱した。(3) Synaptojanin-1 (SYNJ1) は phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂) の inositol 環の D4-/D5-phosphatase であり、神経終末のシナプス小胞輸送に関与する。PUFA-PA は SYNJ1 と強く結合して D4-phosphatase 活性のみを選択的に亢進した。(4) Clathrin coat assembly protein AP180 は clathrin を細胞膜の PI(4,5)P₂ 近傍に蓄積して神経終末のエンドサイトーシスを促進する。AP180 は調べたリン脂質の中で PUFA-PA と PI(4,5)P₂ にのみ強く結合し、両者に対する親和性は同程度であった。さらに、PUFA-PA は AP180 と clathrin との相互作用を阻害したが、PI(4,5)P₂ は影響しなかった。

以上より、PA 分子種は脂肪酸組成の違いにより異なるタンパク質と結合し、これらを機能的に制御することがわかった。脂質生化学において「なぜ PA

を含めたリン脂質が脂肪酸組成の多様性を有するか」という疑問について議論されてきた。本研究により、多様な脂肪酸組成を有することで、異なる PA 分子種それぞれが別のタンパク質を標的にして機能制御することが、リン脂質が多様な脂肪酸組成を有する一つの理由であることが示唆された。

【略語】

AD:	Alzheimer's disease
ANTH:	AP180 N-terminal homology domain
CBB:	Coomassie Brilliant Blue
CD:	circular dichroism
CHC:	clathrin heavy chain
Chol:	cholesterol
CID:	C-terminal intrinsically disordered region
CKM:	creatine kinase muscle type
CL:	cardiolipin
CME:	clathrin-mediated endocytosis
DGK:	diacylglycerol kinase
DMSO:	dimethyl sulfoxide
DTT:	dithiothreitol
emPAI:	exponentially modified protein abundance index
GST:	glutathione S-transferase
KD:	kinase-dead
K_d :	dissociation constant
K_m :	Michaelis constant
LDH:	L-lactate dehydrogenase
LPAAT:	lysophosphatidic acid acyltransferase
MS:	mass spectrometry
MS/MS:	tandem mass spectrometry
MtCK:	mitochondrial creatine kinase

MUFA:	monounsaturated fatty acid
NAD ⁺ :	nicotinamide adenine dinucleotide oxidized
NADH:	nicotinamide adenine dinucleotide reduced
PA:	phosphatidic acid
PABP:	phosphatidic acid-binding protein
PBS:	phosphate buffered saline
PC:	phosphatidylcholine
PE:	phosphatidylethanolamine
PFA:	paraformaldehyde
PG:	phosphatidylglycerol
PI:	phosphatidylinositol
PI(3,4,5)P ₃ :	phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate
PI(4,5)P ₂ :	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PI(4)P:	phosphatidylinositol 4-monophosphate
PLD:	phospholipase D
PMSF:	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PRD:	proline-rich domain
PS:	phosphatidylserine
PUFA:	polyunsaturated fatty acid
PVDF:	PolyVinylidene DiFluoride
SAC:	suppressor of actin
SFA:	saturated fatty acid
SGC:	3-sulfogalactosylceramide
SM:	sphingomyelin

SYNJ1:	synaptojanin-1
T2D:	type 2 diabetes
TBS:	tris buffered saline
TG:	triglyceride
WB:	Western blotting
WT:	wild type

【法令等の遵守への対応】

本論文に記載した全ての実験に関する法令等については下記の通りに対応した。

動物実験に関する法令等の遵守への対応

動物の取り扱い、及び飼育については動物の愛護及び管理に関する法律(昭和48年法律第105号)、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準(平成18年環境省告示第88号)」、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年文部科学省告示第71号)」、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン(平成18年6月日本学術会議作成)」、「動物の殺処分方法に関する指針(平成7年総理府告示第40号)、及び「国立大学法人千葉大学動物実験実施規程(平成29年4月改定)」に沿って実施した。具体的には、国立大学法人千葉大学動物実験実施規程に明記されている教育訓練を受講し、内容を十分に理解した上で実験に従事した。また、研究開発省令第四条に基づき、拡散防止処理が執られたPIAレベルの飼育室で実験動物を飼育する。本研究で用いるC57/BL6マウスに関して。「動物実験計画書」が動物実験委員会の承認を得ている。

遺伝子組み換え実験に関する法令等の遵守への対応

遺伝子組み換え実験実施に関して、「遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律(カルタヘナ法)」に基づき制定された「国立大学法人千葉大学遺伝子組換え実験等安全管理規程(平成16年4月1日制定)」に沿って実施した。具体的には、国立大学法人千葉大学遺伝子組換え実験等安全管理規程に明記されている教育訓練を受講し、内容を十分に理解した上で実験に従事した。また、研究開発省令第四条に基づき、微生物使用実験は拡

散防止処理が執られた P1 レベルの実験室で実験を行った。本研究の実施項目に関しては、研究計画「細胞内外における脂質性メディエーター代謝酵素の変異体作製と相互作用蛋白質のクローニング」、及び、「生体内におけるジアシルグリセロールキナーゼの機能解析」を実験実施機関の長に申請し、承認されている。

第 1 章

Creatine kinase muscle type は
飽和脂肪酸および/または一価不飽和脂肪
酸を含有するホスファチジン酸分子種と
相互作用し活性化される

【概要】

Creatine kinase muscle type (CKM) は骨格筋に強く発現するエネルギー代謝酵素であり、creatine と ATP から phosphocreatine と ADP を産生する交換反応を触媒することで、細胞内で不安定な ATP のエネルギーを phosphocreatine として貯蔵し、エネルギー需要の増加に伴って再供給する。リポソーム沈降法、および、脂質オーバーレイ法により CKM の脂質結合能を検証したところ、CKM は調べたリン脂質の中で PA にのみ特異的に結合した。さらに、CKM は既報の PA 結合タンパク質の中で 16:0/16:0-PA に対して最も高い親和性（解離定数: 2.0 μM ）を示した。興味深いことに、CKM は飽和脂肪酸 (SFA)、および/または、一価不飽和脂肪酸 (MUFA) を含む PA 分子種 (SFA/MUFA-PA: 16:0/16:0-PA, 16:0/18:1-PA, 18:1/18:1-PA, 18:0/18:0-PA) と強く結合したが、一方、多価不飽和脂肪酸 (PUFA) を含有する PA 分子種 (PUFA-PA) とは結合しなかった。

さらに、CKM が SFA/MUFA-PA によって機能的に制御されるかどうかを調べるため、SFA/MUFA-PA がそれぞれ、(1) CD スペクトル測定による CKM の二次構造を変動させるか、(2) CKM の酵素活性を変動させるかについて調べた。その結果、SFA/MUFA-PA は CKM の二次構造を変化させなかったが、その酵素活性を亢進した。

以上より、骨格筋において DGK δ によって産生される SFA/MUFA-PA は CKM と特異的に結合することによって標的とし、その酵素活性を亢進することがわかった。

【緒言】

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) をリン酸化してホスファチジン酸 (PA) を産生する [1-4]。また、DGK は生理活性脂質である DG、および、PA の量的平衡を調節することで種々の生理学的、および、病理学的機能の制御に関与する [5,6]。これまで、10 種類の哺乳類 DGK isozyme (α 、 β 、 γ 、 δ 、 η 、 κ 、 ε 、 ι 、 ζ 、 θ) が同定されており、特徴的な二次構造によって5つのグループ (I ~ V) に分類されている [1-4]。そのうちグループ II に属するのは、 δ 、 η 、および、 κ isozyme である [7]。

DGK δ は、グルコース取り込みにおける主要な器官である骨格筋 [8] で強く発現している [9]。興味深いことに、Chibalin らは DGK δ が高血糖によって誘導される末梢インスリン抵抗性に寄与し、II 型糖尿病 (T2D) の重症度を悪化させることを報告した [10]。さらに、Miele らは、5分以内の急性高グルコース曝露が骨格筋細胞の DGK δ 活性を増強し、続いて、インスリン受容体が活性化されることを報告した [11]。また、最近我々は、DGK δ が高グルコース刺激条件下の C2C12 マウス筋芽細胞において、14:0/16:0-PA、14:0/16:1-PA、16:0/16:0-PA、16:0/16:1-PA、16:0/18:0-PA および 16:0/18:1-PA (X:Y =炭素原子の数:二重結合の数) などの飽和脂肪酸 (SFA)、および/または、一価不飽和脂肪酸 (MUFA) を含む PA 分子種 (SFA/MUFA-PA) を選択的に産生することを報告した [12,13]。一方、DGK δ は多価不飽和脂肪酸 (PUFA) を含有する PA 分子種は産生しなかった [12,13]。したがって、骨格筋における DGK δ タンパク質発現量の調節機構と DGK δ 産生物 (SFA/MUFA-PA) の標的を明らかにすることは、II 型糖尿病の発症メカニズムを解明し、本疾患発症の予防と改善のために重要である。

本研究では、マウス骨格筋の 16:0/16:0-PA の標的タンパク質を探索、および、同定することを目的とし、その結果、以前から II 型糖尿病の発症と関連す

ることが知られている creatine kinase muscle type (CKM) [14-17] を、新規 16:0/16:0-PA 結合タンパク質として同定した。そして、CKM の機能解析により、CKM は非常にユニークな PA 結合タンパク質 (PABP) であることを見出した。

【手法】

試薬

L- α -phosphatidylcholine from egg yolk (PC mixture)、1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphate (16:0/16:0-PA)、1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphate (16:0/18:1-PA)、1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphate (18:1/18:1-PA)、1,2-distearoyl-sn-3-phosphate (18:0/18:0-PA)、1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphate (18:0/20:4-PA)、1-stearoyl-2-docosahexaenoyl-sn-glycero-3-phosphate (18:0/22:6-PA)、および、1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoserine (16:0/16:0-PS) は Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) から購入した。Cholesterol (Chol) とクレアチンリン酸二ナトリウム四水和物は Wako Pure Chemicals (Tokyo, Japan) から購入した。Membrane Lipid StripsTM は、Echelon Biosciences (Salt Lake City, UT, USA) から購入した。

実験動物

C57BL/6N マウス (SLC Japan, Inc.) は千葉大学動物実験実施規程 (許可番号: 動 2-227) に基づき、適切な環境下で飼育を行い、実験に必要な試料 (骨格筋の mRNA、および、ホモジネート) を得るために頸椎脱臼後に解剖し、臓器を摘出した。

リポソームの作製

第 1 章では、① マウス骨格筋ホモジネートを用いた 16:0/16:0-PA 結合タンパク質の同定、または、② CKM の脂質結合能解析に向けた 2 通りのリポソーム作製法を用いた。

① マウス骨格筋ホモジネートを用いた 16:0/16:0-PA 結合タンパク質の同定: 室

素気流下で以下のように混合した脂質混合物を乾燥させた。PC 含有リポソーム [PC mixture (50 mol%)、Chol (50 mol%)]、16:0/16:0-PS 含有リポソーム [16:0/16:0-PS (50 mol%)、(50 mol%)]、および、16:0/16:0-PA リポソーム [16:0/16:0-PA (50 mol%)、Chol (50 mol%)]。乾燥させた脂質混合物に、25 mM HEPES バッファー (pH7.4) [100 mM NaCl、1 mM DTT] を加えて 95°C で 45 分間水和し、水和中 15 分ごとに 1 回 1 分間ボルテックスした。次に、5 回の凍結融解サイクル (-196°C で 3 分間、95°C で 3 分間) を行なった後、Mini Extruder (Avanti Polar Lipids、Alabaster、AL、USA) を用いて、100 nm のポリカーボネートメンブレンからリポソームを 11 回押し出すことによって、粒径 100 nm のリポソームを形成した。Mini extruder は、使用前に 95°C に加熱した。

② CKM の脂質結合能解析: 窒素気流下で以下のように混合した脂質混合物を乾燥させた。PC リポソーム [PC mixture (70 mol%)、および、Chol (30 mol%)]、PS リポソーム [16:0/16:0-PS (30 mol%)、PC mixture (40 mol%)、および、Chol (30 mol%)]、および、PA リポソーム [各 PA 分子種 (30 mol%)、PC mixture (40 mol%)、および、Chol (30 mol%)]。乾燥させた脂質混合物に 25 mM HEPES バッファー (pH 7.4) [100 mM NaCl、1 mM DTT] を加え、95°C で 45 分間水和し、水和中に 15 分ごとに 1 回 1 分間ボルテックスした。次に、5 回の凍結融解サイクル (-196°C で 3 分間、95°C で 3 分間) を行なった。リポソームは、Branson Sonifier 450 を使用して 90°C での超音波処理を行うことによって形成した。

PA 結合タンパク質としての CKM の同定

マウス骨格筋 (雄、11 週齢) を摘出し、50 mM HEPES バッファー (pH 7.2) [150 mM NaCl、5 mM MgCl₂、および、cOmplete EDTA free protease inhibitor cocktail (Roche Applied Science、Penzberg、Germany)] でホモジナイズした。調製したマ

ウス骨格筋ホモジネートを PC 含有リポソームと 30 分間転倒混和した後、200,000×g、4°C、1 時間、超遠心分離によってリポソームを沈降させた。上清画分を回収し、16:0/16:0-PS 含有、または、16:0/16:0-PA 含有リポソームと 30 分間転倒混和した後、200,000×g、4°C、1 時間、超遠心分離によって リポソームを沈降させた。上清画分、および、沈降画分を 25 mM HEPES バッファー (pH 7.4) [100 mM NaCl、1 mM DTT] で回収し、5×SDS サンプルバッファーを加えた後、95°C で 10 分間加熱した。得られたサンプルに含まれるタンパク質を SDS-PAGE、および、銀染色法で検出した。目的のタンパク質バンドを切り出し、トリプシン消化後、脱塩、および還元処理したのち、ペプチド断片を抽出した。抽出したペプチドは、高速液体クロマトグラフィー-ハイブリッドイオントラップフーリエ変換質量分析計である LTQ-Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA、USA) でタンパク質を同定した。

CKM タンパク質の発現と精製

CKM の cDNA は、マウス骨格筋 cDNA からプライマー 5'-GGTGGTCATATGATGCCGTTTCGGCAACACC-3'、および、5'-GGTGGTCTCGAGCTACTTCTGCGCGGGGAT-3'を使用して増幅し、pET-28a にライゲーションし、Rosetta 2-DE3 大腸菌細胞 (Novagen、Merck、Darmstadt、Germany) にトランスフェクションした。His×6 タグ融合 CKM タンパク質の発現と精製は、既報の手法と同様にして実施した [20]。CKM 活性測定では、精製したタンパク質を 25 mM HEPES バッファー (pH 6.8) [100 mM NaCl、1 mM DTT] で透析した。

CKM 活性測定

精製した CKM タンパク質の活性は、creatine kinase、ヘキソキナーゼ、および、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼが関与する連鎖反応を使用して NADPH を生成し、波長 340 nm における吸光度の増加を吸光度計を用いて測定した。2.0 mg/mL His×6-CKM、10 mM phosphocreatine、1 mM ADP、30 mM MgCl₂、20 mM D-グルコース、0.8 mM NADPH、600 U/L ヘキソキナーゼ、300 U/L グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、10 mM AMP、5 mM DTT を含む反応溶液 (1 mL) を 25°C で 10 分間転倒混和した。1 unit は、pH 6.8、25°C で 1 分あたり 1.0 mmol の NADP⁺ を NADPH に変換する活性を示す。

リポソーム沈降法

精製した His×6-CKM (最終濃度: 0.5 μM) を 25 mM HEPES バッファー (pH 7.4) [100 mM NaCl、1 mM DTT] に溶解し、PA 含有、または、コントロールリポソームとともに 4°C で 30 分間転倒混和した。その後、サンプルを 200,000 × g、4°C で 1 時間、超遠心分離によりリポソームを沈降させた。上清、および、沈降画分を回収し、25 mM HEPES バッファー (pH 7.4) [100 mM NaCl、1 mM DTT] に溶解した。回収した上清、および、沈降画分に含まれるタンパク質は 5×SDS サンプルバッファーを加えた後、95°C で 10 分間加熱し、10% アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE によって分子量ごとに分離した。得られたゲルは CBB 染色して約 37kDa の His×6-CKM のバンドを検出した。

ウェスタンブロッティング

SDS サンプルを 4% アクリルアミドの濃縮ゲルで泳動 (100 V、20 分間) し、サンプルの濃縮後、適切なアクリルアミド濃度の分離ゲルでタンパク質を分離した (200 V、60 分間)。分離したタンパク質バンドをポリビニリデンフルオライ

ド (PVDF) 膜にウエット式トランスファー装置を用いて、10 mM CAPS (pH 11) 溶液中、4°C で転写 (400 mA、60 min) した。転写後、PVDF 膜を 10 mL の TBS バッファー (10 mM Tris-HCl (pH 7.4)、150 mM NaCl) でシーソーを用いて室温で 5 分洗浄後、5% (w/v) skim milk 入りの TBS-T バッファー (TBS バッファーに最終濃度 0.05% (v/v) になるように Tween-20 を添加した溶液) で 1 時間ブロッキングした。

次に 10 mL の TBS-T で 5 分洗浄する操作を 3 回行った後、5% (w/v) skim milk/TBS-T に適切な濃度で希釈した一次抗体を 5 mL 加え、4°C で 16 時間反応させた。抗体溶液の回収後、室温で TBS-T で 3 回 5 分間ずつ洗浄し、抗マウス IgG 抗体 (Bethyl Laboratories、Montgomery、TX、USA) を 5% (w/v) skim milk/TBS-T で 10000 倍希釈した溶液を 5 mL 加え、室温で 1 時間反応させた。抗体反応後、TBS-T で 5 分間、3 回洗浄し、ECL 溶液 1 と 2 を 500 μ L ずつ混ぜた溶液をメンブレンに浸した後、暗室にて ECL film に感光させることでタンパク質バンドの検出を行った。次にフィルムの感光度を Image J software を用いてタンパク質バンドの強度を定量した。

脂質オーバーレイアッセイ

種々の脂質 100 pmol がそれぞれスポットされたニトロセルロースメンブレン (Echelon Biosciences) を 2% (w/v) skim milk/PBS で室温で 1 時間ブロッキングした。ブロッキング後、6 \times His タグ融合タンパク質 (最終濃度: 20 nM) を含む 3% BSA/0.1% Tween20/PBS 10 mL をメンブレンに添加し、4°C で 20 分間攪拌した。メンブレンに抗 6 \times His タグ抗体 (D291-3S、Medical & Biological Laboratories、Nagoya、Japan) を加えて攪拌した後 PBS-T で洗浄し、マウス IgG (Bethyl Laboratories、Montgomery、TX、USA) 抗体を加えて攪拌した。最後に、脂質結

合タンパク質は、ECL 溶液 1 と 2 を 100 μ L ずつ混ぜた溶液をメンブレンに浸した後、暗室にて ECL film に感光させることで検出を行った。次にフィルムの感光度を Image J software を用いてスポットの強度を定量した。

円偏光二色性スペクトル測定

円偏光二色性 (CD) スペクトルは、光路長 0.2 mm のセルを使用して、スキャン速度 20 nm/min、バンド幅 1 nm、波長 190~250 nm の条件下で、Jasco J-805 分光計 (Jasco Corporation, Tokyo, Japan) を用いて測定した。10 μ M 濃度の 6 \times His タグ融合 CKM を最終濃度 10 μ M になるように、25 mM HEPES バッファー (pH 7.4) [100 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM PA 含有リポソーム、または、コントロールリポソーム] で希釈した。

統計解析

全てのデータは平均値 \pm SD で示し、one-way ANOVA 後に Tukey's post hoc test で統計処理を行い、有意差があるのかどうかを比較解析した。統計処理には GraphPad Prism 8 (GraphPad) を用いて、 $p < 0.05$ の時に有意差があると判定した。

【結果】

骨格筋において16:0/16:0-PA分子種と特異的に結合するタンパク質の同定

近年我々の研究グループでは脂質代謝酵素DGK δ が高濃度グルコース刺激条件下のマウス筋芽細胞 (C2C12) において14:0/16:0-PA、14:0/16:1-PA、16:0/16:0-PA、16:0/16:1-PA、16:0/18:0-PA、および、16:0/18:1-PAなどのSFA、および/または、MUFA (SFA/MUFA) を含有するPA分子種を選択的に産生することを報告した。しかし、SFA/MUFA-PA (16:0/16:0-PA分子種) の標的タンパク質は不明である。そこで、16:0/16:0-PA分子種の標的タンパク質の探索をマウス骨格筋ホモジネートを用いて行なった。マウス骨格筋ホモジネートを16:0/16:0-PAリポソーム、または、16:0/16:0-PSリポソームと転倒混和した後、超遠心分離した。得られた沈降物中に含まれるタンパク質をSDS処理し、SDS-PAGEを行なった後に銀染色法により検出した。その結果、16:0/16:0-PAリポソームの沈降物中に分子量約60 kDaの高強度バンドが検出された (Figure 1A)。次に、分子量約60 kDaのバンドを切り出してゲル内酵素消化法によってゲル中からタンパク質のペプチド断片を抽出した後、LC-MS/MS法によってタンパク質を同定した。その結果、creatine kinase muscle type (CKM)、 β -enolase、 α -enolase、actin (α cardiac muscle)、および、myosin light chain 1/3 (skeletal muscle isoform) が16:0/16:0-PA結合タンパク質の候補として同定された (Figure 1B)。中でも、CKMは最も高いSCORE (同定の確からしさ) と*emPAI* (サンプル中のタンパク質量の指標) を示したため、CKMに着目して研究を行なった。

次に、マウス骨格筋mRNAの逆転写産物からマウスCKMのcDNAをクローニングし、pET-28aベクターにライゲーションした。His \times 6タグ融合CKMタンパク質を大腸菌細胞で発現し、Ni²⁺アフィニティークロマトグラフィーによって精製した。その結果、His \times 6-CKM (約44 kDa) が高純度に精製され (Figure 1C)、高

い creatine kinase 活性を有することを確認した (Figure 1D)。その比活性 (80.0 ± 1.9 U/mg) は、大腸菌で発現、および、精製されたCKM (105 U/mg) [23]、および、血清から精製されたヒトCKM (152 U/mg) の比活性 [24]と同程度であった。したがって、大腸菌から精製されたHis×6-CKMは適切なコンフォメーションを取り、十分な活性を保持していることが示された。

CKMは16:0/16:0-PAに対して高い結合親和性を有する

次に、リポソーム沈降法を行い、16:0/16:0-PAへのCKMの結合活性を検証した。その結果、CKMの約10%のみが、バックグラウンドコントロールとしてのPCのみを含むリポソームで沈降した。さらに、酸性リン脂質コントロールとして用いた16:0/16:0-PSリポソームは、バックグラウンドコントロール (PC) と同等の約10%のCKMとしか共沈降しなかった (Figure 2A)。一方、CKMの約60%が16:0/16:0-PAリポソームと共沈降し (Figure 2A)、この結果より、CKMが16:0/16:0-PAリポソームとより強く相互作用することがわかった。また、16:0/16:0-PAリポソームと共沈降するCKMのタンパク質量は16:0/16:0-PA濃度依存的に増加した (Figure 2B)。そして、16:0/16:0-PAに対するCKMの解離定数 (K_d) は $2.0 \mu\text{M}$ であった (Figure 2B)。

CKMはSFA/MUFA-PA分子種と選択的に結合する

CKMとPAとの相互作用における分子種選択性を明らかにするために、16:0/18:1-PA、18:1/18:1-PA、18:0/18:0-PA、18:0/20:4-PA、または、18:0/22:6-PAを含むリポソームを作製し、リポソーム沈降法によってCKMとの相互作用解析を行なった。Figure 3に示すように、16:0/18:1-PA、18:1/18:1-PA、および、18:0/18:0-PAは16:0/16:0-PAの場合と同程度にCKMに強く結合した。一方、18:0/20:4-PA、

および、18:0/22:6-PAはCKMとバックグラウンドコントロール (PC) と同程度しか相互作用しなかった (Figure 3)。以上より、CKMはPA分子種のうち、SFA、および/または、MUFAを含有するPA分子種 (SFA/MUFA-PA: 16:0/16:0-PA、16:0/18:1-PA、18:1/18:1-PA、または、18:0/18:0-PA) と選択的に強く相互作用し、一方で、多価不飽和脂肪酸を含有するPA分子種 (PUFA-PA: 18:0/20:4-PA、または、18:0/22:6-PA) とは相互作用しないことがわかった。

CKMは特異的にPA分子種と相互作用する

CKMがPA以外の脂質分子種に対して結合するかを調べるため、パルミチン酸 (16:0) を脂肪酸側鎖として含む (Chol以外) 種々の脂質がそれぞれスポットされたメンブレンを使用して脂質オーバーレイアッセイを行なった。Figure 4に示すように、CKMは強いPA結合活性を示した。一方、PI、PI(4)P、PI(4,5)P₂、PI(3,4,5)P₃、PG、CL、PS、SGCなどの他の酸性脂質、および、TG、DG、PC、PE、Chol、SMなどの中性脂質はCKMと相互作用しなかった。したがって、CKMが非常に特異的にPAとのみ強く相互作用することがわかった。

SFA/MUFA-PA分子種はCKMのタンパク質二次構造を変化させない

CKMがPA分子種と結合することによってCKMのタンパク質二次構造が変化するかどうかを調べるために、種々のPA分子種を含むリポソームと精製したCKMタンパク質を混合してCDスペクトル測定を行なった。その結果、PC、PS、または、PA分子種を含むすべてのリポソームによって、CKMの二次構造に影響しなかった。

SFA/MUFA-PA分子種はCKMの酵素活性を亢進する

CKMと相互作用するSFA/MUFA-PA分子種はCKMが有するエネルギー供給活性 (ATP産性能) に影響を与えるかどうかを調べるために、PC、16:0/16:0-PA、16:0/18:1-PA、18:1/18:1-PA、または、18:0/18:0-PAを含有するリポソームをCKMと転倒混和した後、CKM活性測定を行なった。その結果、バックグラウンドコントロールであるPCリポソームを加えた場合と比較して16:0/16:0-PA、16:0/18:1-PA、18:1/18:1-PA、および、18:0/18:0-PAリポソームを加えた場合に、CKM活性が有意に増加した (Figure 6)。したがって、SFA/MUFA-PA分子種はCKMと相互作用することでその酵素活性を亢進することがわかった。

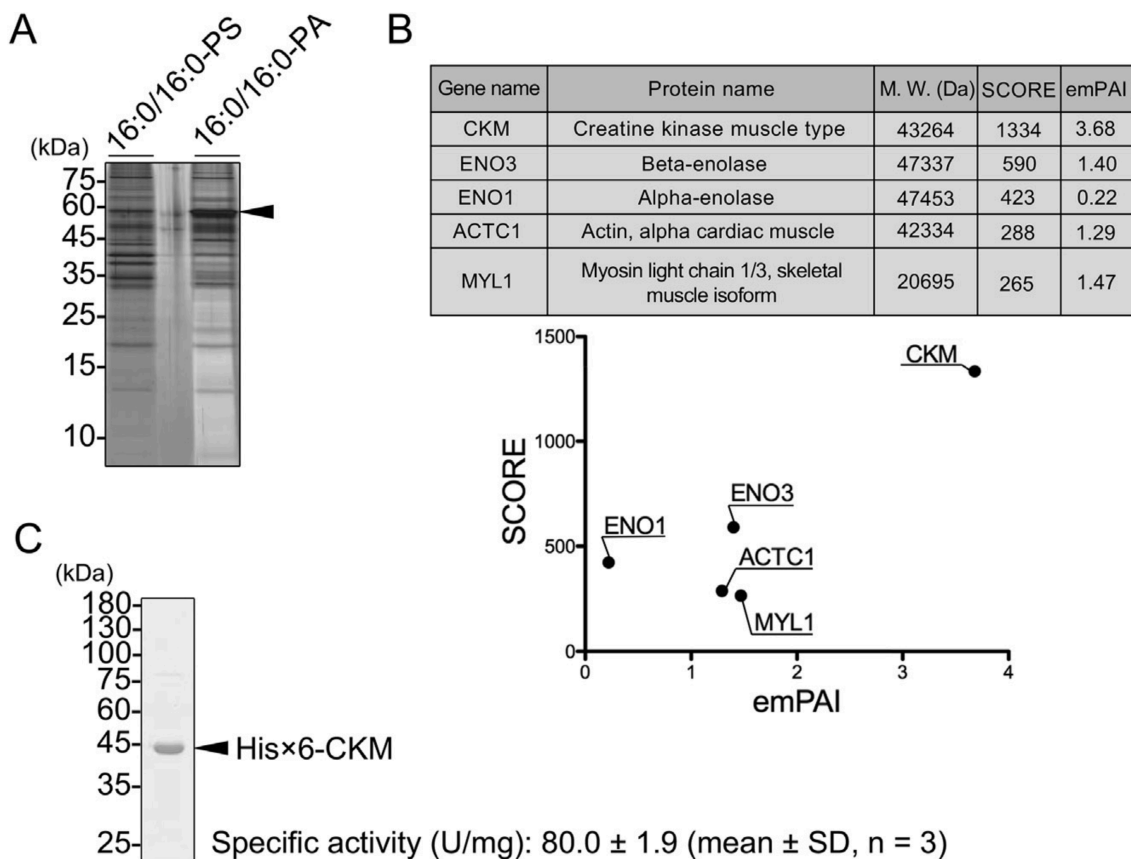


Figure 1. マウス骨格筋における16:0/16:0-PA結合タンパク質の同定

(A) マウス骨格筋ホモジネートを16:0/16:0-PA含有リポソーム、または、16:0/16:0-PS含有リポソームと転倒混和し、次に超遠心分離した。16:0/16:0-PA、または、16:0/16:0-PSリポソームと共沈降したタンパク質をSDS-PAGEで分離し、銀染色で検出した。(B) 銀染色法で検出されたタンパク質バンドのうち、黒矢印でマークしたバンドを切り出し、ゲル内酵素消化後、LC-MS/MSで分析した。タンパク質スコア (*SCORE*: 同定の確からしさ) が250を超える5つのタンパク質を同定した。 *SCORE*、および、*emPAI* (exponentially modified protein abundance index) をプロットした。(C) 大腸菌細胞で発現したHis*6-CKMタンパク質をアフィニティークロマトグラフィーで精製し、SDS-PAGEで分離した後、CBBで染色した。His*6-CKMの比活性は 80.0 ± 1.9 U/mg (平均値 \pm SD, n = 3)。

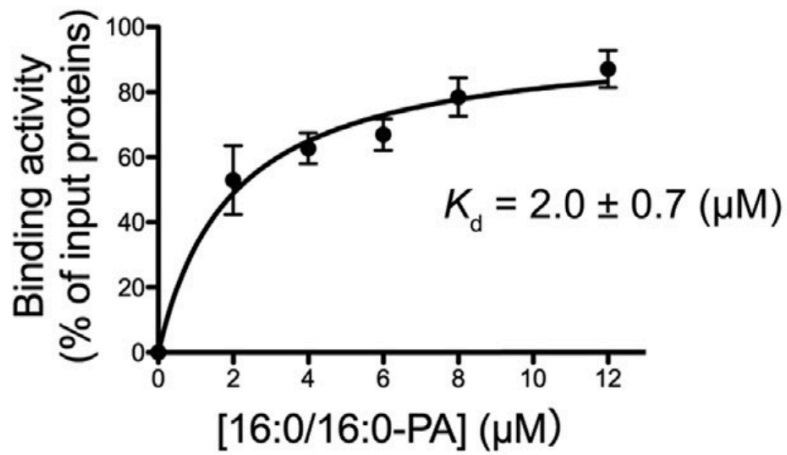
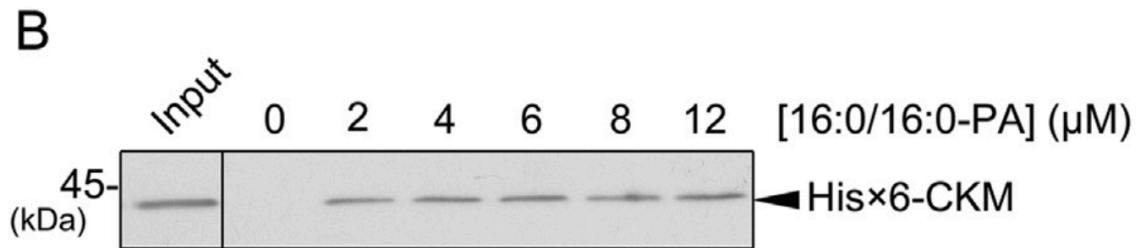
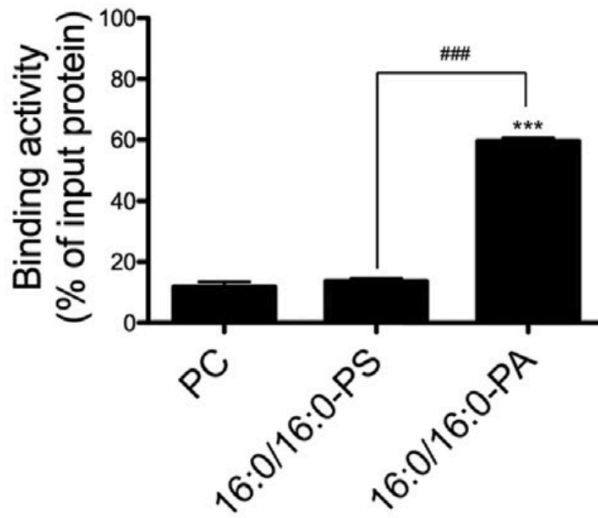
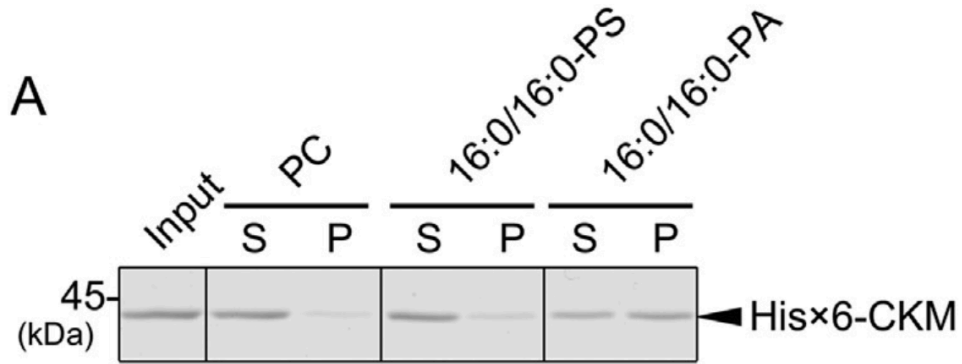


Figure 2. His×6-CKMの16:0/16:0-PAへの結合活性

(A) リポソーム沈降法による16:0/16:0-PA、16:0/16:0-PS、および、PCリポソームとHis×6-CKMとの相互作用解析。精製したHis×6-CKM (最終濃度: 0.5 μ M) を、PC、16:0/16:0-PA、または、16:0/16:0-PSリポソームと転倒混和し、超遠心分離によって各リポソームをそれぞれ沈降させた。上清画分 (S)、および、沈降画分 (P) 中のタンパク質のバンド強度は、Image J softwareを使用したデンシトメトリーによって定量した。各リポソームに対するBinding activity (結合活性) は、上清画分、および、沈降画分のバンド強度の総和に対する沈降画分のバンド強度の比率として算出した。(平均値 \pm SD、n = 3)、***P<0.005 (vs. PC (コントロール) リポソーム)、###P<0.005 (vs. 16:0/16:0-PAリポソーム)。(B) 精製したHis×6-CKM (最終濃度: 0.1 μ M) を、示された濃度の16:0/16:0-PAリポソームとともに転倒混和し、超遠心分離によって16:0/16:0-PAリポソームを沈降させた。沈降画分中のタンパク質のバンド強度は、抗6×Hisタグ抗体を使用したWB法によって検出し、Image J softwareを使用したデンシトメトリーによって定量した。Binding activity (結合活性) は、Inputのバンド強度と比較した沈降画分バンド強度の比率として算出した。(平均値 \pm SD、n = 4)、解離定数 (K_d) は、GraphPad Prism 5.0 (Dissociation-One phase exponential decay) を使用して算出した。

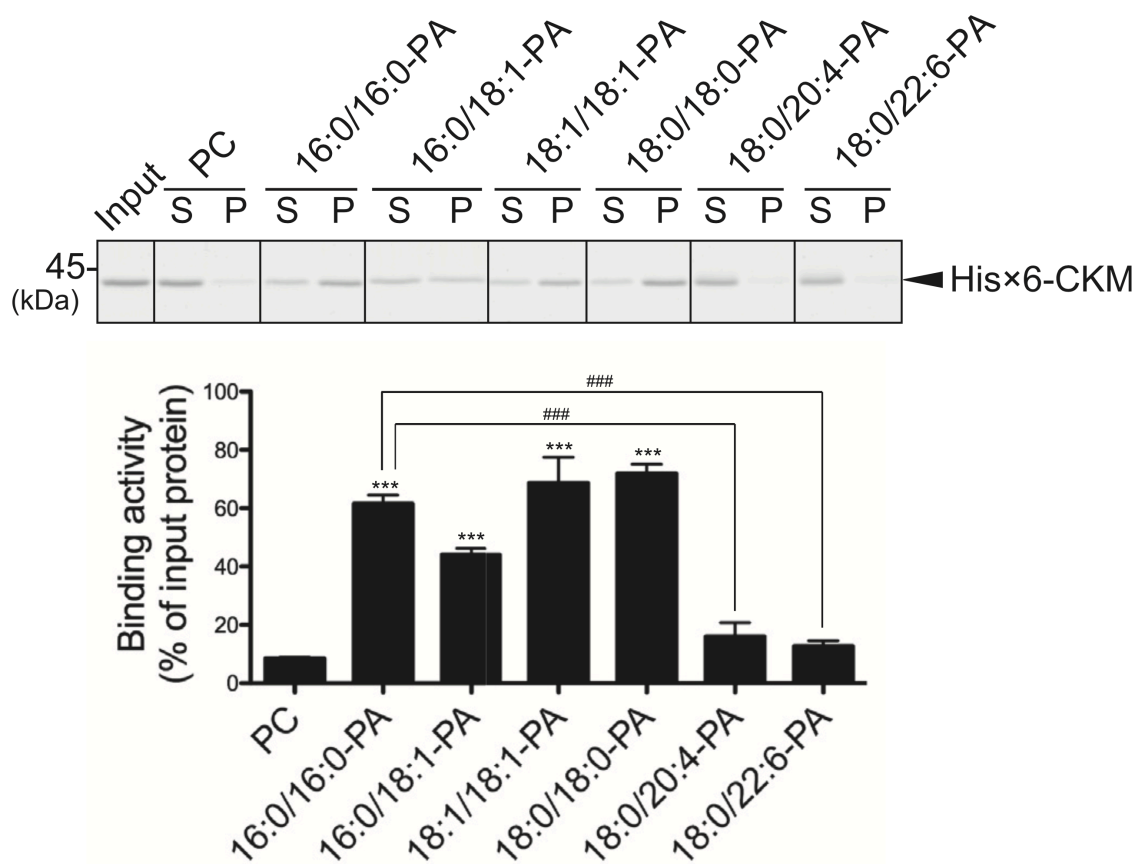


Figure 3. His*6-CKMの種々のPA分子種への結合活性

精製したHis*6-CKM (0.5 μ M) をPC、16:0/16:0-PA、16:0/18:1-PA、18:1/18:1-PA、18:0/18:0-PA、18:0/20:4-PA、または、18:0/22:6-PAリポソームと転倒混和し、次に超遠心分離によりリポソームを沈降させた。上清画分 (S)、および、沈降画分 (P) 中のタンパク質のバンド強度はImage J softwareを使用したデンシトメトリーによって定量した。Binding activity (結合活性) は、上清画分、および、沈降画分のバンド強度の総和に対する沈降画分のバンド強度の比率として算出した。(平均値 \pm SD、n=3)、***P<0.005 (vs. PC (コントロール) リポソーム); ####P<0.005 (vs. 16:0/16:0-PAリポソーム)。

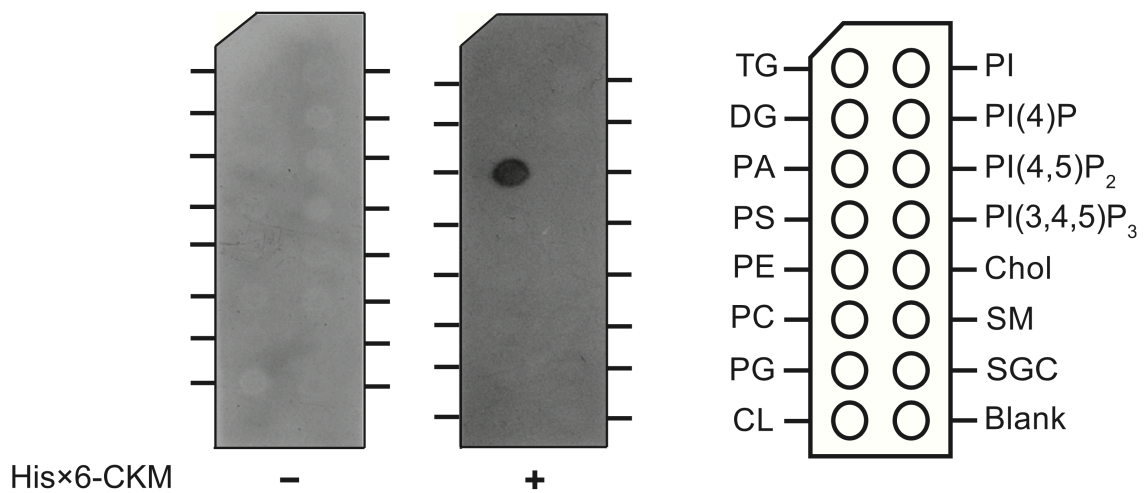


Figure 4. His×6-CKMの種々の脂質への結合活性

パルミチン酸 (16:0) を脂肪酸側鎖に持つ様々な脂質分子種を使用したHis×6-CKMの脂質オーバーレイアッセイ。100 pmolの種々の脂質をニトロセルロースメンブレンにスポットし、精製したHis×6-CKM (20 nM) を加えた。脂質結合タンパク質は、抗6×Hisタグ抗体で検出した。独立した3回の実験結果のうち代表的な1例を示した。(triglyceride: TG、 diacylglycerol: DG、 phosphatidic acid: PA、 phosphatidylserine: PS、 phosphatidylethanolamine: PE、 phosphatidylcholine: PC、 phosphatidylglycerol: PG、 cardiolipin: CL、 phosphatidylinositol: PI、 PI 4-monophosphate: PI(4)P、 PI 4,5-bisphosphate: PI(4,5)P₂、 PI 3,4,5-trisphosphate: PI(3,4,5)P₃、 cholesterol: Chol、 sphingomyelin: SM、 3-sulfogalactosylceramide: SGC)

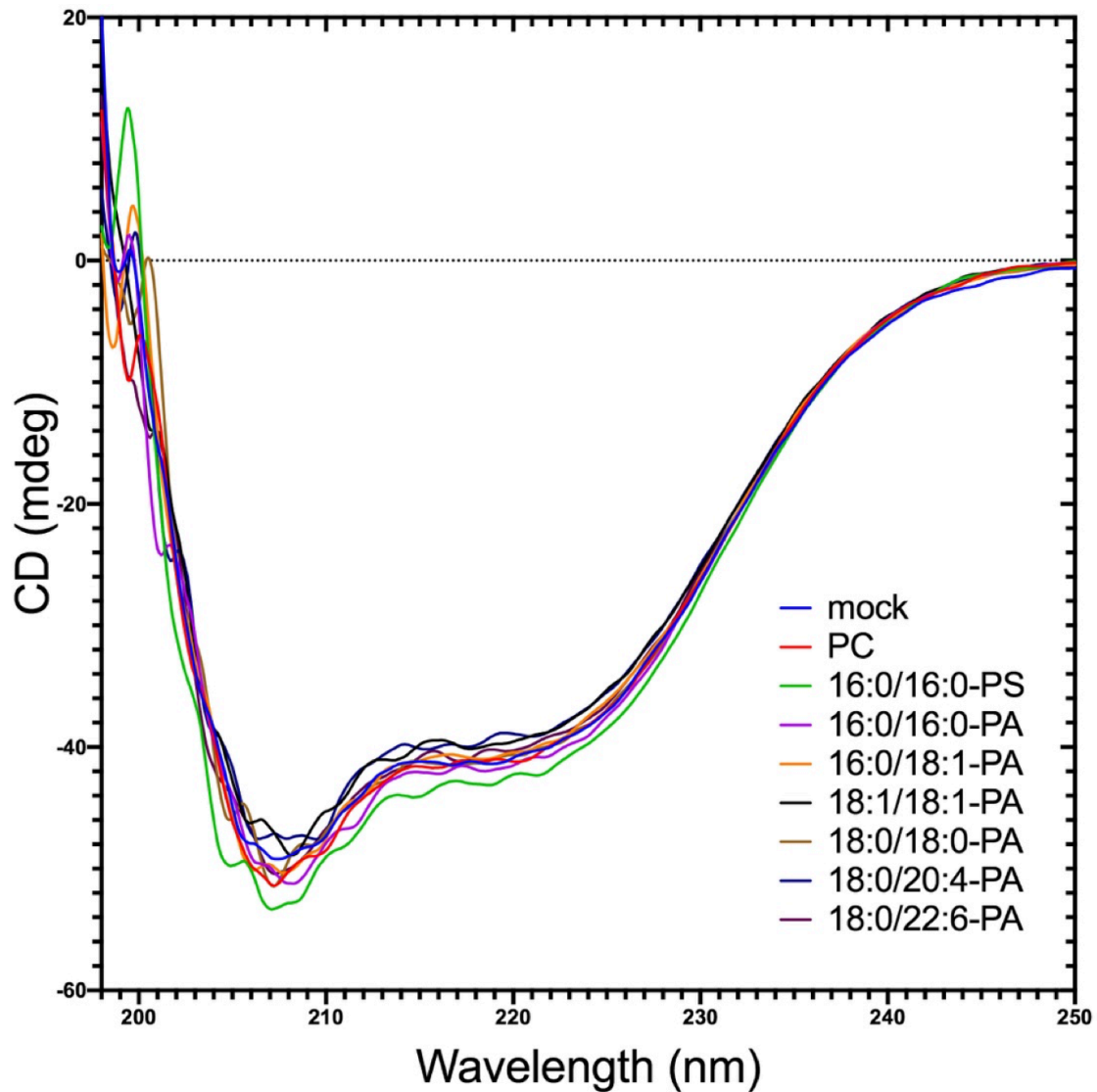


Figure 5. CKMのタンパク質二次構造に対するPAの影響

CKMのCDスペクトルは、Jasco J-805分光計で198～250nmの波長条件下で測定した。(A) 精製した6×His-CKMを25 mM HEPESバッファ (pH 7.4) [100 mM NaCl, 1 mM DTT] で最終濃度20 μ Mになるように希釈し、1 mM のPC、16:0/16:0-PS、16:0/16:0-PA、16:0/18:1-PA、18:1/18:1-PA、18:0/18:0-PA、18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PAリポソームと転倒混和した後、CDスペクトルを測定した。独立した3回の実験結果のうち代表的なデータを示した。

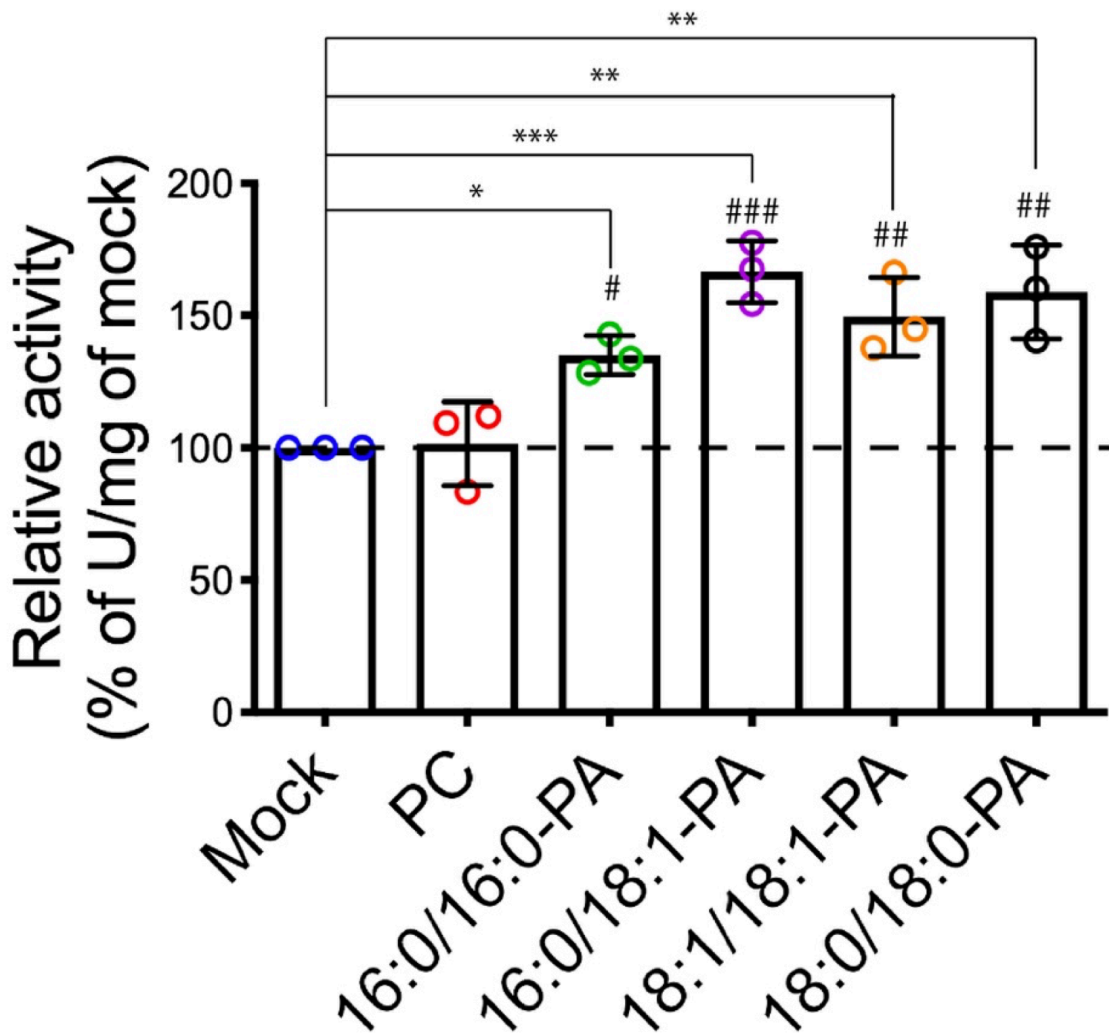


Figure 6. CKM活性に対するSFA-MUFA-PA分子種の影響

精製した6×His-CKM (0.2 μM) をPC、16:0/16:0-PA、16:0/18:1-PA、18:1/18:1-PA、または、18:0/18:0-PAリポソームと4°Cで10分間転倒混和した。その後、CKM反応バッファー (25 mM HEPES (pH 6.8)、10 mM phosphocreatine、1 mM ADP、30 mM MgCl₂、20 mM D-グルコース、0.8 mM NADP⁺、0.6 kU ヘキソキナーゼ、0.3 kU/L GAPDH、10 mM AMP、5 mM DTT) を添加して反応を開始し、37°Cでさらに10分間転倒混和した。リポソームを加えていないCKMのみの活性を100%とした場合の相対活性を示した。(平均値±SD、n=3)、*P<0.05、**P<0.01、***P<0.005、

および、 $\#P<0.05$ 、 $\#\#P<0.01$ 、 $\#\#\#P<0.005$ (vs. PC (コントロール) リポソーム)

【考察】

本研究では、T2D発症との関連が報告されているエネルギー代謝酵素であるCKM [14–17] がPA結合タンパク質であることを初めて明らかにした。さらに、CKMは非常にユニークなPA結合タンパク質であり、以下で詳しく説明する3つの特性を備えていることを明らかにした。1. PAに対する非常に高い親和性、2. PA分子種のうちSFA/MUFA-PAに対する結合選択性、および、3. PAに対する非常に高い特異性。

1. PAに対する非常に高い親和性: CKMの16:0/16:0-PAに対する K_d 値は2.0 μM であることがわかった (Figure 2B)。なお、既報のPA結合タンパク質であるSpo20p、PDE4A1、および、Opi1pの K_d 値は、それぞれ2.2、6.8、および、4.5 μM であると報告されている [25]。さらに、 α -シヌクレイン-N末端領域 (α -Syn-N)の K_d 値は6.6 μM であった [19]。したがって、CKMは既にPAと結合することが報告されているタンパク質の中で最も高い親和性 (K_d : 2.0 μM (Figure 2B)) でPAに結合する。

2. PA分子種のうちSFA/MUFA-PAに対する高い結合選択性を有する: Spo20p、PDE4A1、および、Opi1pは特定のPA分子種に対する結合選択性は報告されていない [25]。 α -Syn-Nは、SFA-PA (16:0/16:0-PAや18:0/18:0-PA)、または、PUFA-PA (18:0/20:4-PA) と比較してMUFA-PA (18:1/18:1-PA) と強く結合することが報告されている [19]。また、DGK γ は18:0/18:0-PAと比較して18:0/20:4-PAおよび18:1/18:1-PAに強く結合する [26]。一方、本研究では、CKMがPUFA-PAと比較して、SFA/MUFA-PA (16:0/16:0-PA、16:0/18:1-PA、18:1/18:1-PA、および、18:0/18:0-PA) に対して高い親和性を有することを明らかにした (Figure 3)。

3. PAに対する非常に高い特異性: CKMはTG、DG、PC、PE、PS、PG、CL、PI、PI(4)P、PI(4,5)P₂、PI(3,4,5)P₃、または、SMを含む多様な脂質分子種の中でPA

にのみ結合する非常に高いPA特異性を有する (Figure 4)。一方、Raf-1 [28]、p47^{PHOX} [29]、プロテインキナーゼ C ϵ [30]、スフィンゴシンキナーゼ1 [31]、Spo20p [32]、 α -シヌクレイン [19] および、DGK γ [26] など、これまでに報告された多くのPA結合タンパク質は、PAに加えて、PS、CL、および/または、ホスホイノシチドなどの他の酸性リン脂質に強く、または、中程度に結合する。したがって、CKMはPAに対して非常に高い特異性を持つPA結合タンパク質である。

ミトコンドリアクレアチンキナーゼ (MtCK) は、酸性リン脂質のCL、PG、PI、PS、および、PAと相互作用することがわかっている [33, 34]。しかし、CKMはCL、PG、PI、および、PSに結合しなかった (Figure 4)。したがって、細胞質に分布するCKMの脂質結合活性は、MtCKの脂質結合活性と異なる可能性がある。CKM、および、MtCKの細胞内局在に加えて脂質結合活性の違いは、両タンパク質間の機能的分離を意味する。

PAは細胞の全脂質の内、ごく一部 (総リン脂質の1%) を構成するに過ぎないが、種々の生物学的、および、病理学的現象の調節に関与している [1-4, 35]。したがって、細胞内PAの局在とダイナミクスを追跡することは、PAによって調節される多種多様な生物学的現象を理解するために不可欠である。ただし、信頼性の高いPAセンサーは開発されていない。上記のように、PAに対するCKMの特異性と親和性は他のPA結合タンパク質よりも優れているため、CKMは有望なSFA/MUFA-PAセンサーになる可能性がある。さらに、CKMのPA分子種 (SFA/MUFA-PA) の選択性は、他のPA結合タンパク質の選択性とは異なっている。したがって、CKMはPA分子種別の (SFA/MUFA-PA) 選択的センサーになりうる可能性がある。

CKM、および、creatine kinase brain type (CKB) の活性、および、タンパク質量の変動は、T2D発症の危険因子である [14-17]。骨格筋のDGK δ のレベルが

低下すると、骨格筋細胞内へのグルコース取り込み能が減弱し、T2D発症の要因になる可能性がある [10,11]。また、DGK δ は、高グルコースで刺激されたC2C12細胞でSFA/MUFA-PA分子種を選択的に産生する [12,13]。さらに、CKMはSFA/MUFA-PAと選択的に相互作用し、活性化された (Figure 3、および、6)。これらの結果は、CKMとDGK δ の間に機能的な関係があることを示唆している。すなわち、T2D患者の骨格筋におけるDGK δ の発現の減弱によって引き起こされるSFA/MUFA-PA分子種の減少は、CKMの細胞内局在と活性に悪影響を及ぼし、T2Dを悪化させるエネルギー代謝障害につながる可能性が考えられる。

以上より、我々は、T2Dの発症に関連するエネルギー代謝酵素CKMがSFA、および/または、MUFAを含むPA分子種に特異的に結合し、CKMがPAに対して非常に高い親和性を有する非常にユニークなPA結合タンパク質であることを初めて明らかにした。さらに、CKMはSFA/MUFA-PAによって活性化された。したがって、DGK δ 、SFA/MUFA-PA、および、CKM間の機能的関連性を明らかにすることによってT2Dの発症メカニズムがより詳細に明らかになることが期待される。

【参考文献】

- [1] K. Goto, T. Nakano, Y. Hozumi, Diacylglycerol kinase and animal models: the pathophysiological roles in the brain and heart, *Adv. Enzyme Regul.* **46** (2006) 192-202.
- [2] I. Merida, A. Avila-Flores, E. Merino, Diacylglycerol kinases: at the hub of cell signalling, *Biochem. J.* **409** (2008) 1-18.
- [3] F. Sakane, S. Imai, M. Kai, et al., Diacylglycerol kinases: why so many of them?, *Biochim. Biophys. Acta* **1771** (2007) 793-806.
- [4] M.K. Topham, R.M. Epand, Mammalian diacylglycerol kinases: molecular interactions and biological functions of selected isoforms, *Biochim. Biophys. Acta* **1790** (2009) 416-424.
- [5] F. Sakane, S. Imai, M. Kai, et al., Diacylglycerol kinases as emerging potential drug targets for a variety of diseases, *Curr. Drug Targets* **9** (2008) 626-640.
- [6] F. Sakane, S. Mizuno, S. Komenoi, Diacylglycerol Kinases as Emerging Potential Drug Targets for a Variety of Diseases: An Update, *Front. Cell Dev. Biol.* **4** (2016) 82.
- [7] H. Sakai, F. Sakane, Recent progress on type II diacylglycerol kinases: the physiological functions of diacylglycerol kinase δ , η and κ and their involvement in disease, *J. Biochem.* **152** (2012) 397-406.
- [8] F. Sakane, S. Imai, M. Kai, et al., Molecular cloning of a novel diacylglycerol kinase isozyme with a pleckstrin homology domain and a C-terminal tail similar to those of the EPH family of protein tyrosine kinase, *J. Biol. Chem.* **271** (1996) 8394-8401.
- [9] R.A. DeFronzo, E. Jacot, E. Jequier, et al., The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization, *Diabetes* **30** (1981) 1000-1007.
- [10] A.V. Chibalin, Y. Leng, E. Vieira, et al., Downregulation of diacylglycerol kinase delta contributes to hyperglycemia-induced insulin resistance, *Cell* **132** (2008) 375-386.
- [11] C. Miele, F. Paturzo, R. Teperino, et al., Glucose regulates diacylglycerol intracellular levels and protein kinase C activity by modulating diacylglycerol-kinase subcellular localization, *J. Biol. Chem.* **282** (2007) 31835-31843.
- [12] H. Sakai, S. Kado, A. Taketomi, et al., Diacylglycerol kinase δ phosphorylates phosphatidylcholine-specific phospholipase C-dependent, palmitic acid-containing diacylglycerol species in response to high glucose levels, *J. Biol. Chem.*

- 289** (2014) 26607-26617.
- [13] F. Sakane, S. Mizuno, D. Takahashi, et al., Where do substrates of diacylglycerol kinases come from? Diacylglycerol kinases utilize diacylglycerol species supplied from phosphatidylinositol turnover-independent pathways, *Adv. Biol. Regul.* **67** (2018) 101-108.
- [14] M. Aragno, R. Mastrocola, M.G. Catalano, et al., Oxidative stress impairs skeletal muscle repair in diabetic rats, *Diabetes* **53** (2004) 1082-1088.
- [15] A. Jevric-Causevic, M. Malenica, T. Dujic, Creatine kinase activity in patients with diabetes mellitus type I and type II, *Bosn. J. Basic Med. Sci.* **6** (2006) 5-9.
- [16] E.P. Odum, E.E. Young, Elevated cardiac troponin I, creatine kinase and myoglobin and their relationship with cardiovascular risk factors in patients with type 2 diabetes, *Diabetes Metab. Syndr.* **12** (2018) 141-145.
- [17] B.K. Popovich, K.R. Boheler, W.H. Dillmann, Diabetes decreases creatine kinase enzyme activity and mRNA level in the rat heart, *Am. J. Physiol.* **257** (1989) E573-577.
- [18] D. Marquardt, B. Geier, G. Pabst, Asymmetric lipid membranes: towards more realistic model systems, *Membranes (Basel)* **5** (2015) 180-196.
- [19] M. Satoh, E. Haruta-Satoh, M. Yamada, et al., Overexpression of hydroxymethylglutaryl CoA synthase 2 and 2,4-dienoyl-CoA reductase in rat pancreas following chronic alcohol consumption, *Pancreas* **42** (2013) 475-482.
- [20] D. Takahashi, F. Sakane, Expression and purification of human diacylglycerol kinase alpha from baculovirus-infected insect cells for structural studies, *PeerJ* **6** (2018) e5449.
- [21] G. Szasz, W. Gruber, E. Bernt, Creatine kinase in serum: 1. Determination of optimum reaction conditions, *Clin. Chem.* **22** (1976) 650-656.
- [22] K. Yanagisawa, S. Yasuda, M. Kai, et al., Diacylglycerol kinase α suppresses tumor necrosis factor- α -induced apoptosis of human melanoma cells through NF- κ B activation, *Biochim. Biophys. Acta* **1771** (2007) 462-474.
- [23] H.W. Sun, C.F. Hui, J.L. Wu, Cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of three creatine kinase muscle isoenzyme cDNAs from carp (*Cyprinus carpio*) striated muscle, *J. Biol. Chem.* **273** (1998) 33774-33780.
- [24] T. Hornemann, M. Stolz, T. Wallimann, Isoenzyme-specific interaction of muscle-type creatine kinase with the sarcomeric M-line is mediated by NH(2)-terminal lysine charge-clamps, *J. Cell Biol.* **149** (2000) 1225-1234.
- [25] N. Kassas, E. Tanguy, T. Thahouly, et al., Comparative Characterization of Phosphatidic Acid Sensors and Their Localization during Frustrated Phagocytosis,

- J. Biol. Chem.* **292** (2017) 4266-4279.
- [26] S. Mizuno, H. Sasai, A. Kume, et al., Dioleoyl-phosphatidic acid selectively binds to alpha-synuclein and strongly induces its aggregation, *FEBS Lett.* **591** (2017) 784-791.
- [27] E. Takeshita, A. Kume, Y. Maeda, et al., Diacylglycerol kinase γ is a novel anionic phospholipid binding protein with a selective binding preference, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **444** (2014) 617-621.
- [28] C.L. Stace, N.T. Ktistakis, Phosphatidic acid- and phosphatidylserine-binding proteins, *Biochim. Biophys. Acta* **1761** (2006) 913-926.
- [29] S. Ghosh, J.C. Strum, V.A. Sciorra, et al., Raf-1 kinase possesses distinct binding domains for phosphatidylserine and phosphatidic acid. Phosphatidic acid regulates the translocation of Raf-1 in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-stimulated Madin-Darby canine kidney cells, *J. Biol. Chem.* **271** (1996) 8472-8480.
- [30] D. Karathanassis, R.V. Stahelin, J. Bravo, et al., Binding of the PX domain of p47(phox) to phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate and phosphatidic acid is masked by an intramolecular interaction, *EMBO J.* **21** (2002) 5057-5068.
- [31] S. Corbalan-Garcia, S. Sanchez-Carrillo, J. Garcia-Garcia, et al., Characterization of the membrane binding mode of the C2 domain of PKC epsilon, *Biochemistry* **42** (2003) 11661-11668.
- [32] R.V. Stahelin, J.H. Hwang, J.H. Kim, et al., The mechanism of membrane targeting of human sphingosine kinase 1, *J. Biol. Chem.* **280** (2005) 43030-43038.
- [33] H. Nakanishi, P. de los Santos, A.M. Neiman, Positive and negative regulation of a SNARE protein by control of intracellular localization, *Mol. Biol. Cell* **15** (2004) 1802-1815.
- [34] U. Schlattner, F. Gehring, N. Vernoux, et al., C-terminal lysines determine phospholipid interaction of sarcomeric mitochondrial creatine kinase, *J. Biol. Chem.* **279** (2004) 24334-24342.
- [35] M.J. Vacheron, E. Clottes, C. Chautard, et al., Mitochondrial creatine kinase interaction with phospholipid vesicles, *Arch. Biochem. Biophys.* **344** (1997) 316-324.
- [36] X. Peng, M.A. Frohman, Mammalian phospholipase D physiological and pathological roles, *Acta Physiol. (Oxf.)* **204** (2012) 219-226.

第 2 章

L-lactate dehydrogenase A は
多価不飽和脂肪酸を含有する
ホスファチジン酸分子種と相互作用して
不活性化される

【概要】

L-lactate dehydrogenase A (LDHA) は lactate と pyruvate の交換反応を触媒することで嫌気性条件下においてエネルギーを供給する酵素である。また、嫌気性条件下でのエネルギー供給はがん細胞の増殖に必須の生理機能であり、LDHA は種々のがん細胞で強く発現する。リポソーム沈降法、および、脂質オーバーレイ法により LDHA の脂質結合能を検証したところ、LDHA は PC、PE、PS、PI、PG、phosphoinositides、CL などの他のリン脂質とは結合せず、PA とのみ強く結合した。さらに、PA 分子種の中でも 16:0/16:0-PA、18:0/18:0-PA、18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PA と選択的に強く結合した。

さらに、LDHA が PA 分子種との相互作用によって機能的に制御されるかどうかを調べるため、LDHA と結合する 16:0/16:0-PA、18:0/18:0-PA、18:0/20:4-PA および、18:0/22:6-PA がそれぞれ、(1) CD スペクトル測定による LDHA の二次構造を変動させるか、(2) LDHA の酵素活性を変動させるかについて調べた。その結果、上述の PA 分子種のうち 18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PA は LDHA の α -ヘリックス構造を減少させ、ランダムコイル構造を増加させた。さらに、18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PA は LDHA の酵素活性を減弱させた。一方、16:0/16:0-PA、および、18:0/18:0-PA は LDHA の二次構造と活性に対して影響を及ぼさなかった。

以上より、18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PA は LDHA と強く結合することで標的とし、LDHA の α -ヘリックス構造を減少させることでその酵素活性を減弱することがわかった。

【緒言】

前述のように PA は最も単純な構造のグリセロリン脂質であり、グリセロール骨格の sn-1、および、sn-2 の位置に 2 つの脂肪酸側鎖が結合し、sn-3 の位置にリン酸基が結合している [1,2]。PA は全細胞の脂質のうちごく一部(総リン脂質の約 1%) を構成しているにもかかわらず、生体膜リン脂質生合成の中心となる重要な代謝物である [3]。さらに、PA は細胞内シグナル伝達において重要な役割を果たす [1,2,4,5]。これに関連して、PA が phosphatidylinositol (PI)-4-monophosphate-5-kinase [6,7]、mammalian target of rapamycin [8,9]、atypical protein kinase C [10]、p21 activated protein kinase 1 [11,12] などの多くのシグナル伝達酵素を制御することがわかっている。細胞内には、2 つの脂肪酸側鎖の組成が異なる 50 を超える分子種の PA が存在する。ただし、細胞内の PA 分子種の多様性の生理学的意義は不明である。特に、個々の PA 分子種と相互作用する標的タンパク質はよくわかっていない。

PA は DGK による DG のリン酸化 [13-17]と、ホスホリパーゼ D (PLD) による phosphatidylcholine (PC) の加水分解 [18-20]によって産生される。現在までに、10 種類の哺乳類 DGK isozyme (DGK α 、 β 、 γ 、 δ 、 η 、 κ 、 ϵ 、 ι 、 ζ 、 θ) が同定されている [13-17]。これらの DGK isozyme は、特徴的な二次構造によって 5 つのグループ (タイプ I~V) に分類される。これらの DGK isozyme それぞれ、がん [23-26]、てんかん [27]、強迫性障害 [28]、双極性障害 [29]、自己免疫疾患 [30]、心肥大 [31]、高血圧 [32]、および、T2D [33] など様々な疾患の発症に関与することが報告されている。また、PLD も 2 つの isozyme (PLD1、および、2) で構成されており、パーキンソン病やアルツハイマー病などの神経変性疾患やがんなどの種々の疾患 [34,35] に関連している [36]。さらに、細胞膜リン脂質の *de novo* 合成の重要な中間体として機能する PA は、lysoPA acyltransferase (LPAAT) によ

って産生される [37]。LPAAT は、卵巣がん、子宮内膜がん、および、急性白血病の治療標的でもある [38,39]。したがって、DGK、PLD、LPAAT が産生する PA の標的タンパク質を明らかにすることが重要である。

我々の以前の研究では、高濃度グルコース刺激が筋管細胞における DGK δ を活性化し、DGK δ が 14:0/16:0-PA、14:0/16:1-PA、16:0/16:0-PA、16:0/16:1-PA、16:0/18:1-PA、および、16:0/18:1-PA (X:Y = 炭素原子の総数:脂肪酸側鎖の二重結合の総数) などの SFA、および/または、MUFA を含む PA 分子種 (SFA/MUFA-PA) を選択的に産生することを示した [40]。一方、DGK δ 欠損マウスの脳では、18:0/22:6-PA の量が有意に減少した [41,42]。DGK η ノックアウトマウスの脳では、18:1/18:2-PA、18:0/20:3-PA、18:0/22:5-PA、20:0/20:4-PA、18:1/22:2-PA の量が著しく減少した [43]。DGK δ 、および、DGK η ノックアウト (KO) マウスは、それぞれ強迫性障害 [28]、および、双極性障害 [29] のような表現型を示した。さらに、DGK ζ は神経芽細胞腫細胞分化の初期段階で 16:0/16:0-PA を選択的に産生し、神経突起伸長を促進した [44]。DGK α はメラノーマ細胞で 16:0/16:0-PA、および、16:0/18:0-PA を産生し [45]、血清飢餓条件下 (非増殖) における T 細胞で 14:1/16:1-PA、14:0/16:1-PA、14:0/16:0-PA、16:1/16:2-PA、16:1/16:1-PA、16:0/16:1-PA、16:0/16:0-PA、16:0/18:1-PA、および、16:0/18:0-PA を選択的に産生した [46]。これらの結果は、異なる PA 分子種が種々の組織や細胞に発現する異なる DGK isozyme によって産生されることを示しており、これらの PA 分子種が異なる標的と機能を持っている可能性を示している。

現在までに多くの PA 結合タンパク質 (PABP) が同定されているが、これらのタンパク質を探索するために、ほとんどの組織や細胞で主要な PA 分子種である 16:0/18:1-PA が一般的に使用されてきた。しかし、16:0/18:1-PA を使用した探索法では、16:0/16:0-PA、18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PA などの他の PA 分

子種に対して選択性のある PA 結合タンパク質を検出できない可能性がある。上記のように、16:0/16:0-PA は少なくとも 3 つの DGK isozyme、DGK α [45、46]、 δ [40]、および、 ζ [44] によって産生される。こういった背景から、以前にマウス骨格筋を用いて 16:0/16:0-PA 結合タンパク質を探索し、16:0/16:0-PA、16:0/18:1-PA、18:1/18:1-PA、および、18:0/18:0-PA と選択的に相互作用し、18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PA とは相互作用しない CKM を同定した [47]。

本研究では、骨格筋における新たな 16:0/16:0-PA 結合タンパク質を探索した。その結果、CKM [47] に加えて、骨格筋の新規 16:0/16:0-PA 結合タンパク質として L-lactate dehydrogenase A (LDHA) を同定した。LDHA は、がん細胞や骨格筋細胞において嫌気性条件下においてもエネルギーを得るために重要な働きを持つエネルギー代謝酵素である [48]。さらに、LDHA の機能解析により、CKM とは異なり、LDHA は 16:0/16:0-PA に加えて、18:0/18:0-PA、18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PA と相互作用することがわかった。さらに、18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PA は、LDHA の α -ヘリックス構造を大幅に減少させ、その活性がわずかながら有意に減弱させた。したがって、LDHA は PUFA を含有する PA 分子種と結合することにより、構造的、および、機能的に制御される非常にユニークな PABP であることがわかった。

【手法】

試薬

L- α -phosphatidylcholine from egg yolk (PC mixture)、1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphate (16:0/16:0-PA)、1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphate (16:0/18:1-PA)、1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphate (18:1/18:1-PA)、1-stearoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphate (18:0/18:1-PA)、1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphate (18:0/18:0-PA)、1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphate (18:0/20:4-PA)、1-stearoyl-2-docosahexaenoyl-sn-glycero-3-phosphate (18:0/22:6-PA)、および、1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoserine (16:0/16:0-PS) は、Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) から購入した。コレステロール (Chol)、ピルビン酸ナトリウム、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド還元型 (NADH)、および、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化 (NAD⁺) は、Wako Pure Chemical から購入した。L-lactate は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan) から購入した。Membrane Lipid StripsTM は、Echelon Biosciences から購入した。

実験動物

C57BL/6N マウス (SLC Japan, Inc.) は千葉大学動物実験実施規程 (許可番号: 動 2-227) に基づき、適切な環境下で飼育を行い、実験に必要な試料 (骨格筋の mRNA、および、ホモジネート) を得るために頸椎脱臼後に解剖し、臓器を摘出した。

リポソームの作製

マウス骨格筋における 16:0/16:0-PA 特異的結合タンパク質の同定: 16:0/16:0-PS-リポソーム [50 mol% 16:0/16:0-PS, 50 mol% Chol]、および、16:0/16:0-

PA リポソーム[50 mol% 16:0/16:0-PA, 50 mol% Chol]。窒素気流下で乾燥した脂質混合物を、25 mM HEPES バッファー (pH 7.4) [100 mM NaCl, 1 mM DTT] で 95°C で 45 分間水和し、水和中に 15 分ごとに 1 回 1 分間ボルテックスした。次に、リポソームを 5 回の凍結融解サイクル (-196°C で 3 分間、95°C で 3 分間) にかけた [49]。次に、Mini extruder (Avanti Polar Lipids: Alabaster, AL, USA) を使用して、リポソームを 100nm のポリカーボネートメンブレンから 11 回押し出した。Mini extruder は、使用前に 95°C に加温した [50]。

LDHA の脂質結合能解析 : PC リポソーム[30 mol% Chol, 70 mol% PC mix]、PS リポソーム [30 mol% Chol, 60 mol% PC mix, 10 mol% 16:0/16:0-PS]、および、PA リポソーム[30 mol% Chol, 60 mol% PC mix, 10 mol% 各 PA 分子種]。脂質結合アッセイでは、混合した乾燥脂質混合物を 25 mM HEPES バッファー (pH 7.4) [100 mM NaCl, 1 mM DTT] で 95°C で 45 分間水和し、水和中に 15 分ごとに 1 回 1 分間ボルテックスした。次に、リポソームを 5 回の凍結融解サイクル (-196°C で 3 分間、95°C で 3 分間) にかけた。リポソームは、Branson Sonifier 450 を使用した 90°C での超音波処理を行うことによって形成した [51]。

PA 結合タンパク質としての LDHA の同定

前章の記載内容と同様に行なった。

LDHA タンパク質の発現と精製

LDHA の cDNA は、マウス骨格筋 cDNA からプライマー 5'-GGTGGTCATATGGCAACCCTCAAGGAC-3'、および、5'-GGTGGTCTCGAGTTAGAACTGCAGCTCCTTCTG-3' を使用して増幅し、pET-28a にライゲーションし、Rosetta 2-DE3 大腸菌細胞 (Novagen, Merck, Darmstadt、

Germany) で発現させた。6×His タグ融合 LDHA タンパク質の発現と精製は以前に記載されたように実施した [54,55]。

ウエスタンブロッティング

前章の記載内容と同様に実施した [26]。

リポソーム沈降法

精製した 6×His-LDHA (0.5 μM) を 25 mM HEPES バッファー (pH 7.4) [100 mM NaCl, 1 mM DTT] に溶解し、PA 含有、または、コントロールリポソームとともに 4°C で 30 分間転倒混和した。サンプルを 200,000 × g、4°C で 1 時間、超遠心分離によりリポソームを沈降させた後、沈降画分を 25 mM HEPES バッファー (pH 7.4) [100 mM NaCl, 1 mM DTT] に再懸濁した。

脂質オーバーレイアッセイ

前章の記載内容と同様に実施した。

Circular dichroism spectroscopy

前章の記載内容と同様に実施した。また、測定したスペクトルデータは、DICHROWEB (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>) [56] の K2D プログラム [57] を使用して分析した。

COS-7 細胞トランスフェクション用のプラスミド

DGKα の constitutively active mutant (CA) である pEGFP-DGKα-Δ1-196 は以前当研究室で以前に作製されたものを用いた [58]。p3×FLAG-LDHA は、pET-28a-

LDHA から増幅された LDHA をコードする PCR フラグメントを p3×FLAG-CMV-7.1 ベクター (Sigma Aldrich、St. Louis、MO、USA) の EcoRI/SalI サイトにライゲーションすることによって作製した。

細胞培養とトランスフェクション

COS-7 細胞は、10% ウシ胎児血清 (Biological Industries、Beit-Haemek、Israel)、100 units/mL ペニシリン、および、100 µg/mL ストレプトマイシンを添加したダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM、Wako Pure Chemicals (Tokyo, Japan)) で、37°C、5% CO₂ 含有雰囲気下において培養した。製造元の説明に従って、PolyFect 試薬 (Qiagen、Venlo、Netherlands) を使用して細胞にトランスフェクションして目的タンパク質を発現させた。

共焦点レーザー走査顕微鏡

トランスフェクションの 24 時間後、p3×FLAG-LDHA、および、pEGFP-DGKα-CA でトランスフェクションされた COS-7 細胞を、DMEM (最終濃度: 3 µM) 中の DGKα 選択的阻害剤 CU-3 [58] (または、コントロールとして DMSO) と 30 分間インキュベートした。次に、細胞を 4% パラホルムアルデヒド (PFA)/PBS で固定した。細胞を 0.1% Triton X-100 で 5 分間透過処理した後、2% BSA/PBS で 30 分間ブロッキングした。細胞を抗 FLAG タグ M2 モノクローナル抗体 (Sigma-Aldrich)、および、抗マウス IgG Alexa Fluor 594 (Thermo Fisher Scientific) で染色した。カバースリップは、Vectashield (Vector Laboratories、Burlingame、CA、USA) を使用して固定した。蛍光画像は、UPLSAPO60×1.35NA オイルを添加した後、オリンパス FV1000-D (IX81) 共焦点レーザー走査顕微鏡 (Olympus、Tokyo、Japan) を使用して室温で観察した。GFP 蛍光は 488nm で励

起し、AlexaFluor594 の蛍光は 543nm で励起した。画像は FV-10ASW software (Olympus) を使用して解析した。

LDHA 活性測定

LDHA の酵素活性は、ピルビン酸と NADH が関与する反応を使用して、L-lactate と NAD⁺を生成し、340 nm における吸光度の低下率を定量することで測定した [59]。0.2 μM の 6×His タグ融合 LDHA、25 mM HEPES バッファー (pH 7.4) [100 mM NaCl、15 mM ピルビン酸、および、0.2 mM NADH] (1 mL) を 37°C で 10 分間転倒混和した。1 unit は、pH 7.4、37°C で 1 分あたり 1.0 μmol の NADH を NAD⁺に変換する活性に相当する。

統計解析

全てのデータは平均値±SD で示し、one-way ANOVA 後に Tukey's post hoc test で統計処理を行い、有意差があるのかどうかを比較解析した。統計処理には GraphPad Prism 8 (GraphPad) を用いて、 $p < 0.05$ の時に有意差があると判定した。

【結果】

16:0/16:0-PA結合タンパク質としてL-lactate dehydrogenase Aを同定

マウス骨格筋ホモジネートを16:0/16:0-PA含有リポソーム、または、16:0/16:0-PS含有リポソームと転倒混和し、次に超遠心分離によりリポソームを沈降させた後、それぞれのリポソームとの共沈降画分を回収し、SDS処理した後、SDS-PAGEによって分子量ごとに分離した。得られたゲルは銀染色法によりタンパク質バンドを検出した。その結果、分子量約37 kDaのバンドは16:0/16:0-PAリポソームの沈降物で検出されたが、16:0/16:0-PSリポソームでは検出されなかった (Figure 1A)。ゲル内酵素消化とタンデム質量分析法 (MS/MS) により上述のタンパク質バンドを解析したところ、L-lactate dehydrogenase A (LDHA) (UniProt accession ID: P06151) が16:0/16:0-PA結合タンパク質の候補として同定された。Figure 1BにはSCORE (同定の確からしさ)、*emPAI*の値、および、同定されたペプチドを示した。

次に、マウス骨格筋mRNAの逆転写産物からマウスLDHAのcDNAをクローニングし、pET-28aベクターにライゲーションした。6×Hisタグ融合LDHAタンパク質を大腸菌細胞で発現させ、Ni²⁺アフィニティークロマトグラフィーで精製した。SDS-PAGE、および、CBB染色によって6×His-LDHA (約37 kDa) が高純度に精製されていることを確認した (Figure 1C)。さらに、抗6×His抗体を用いたウェスタンブロットティングにより、37kDaのバンドが6×His-LDHAであることを確認した (Figure 1D)。

LDHAは16:0/16:0-PSではなく16:0/16:0-PAと強く結合する

次に、リポソーム沈降法によって、LDHAの16:0/16:0-PAへの結合活性を検証した [47]。バックグラウンドコントロールとしてPC (中性リン脂質) のみを含

むリポソームと共沈したのは、Input中のLDHAタンパク質のうち約20%のみであった (Figure 2)。さらに、酸性リン脂質コントロールとしての16:0/16:0-PSリポソームは、バックグラウンドコントロールと同様に約30%のLDHAとのみ共沈降した (Figure 2)。しかし、Input中のLDHAタンパク質のうち約50%が16:0/16:0-PAリポソームと共沈した (Figure 2)。したがって、これらの結果はLDHAがPCのみのリポソーム (バックグラウンドコントロール)、および、16:0/16:0-PSリポソーム (酸性リン脂質コントロール) よりも16:0/16:0-PAリポソームとより強く相互作用したことを示している。

LDHAは特異的にPAと相互作用する

LDHAの脂質結合特異性を調べるため、脂肪酸鎖としてパルミチン酸 (16:0) を含む種々の脂質をスポットしたメンブレンを使用して、pH 7.4の条件下で脂質オーバーレイアッセイを行なった。Figure 3に示すように、LDHAは非常に強い16:0/16:0-PA結合活性を示した。一方、PI、PI(4)P、PI(4,5)P₂、PI(3,4,5)P₃、PG、SGCなどの他の酸性脂質、および、TG、DG、PC、PE、Chol、および、SMはLDHAと相互作用しなかった (Figure 3)。これまでの報告通り [60,61]、PSとCLのみがLDHAへのわずかな結合活性を示したが、PAに対する結合活性と比較すると無視できる範囲である。まとめると、これらの結果は、LDHAが16:0/16:0-PAと排他的に相互作用することを示している。

LDHAは生理的条件下のpH (7.4) でPAと選択的に結合する

PA分子種に対するLDHAの選択性を明らかにするために、16:0/16:0-PA、16:0/18:1-PA、18:1/18:1-PA、18:0/18:1-PA、18:0/18:0-PA、18:0/20:4-PA、または、18:0/22:6-PAなどの種々のPA分子種を含むリポソームを使用してリポソーム沈

降法を行なった。調べたPA分子種のうち16:0/16:0-PAだけでなく、18:0/18:0-PA、18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PAがLDHAに強く結合した (Figure 4)。しかし、16:0/18:1-PA、18:1/18:1-PA、および、18:0/18:1-PAはLDHA相互作用しなかった (バックグラウンドコントロールと同程度しか沈降させなかった) (Figure 4)。

次に、LDHAとLDHB (心筋タイプ) が低pH条件 (pH 5.4) でPSやCLなどの酸性リン脂質に強く結合することを示した報告 [61,62] があるため、LDHAの結合活性がpHによって異なるかどうかを検証した。その結果、Figure 5に示すように、LDHAはpH 7.4よりもpH 5.4、および、6.4で、16:0/16:0-PS、および、16:0/16:0-PAに強く結合することがわかった。一方、18:0/18:0-PA、18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PAは、広範囲のpH値 (pH 5.4~7.4) でLDHAに強く結合した (Figure 5)。したがって、18:0/18:0-PA、18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PAは、pH 7.4付近では16:0/16:0-PS、および、16:0/16:0-PAよりもLDHAとより強く相互作用することがわかった。さらに、調べたすべての酸性リン脂質は、pH 8.4でLDHAへの結合活性を失った。

LDHAは18:0/18:0-PA、18:0/20:4-PAおよび18:0/22:6-PAに対してより高い結合親和性を有する

PC、16:0/16:0-PS、16:0/16:0-PA、18:0/18:0-PA、18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PAに対するLDHAの親和性を調べた。まず初めに、PCと16:0/16:0-PSの結合親和性が非常に低いことを確認した (Figure 6A、および、B)。16:0/16:0-PA、18:0/18:0-PA、18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PAとLDHAの相互作用は各PA分子種の濃度依存的に大幅に増加した (Figure 6C-F)。さらに、18:0/18:0-PA、18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PAは、16:0/16:0-PAと比較してLDHAに対して高い親和性を示した。16:0/16:0-PA、18:0/18:0-PA、18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PAのLDHAに

対する解離定数 (K_d) はそれぞれ、 >25 、 3.8 ± 0.65 、 3.8 ± 0.46 、 $3.7 \pm 1.1 \mu\text{M}$ ($n = 3$) であることがわかった (Figure 6C–F)。これらの結果は、PUFAを含むPA分子種と 18:0/18:0-PAがLDHAと非常に強く結合していることを示している。18:0/22:6-PAのLDHAに対する解離定数の値は、Spo20pの18:0/18:1-PAに対する値 ($K_d = 2.2 \mu\text{M}$) [63]、phosphodiesterase (PDE) 4A1の18:0/18:1-PAに対する値 ($K_d = 6.8 \mu\text{M}$) [63]、および、CKMの16:0/16:0-PAに対する値 ($K_d = 2.0 \mu\text{M}$) [47] と同程度であった。

LDHAはCOS-7細胞内において産生されたPA分子種と相互作用して細胞膜に局在する

LDHAが細胞内で産生されたPAに結合できるかどうかを調べるために、18:0/20:4-PAを産生するEGFP-DGK α のconstitutively active mutant (DGK α -CA) [58]、および、3×FLAG-LDHAを過剰発現させたCOS-7細胞におけるDGK α -CA、および、LDHAの細胞内局在を観察した。まず初めに、3×FLAG-LDHAが細胞質に広い分布を示したことを確認した (Figure 7A)。また、一過性に発現したEGFP-DGK α -CAは細胞膜に強く局在し、3×FLAG-LDHAは細胞膜でEGFP-DGK α -CAと共局在した (Figure 7A, B)。さらに、DGK α の選択的阻害剤であるCU-3 [58] は、細胞膜におけるDGK α -CAの局在性を変化させなかったが (Figure 7D)、3×FLAG-LDHAの細胞膜への局在は明らかに減少しており、その多くが細胞質に局在した (Figure 7A, C、および、E)。これらの結果はEGFP-DGK α -CAと3×FLAG-LDHAとの細胞膜における共局在がDGK活性 (PA産生能) に依存して誘導されたことを示している。したがって、LDHAが細胞内において産生されたPAと相互作用し、LDHAの局在が細胞内のDGKによって生成されるPAによって変化する可能性があることを強く示唆している。

18:0/20:4-PAおよび18:0/22:6-PAはLDHAの二次構造を変化させる

LDHAが異なるPA分子種に結合したときに、LDHAのコンフォメーション(二次構造)が変化するかどうかを調べるために、PC、16:0/16:0-PS、および、種々のPA分子種(16:0/16:0-PA、16:0/18:1-PA、18:1/18:1-PA、18:0/18:1-PA、18:0/18:0-PA、18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PA)の存在下でCDスペクトル法を行なった。精製した6×His-LDHAタンパク質を最終濃度10 μMになるようにPC、PS、または、PAを含むリポソームと転倒混和し、CDスペクトルを190 ~ 250 nmの波長で測定した (Figure 8A)。興味深いことに、18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PA含有リポソームを加えた場合、α-ヘリックスの特徴である208、および、222 nmでの負の極大を減少させた (Figure 8A) [64]。一方、16:0/16:0-PA、16:0/18:1-PA、18:1/18:1-PA、18:0/18:1-PA、および、18:0/18:0-PAはそのような影響を与えなかった (Figure 8A)。

K2Dプログラムを使用した二次構造分析 [56] によって、18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PA含有リポソームが、LDHAのα-ヘリックス含有量を有意に減少させることを示した (Figure 8B)。さらに、18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PAの存在下では、β-シート含有量も大幅に減少した。また、18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PA含有リポソームは、ランダムコイル含有量を著しく増加させた (Figure 8B)。以上より、18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PA (Figure 6E、および、F) はLDHAと相互作用することでα-ヘリックス、および、β-シート含有量を減少させ、一方で、ランダムコイル構造を増加させる形で、コンフォメーション変化を選択的に誘導することが示された。第1章では、SFA/MUFA-PAがCKMに強く結合することを示した [47]。しかし、SFA/MUFA-PAはCKMの二次構造を変化させなかった。したがって、PA結合タンパク質のすべての構造がPA分子種との結

合によって影響されるわけではないことがわかった。

LDHAへの結合に脂質二重膜の形成が必要かどうかを確認するために、界面活性剤Tween 20の存在下、または、非存在下でCD分光法を行なった。Figure 8と同様に、0% Tween 20の条件においてLDHAは18:0/22:6-PAによって二次構造が変化した (Figure 9A)。一方、0.05、および、0.1% Tween 20を加えた条件下において、18:0/22:6-PAによるLDHAの二次構造に対する影響が見られなくなった (Figure 9B、および、C)。これらの結果は、水溶性ミセルやPA分子種単独ではなく、リポソーム (脂質二重膜) 中のPUFA-PAがLDHAに結合し、二次構造を変動させることを示唆している。

18:0/20:4-PAおよび18:0/22:6-PAはLDHAの酵素活性を減弱させる

最後に、PUFA-PA含有リポソームがLDHAの酵素活性を変化させるかどうかを検証した。Figure 10に示すように、PC、16:0/16:0-PS、16:0/16:0-PA、16:0/18:1-PA、18:1/18:1-PA、18:0/18:1-PA、および、18:0/18:0-PAリポソームはLDHAの活性に影響しなかった。一方で、18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PA含有リポソームは、LDHA活性をそれぞれ約6%、および、9%有意に減弱させた (Figure 10)。興味深いことに、LDHAとは対照的に、SFA/MUFA-PA分子種に結合したCKMは、SFA/MUFA-PAによって活性化された [47]。以上より、LDHAがPUFA-PA分子種 (18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PA) に選択的かつ強力に結合し、その酵素活性がこれらのPA分子種によって阻害されることを示している。

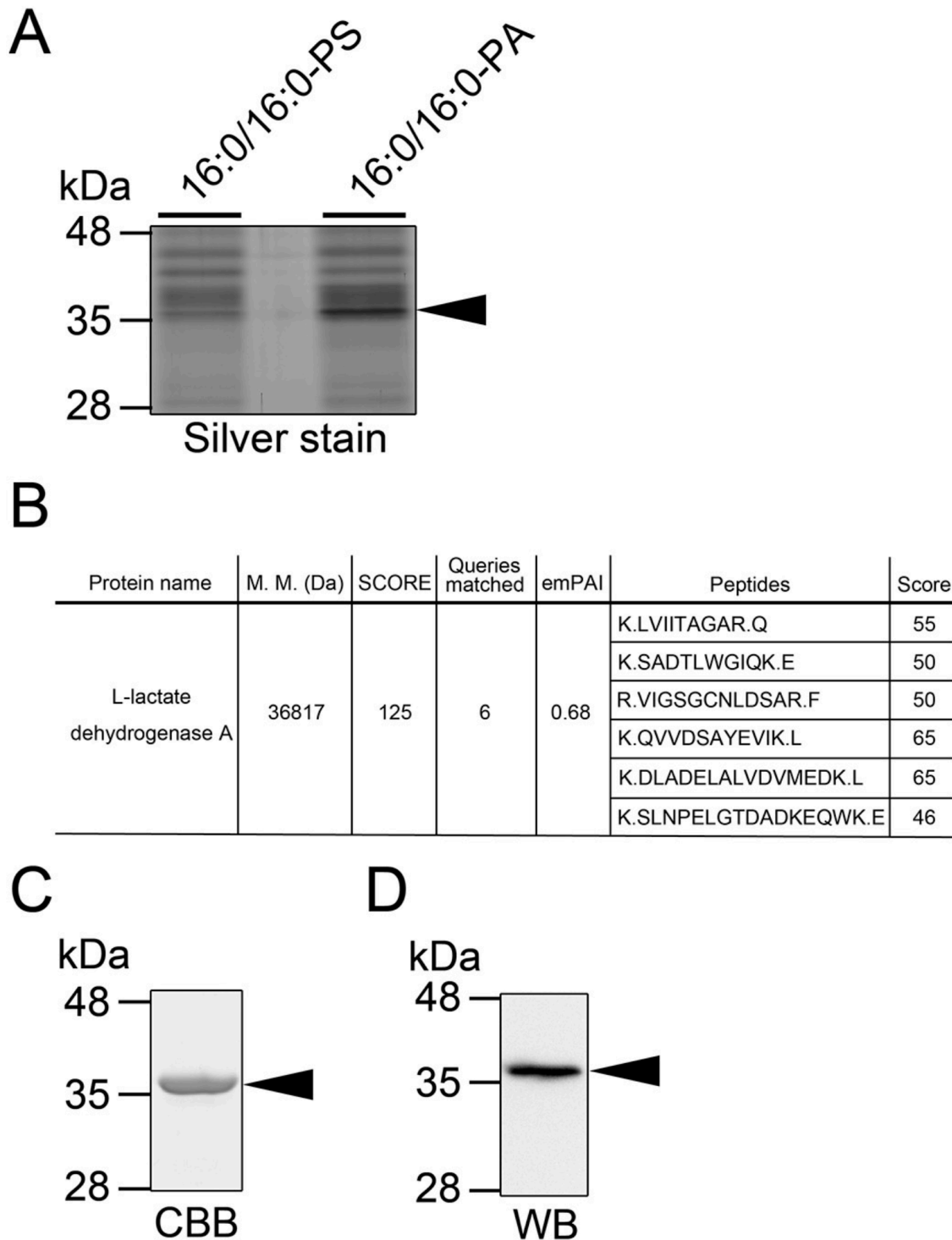


Figure 1. PA結合タンパク質としてのLDHAの同定

(A) マウス骨格筋ホモジネートを16:0/16:0-PA含有リポソーム、または、16:0/16:0-PS含有リポソームと転倒混和し、次に超遠心分離によりリポソームを

沈降させた。16:0/16:0-PA、または、16:0/16:0-PS-リポソームと共沈降したタンパク質をSDS-PAGEで分離し、銀染色で検出した。黒矢印でマークされた約37 kDaのバンドを切り出し、ゲル内酵素消化した後、LC-MS/MSでタンパク質を同定した。(B) LC-MS/MSによってL-lactate dehydrogenase A (LDHA) を同定した。*SCORE* (同定の確からしさ)、*emPAI*、および、同定されたペプチドを示した。(C) 大腸菌細胞で発現した6×His-LDHAタンパク質を精製し、SDS-PAGE (12%アクリルアミド) で分離し、CBBで染色した。(D) 精製した6×His-LDHAタンパク質をSDS-PAGE (12%アクリルアミド) で分離し、抗6×Hisタグ抗体を用いたウエスタンブロットティングで検出した。

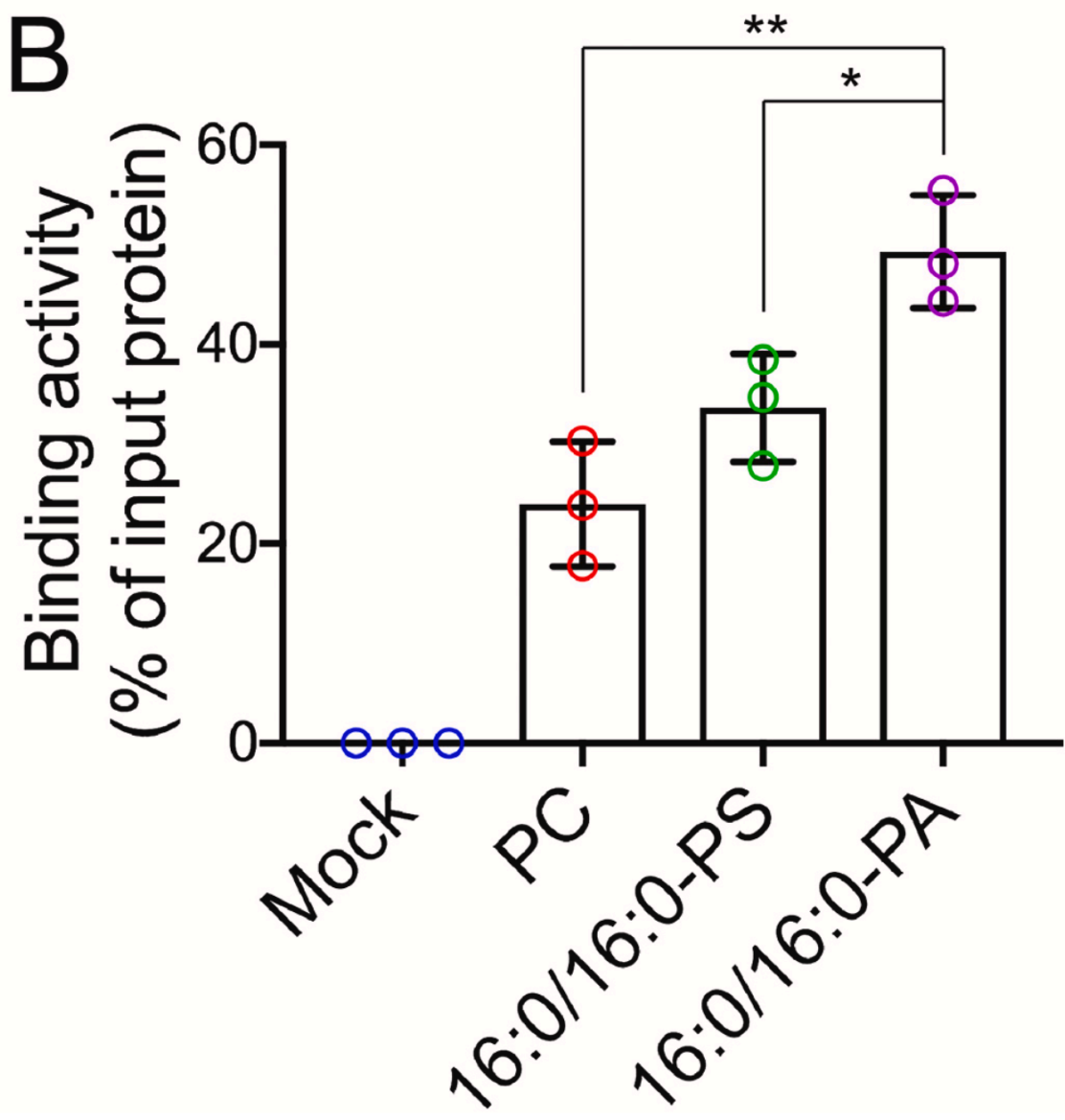
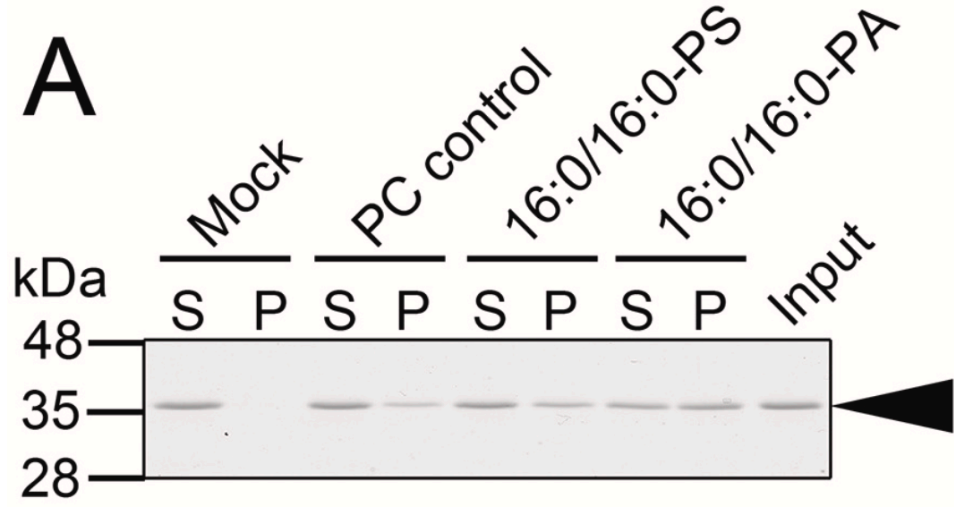


Figure 2. 6×His-LDHAのPAへの結合活性

(A) 16:0/16:0-PA、16:0/16:0-PS、および、PCリポソームを使用した6×His-LDHAのリポソーム沈降法。精製した6×His-LDHA (0.5 μM) をPC、16:0/16:0-PA、または、16:0/16:0-PSリポソーム (PA、または、PS: 100 μM) と転倒混和し、超遠心分離によりリポソームを沈降させた後、沈降画分を回収し、SDS-PAGE (12%アクリルアミド) を行い、分離したタンパク質をCBBで染色した。6×His-LDHAの位置は、黒矢印で示した。(B) 上清画分 (S)、および、沈降画分 (P) 中のタンパク質のバンド強度は、Image J softwareを使用したデンシトメトリーによって定量した。Binding activity (結合活性) は、上清画分、および、沈降画分のバンド強度の総和に対する沈降画分のバンド強度の比率として算出した。(平均値±SD、n = 3)、*P<0.05、**P<0.01

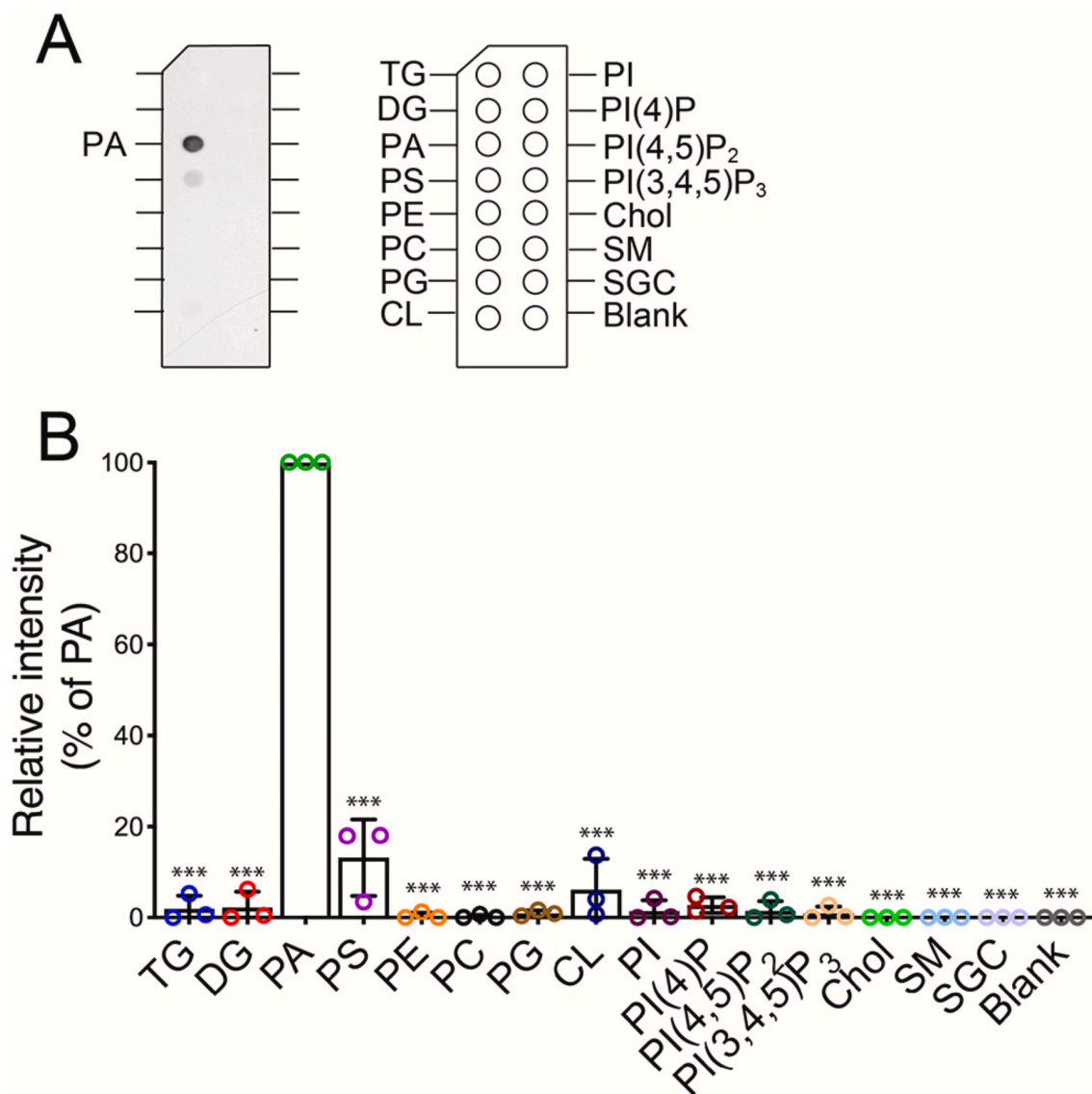


Figure 3. 6×His-LDHAの種々の脂質への結合活性

パルミチン酸 (16:0) を脂肪酸側鎖に持つ様々な脂質分子種を使用した6×His-LDHAの脂質オーバーレイアッセイ。100 pmolの種々の脂質をニトロセルロースメンブレンにスポットし、精製した6×His-LDHA (20 nM) を加えて攪拌した。脂質結合タンパク質は、抗6×Hisタグ抗体で検出した。独立した3回の実験結果のうち代表的な1例を示した。(B) LDHAのPA結合活性 (スポット強度) を100%に設定した相対値として他の脂質に対する結合活性を示した。(平均値±SD、n=3)、***P<0.005 (vs. PA)

(triglyceride: TG、diacylglycerol: DG、phosphatidic acid: PA、phosphatidylserine: PS、phosphatidylethanolamine: PE、phosphatidylcholine: PC、phosphatidylglycerol: PG、cardiolipin: CL、phosphatidylinositol: PI、PI 4-monophosphate: PI(4)P、PI 4,5-bisphosphate: PI(4,5)P₂、PI 3,4,5-trisphosphate: PI(3,4,5)P₃、cholesterol: Chol、sphingomyelin: SM、3-sulfogalactosylceramide: SGC)

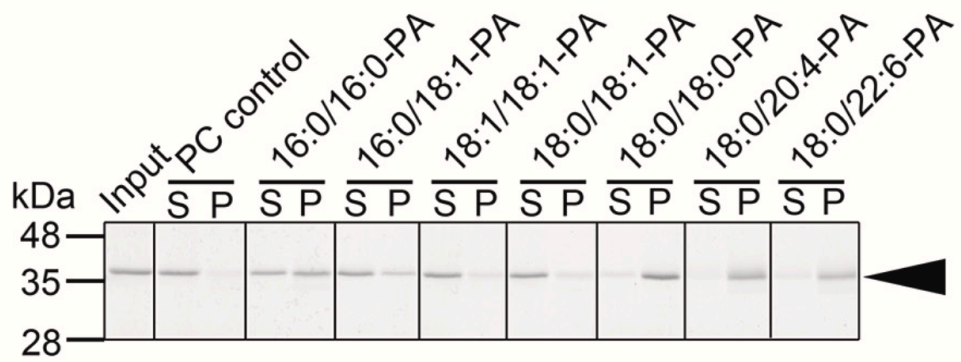
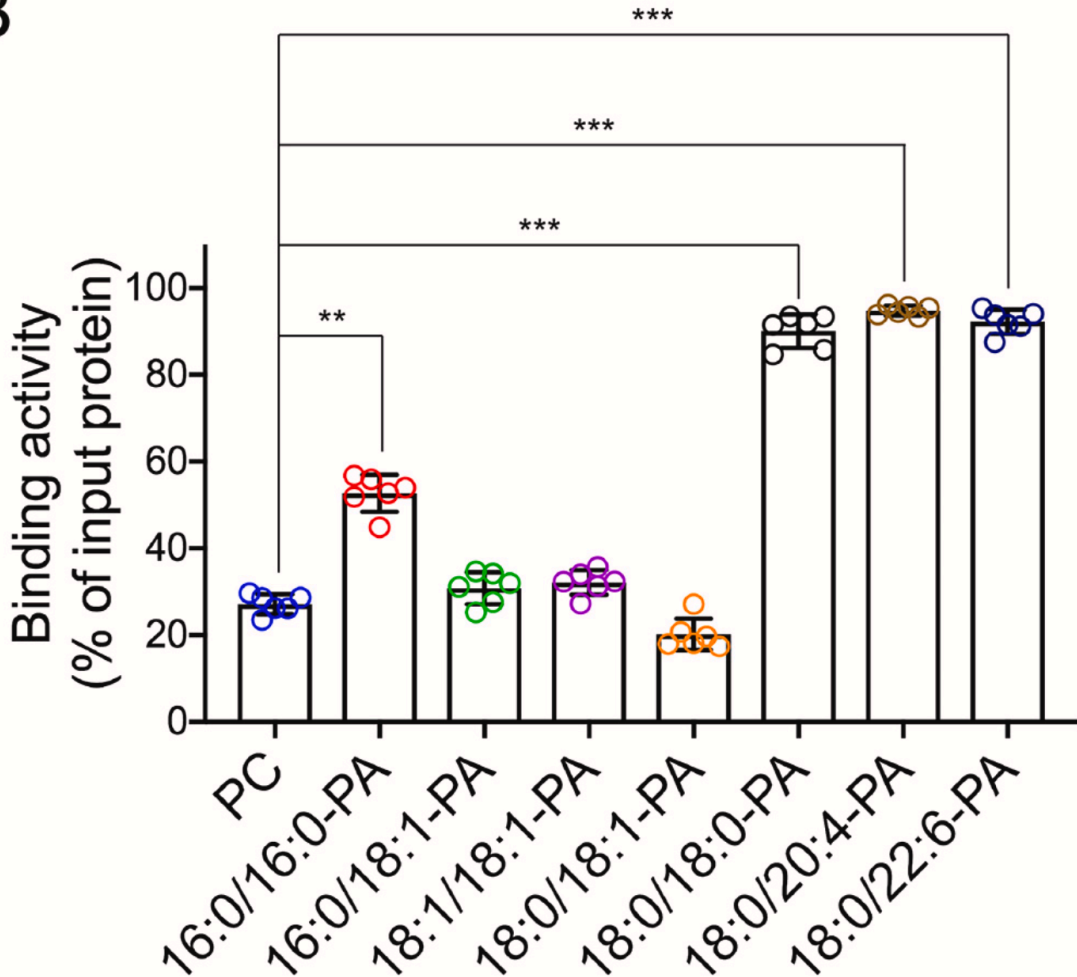
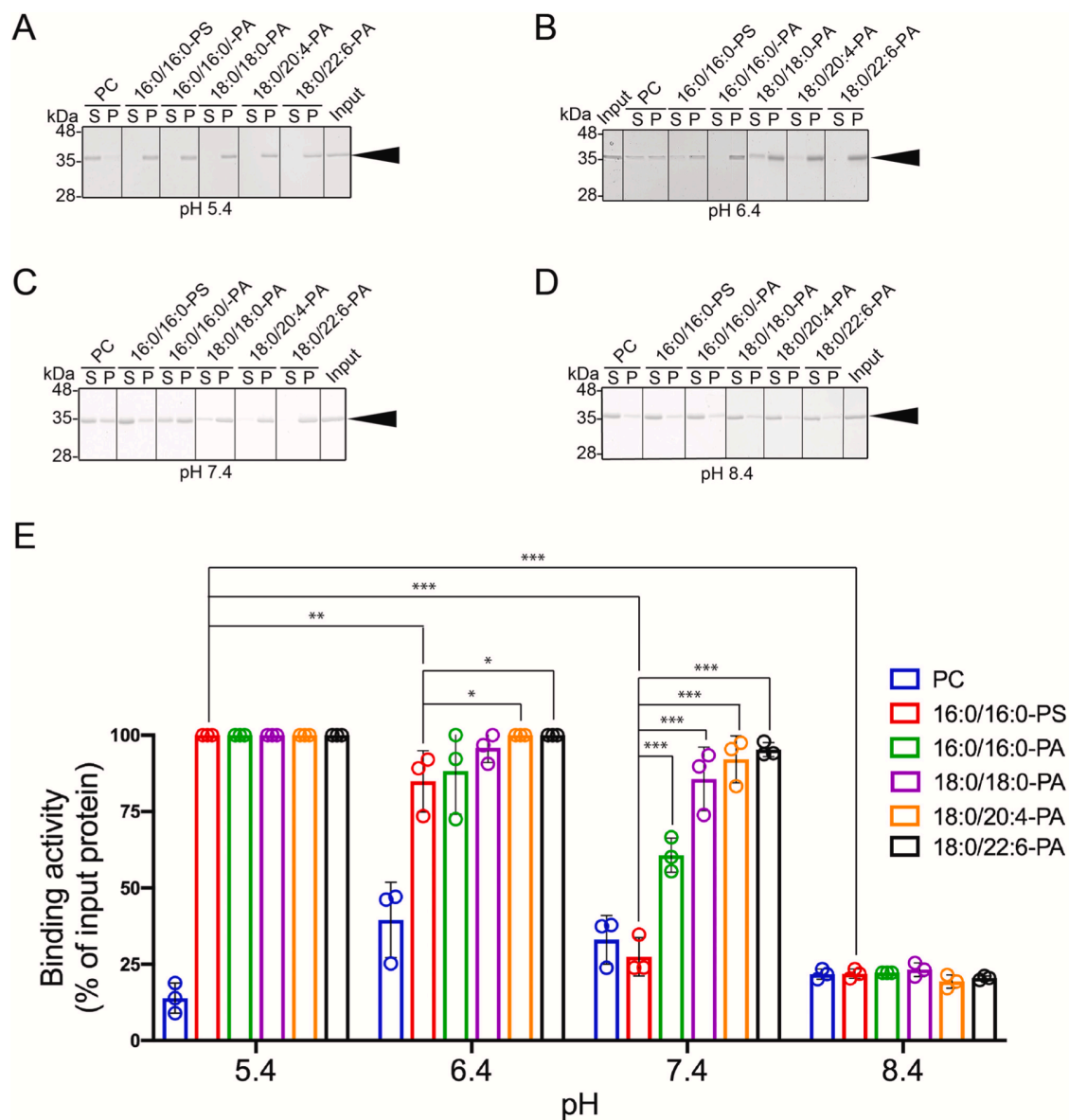
A**B**

Figure 4. 6xHis-LDHA の種々の PA 分子種への結合活性

(A) 精製した 6xHis-LDHA (0.5 μ M) を PC、16:0/16:0-PA、16:0/18:1-PA、18:1/18:1-

PA、18:0/18:1-PA、18:0/18:0-PA、18:0/20:4-PA、または、18:0/22:6-PA リポソーム (PA: 100 μ M) と転倒混和した後、超遠心分離によりリポソームを沈降させた。沈降画分を回収し、SDS-PAGE (12%アクリルアミド) を行い、分離したタンパク質を CBB で染色した。6 \times His-LDHA の位置は、黒い矢印で示した。(B) 上清画分 (S)、および、沈降画分 (P) 中のタンパク質のバンド強度は、Image J software を使用したデンシトメトリーによって定量した。Binding activity (結合活性) は、上清画分、および、沈降画分のバンド強度の総和に対する沈降画分のバンド強度の比率として算出した。(平均値 \pm SD、n = 6)、**P<0.01、***P<0.005 (vs. PC (コントロール) リポソーム)



たタンパク質を CBB で染色した。上清画分 (*S*)、および、沈降画分 (*P*) の LDHA のタンパク質バンド強度は、Image J software を使用したデンシトメトリーによって定量した。Binding activity (結合活性) は、上清画分、および、沈降画分のバンド強度の総和に対する沈降画分のバンド強度の比率として算出した。(平均値 ±SD、n = 3)、*P<0.05、**P<0.01、***P<0.005

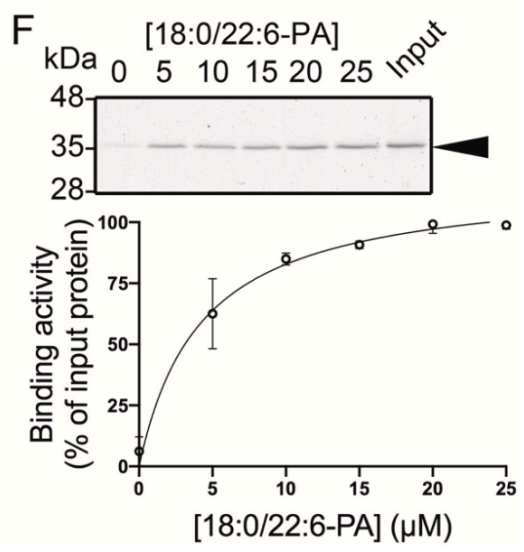
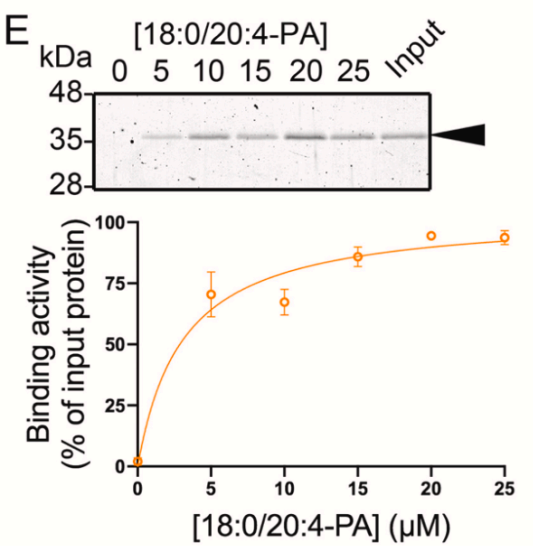
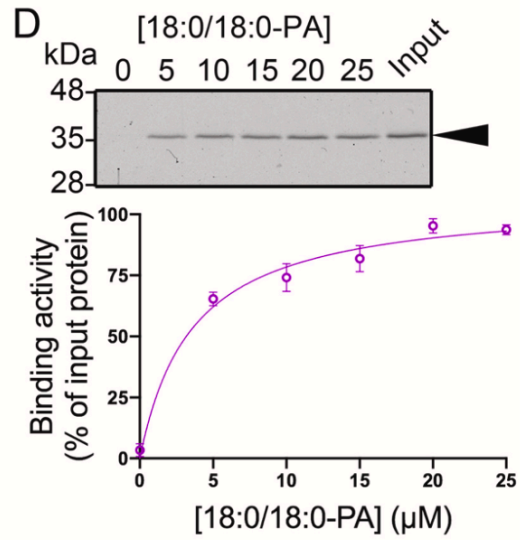
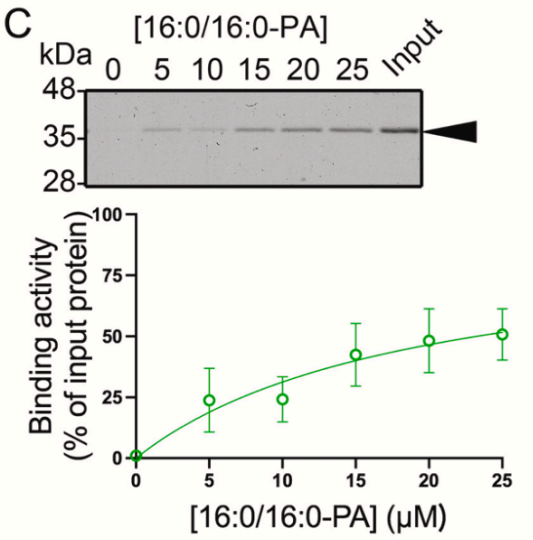
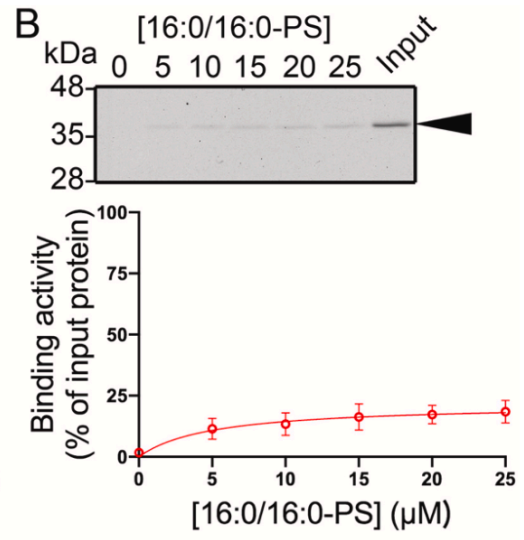
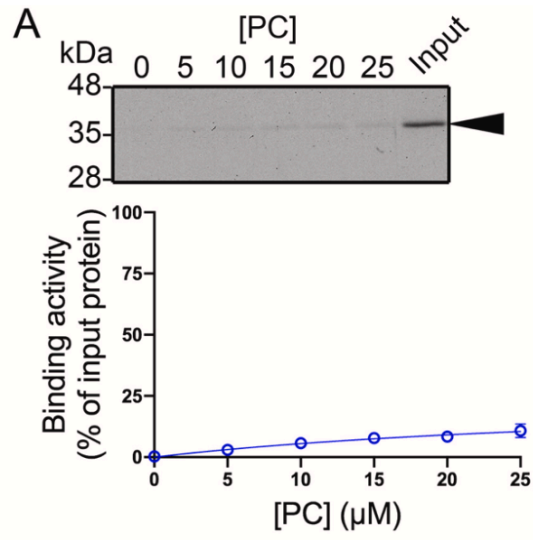


Figure 6. 異なる PA 分子種に対する LDHA の解離定数

6×His-LDHA の PA 分子種結合親和性。(A-E) 精製した 6×His-LDHA (0.2 μM) を、示された濃度 (0~25 μM) の PC (A)、16:0/16:0-PS (B)、16:0/16:0-PA (C)、18:0/18:0-PA (D)、18:0/20:4-PA (E)、および、18:0/22:6-PA (F) リポソームと転倒混和した後、超遠心分離によりリポソームを沈降させた。SDS-PAGE (12%ポリアクリルアミド) を行い、分離したタンパク質を CBB で検出した。6×His-LDHA の位置は、黒い矢印で示した。LDHA のタンパク質のバンド強度は、Image J software を使用したデンストメトリーによって定量した。Binding activity (結合活性) は、*Input* のバンド強度と比較した沈降画分のバンド強度の比率として算出した。(平均値±SD、n = 3)、解離定数: K_d は、GraphPad Prism 8 (Dissociation-One phase exponential decay) を使用して求めた。

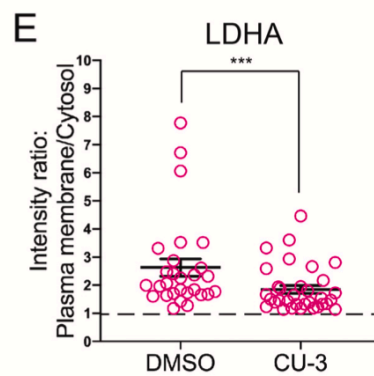
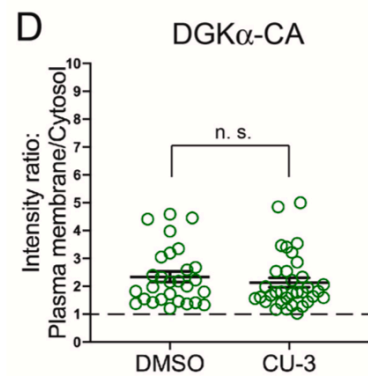
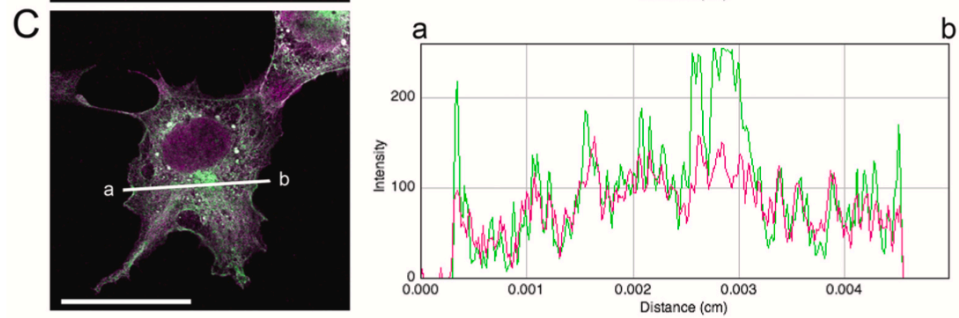
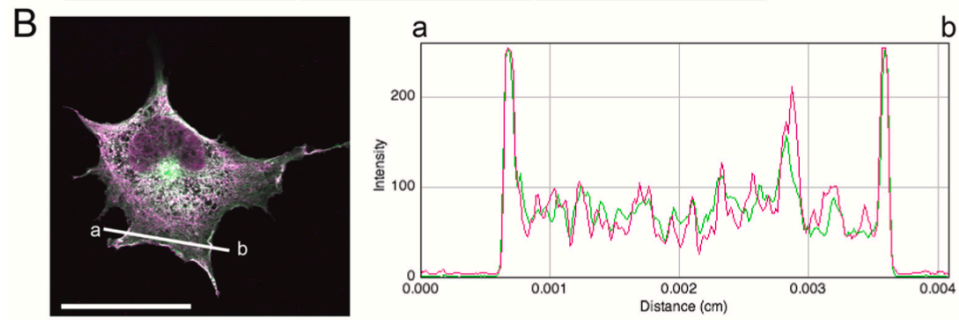
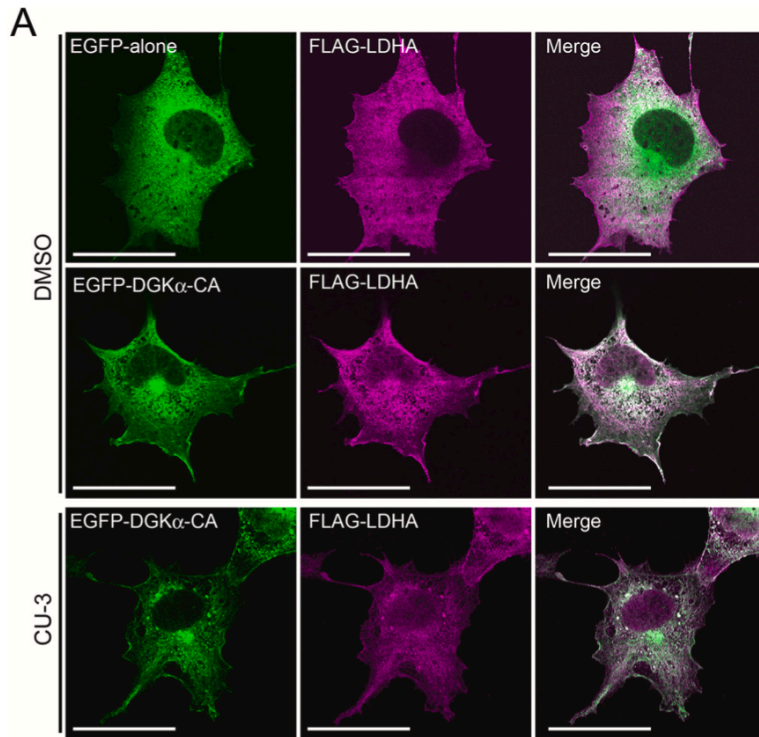


Figure 7. 細胞質から細胞膜への LDHA の局在変化は、DGK α -CA の PA 産生活性依存的に制御される

細胞膜で DGK α -CA と共局在する 3 \times FLAG-LDHA。(A) EGFP-alone、EGFP-DGK α -CA を COS-7 細胞において 3 \times FLAG-LDHA と共過剰発現した。トランスフェクションの 24 時間後、CU-3 (3 μ M)、または、DMSO を添加し、30 分間転倒混和した。細胞を 4% PFA/PBS で固定し、抗 FLAG 抗体で免疫染色した。独立した 3 回の実験結果から代表的なデータを示した。スケールバー、40 μ m。(B、および、C) CU-3 の非存在下 (B)、または、存在下 (C) での EGFP-DGK α -CA、および、3 \times FLAG-LDHA の細胞膜における局在を、Image J software を使用して定量した。EGFP-DGK α -CA (green)、および、3 \times FLAG-LDHA (magenta)。(D) DMSO (3 回の独立した実験 (n = 28))、または、CU-3 (3 回の独立した実験 (n = 32)) の存在下における COS-7 細胞の細胞膜での EGFP-DGK α -CA 局在の定量的画像分析。(E) DMSO (独立した 3 回の実験からの n = 28)、または、CU-3 (3 回の独立した実験 (n = 32)) の存在下における EGFP-DGK α -CA を同時トランスフェクトした COS-7 細胞の細胞膜での 3 \times FLAG-LDHA 局在の定量的画像分析。各ドットは、COS-7 細胞における EGFP-DGK α -CA (green)、および、3 \times FLAG-LDHA (magenta) の細胞膜：細胞質強度比を示した。(平均値 \pm SEM)、*** P < 0.001

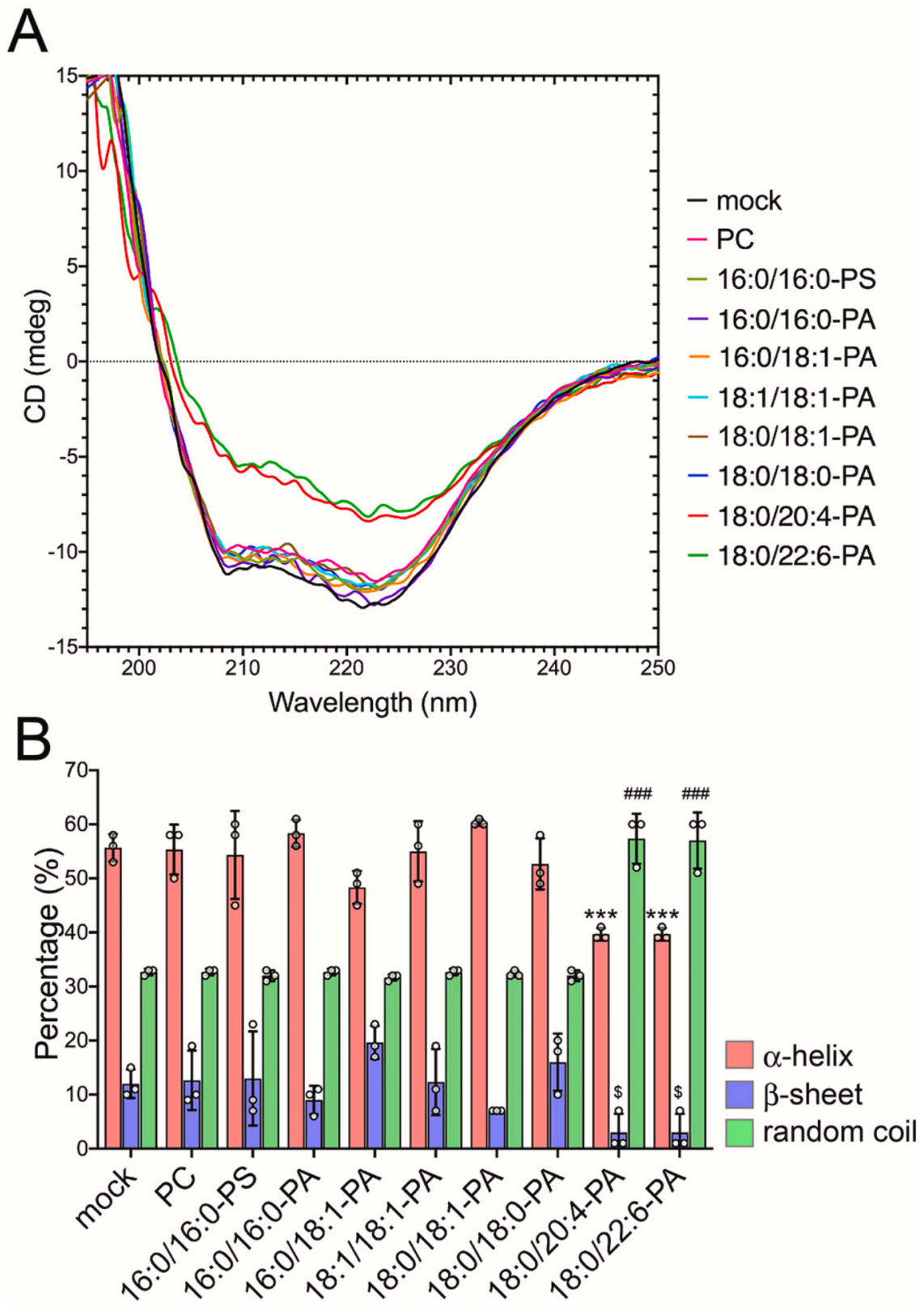


Figure 8. LDHA の二次構造に対する PA 分子種の影響

LDHA の CD スペクトルは、Jasco J-805 分光計で 190~250nm の波長範囲条件下で測定した。(A) 6×His-LDHA を最終濃度 10 μM となるように 25 mM HEPES バッファー (pH 7.4) [100 mM NaCl, 1 mM DTT] で希釈し、1 mM の PC、16:0/16:0-PS、16:0/16:0-PA、16:0/18:1-PA、18:1/18:1-PA、18:0/18:1-PA、18:0 / 18:0-PA、18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PA リポソームと転倒混和した後、CD スペクトルを測定した。独立した 3 回の実験結果の代表的なデータを示した。(B) LDHA の二次構造は、DichroWeb インターフェースを介した K2D プログラムを使用して CD スペクトルデータから算出した。(平均値±SD、n = 3)、***P<0.005 (α-ヘリックス)、^{\$}P<0.05 (β-シート)、###P<0.005 (ランダムコイル)(vs. mock (コントロール))

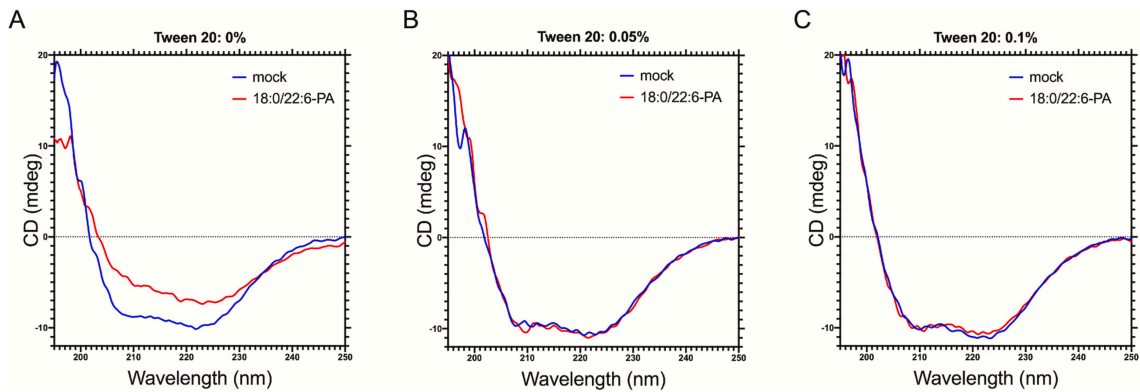


Figure 9. PUFA-PA による LDHA の二次構造変化に対する界面活性剤 Tween 20 の影響

LDHA の CD スペクトルは、Jasco J-805 分光計で 190～250nm の波長範囲条件下で測定した。(A–C) 6×His-LDHA を最終濃度 10 μM となるように 25 mM HEPES バッファー (pH 7.4) [100 mM NaCl, 1 mM DTT] で希釈し、1 mM の 18:0/22:6-PA リポソームと転倒混和した後、CD スペクトルを測定した。(A) 0% Tween 20、(B) 0.05% Tween 20、および、(C) 0.1% Tween 20。独立した 3 回の実験結果の代表的なデータを示した。

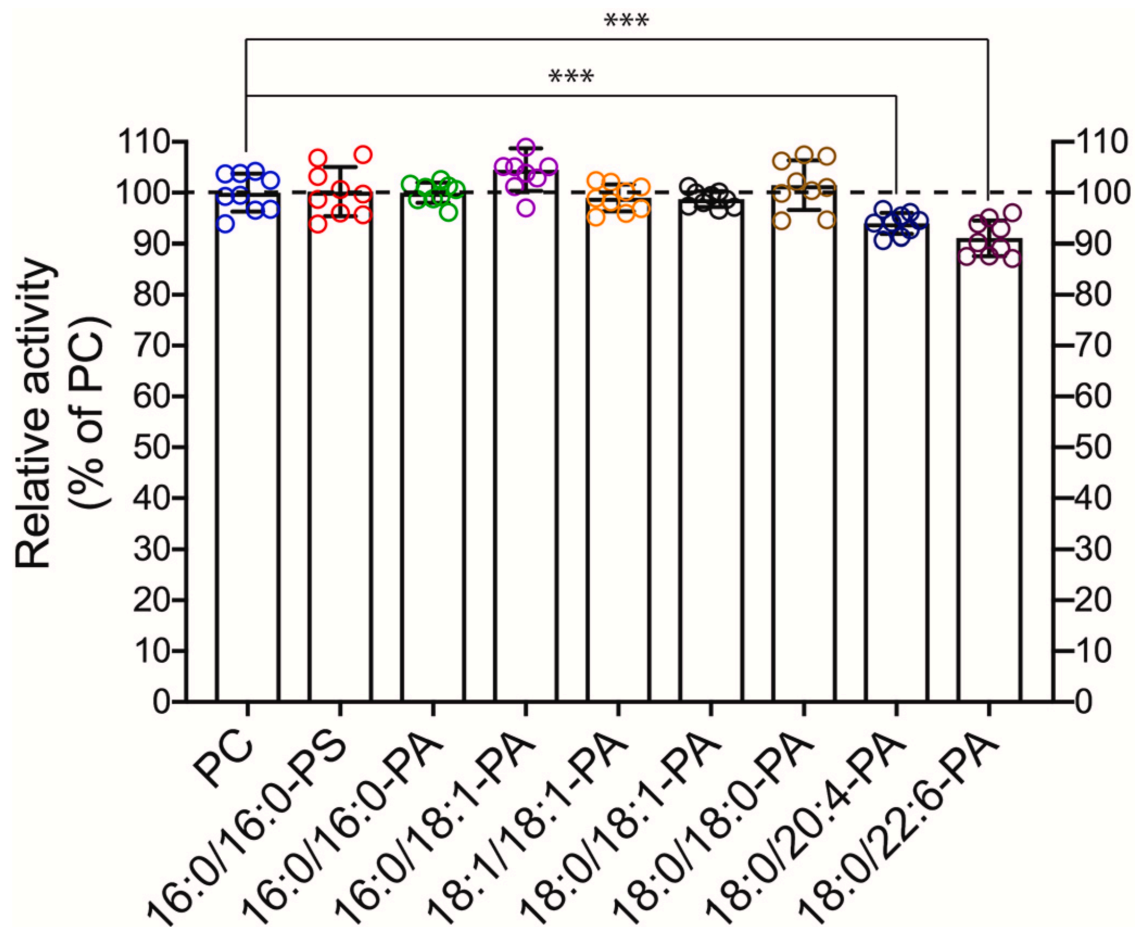


Figure 10. LDHA 活性に対する PA 分子種の影響

精製した 6×His-LDHA (0.2 μM) を PC、16:0/16:0-PS、16:0/16:0-PA、16:0/18:1-PA、18:1/18:1-PA、18:0/18:1-PA、18:0/18:0-PA、18:0/20:4-PA、または、18:0/22:6-PA リポソームと 4°C で 10 分間転倒混和した後、LDHA 反応バッファー (25 mM HEPES (pH 7.4)、100 mM NaCl、15 mM ピルビン酸、0.2 mM NADH) を添加して反応を開始し、37°C でさらに 10 分間転倒混和した。PC リポソームを用いた LDHA の比活性を 100%とした相対活性を示した。(平均値±SD、n = 9)、***P<0.005(vs. PC (コントロール) リポソーム)

【考察】

近年、多くの PA 結合タンパク質が報告されている [2]。しかし、これらの PA 結合タンパク質の多くは、PA に加えて、PS、CL、PI、および/または、phosphoinositides などの他の酸性リン脂質に強く、または、弱くに結合する [2]。さらに、PA 分子種のみに対して高い結合選択性を示す PA 結合タンパク質は、最近まで発見されていない。たとえば、trigalactosyldiacylglycerol 2 [65]、プロテインホスファターゼ-1 [66]、Spo20 [63]、cAMP phosphodiesterase (PDE) 4A1 [63]、および、Opi1 [63] は、幅広い PA 分子種と相互作用し、特定の PA 分子種に対して顕著な選択性を持たない。これまで、PA 結合タンパク質を探索するために、ほとんどの組織、および、細胞で主要な PA 分子種である 16:0/18:1-PA が一般的に使用されてきた。一方、16:0/18:1-PA を使用したこれらの探索法では、他の PA 分子種、特に 16:0/16:0-PA、18:0/20:4-PA、または、18:0/22:6-PA などの比較的マイナーな PA 分子種に対して選択性を持つ、多種多様な PA 結合タンパク質を検出できない可能性がある。したがって、本研究では、マウス骨格筋から 16:0/16:0-PA 結合タンパク質を探索した。その結果、LDHA を 16:0/16:0-PA 結合タンパク質として同定し (Figure 1、および、2)、種々の脂質の中で PA と特異的に相互作用することを明らかにした (Figure 3)。実際、LDHA は PC、または、PS と比較して 16:0/18:1-PA との強い結合活性を示さなかった (Figure 4)。

18:0/18:0-PA、18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PA は、広範囲の pH 条件下 (pH 5.4~7.4) において LDHA と強く相互作用した (Figure 5)。骨格筋細胞の細胞内 pH は一般的に pH 7.2~7.3 で安定しており、急性運動に反応しても、せいぜい pH 7.0 に移行するのみである [67,68]。またがん細胞の細胞内 pH 値は 7.2~7.4 であると報告されている [69]。したがって、生理学的細胞内条件下 (pH 7.4) において LDHA は 16:0/16:0-PA、18:0/18:0-PA、18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PA

に対して PS、および、CL よりも強く結合する可能性がある。一方、PS、および、CL はより低い pH (pH 5.4) [61,62] で LDHA と相互作用する (Figure 3、および、5)。

16:0/16:0-PA リポソームを使用したスクリーニングにより、LDHA を新規の 16:0/16:0-PA 結合タンパク質として同定した。さらに、LDHA は 18:0/18:0-PA、18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PA とより強く相互作用することがわかった (Figure 4、および、5)。したがって、sn-1 のステアリン酸 (18:0) は LDHA との相互作用にとって重要である可能性がある。しかし、不可解なことに、18:0/18:1-PA は LDHA と相互作用しなかった。したがって、sn-1 位置の 18:0 は、LDHA に結合活性を与えるのに十分ではないと考えられる。さらに、18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PA のみが LDHA の二次構造、および、活性に影響を与え、18:0/18:0-PA は影響を及ぼさなかった。これらの結果から、LDHA には 2 つ以上の PA 結合部位が存在する可能性が考えられる。PA 結合タンパク質の一つである α -シヌクレインは酸性リン脂質を認識する多くの塩基性残基 (11 個の塩基性アミノ酸残基) を含むいくつかの両親媒性の α -ヘリックスを有することがわかっている [70-72]。しかし、LDHA にはそのようなモチーフは存在しない [60]。したがって、LDHA はおそらく異なる PA 結合モチーフを持っている可能性がある。LDHA には、[Lys265、Arg268、Arg269、Lys278]と[Lys305、Arg315、Lys317、Lys318] の 2 つの塩基性アミノ酸残基が豊富な配列があり、これらの塩基性アミノ酸残基が豊富な領域は、PA 結合モチーフとして機能する可能性がある。ただし、LDHA の PA 結合モチーフを探索し、2 つの PA 結合部位があるかどうかを判断するには、さらなる研究が必要である。

LDHA は骨格筋において強く発現し、さらに、LDHA は神経膠芽腫を含むヒト腫瘍細胞で強く発現する [73-75]。Warburg 効果は、好氣的条件下において

もがん細胞が解糖系を利用してエネルギーを得るメカニズムのことであり、がん細胞の増殖において重要な働きをもつメカニズムである [76]。LDHA は Warburg 効果において重要な役割を担う酵素の一つである [48,77,78]。さらに、L-lactate は免疫応答を制御することができる活性分子として認識され始めており、がん細胞由来の乳酸は免疫細胞の機能を調節し、腫瘍の発生を促進する免疫抑制性の微小環境の確立に貢献する [79]。また、遺伝子破壊、または、サイレンシングによる LDHA のタンパク質発現抑制は、いくつかの研究によって *in vitro*、および、*in vivo* で腫瘍増殖を阻害することが明らかになっている [80-82]。興味深いことに、アラキドン酸 (20:4)、および、ドコサヘキサエン酸 (22:6) を含む DG は、腫瘍領域内で減少することが報告されている [83]。したがって、LDHA の活性を減弱する PUFA-PA の基質である PUFA-DG が減少している腫瘍細胞においてはアラキドン酸 (20:4)、または、ドコサヘキサエン酸 (22:6) を含む PA 分子種も減少している可能性があり、腫瘍細胞における Warburg 効果の重要な要因である LDHA の活性を弱めることができないことが考えられる。したがって、18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PA の物理化学的な特性を模倣する化合物が腫瘍細胞の成長に対する治療法になり得ることが期待される。

最近、LDHA に加えて、 α -シヌクレインが 18:1/18:1-PA と選択的に相互作用することを明らかにした [85,86]。さらに、CKM は 16:0/16:0-PA、16:0/18:1-PA、18:1/18:1-PA、および、18:0/18:0-PA [47] と選択的に結合し、これらの PA 分子種によって活性化されることがわかってきた。さらに、我々は、Praja-1 E3 ユビキチンタンパク質リガーゼが 18:0/22:6-PA [41] と特異的に相互作用し、その活性がこの PA 分子種によって亢進されることを明らかにした [42]。したがって、PA 分子種に対して異なる選択性を持ち、異なる PA 分子種によって機能的に制御される様々な PA 結合タンパク質が多数存在することが示唆された。

以上より、我々は、LDHA が 16:0/16:0-PA、18:0/18:0-PA、18:0/20:4-PA、18:0/22:6-PA などの PA 分子種と特異的かつ選択的に相互作用することを明らかにした。さらに、18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PA は、LDHA の α -ヘリックス構造からランダムコイル構造への二次構造変化を誘導し、LDHA の酵素活性を阻害することがわかった。したがって、これらの PA 分子種は LDHA の負の調節因子として機能する。今後、LDHA の PA 結合部位に焦点を当てたさらなる研究は必要である。さらに、アラキドン酸、および、ドコサヘキサエン酸を含む PA と、これらの PA 分子種を模倣する化合物が、LDHA を標的とする新規の抗がん剤になり得るかどうかを明らかにする必要がある。

【参考文献】

- [1] E.E. Kooijman, K.N. Burger, Biophysics and function of phosphatidic acid: a molecular perspective, *Biochim. Biophys. Acta*, **1791** (2009) 881-888.
- [2] C.L. Stace, N.T. Ktistakis, Phosphatidic acid- and phosphatidylserine-binding proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, **1761** (2006) 913-926.
- [3] A.G. Buckland, D.C. Wilton, Anionic phospholipids, interfacial binding and the regulation of cell functions, *Biochim. Biophys. Acta*, **1483** (2000) 199-216.
- [4] D. English, Phosphatidic acid: a lipid messenger involved in intracellular and extracellular signalling, *Cell. Signal.*, **8** (1996) 341-347.
- [5] J.H. Exton, Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction, *Biochim. Biophys. Acta*, **1212** (1994) 26-42.
- [6] G.H. Jenkins, P.L. Fiset, R.A. Anderson, Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase isoforms are specifically stimulated by phosphatidic acid, *J. Biol. Chem.*, **269** (1994) 11547-11554.
- [7] A. Moritz, P.N. De Graan, W.H. Gispen, K.W. Wirtz, Phosphatidic acid is a specific activator of phosphatidylinositol-4-phosphate kinase, *J. Biol. Chem.*, **267** (1992) 7207-7210.
- [8] A. Avila-Flores, T. Santos, E. Rincon, I. Merida, Modulation of the mammalian target of rapamycin pathway by diacylglycerol kinase-produced phosphatidic acid, *J. Biol. Chem.*, **280** (2005) 10091-10099.
- [9] Y. Fang, M. Vilella-Bach, R. Bachmann, A. Flanigan, J. Chen, Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling, *Science*, **294** (2001) 1942-1945.
- [10] C. Limatola, D. Schaap, W.H. Moolenaar, W.J. van Blitterswijk, Phosphatidic acid activation of protein kinase C ζ overexpressed in COS cells: comparison with other protein kinase C isoforms and other acidic lipids., *Biochem. J.*, **304** (1994) 1001-1008.
- [11] H. Abramovici, P. Mojtabaie, R.J. Parks, X.P. Zhong, G.A. Koretzky, M.K. Topham, S.H. Gee, Diacylglycerol kinase ζ regulates actin cytoskeleton reorganization through dissociation of Rac1 from RhoGDI, *Mol. Biol. Cell*, **20** (2009) 2049-2059.
- [12] G.M. Bokoch, A.M. Reilly, R.H. Daniels, C.C. King, A. Olivera, S. Spiegel, U.G. Knaus, A GTPase-independent mechanism of p21-activated kinase activation. Regulation by sphingosine and other biologically active lipids, *J. Biol. Chem.*, **273** (1998) 8137-8144.
- [13] F. Sakane, S. Mizuno, D. Takahashi, H. Sakai, Where do substrates of diacylglycerol kinases come from? Diacylglycerol kinases utilize diacylglycerol species supplied from phosphatidylinositol turnover-independent pathways, *Adv. Biol. Regul.*, **67**

- (2018) 101-108.
- [14] I. Merida, A. Avila-Flores, E. Merino, Diacylglycerol kinases: at the hub of cell signalling, *Biochem. J.*, **409** (2008) 1-18.
- [15] M.K. Topham, R.M. Epand, Mammalian diacylglycerol kinases: molecular interactions and biological functions of selected isoforms, *Biochim. Biophys. Acta*, **1790** (2009) 416-424.
- [16] F. Sakane, S. Imai, M. Kai, S. Yasuda, H. Kanoh, Diacylglycerol kinases: why so many of them?, *Biochim. Biophys. Acta*, **1771** (2007) 793-806.
- [17] K. Goto, Y. Hozumi, H. Kondo, Diacylglycerol, phosphatidic acid, and the converting enzyme, diacylglycerol kinase, in the nucleus, *Biochim. Biophys. Acta*, **1761** (2006) 535-541.
- [18] J.H. Exton, Regulation of phospholipase D, *Biochim. Biophys. Acta*, **1439** (1999) 121-133.
- [19] Y. Kanaho, Y. Funakoshi, H. Hasegawa, Phospholipase D signalling and its involvement in neurite outgrowth, *Biochim. Biophys. Acta*, **1791** (2009) 898-904.
- [20] X. Peng, M.A. Frohman, Mammalian phospholipase D physiological and pathological roles, *Acta Physiol. (Oxf.)*, **204** (2012) 219-226.
- [21] F. Sakane, S. Imai, M. Kai, S. Yasuda, H. Kanoh, Diacylglycerol kinases as emerging potential drug targets for a variety of diseases, *Curr. Drug Targets*, **9** (2008) 626-640.
- [22] F. Sakane, S. Mizuno, S. Komenoi, Diacylglycerol Kinases as Emerging Potential Drug Targets for a Variety of Diseases: An Update, *Front. Cell Dev. Biol.*, **4** (2016) 82.
- [23] S. Cutrupi, G. Baldanzi, D. Gramaglia, A. Maffe, D. Schaap, E. Giraud, W. van Blitterswijk, F. Bussolino, P.M. Comoglio, A. Graziani, Src-mediated activation of alpha-diacylglycerol kinase is required for hepatocyte growth factor-induced cell motility, *EMBO J.*, **19** (2000) 4614-4622.
- [24] I. Merida, P. Torres-Ayuso, A. Avila-Flores, J. Arranz-Nicolas, E. Andrada, M. Tello-Lafoz, R. Liebana, R. Arcos, Diacylglycerol kinases in cancer, *Adv. Biol. Regul.*, **63** (2017) 22-31.
- [25] K. Takeishi, A. Taketomi, K. Shirabe, T. Toshima, T. Motomura, T. Ikegami, T. Yoshizumi, F. Sakane, Y. Maehara, Diacylglycerol kinase alpha enhances hepatocellular carcinoma progression by activation of Ras-Raf-MEK-ERK pathway, *J. Hepatol.*, **57** (2012) 77-83.
- [26] K. Yanagisawa, S. Yasuda, M. Kai, S. Imai, K. Yamada, T. Yamashita, K. Jimbow, H. Kanoh, F. Sakane, Diacylglycerol kinase α suppresses tumor necrosis factor- α

- induced apoptosis of human melanoma cells through NF- κ B activation, *Biochim. Biophys. Acta*, **1771** (2007) 462-474.
- [27] E.B. Rodriguez De Turco, W. Tang, M.K. Topham, F. Sakane, V.L. Marcheselli, C. Chen, A. Taketomi, S.M. Prescott, N.G. Bazan, Diacylglycerol kinase ϵ regulates seizure susceptibility and long-term potentiation through arachidonoyl- inositol lipid signaling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98** (2001) 4740-4745.
- [28] T. Usuki, T. Takato, Q. Lu, H. Sakai, K. Bando, H. Kiyonari, F. Sakane, Behavioral and pharmacological phenotypes of brain-specific diacylglycerol kinase δ -knockout mice, *Brain Res.*, **1648** (2016) 193-201.
- [29] T. Isozaki, S. Komenoi, Q. Lu, T. Usuki, S. Tomokata, D. Matsutomo, H. Sakai, K. Bando, H. Kiyonari, F. Sakane, Deficiency of diacylglycerol kinase η induces lithium-sensitive mania-like behavior, *J. Neurochem.*, **138** (2016) 448-456.
- [30] I. Merida, E. Andrada, S.I. Gharbi, A. Avila-Flores, Redundant and specialized roles for diacylglycerol kinases α and ζ in the control of T cell functions, *Sci. Signal.*, **8** (2015) re6.
- [31] T. Arimoto, Y. Takeishi, H. Takahashi, T. Shishido, T. Niizeki, Y. Koyama, R. Shiga, N. Nozaki, O. Nakajima, K. Nishimaru, J. Abe, M. Endoh, R.A. Walsh, K. Goto, I. Kubota, Cardiac-specific overexpression of diacylglycerol kinase ζ prevents Gq protein-coupled receptor agonist-induced cardiac hypertrophy in transgenic mice, *Circulation*, **113** (2006) 60-66.
- [32] J. Ohanian, V. Ohanian, Lipid second messenger regulation: the role of diacylglycerol kinases and their relevance to hypertension, *J. Hum. Hypertens.*, **15** (2001) 93-98.
- [33] A.V. Chibalin, Y. Leng, E. Vieira, A. Krook, M. Bjornholm, Y.C. Long, O. Kotova, Z. Zhong, F. Sakane, T. Steiler, C. Nysten, J. Wang, M. Laakso, M.K. Topham, M. Gilbert, H. Wallberg-Henriksson, J.R. Zierath, Downregulation of diacylglycerol kinase delta contributes to hyperglycemia-induced insulin resistance, *Cell*, **132** (2008) 375-386.
- [34] R.C. Bruntz, C.W. Lindsley, H.A. Brown, Phospholipase D signaling pathways and phosphatidic acid as therapeutic targets in cancer, *Pharmacol. Rev.*, **66** (2014) 1033-1079.
- [35] M.A. Frohman, The phospholipase D superfamily as therapeutic targets, *Trends Pharmacol. Sci.*, **36** (2015) 137-144.
- [36] C. Cruchaga, C.M. Karch, S.C. Jin, B.A. Benitez, Y. Cai, R. Guerreiro, O. Harari, J. Norton, J. Budde, S. Bertelsen, A.T. Jeng, B. Cooper, T. Skorupa, D. Carrell, D. Levitch, S. Hsu, J. Choi, M. Ryten, C. Sassi, J. Bras, R.J. Gibbs, D.G. Hernandez,

- M.K. Lupton, J. Powell, P. Forabosco, P.G. Ridge, C.D. Corcoran, J.T. Tschanz, M.C. Norton, R.G. Munger, C. Schmutz, M. Leary, F.Y. Demirci, M.N. Bamne, X. Wang, O.L. Lopez, M. Ganguli, C. Medway, J. Turton, J. Lord, A. Braae, I. Barber, K. Brown, U.K.C. Alzheimer's Research, P. Pastor, O. Lorenzo-Betancor, Z. Brkanac, E. Scott, E. Topol, K. Morgan, E. Rogaeva, A. Singleton, J. Hardy, M.I. Kamboh, P.S. George-Hyslop, N. Cairns, J.C. Morris, J.S.K. Kauwe, A.M. Goate, Rare coding variants in the phospholipase D3 gene confer risk for Alzheimer's disease, *Nature*, **505** (2014) 550-554.
- [37] R.M. Bradley, R.E. Duncan, The lysophosphatidic acid acyltransferases (acylglycerophosphate acyltransferases) family: one reaction, five enzymes, many roles, *Curr. Opin. Lipidol.*, **29** (2018) 110-115.
- [38] M.G. Douvas, K.N. Hogan, Y. Ji, D. Hollenback, L. Bonham, J.W. Singer, B.S. Mitchell, Effect of lysophosphatidic acid acyltransferase- β inhibition in acute leukemia, *Leuk. Res.*, **30** (2006) 1027-1036.
- [39] G.M. Springett, L. Bonham, A. Hummer, I. Linkov, D. Misra, C. Ma, G. Pezzoni, S. Di Giovine, J. Singer, H. Kawasaki, D. Spriggs, R. Soslow, J. Dupont, Lysophosphatidic acid acyltransferase- β is a prognostic marker and therapeutic target in gynecologic malignancies, *Cancer Res.*, **65** (2005) 9415-9425.
- [40] H. Sakai, S. Kado, A. Taketomi, F. Sakane, Diacylglycerol kinase δ phosphorylates phosphatidylcholine-specific phospholipase C-dependent, palmitic acid-containing diacylglycerol species in response to high glucose levels, *J. Biol. Chem.*, **289** (2014) 26607-26617.
- [41] Q. Lu, C. Murakami, F. Hoshino, Y. Murakami, F. Sakane, Diacylglycerol kinase δ destabilizes serotonin transporter protein through the ubiquitin-proteasome system, *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Biol. Lipids*, **1865** (2020) 158608.
- [42] Q. Lu, C. Murakami, Y. Murakami, F. Hoshino, M. Asami, T. Usuki, H. Sakai, F. Sakane, 1-Stearoyl-2-docosahexaenoyl-phosphatidic acid interacts with and activates Praja-1, the E3 ubiquitin ligase acting on the serotonin transporter in the brain, *FEBS Lett.*, **594** (2020) 1787-1796.
- [43] S. Komenoi, Y. Suzuki, M. Asami, C. Murakami, F. Hoshino, S. Chiba, D. Takahashi, S. Kado, F. Sakane, Microarray analysis of gene expression in the diacylglycerol kinase η knockout mouse brain, *Biochem. Biophys. Rep.*, **19** (2019) 100660.
- [44] S. Mizuno, S. Kado, K. Goto, D. Takahashi, F. Sakane, Diacylglycerol kinase ζ generates dipalmitoyl-phosphatidic acid species during neuroblastoma cell differentiation, *Biochem. Biophys. Rep.*, **8** (2016) 352-359.
- [45] A. Yamaki, R. Akiyama, C. Murakami, S. Takao, Y. Murakami, S. Mizuno, D.

- Takahashi, S. Kado, A. Taketomi, Y. Shirai, K. Goto, F. Sakane, Diacylglycerol kinase α -selective inhibitors induce apoptosis and reduce viability of melanoma and several other cancer cell lines, *J. Cell. Biochem.*, **120** (2019) 10043-10056.
- [46] Y. Murakami, C. Murakami, F. Hoshino, Q. Lu, R. Akiyama, A. Yamaki, D. Takahashi, F. Sakane, Palmitic acid- and/or palmitoleic acid-containing phosphatidic acids are generated by diacylglycerol kinase α in starved Jurkat T cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **525** (2020) 1054-1060.
- [47] F. Hoshino, C. Murakami, H. Sakai, M. Satoh, F. Sakane, Creatine kinase muscle type specifically interacts with saturated fatty acid- and/or monounsaturated fatty acid-containing phosphatidic acids, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **513** (2019) 1035-1040.
- [48] K. Augoff, A. Hryniewicz-Jankowska, R. Tabola, Lactate dehydrogenase 5: an old friend and a new hope in the war on cancer, *Cancer Lett.*, **358** (2015) 1-7.
- [49] L.D. Mayer, M.J. Hope, P.R. Cullis, A.S. Janoff, Solute distributions and trapping efficiencies observed in freeze-thawed multilamellar vesicles, *Biochim. Biophys. Acta*, **817** (1985) 193-196.
- [50] M.M. Julkowska, J.M. Rankenberg, C. Testerink, Liposome-binding assays to assess specificity and affinity of phospholipid-protein interactions, *Methods Mol. Biol.*, **1009** (2013) 261-271.
- [51] A. Bruni, A. Pitotti, A.R. Contessa, P. Palatini, Role of phosphatidylserine and phosphatidylcholine in the dicyclohexylcarbodiimide-induced inhibition of mitochondrial ATPase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44** (1971) 268-274.
- [52] D. Marquardt, B. Geier, G. Pabst, Asymmetric lipid membranes: towards more realistic model systems, *Membranes (Basel)*, **5** (2015) 180-196.
- [53] M. Satoh, E. Haruta-Satoh, M. Yamada, S. Kado, F. Nomura, Overexpression of hydroxymethylglutaryl CoA synthase 2 and 2,4-dienoyl-CoA reductase in rat pancreas following chronic alcohol consumption, *Pancreas*, **42** (2013) 475-482.
- [54] T. Saito, D. Takahashi, F. Sakane, Expression, Purification, and Characterization of Human Diacylglycerol Kinase ζ , *ACS Omega*, **4** (2019) 5540-5546.
- [55] D. Takahashi, F. Sakane, Expression and purification of human diacylglycerol kinase α from baculovirus-infected insect cells for structural studies, *PeerJ*, **6** (2018) e5449.
- [56] M.A. Andrade, P. Chacón, J.J. Merelo, F. Morán, Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network, *Protein Eng.*, **6** (1993) 383-390.
- [57] L. Whitmore, B.A. Wallace, DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data, *Nucleic Acids Res.*, **32**

- (2004) W668-673.
- [58] K. Liu, N. Kunii, M. Sakuma, A. Yamaki, S. Mizuno, M. Sato, H. Sakai, S. Kado, K. Kumagai, H. Kojima, T. Okabe, T. Nagano, Y. Shirai, F. Sakane, A novel diacylglycerol kinase α -selective inhibitor, CU-3, induces cancer cell apoptosis and enhances immune response., *J. Lipid Res.*, **57** (2016) 368-379.
- [59] R.E. Vanderlinde, Measurement of total lactate dehydrogenase activity, *Ann. Clin. Lab. Sci.*, **15** (1985) 13-31.
- [60] G. Terlecki, E. Czapinska, J. Gutowicz, The role of lipid phase structure in the interaction of lactate dehydrogenase with phosphatidylserine. Activity studies, *Cell. Mol. Biol. Lett.*, **7** (2002) 895-903.
- [61] G. Terlecki, E. Czapinska, K. Rogozik, M. Lisowski, J. Gutowicz, Investigation of the interaction of pig muscle lactate dehydrogenase with acidic phospholipids at low pH, *Biochim. Biophys. Acta*, **1758** (2006) 133-144.
- [62] G. Terlecki, E. Czapinska, K. Hotowy, Ultracentrifugation studies of the location of the site involved in the interaction of pig heart lactate dehydrogenase with acidic phospholipids at low pH. A comparison with the muscle form of the enzyme, *Cell. Mol. Biol. Lett.*, **12** (2007) 378-395.
- [63] N. Kassas, E. Tanguy, T. Thahouly, L. Fouillen, D. Heintz, S. Chasserot-Golaz, M.F. Bader, N.J. Grant, N. Vitale, Comparative Characterization of Phosphatidic Acid Sensors and Their Localization during Frustrated Phagocytosis, *J. Biol. Chem.*, **292** (2017) 4266-4279.
- [64] N.J. Greenfield, Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure, *Nat. Protoc.*, **1** (2006) 2876-2890.
- [65] K. Awai, C. Xu, B. Tamot, C. Benning, A phosphatidic acid-binding protein of the chloroplast inner envelope membrane involved in lipid trafficking, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103** (2006) 10817-10822.
- [66] J.A. Jones, Y.A. Hannun, Tight binding inhibition of protein phosphatase-1 by phosphatidic acid. Specificity of inhibition by the phospholipid, *J. Biol. Chem.*, **277** (2002) 15530-15538.
- [67] A. de Hemptinne, Intracellular pH and surface pH in skeletal and cardiac muscle measured with a double-barrelled pH microelectrode, *Pflugers Arch.*, **386** (1980) 121-126.
- [68] H. Westerblad, D.G. Allen, Changes of intracellular pH due to repetitive stimulation of single fibres from mouse skeletal muscle, *J. Physiol.*, **449** (1992) 49-71.
- [69] B.A. Webb, M. Chimenti, M.P. Jacobson, D.L. Barber, Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression, *Nat. Rev. Cancer*, **11** (2011) 671-677.

- [70] W.S. Davidson, A. Jonas, D.F. Clayton, J.M. George, Stabilization of α -synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes, *J. Biol. Chem.*, **273** (1998) 9443-9449.
- [71] Z. Jiang, S.K. Hess, F. Heinrich, J.C. Lee, Molecular details of α -synuclein membrane association revealed by neutrons and photons, *J. Phys. Chem. B*, **119** (2015) 4812-4823.
- [72] C.L. Ugalde, V.A. Lawson, D.I. Finkelstein, A.F. Hill, The role of lipids in α -synuclein misfolding and neurotoxicity, *J. Biol. Chem.*, **294** (2019) 9016-9028.
- [73] C.A. Crane, K. Austgen, K. Haberthur, C. Hofmann, K.W. Moyes, L. Avanesyan, L. Fong, M.J. Campbell, S. Cooper, S.A. Oakes, A.T. Parsa, L.L. Lanier, Immune evasion mediated by tumor-derived lactate dehydrogenase induction of NKG2D ligands on myeloid cells in glioblastoma patients, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111** (2014) 12823-12828.
- [74] V.R. Fantin, J. St-Pierre, P. Leder, Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance, *Cancer Cell*, **9** (2006) 425-434.
- [75] M. Koukourakis, A. Tsolou, S. Pouliliou, I. Lamprou, M. Papadopoulou, M. Ilemosoglou, G. Kostoglou, D. Ananiadou, E. Sivridis, A. Giatromanolaki, Blocking LDHA glycolytic pathway sensitizes glioblastoma cells to radiation and temozolomide, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **491** (2017) 932-938.
- [76] M.G. Vander Heiden, L.C. Cantley, C.B. Thompson, Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation, *Science*, **324** (2009) 1029-1033.
- [77] M. Gallo, L. Sapio, A. Spina, D. Naviglio, A. Calogero, S. Naviglio, Lactic dehydrogenase and cancer: an overview, *Front. Biosci. (Landmark Ed.)*, **20** (2015) 1234-1249.
- [78] C.J. Valvona, H.L. Fillmore, P.B. Nunn, G.J. Pilkington, The Regulation and Function of Lactate Dehydrogenase A: Therapeutic Potential in Brain Tumor, *Brain Pathol.*, **26** (2016) 3-17.
- [79] K. Goetze, S. Walenta, M. Ksiazkiewicz, L.A. Kunz-Schughart, W. Mueller-Klieser, Lactate enhances motility of tumor cells and inhibits monocyte migration and cytokine release, *Int. J. Oncol.*, **39** (2011) 453-463.
- [80] C. Chesnelong, M.M. Chaumeil, M.D. Blough, M. Al-Najjar, O.D. Stechishin, J.A. Chan, R.O. Pieper, S.M. Ronen, S. Weiss, H.A. Luchman, J.G. Cairncross, Lactate dehydrogenase A silencing in IDH mutant gliomas, *Neuro. Oncol.*, **16** (2014) 686-695.

- [81] N. Mack, E.A. Mazzi, D. Bauer, H. Flores-Rozas, K.F. Soliman, Stable shRNA Silencing of Lactate Dehydrogenase A (LDHA) in Human MDA-MB-231 Breast Cancer Cells Fails to Alter Lactic Acid Production, Glycolytic Activity, ATP or Survival, *Anticancer Res.*, **37** (2017) 1205-1212.
- [82] M. Zdravlevic, A. Brand, L. Di Ianni, K. Dettmer, J. Reinders, K. Singer, K. Peter, A. Schnell, C. Bruss, S.M. Decking, G. Koehl, B. Felipe-Abrio, J. Durivault, P. Bayer, M. Evangelista, T. O'Brien, P.J. Oefner, K. Renner, J. Pouyssegur, M. Kreutz, Double genetic disruption of lactate dehydrogenases A and B is required to ablate the "Warburg effect" restricting tumor growth to oxidative metabolism, *J. Biol. Chem.*, **293** (2018) 15947-15961.
- [83] N.C. Wildburger, P.L. Wood, J. Gumin, C.F. Lichti, M.R. Emmett, F.F. Lang, C.L. Nilsson, ESI-MS/MS and MALDI-IMS Localization Reveal Alterations in Phosphatidic Acid, Diacylglycerol, and DHA in Glioma Stem Cell Xenografts, *J. Proteome Res.*, **14** (2015) 2511-2519.
- [84] T. Usuki, H. Sakai, T. Shionoya, N. Sato, F. Sakane, Expression and localization of type II diacylglycerol kinase isozymes δ and η in the developing mouse brain, *J. Histochem. Cytochem : Official Journal of the Histochemistry Society*, **63** (2015) 57-68.
- [85] S. Mizuno, H. Sasai, A. Kume, D. Takahashi, M. Satoh, S. Kado, F. Sakane, Dioleoyl-phosphatidic acid selectively binds to α -synuclein and strongly induces its aggregation, *FEBS Lett.*, **591** (2017) 784-791.
- [86] H. Yamada, S. Mizuno, S. Honda, D. Takahashi, F. Sakane, Characterization of α -synuclein N-terminal domain as a novel cellular phosphatidic acid sensor, *FEBS J.*, **287** (2020) 2212-2234.

第3章

Synaptojanin-1 は多価不飽和脂肪酸を
含有するホスファチジン酸分子種と
相互作用して活性化される

【概要】

Synaptojanin-1 (SYNJ1) は神経細胞に強く発現する phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂) の inositol 環の D4-、および、D5-phosphatase であり、PI(4,5)P₂ の 2 段階の脱リン酸化を触媒することで、clathrin-mediated endocytosis (CME) を促進する。リポソーム沈降法により SYNJ1 の脂質結合能を検証した結果、SYNJ1 は調べたリン脂質のうち PA のみに強く結合した。さらに PA 分子種の中でも 18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PA などの PUFA-PA と選択的に強く結合し、一方、16:0/16:0-PA、16:0/18:1-PA、18:1/18:1-PA、18:0/18:0-PA などの SFA/MUFA-PA とは結合しなかった。さらに、18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PA は N 末端に位置し、D4-phosphatase 活性を有する SAC1 ドメインを介して SYNJ1 に結合した。また、18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PA は SYNJ1 の SAC1 ドメインに結合することで D4-phosphatase 活性を選択的に亢進し、D5-phosphatase 活性に影響しなかった。

以上より、18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PA は SYNJ1 の SAC1 ドメインを介して強く結合することで標的とし、さらに、その D4-phosphatase 活性を亢進した。

【緒言】

Phosphatidylcholine (PC)、phosphatidylethanolamine (PE)、phosphatidylglycerol (PG)、phosphatidylserine (PS)、phosphatidylinositol (PI)、phosphoinositides、cardiolipin (CL)、phosphatidic acid (PA) などのグリセロリン脂質は、細胞膜の重要な構成成分である。極性頭部を水層側に、非極性側鎖を内側に向けて脂質二重層を形成する。これらのグリセロリン脂質の中で PA は、sn-1 と sn-2 の位置に 2 つの脂肪酸側鎖が結合し、sn-3 の位置にリン酸基が結合した最も単純な構造を有する。[1]。PA は、種々の生理学的、および、病理学的機能を有する脂質セカンドメッセンジャーとして重要な働きを担う [2-6]。

前述のように、細胞内における PA 産生は、DGK による DG のリン酸化 [7] と、ホスホリパーゼ D (PLD) による PC の加水分解 [8] によって促進される。さらに、細胞膜リン脂質の *de novo* 合成の重要な中間体として機能する PA は、lysoPA acyltransferase (LPAAT) によって供給される [9]。したがって、細胞内における PA の生合成はいくつかの経路に由来する。さらに、これらの PA 産生酵素は、種々の疾患の病因に関与していることが報告されている [5,10-13]。PA は、様々な数の炭素原子 (14-22) と二重結合 (0-6) からなる、種々の脂肪酸側鎖を持つ多様な分子種で構成されている。その結果、哺乳類細胞は 50 種類以上の構造的に異なる PA 分子種を有する。しかし、各 PA 分子種、特にそれらの相互作用タンパク質の異なる役割はほとんどわかっていない [2]。

本研究では、脳から 18:0/22:6-PA 結合タンパク質として、パーキンソン病関連タンパク質 (PARK20) [14] である synaptojanin-1 (SYNJ1) を同定した。SYNJ1 は phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂) に結合する inositol 環の D5-、および、D4-ホスファターゼであり、clathrin を介したシナプス小胞のエンドサイトーシスとリサイクルの調節に不可欠なタンパク質である [15-18]。また、

機能解析により、SYNJ1 はその N 末端 SAC1 ドメインを介して 18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PA などの多価不飽和脂肪酸 (PUFA) を含む PA 分子種と選択的に相互作用することがわかった。なお、SAC1 ドメインは PI 4-monophosphate (PI(4)P) の D4-ホスファターゼ活性を有するが、PI(4,5)P₂ の D4-ホスファターゼ活性を持たない。さらに、18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PA は、SYNJ1 の D4-ホスファターゼ活性を有意に増強した。したがって、我々は、SYNJ1 が PUFA-PA と結合することによって機能的に制御されるユニークな PUFA 含有 PA 結合タンパク質であることを明らかにした。

【手法】

試薬

脂質: L- α -phosphatidylcholine from egg yolk (PC mixture)、1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphate (16:0/16:0-PA)、1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphate (16:0/18:1-PA)、1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphate (18:1/18:1-PA)、1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphate (18:0/18:0-PA)、1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphate (18:0/20:4-PA)、1-stearoyl-2-docosahexaenoyl-sn-glycero-3-phosphate (18:0/22:6-PA)、1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (18:1/18:1-PE)、1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphosetine (16:0/16:0-PS)、1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoserine (18:1/18:1-PS)、1,3-bis[1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho]-glycerol (18:1/18:1/18:1/18:1-CL)、1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphatidylinositol (18:0/20:4-PI)、および、1-stearoyl-2-docosahexaenoyl-sn-glycero-3-phospho-glycerol (18:0/22:6-PG) は、Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) から購入。コレステロール (Chol) は Wako Pure Chemicals (Tokyo, Japan) から購入した。

抗体: マウスモノクローナル抗 6×His 抗体 (D291-3S) は、Medical and Biological Laboratories (Nagoya, Japan) から購入した。マウスモノクローナル抗 FLAG タグ抗体 (F1804) は、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。

実験動物

C57BL/6N マウス (SLC Japan, Inc.) は千葉大学動物実験実施規程 (許可番号:動 2-227) に基づき、適切な環境下で飼育を行い、実験に必要な試料 (全脳の mRNA、および、ホモジネート) を得るために頸椎脱臼後に解剖し、臓器を摘出した。

プラスミドとコンストラクト

p3×FLAG-SYNJ1-WT、p3×FLAG-SYNJ1-C383S、p3×FLAG-SYNJ1-SAC1 (aa 1~500)、p3×FLAG-SYNJ1-5-phosphatase (aa 501~1070)、および、p3×FLAG-SYNJ1-PRD (aa 1071~1311) を作製するため、human SYNJ1 (UniProt accession ID: O43426-2) をコードする cDNA、および、その欠失変異体を p3×FLAG-CMV-7.1 ベクターの NotI/SalI 部位に挿入した。また、pET-28a-SYNJ1-SAC1 を作製するため、human SYNJ1-SAC1 をコードする cDNA を pET-28a ベクターの SalI/EcoRI 部位に挿入した。

リポソームの作製

マウス全脳における 18:0/22:6-PA 特異的結合タンパク質の同定: 18:0/22:6-PG リポソーム [Chol (30 mol%)、PC mix (60 mol%)、および、18:0/22:6-PG (10 mol%)], および、18:0/22:6-PA リポソーム [Chol (30 mol%)、PC mix (60 mol%)、および、18:0/22:6-PA (10 mol%)]. 窒素気流下で乾燥させた脂質混合物に 25 mM HEPES バッファー (pH 7.4) [100 mM NaCl、1 mM DTT] を加え、95°C で 45 分間水和し、水和中に 15 分ごとに 1 回 1 分間ボルテックスした。次に、リポソームを 5 回の凍結融解サイクル (-196°C で 3 分間、95°C で 3 分間) にかけた [19]。次に、リポソームを、Mini extruder (Avanti Polar Lipids: Alabaster, AL, USA) を使用して 100 nm のポリカーボネート膜を通して 11 回押し出した [20]。Mini extruder は、使用前に 95°C に加温したものをを用いた。

前述の [21] の脂質混合物を使用して、SYNJ1 タンパク質の脂質結合能の解析を行なった。PC リポソーム [Chol (30 mol%)、および、PC mix (70 mol%)], リン脂質-含有リポソーム [Chol (30 mol%)、PC mix (60 mol%)、および、リン脂質 (PE、PS、PG、PI、および、CL) (10 mol%)], および、PA リポソーム [Chol (30 mol%)、

PC mix (60 mol%)、および、各 PA 分子種 (10 mol%)。脂質結合能解析では、乾燥させた脂質混合物を 25 mM HEPES バッファー (pH 7.4) [100 mM NaCl, 1 mM DTT] で 95°C で 45 分間水和し、水和中に 15 分ごとに 1 回 1 分間ボルテックスした。次に、リポソームを 5 回の凍結融解サイクル (-196°C で 3 分間、95°C で 3 分間) にかけて。リポソームは、Branson Sonifier 450 [22] によって 90°C で超音波処理、または、Mini extruder を使用して形成した (Figure 2E-H)。

PA 結合タンパク質としての SYNJ1 の同定

マウス全脳 (11 週齢の雄マウス) を 50 mM HEPES バッファー (pH 7.2) [150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, および、cOmplete EDTA free protease inhibitor cocktail (Roche Applied Science, Penzberg, Germany)] でホモジナイズした。マウス脳ホモジネートを PC リポソームとともに 4°C で 30 分間転倒混和し、PC リポソームに結合した非特異的タンパク質を 200,000 × g、4°C で 1 時間の超遠心分離によって除去した。得られた上清を 18:0/22:6-PG-リポソーム、または、18:0/22:6-PA リポソームとともに 4°C で 30 分間転倒混和した後、200,000 × g、4°C で 1 時間の超遠心分離によりリポソームを沈降させた。沈降画分を、25 mM HEPES バッファー (pH 7.4) [100 mM NaCl, 1 mM DTT] で再懸濁した。18:0/22:6-PG リポソーム、または、18:0/22:6-PA リポソームと共沈したタンパク質を SDS/PAGE で分離し、銀染色で検出した (Figure 1A)。約 150 kDa バンドのゲル内酵素消化と LC-MS/MS タンパク質の同定は、第 1 章の記載内容と同様に実施した [24]。

COS-7 細胞で発現した 3×FLAG-SYNJ1 のリポソーム結合アッセイ

PolyFect (Qiagen, Venlo, Netherlands) を使用した細胞培養とトランスフェクションは、以前に説明されているように行なった [25]。トランスフェクショ

ンの 24 時間後、3×FLAG-SYNJ1 を発現した COS-7 細胞を氷冷した PBS で 3 回洗淨した後、25 mM HEPES バッファー (pH 7.4) [100 mM NaCl、1 mM DTT、cOmplete EDTA free protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics)] で回収した。超音波処理後、超遠心分離 (200,000 × g、4°C で 30 分間) によって不溶性物質を除去した。上記で作製したリポソーム (2 mM 総脂質、450 μL) を細胞溶解物 (450 μL) に添加し、4°C で 30 分間転倒混和した後、サンプルを 200,000 × g、4°C で 1 時間、超遠心分離によりリポソームを沈降させた。沈降画分は 25 mM HEPES バッファー (pH 7.4) [100 mM NaCl、1 mM DTT、cOmplete EDTA free protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics)] で再懸濁した。

ホスファターゼ活性測定

3×FLAG-alone、3×FLAG-SYNJ1-WT、または、3×FLAG-SYNJ1-C383S 変異体の哺乳類細胞発現コンストラクトを COS-7 細胞にトランスフェクションした (100 mm dish あたり 5 μg のプラスミド)。24 時間後、細胞を 1 mL の 25 mM HEPES バッファー (pH 7.4) [100 mM NaCl、1 mM DTT、cOmplete EDTA free protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics)] で回収し、200,000 × g で 30 分間 4°C で超遠心分離によりリポソームを沈降させた。得られた上清のうち (5 μL) をリポソーム溶液 (125 mM) に最終 25 μL の容量になるように添加した。混合物を 5 分ごとにタッピングしながら 4°C で 30 分間転倒混和した。タンパク質-リポソーム溶液の混合サンプル (5 μL) を、20 μL の phosphoinositide 基質 (L-α-PI(4)P (脳、ブタ由来)、L-α-PI(4,5)P₂ (脳、ブタ由来) (Avanti Polar Lipids: Alabaster, AL, USA)) を含むチューブに加えた。次に反応溶液を 37°C で 25 分間転倒混和した。その後、反応溶液を 125 μL の BIOMOL Green 試薬 (Enzo Life Sciences、Farmingdale、NY、USA)を含むチューブに移し、BIOMOL 反応を室温で 45 分間進行させた。

生成された遊離リン酸塩は、600nm の波長でプレートリーダーによって測定した。

Western blotting

SDS サンプルバッファーに溶出したタンパク質を SDS-PAGE で分離した。分離したタンパク質を PVDF (Wako Pure Chemicals (Tokyo, Japan)) に転写し、5% (w/v) skim milk/TBS-T (10 mM Tris / HCl (pH 7.4)、150 mM NaCl、0.05% (v/v) Tween 20) で室温で 1 時間ブロッキングした。TBS-T で洗浄した後、メンブレンを 5% (w/v) skim milk/TBS-T で希釈した抗体とともに 4°C で 16 時間攪拌した。次に、抗マウス IgG 抗体を 5% (w/v) skim milk で 10000 倍に希釈した溶液を 5 μ L 加え、室温で 1 時間反応させた。抗体反応後、TBS-T で 5 分間、3 回洗浄し、ECL 溶液 1 と 2 を 500 μ L ずつ混ぜた溶液をメンブレンに浸した後、暗室にて ECL film に感光させることでタンパク質バンドの検出を行った。次にフィルムの感光度を Image J software を用いてタンパク質バンドの強度を定量した。

6×His タグ融合 SYNJ1-SAC1 ドメインの発現と精製

6×His-SYNJ1-SAC1 (pET-28a ベクター、SalI/NotI サイト) をコードする発現プラスミドで形質転換した Rosetta2-DE3 細胞を、100 μ g/mL アンピシリンを添加した LB 培地で 0.45 の OD₆₀₀ の細胞密度になるまで 37°C で増殖させた。大腸菌細胞を 0.1 mM IPTG の存在下で 16°C で 10 時間インキュベートし、遠心分離によって回収した。沈降画分を 10 mM リン酸ナトリウムバッファー (pH 8.0) [300 mM NaCl、0.05% Nonidet P-40、20 mg/mL アプロチニン、20 mg/mL ロイペプチン、および、20 mg/mL ペプスタチンを含む] で再懸濁し、氷上でタンパク質を十分に冷却した状態を保って超音波処理を行うことによって可溶化した。

その後、遠心分離 (15,000 × g、4°C で 1 時間) を行い、上清画分のタンパク質を Ni²⁺-Sepharose 6 Fast Flow カラム (GE Healthcare) でのアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。ビーズを 20 mL の Wash バッファー (10 mM イミダゾール、50 mM リン酸ナトリウム、pH 8.0、300 mM NaCl) で洗浄した。続いて、結合したタンパク質を溶出バッファー (300 mM イミダゾール、50 mM リン酸ナトリウム、pH 8.0、300 mM NaCl) で溶出した。溶出したタンパク質サンプルを、25 mM HEPES、pH 7.4、100 mM NaCl、および、1mM DTT で平衡化した ENrichSEC650 10 × 300 カラム (Bio-Rad Laboratories、Hercules、CA、USA) でゲル濾過クロマトグラフィーを行なった。

統計解析

全てのデータは 平均値 ± SD で示し、one-way ANOVA 後に Tukey's post hoc test で統計処理を行い、有意差があるのかどうかを比較解析した。統計処理には GraphPad Prism 8 (GraphPad) を用いて、 $p < 0.05$ の時に有意差があると判定した。

【結果】

マウス脳において 18:0/22:6-PA と結合するタンパク質の同定

マウス脳ホモジネートを 18:0/22:6-PA 含有リポソーム、および、18:0/22:6-PG 含有リポソームと転倒混和し、次に超遠心分離によりリポソームを沈降させた。18:0/22:6-PA リポソームの沈降物では分子量約 150 kDa の高強度バンドが検出されたが、18:0/22:6-PG-リポソームでは検出されなかった (Figure 1A)。ゲル内酵素消化、および、液体クロマトグラフィー (LC)-タンデム質量分析法 (MS/MS) により、synaptojanin-1 (SYNJ1) (計算分子量: 約 145,000 Da (Figure 1B)) が 18:0/22:6-PA 結合タンパク質の候補として同定された。Figure 1B に示したように、*SCORE* (同定の確からしさ)、および、*emPAI* (サンプル中のタンパク質量の指標) は、それぞれ 674 と 0.45 であった。

Clathrin を介したシナプス小胞のエンドサイトーシスとリサイクルの調節に不可欠な SYNJ1 [15,16] は、生体膜のホスホイノシチドを脱リン酸化する [26]。このタンパク質は、N 末端の SAC1 ドメイン、中央の 5-phosphatase、および、C 末端の proline-rich domain (PRD) という 3 つの機能ドメインを有する (Figure 1C) [15,27]。SYNJ1 は主に、PI(4,5)P₂ を脱リン酸化して PI(4)P を産生する D5-ホスファターゼとして知られている [15]。さらに、SAC1 ドメインは、PI(4)P の D4-ホスファターゼ活性を有する [17、18]。ただし、SAC1 ドメインは PI(4,5)P₂ を PI(5)P に変換する D4-ホスファターゼ活性を示さず、その結果、PI(4)P のみを脱リン酸化する [18]。重要なことに、シナプス小胞輸送を制御するには、D5-ホスファターゼ活性と D4-ホスファターゼ活性の両方が必要である [28]。

次に、リポソーム沈降法を用いて、SYNJ1 の 18:0/22:6-PA への結合活性を検証した。その結果、3×FLAG-SYNJ1 の約 2%のみが、バックグラウンドコントロールとして PC (中性リン脂質) のみを含むリポソームと共沈した (Figure

1D、および、E)。さらに、酸性リン脂質コントロールとして用いた 18:0/22:6-PG-リポソームは、わずか約 10%の 3×FLAG-SYNJ1 と共沈した。一方、3×FLAG-SYNJ1 の約 38%が 18:0/22:6-PA リポソームと共沈しており、SYNJ1 が PC、および、18:0/22:6-PG リポソームよりも 18:0/22:6-PA リポソームとより強く相互作用することがわかった。

SYNJ1 は 18:0/20:4-PA や 18:0/22:6-PA のような多価不飽和脂肪酸を含有する PA 分子種と相互作用する

様々な脂肪酸側鎖を有する PA 分子種に対する SYNJ1 の結合選択性を明らかにするため、16:0/16:0-PA、16:0/18:1-PA、18:1/18:1-PA、18:0/18:0-PA、18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PA などの種々の PA 分子種を含むリポソームを使用してリポソーム沈降法を行なった。Figure 2A、および、B に示すように、18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PA は 3×FLAG-SYNJ1 に強く結合した。一方、16:0/16:0-PA、16:0/18:1-PA、18:1/18:1-PA、および、18:0/18:0-PA は、3×FLAG-SYNJ1 と相互作用しなかった (Figure 2A、および、B)。したがって、これらの結果は、SYNJ1 が 18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PA などの PUFA-PA と選択的に相互作用することを示している。

SYNJ1 は PUFA-PA と相互作用し、他のリン脂質とは相互作用しない

SYNJ1 のリン脂質結合特異性を調べるために、PC、PE、PS、CL、PI、PG、PA などの中性、または、酸性リン脂質を含むリポソームを使用してリポソーム沈降法を行なった。Figure 2C、および、D に示すように、3×FLAG-SYNJ1 は非常に強い PA 結合活性を示した。一方、PC、PE、PS、CL、PI、PG などの他のリン脂質は 3×FLAG-SYNJ1 と相互作用しなかった。以上より、これらの結果は、

SYNJ1 が PUFA-PA と特異的に相互作用することを示している。

リポソームの粒径は SYNJ1 と 18:0/22:6-PA との相互作用に影響しない

次に、異なる粒径 (100 nm、400 nm、および、1000 nm) のリポソームを使用してリポソーム沈降法を行なった。Figure 2E-H に示すように、3×FLAG-SYNJ1 はすべてのサイズの 18:0/22:6-PA 含有リポソームと同程度に強く相互作用したが、PC、16:0/16:0-PA、16:0/16:0-PS、および、18:0/22:6-PG リポソームとは相互作用しなかった。したがって、種々のリポソームの粒径によって形成される異なる膜の曲率、および、形状は、SYNJ1 と 18:0/22:6-PA との相互作用に影響を及ぼさない可能性がある。

SYNJ1 の SAC1 ドメインは 18:0/20:4-PA および 18:0/22:6-PA と相互作用する

Figure 1C に示すように、SYNJ1 は N 末端の SAC1 ドメインと C 末端の PRD、および、中央の 5-phosphatase で構成されている。このタンパク質のどのドメインが 18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PA との相互作用に寄与するかを調べるために、3×FLAG-SYNJ1-SAC1、3×FLAG-SYNJ1-5-phosphatase、または、3×FLAG-SYNJ1-PRD のドメイン欠損変異体を使用してリポソーム沈降法を行なった。その結果、全長 3×FLAG-SYNJ1 (WT) の場合と同様に (Figure 1D、E、および 2A、B)、3×FLAG-SYNJ1-SAC1 は 18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PA リポソームに強く結合したが、PC、および、18:0/22:6-PG リポソームには結合しないことがわかった (Figure 3A、および、B)。一方、3×FLAG-SYNJ1-5-phosphatase (Figure 3C、および、D) および 3×FLAG-SYNJ1-PRD (Figure 3E、および、F) はどのリポソームとも結合しなかった。以上より、SYNJ1 は N 末端領域の SAC1 ドメインを介して 18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PA と選択的に相互作用する

ことがわかった。

18:0/20:4-PA および 18:0/22:6-PA は SYNJ1 の D4-ホスファターゼ活性を選択的に亢進する

SYNJ1 の SAC1 ドメインが PUFA- PA 分子種 (18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PA) 相互作用することで機能的に制御されるかどうかを調べるために、PUFA-PA を含むリポソームが SYNJ1 の D4-ホスファターゼ活性を変化させるかどうかを調べた。Hughes らの研究グループ [18] は SAC1 ホスファターゼが触媒活性に重要であるシステイン残基を持つコンセンサス配列 C(X₅)RT/S (aa 383-390) を有することを報告した [14,17] (Figure 4A)。そこで、まず、SYNJ1 の C383S 変異が D4-ホスファターゼ活性を欠失させることを確認した。3×FLAG-SYNJ1-WT、および、3×FLAG-SYNJ1-C383S を COS-7 細胞で発現させた後、細胞溶解物を使用してホスファターゼ活性を測定した。3×FLAG alone のみをトランスフェクションした COS-7 細胞溶解物と比較して、PI(4)P を基質に用いた場合、SYNJ1-WT 発現細胞溶解物のホスファターゼ活性は有意に増加した (0.09 ± 0.02 nmol/min/μg の増加) (Figure 4B)。しかし、SYNJ1-C383S はそのような増加を示さなかった (Figure 4B)。したがって、SYNJ1 の C383S 変異が D4-ホスファターゼ活性をほぼ完全に欠失していることを確認した。さらに、PI(4,5)P₂ を基質として使用した場合 (Figure 4C)、SYNJ1-WT のホスファターゼ活性は有意に増加した (0.22 ± 0.05 nmol/min/μg の増加)。一方、SYNJ1-C383S は、野生型 SYNJ1 と比較しておよそ半分の増加 (0.12 ± 0.01 nmol/min/μg の増加) しか示さなかった (Figure 4C)。さらに、PI(4,5)P₂ を基質にした場合の SYNJ1-WT と SYNJ1-C383S のホスファターゼ活性の差分 (0.12 ± 0.05 nmol/min/μg) (Figure 4C) は、PI(4)P を基質にした場合の SYNJ1-WT のホスファターゼ活性 (0.09 ± 0.05 nmol/min/μg)

と比較してほぼ同じであった。これらの結果は、C383S 変異体が SYNJ1 の D5-ホスファターゼ活性ではなく、D4-ホスファターゼ活性のみを欠損させたという以前の報告と一致している [28]。

次に、18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PA が SYNJ1 の D4-、および/または、D5-ホスファターゼ活性を変化させるかどうかを調べた。まず、PI(4)P を基質として使用した場合、SYNJ1-WT のホスファターゼ活性は 18:0/20:4-PA および 18:0/22:6-PA によって大幅に (約 3.5~4 倍) 増加した (Figure 4D)。一方、PC、および、18:0/22:6-PG ではこのような活性の増加は確認できなかった (Figure 4D)。また、SYNJ1-WT とは対照的に、C383S 変異体の活性は 18:0/20:4-PA、または、18:0/22:6-PA の影響を受けなかった。これらの結果は、18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PA が D4-ホスファターゼ活性を著しく増強したことを示している (Figure 4D)。

PI(4,5)P₂ を基質として使用した場合、SYNJ1-WT のホスファターゼ活性は 18:0/22:6-PA によってわずかに増強され、18:0/20:4-PA によって変化しなかった (Figure 4E)。また、SYNJ1-C383S のホスファターゼ活性も 18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PA によって変化しなかった (Figure 4E)。ここで、PUFA-PA が SYNJ1 の D5-ホスファターゼ活性を増強する場合、D5-ホスファターゼ活性を有する SYNJ1-C383S でもホスファターゼ活性が亢進される可能性があるが、そのような増強は検出されなかった (Figure 4E)。また、SYNJ1-WT と SYNJ1-C383S の両方が 18:0/22:6-PA と同程度に強く相互作用することを確認した (Figure 4H、および、I)。以上より、これらの結果は、18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PA などの PUFA 含有 PA が SYNJ1 の D5-ホスファターゼ活性ではなく D4-ホスファターゼ活性を選択的に活性化することを示している。

SYNJ1 の D4-ホスファターゼ活性は多価不飽和脂肪酸を含有する PA 分子種によって選択的に活性化され、他のリン脂質や飽和脂肪酸を含有する PA 分子種によって活性化されない

Zhong らの研究グループは、酵母に発現する SAC1 が、パルミチン酸 (16:0) やカプリル酸 (8:0) などの短鎖、および、飽和脂肪酸を含む PI、PS、および、PA によって活性化されるアロステリック酵素であると報告した [29]。したがって、SYNJ1 の SAC1 ドメインは、18:0/22:6-PA に加えて酸性リン脂質によっても活性化される可能性がある。これを確認するために、SYNJ1 の D4-、および/または、D5-ホスファターゼ活性が 16:0/16:0-PA、16:0/16:0-PS、18:1/18:1-PS、18:1/18:1/18:1/18:1-CL、18:0/20:4-PI、および、18:0/22:6-PG によって変化するかどうかを解析した。その結果、Figure 4F に示すように、SYNJ1 の D4-ホスファターゼ活性は 18:0/22:6-PA によって増加したが、16:0/16:0-PA を含む他の酸性リン脂質は活性化しなかった。さらに、これらの酸性リン脂質が D5-ホスファターゼ活性に有意な影響を及ぼさないことを確認した (Figure 4G)。したがって、これらの結果は、PUFA 含有 PA 分子種 (18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PA) が SYNJ1 の D4-ホスファターゼ活性を選択的に増強したことを強く示唆している。

精製した SYNJ1-SAC1 ドメインは 18:0/22:6-PA との相互作用によって活性化される

PUFA-PA が SYNJ-1 の SAC1 ドメインに結合することを確認し、ドメインの D4-ホスファターゼ活性の酵素学的パラメーターに対する PUFA 含有 PA 分子種の影響を解析するために、6×His-SYNJ1-SAC1 を使用してホスファターゼ活性測定を行なった。6×His-SYNJ1-SAC1 は、大腸菌細胞で発現し、Ni²⁺アフィニティークロマトグラフィー (Figure 5A)、および、ゲル濾過クロマトグラフィー

(Figure 5B) によって精製した。精製した 6×His-SYNJ1-SAC1 (計算分子量: 56.9 kDa) は、ゲル濾過クロマトグラフィーの予想される位置 (59 kDa) で単量体として溶出された (Figure 5B)。Figure 5C、および、D に示すように、18:0/22:6-PA リポソームは、PC リポソームと比較して、精製した 6×His-SYNJ1-SAC1 に対して高い親和性を示した。また、18:0/22:6-PA の SYNJ1-SAC1 に対する解離定数 (K_d) は $0.5 \mu\text{M}$ であった (Figure 5C、および、D)。SYNJ1-SAC1 に対する 18:0/22:6-PA の K_d 値は、他の PA 結合タンパク質である α -シヌクレイン (18:1/18:1-PA: $6.6 \mu\text{M}$) [25]、LDHA (18:0/18:0-PA: $3.8 \mu\text{M}$) [21]、および、CKM (16:0/16:0-PA: $2.0 \mu\text{M}$) [30] と比較して同程度であった。さらに、予想通り、18:0/22:6-PA リポソームの存在下では、精製 SYNJ1-SAC1 の D4-ホスファターゼ活性は、PC リポソームの存在下よりも有意に高い活性を示した (Figure 5E)。18:0/22:6-PA の存在下における PI(4)P を気質としたミカエリス定数 (K_m)、および、最大反応速度 (V_{\max}) の値はそれぞれ、 $15.4 \pm 2.8 \mu\text{M}$ 、および、 $7.6 \pm 0.5 \text{ nmol/min}/\mu\text{g}$ (SD, $n = 3$) であった (Figure 5F)。18:0/22:6-PA の非存在下においては、 K_m 値は 18:0/22:6-PA 存在下と同等であったが、 V_{\max} 値は、18:0/22:6-PA がある場合の値よりも低かった ($18.7 \pm 8.7 \mu\text{M}$ 、および、 $3.2 \pm 0.6 \text{ nmol/min}/\mu\text{g}$ (\pm SD, $n = 3$)) (Figure 5F)。これらの結果は、18:0/22:6-PA が SYNJ1 による PI(4)P 加水分解の代謝回転を促進することを示唆している。

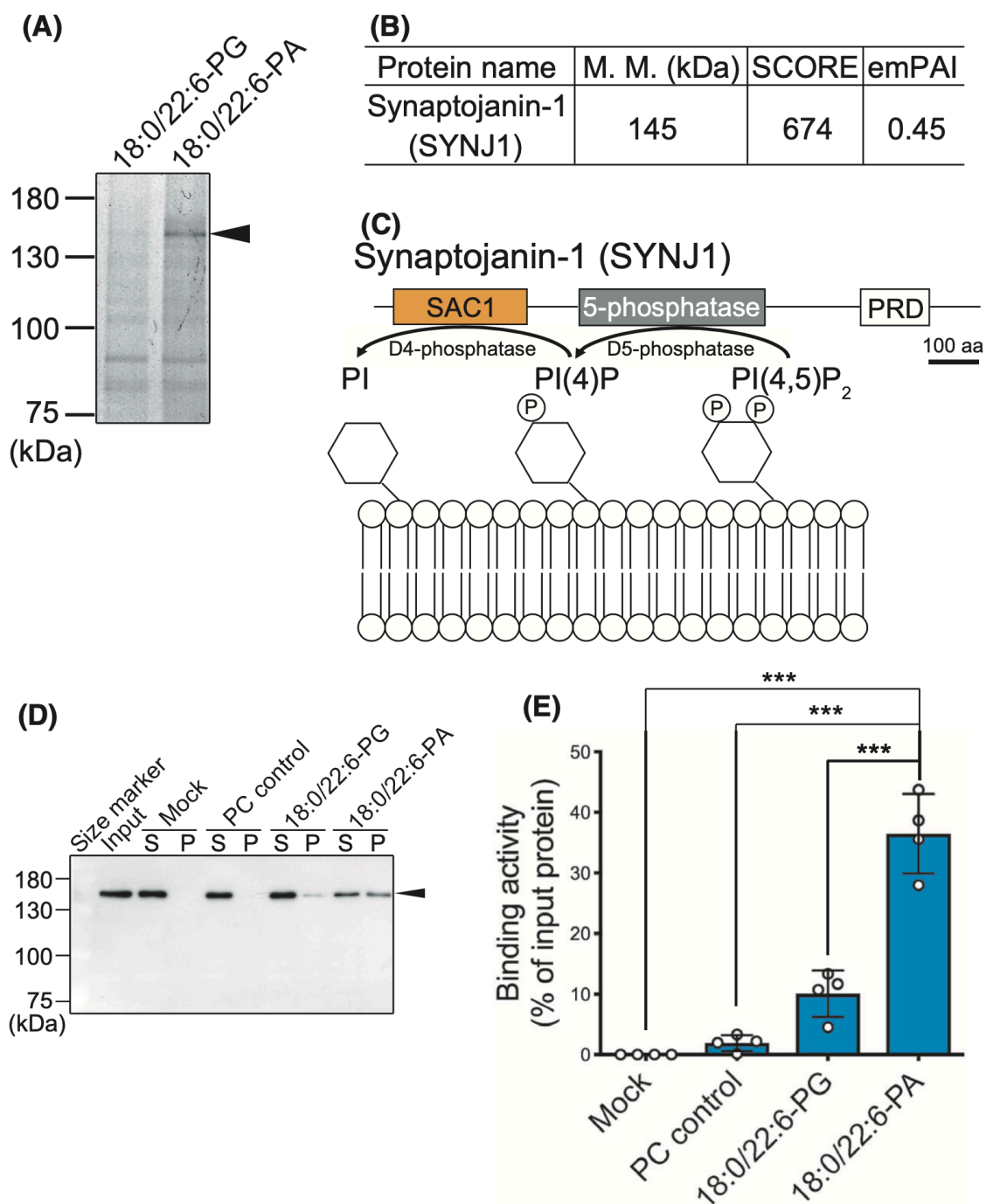


Figure 1. マウス脳における 18:0/22:6-PA 結合タンパク質としての SYNJ1 の同定

(A) 11 週齢の雄マウス全脳ホモジネートを、18:0/22:6-PA 含有リポソーム、または、18:0/22:6-PG 含有リポソームと転倒混和し、次に超遠心分離によりリポソームを沈降させた。18:0/22:6-PA 結合タンパク質と 18:0/22:6-PG 結合タンパク質を

SDS-PAGE (7.5%アクリルアミド) で分離し、銀染色で検出した。黒い矢印でマークされたバンドを切り出し、ゲル内酵素消化後、LC-MS/MS でタンパク質を同定した。(B) LC-MS/MS で同定された synaptojanin-1 (SYNJ1)。SCORE (同定の確からしさ) と *emPAI* (サンプル中のタンパク質量の指標) を示した。(C) SYNJ1 の3つの機能ドメイン、PI(4)P を基質とする SAC1 ドメイン、PI(4,5)P₂ 基質とする 5-phosphatase ドメイン、および、エンドフィリンなどの種々の SH3 ドメイン含有アダプタータンパク質と相互作用する proline-rich domain (PRD)。(D) PC、18:0/22:6-PG-, 18:0/22:6-PA リポソームを使用した 3×FLAG-SYNJ1 のリポソーム沈降法 [PC リポソーム: PC/Chol = 70/30 mol%]、[18:0/22:6-PG-リポソーム: PG/PC/Chol = 10/60/30 mol%]、[18:0/22:6-PA リポソーム: PA/PC/Chol = 10/60/30 mol%]。3×FLAG-SYNJ1 を過剰発現した COS-7 細胞溶解物を、PC、18:0/22:6-PG、または、18:0/22:6-PA リポソームと転倒混和し、超遠心分離によりリポソームを沈降させた。SDS-PAGE (7.5%アクリルアミド) を行い、抗 FLAG 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより分離したタンパク質を検出した。3×FLAG-SYNJ1 の位置は、黒い矢印で示した。(E) 上清画分 (S)、および、沈降画分 (P) 中の 3×FLAG-SYNJ1 タンパク質のバンド強度を、Image J software を使用したデンストメトリーによって定量した。結合活性は、上清画分、および、沈降画分のバンド強度の総和に対する沈降画分のバンド強度の比率として算出した。(平均値±SD、n = 4)、***P<0.005

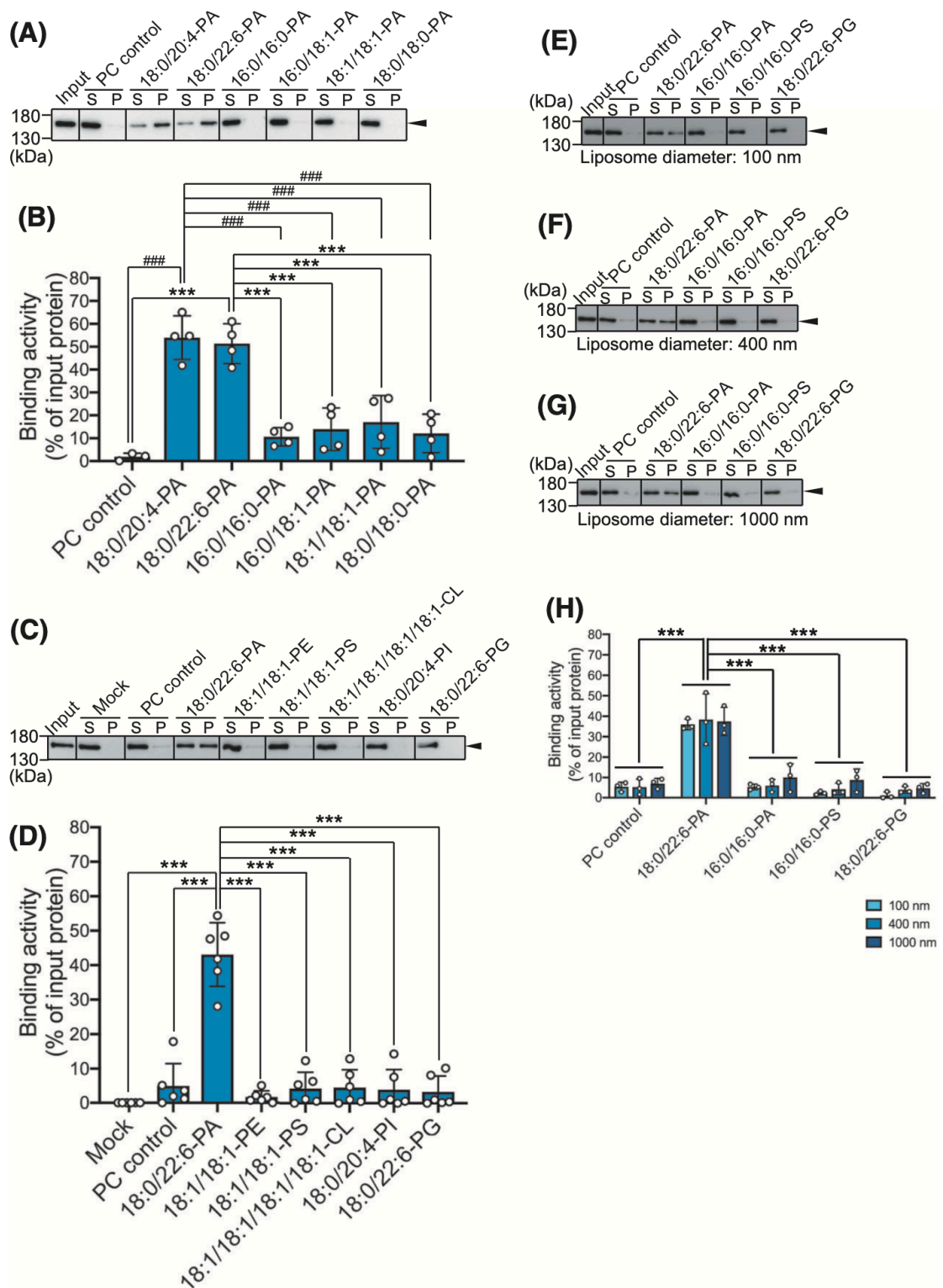


Figure 2. 3×FLAG-SYNJ1 は、18:0/20:4-PA および 18:0/22:6-PA と選択的に相互作用するが、他の PA 分子種またはリン脂質とは相互作用しない

異なる脂肪酸側鎖を有する PA 分子種 (A、および、B)、または、リン脂質 (C、および、D) を含むリポソームを使用して 3×FLAG-SYNJ1 のリポソーム沈降法を行なった。3×FLAG-SYNJ1 を過剰発現した COS-7 細胞溶解物をリポソームと転倒混和した後、超遠心分離によりリポソームを沈降させた。[PA リポソーム: PA/PC/Chol = 10/60/30 mol%、PC リポソーム: PC/Chol = 70/30 mol%、PE リポソーム: PE/PC/Chol = 10/60/30 mol%、PS リポソーム: PS/PC/Chol = 10/60/30 mol%、CL リポソーム: CL/PC/Chol = 10/60/30 mol%、PI リポソーム: PI/PC/Chol = 10/60/30 mol%、PG リポソーム: PG/PC/Chol = 10/60/30 mol%]。次に、SDS-PAGE (7.5%アクリルアミド) を行い、抗 FLAG 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより分離タンパク質を検出した。3×FLAG-SYNJ1 の位置は、黒い矢印で示した。(B、および、D) 上清画分 (S)、および、沈降画分 (P) 中の 3×FLAG-SYNJ1 タンパク質のバンド強度を、Image J software を使用したデンシトメトリーによって定量した。Binding activity (結合活性)は、上清画分、および、沈降画分のバンド強度の総和に対する沈降画分のバンド強度の比率として算出した。結合活性の値は 4 回 (A と B) と 6 回 (C と D) の独立した実験結果の平均値±SD として表記した。*P<0.05、***P<0.005 (vs. 18:0/22:6-PA)、####P<0.005 (vs. 18:0/20:4-PA) (E-H) Mini extruder によって形成された異なる粒径 (100 nm (E)、400 nm (F)、および、1000 nm (G)) のリポソームを使用した 3×FLAG-SYNJ1 のリポソーム沈降法は、上述と同様の実験手順で行なった。(平均値±SD、n = 3)、***P<0.005

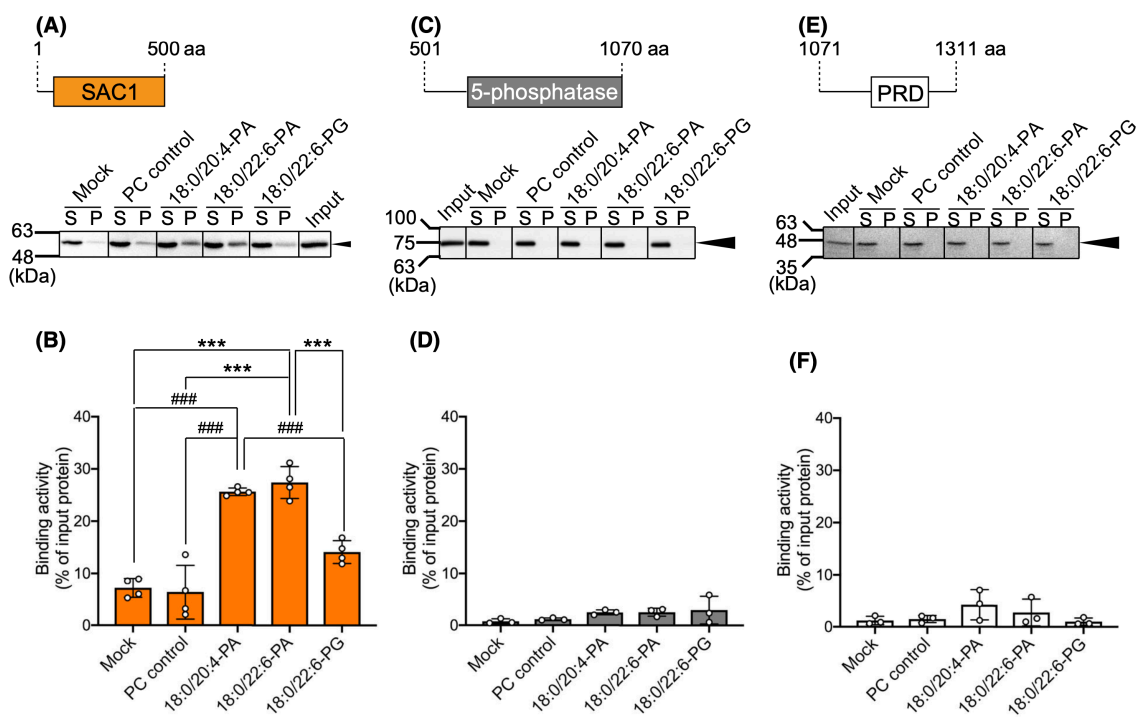


Figure 3. SYNJ1 の SAC1 ドメインは、18:0/20:4-PA および 18:0/22:6-PA に選択的に結合する

PC、18:0/22:6-PG、18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PA リポソームを使用した SYNJ1 の 3 つのドメイン欠失変異体のリポソーム沈降法

[PC リポソーム: PC/Chol = 70/30 mol%、18:0/22:6-PG リポソーム: PG/PC/Chol = 10/60/30 mol%、PA リポソーム: PA/PC/Chol = 10/60/30 mol%]。

(A) 3×FLAG-SYNJ1-SAC1 (aa 1-500)、(C) 3×FLAG-SYNJ1-5-phosphatase (aa 501-1070)、(E) 3×FLAG-SYNJ1-PRD (aa 1071-1311) それぞれを過剰発現した COS-7 細胞溶解物と PC、18:0/22:6-PG、18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PA リポソームと転倒混和し、次に超遠心分離によりリポソームを沈降させた。SDS-PAGE (7.5% アクリルアミド) を行い、抗 FLAG 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより分離タンパク質を検出した。3×FLAG-SYNJ1-SAC1、3×FLAG-SYNJ1-5-phosphatase、および、3×FLAG-SYNJ1-PRD の位置は、それぞれ黒い矢印で示した。

(B、D、および、F) 上清画分 (S)、および、沈降画分 (P) 中の 3×FLAG-SYNJ1-

SAC1、3×FLAG-SYNJ1-5-phosphatase、および、3×FLAG-SYNJ1-PRD タンパク質のバンド強度を、Image J software を使用したデンシトメトリーによって定量した。Binding activity (結合活性) は、上清画分、および、沈降画分のバンド強度の総和に対する沈降画分のバンド強度の比率として算出した。(平均値±SD、n=4)、***P<0.005 (vs. 18:0/22:6-PA リポソーム)、###P<0.005 (vs. 18:0/20:4-PA リポソーム)

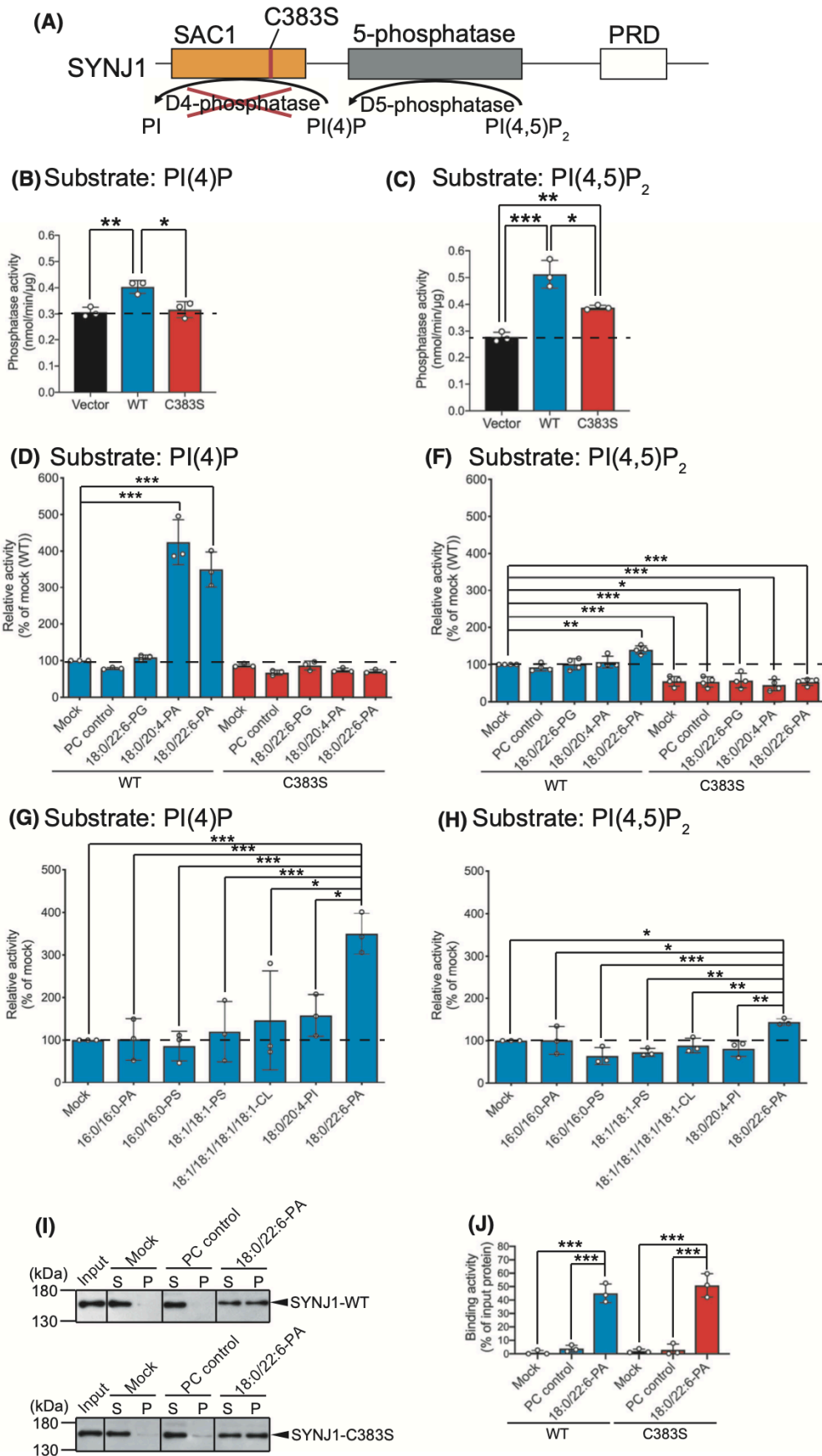


Figure 4. PUFA-PA は SYNJ1 の D4-ホスファターゼ活性を選択的に亢進する

(A) SYNJ1-SAC1 の D4-ホスファターゼ活性欠損変異体 (SYNJ1-C383S) の作製。
(B、および、C) 3×FLAG alone、3×FLAG SYNJ1-WT、および、3×FLAG SYNJ1-C383S をコードするプラスミドを COS-7 細胞にトランスフェクションした。COS-7 細胞溶解物を 20 μM の PI(4)P、または、PI(4,5)P₂ と転倒混和し、生成された遊離リン酸をマラカイトグリーンホスファターゼアッセイを使用して測定した。(平均値±SD、n = 4)、*P<0.05、**P<0.01 および***P<0.005。(D、および、E) 25 μM の PC、18:0/22:6-PG、18:0/20:4-PA、または、18:0/22:6-PA リポソームの存在、または、非存在下において 20 μM の PI(4)P、または、PI(4,5)P₂ と転倒混和した 3×FLAG-SYNJ1-WT、または、3×FLAG-SYNJ1-C383S を発現した COS-7 細胞溶解物から産生された遊離リン酸をマラカイトグリーンホスファターゼアッセイを使用して測定した。(平均値±SD、n = 3)、***P<0.005。
(F、および、G) 25 μM の 16:0/16:0-PA、16:0/16:0-PS、18:1/18:1-PS、18:1/18:1/18:1/18:1-CL、18:0/20:4-PI、または、18:0/22:6-PA リポソームの存在、または、非存在下において、20 μM の PI(4)P、または、PI(4,5)P₂ と転倒混和した 3×FLAG-SYNJ1-WT、または、3×FLAG-SYNJ1-C383S を発現した COS-7 細胞溶解物から産生された遊離リン酸をマラカイトグリーンホスファターゼアッセイを使用して測定した。(平均値±SD、n = 3)、*P<0.05、**P<0.01、および、***P<0.005。
(H、および、I) PC、および、18:0/22:6-PA リポソームを使用した SYNJ1-WT、および、SYNJ1-C383S のリポソーム沈降法 [PC リポソーム: PC/Chol = 70/30 mol%、PA リポソーム: PA/PC/Chol = 10/60/30 mol%]。3×FLAG-SYNJ1-WT (H)、および、3×FLAG-SYNJ1-C383S (I) を過剰発現した COS-7 細胞溶解物を、PC、および、18:0/22:6-PA リポソームと転倒混和し、超遠心分離によりリポソームを沈降させた。SDS-PAGE (7.5%アクリルアミド) を行い、抗 FLAG 抗体を用いたウエスタ

ンブロットティングにより分離タンパク質を検出した。3×FLAG-SYNJ1-WT、および、3×FLAG-SYNJ1-C383S の位置は、黒い矢印で示した。上清画分 (S)、および、沈降画分 (P) 中の 3×FLAG-SYNJ1-WT、および、3×FLAG-SYNJ1-C383S タンパク質のバンド強度を、Image J software を使用したデンシトメトリーによって定量した。Binding activity (結合活性) は、上清画分、および、沈降画分のバンド強度の総和に対する沈降画分のバンド強度の比率として算出した。(平均値±SD、n = 3)、***P<0.005。

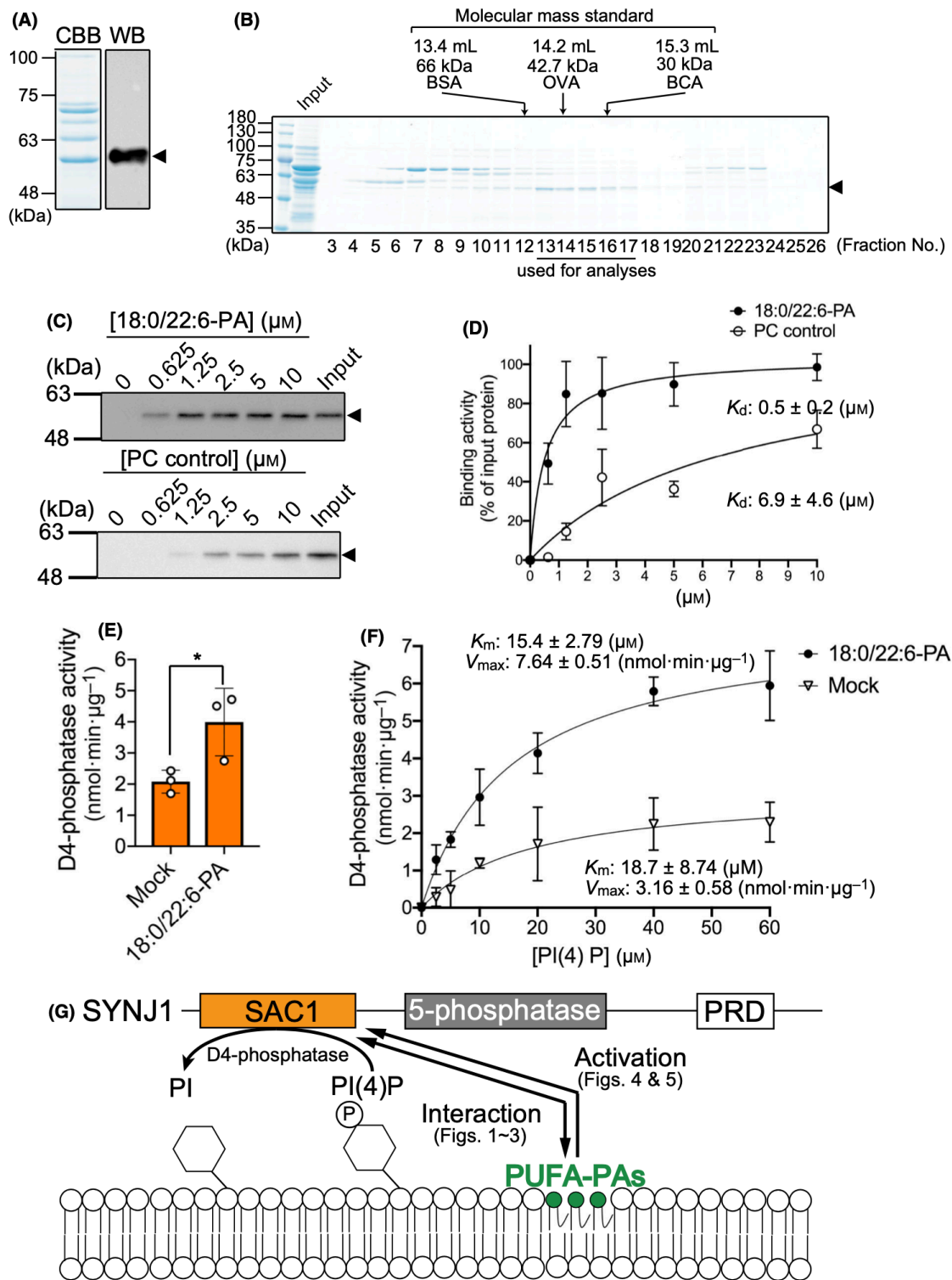


Figure 5. 精製した SYNJ1-SAC1 ドメインは、18:0/22:6-PA と相互作用して活性化される

(A) Ni^{2+} アフィニティークロマトグラフィーによって精製した 6×His-SYNJ1-

SAC1 の SDS-PAGE (10%アクリルアミド)。分離したタンパク質を CBB で染色し、抗 6×His 抗体を使用してウェスタンブロッティングを行なった。(B) Ni²⁺アフィニティークロマトグラフィー精製後にゲル濾過クロマトグラフィーを行なって精製した 6×His-SYNJ1-SAC1 (aa 1 ~ 500) の SDS-PAGE (10%アクリルアミド)。分子量検量線 (BSA: ウシ血清アルブミン (66 kDa)、OVA: オボアルブミン (42.7 kDa)、および、BCA: ウシ炭酸脱水酵素 (30 kDa)) の画分番号と位置を示した。画分番号 13~17 に含まれる得られたタンパク質は、その後の実験で用いた。6×His-SYNJ1-SAC1 タンパク質バンドは、黒い矢印で示した。(C、および、D) 18:0/22:6-PA の濃度依存的な 6×His-SYNJ1-SAC1 に対する結合活性。精製した 6×His-SYNJ1-SAC1 (10 nM) を、示した濃度 (0、0.625、1.25、2.5、5、および、10 μM) の (上部画像) 18:0/22:6-PA、または、(下部画像) PC リポソームとともに転倒混和し、超遠心分離によりリポソームを沈降させた。SDS-PAGE (10 %アクリルアミド) を行い、続いて抗 6×His 抗体を使用したウェスタンブロッティングを行なった。6×His-SYNJ1-SAC1 の位置は、黒い矢印で示した。(D) 沈降画分のタンパク質のバンド強度は、Image J software を使用したデンシトメトリーによって定量した。Binding activity (結合活性) は、総バンド強度 (*Input*) と比較した沈降画分バンド強度の比率として算出した。(平均値±SD、n = 3)、解離定数 K_d は、GraphPad Prism 8 (Dissociation-One phase exponential decay) を使用して決定した。(E) 80 μM の PI(4)P 存在下での SYNJ1-SAC1 の D4-ホスファターゼ活性。(F) SYNJ1-SAC1 の D4-ホスファターゼ活性を PI(4)P 濃度 (μM) の関数としてプロットした。測定された吸光度値 (600 nm) は、既知の遊離リン酸塩濃度 (40 ~ 0.625 μM) で個別に測定されたリン酸塩標準曲線に基づいて、産生された遊離リン酸塩の量 (nmol) に変換した。(平均値±SD、n = 3)、 K_m と V_{max} の値は、GraphPad Prism 8 (nonlinear regression (curve fit) model) を使用して算出した。(F) PUFA-PA

による SYNJ1 の D4-ホスファターゼ活性の活性化のメカニズム。本研究では、SYNJ1 が SAC1 ドメイン (Figure 1-3) を介して PUFA-PA (18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PA) と選択的に相互作用することを示した。PUFA-PA は、PI(4)P を基質として使用した場合にのみ SYNJ1 の活性を増強する (Figure 4-5)。

【考察】

本研究 (Figure 5G) では、SYNJ1 が PI(4)P の D4-ホスファターゼ活性を有する N 末端 SAC1 ドメイン [17,18] を介して 18:0/20:4-PA や 18:0/22:6-PA などの PUFA 含有 PA 分子種と特異的、かつ、強力に相互作用することを初めて示した (Figure 1-3)。さらに、PUFA-PA 分子種は、SYNJ1 の D4-ホスファターゼ活性のみを選択的に亢進し、D5-ホスファターゼ活性には影響しなかった (Figure 4、および、5)。

SYNJ1 は、PA を含むリポソームと選択的に共沈降したが、PC、PE、PS、CL、PI、PG などの他のリン脂質を含むリポソームとは共沈しなかった (Figure 1、および、2)。この選択性は、負に帯電した小さな極性ヘッドグループや円錐形のかさばる脂肪酸側鎖など、PA の静電的、および、構造的特性に応じて発生する可能性がある。中性リン脂質である PC、および、PE と比較して、PA の負に帯電したヘッドグループは SYNJ1 との相互作用に寄与した (Figure 2A、および、B)。さらに、SYNJ1 は、PA よりも大きなヘッドグループを持つ他の酸性リン脂質、PS、CL、PI、および、PG に対して結合しなかったことから (Figure 2A、および、B)、リン脂質に結合する極性頭部のサイズも寄与している可能性がある。また、PA と同様に円錐形の脂質である PE [4] は、SYNJ1 と相互作用しなかったことから (Figure 2A、および、B)、円錐形だけでは SYNJ1 に PA 結合活性を与えるのに十分ではないことを示唆している。今回調べた PA 分子種の中で、18:0/20:4-PA や 18:0/22:6-PA などの PUFA 含有 PA 分子種は SYNJ1 と相互作用したが、一方で、16:0/16:0-PA、16:0/18:1-PA、18:1/18:1-PA、および、18:0/18:0-PA などの SFA/MUFA-PA とは相互作用しなかった (Figure 2C、および、D)。生物物理学的測定により、PUFA アシル鎖は二重結合の剛性にもかかわらず高いコンフォメーションの柔軟性を持っていることが示されている [31]。したがって、

SYNJ1 と PUFA-PA の相互作用は、PA の分子単位だけでなく、PUFA によって引き起こされる負の曲率や流動性などの膜環境に起因する可能性が高い。以上より、SYNJ1 との結合のリン脂質選択性は、おそらく PA の固有の特性によるものであると考えられる。Chang-Ileto らの研究グループは、SYNJ1 を介した PI(4,5)P₂ の加水分解が正の膜曲率によって制御されることを報告している [32]。したがって、SYNJ1 は脂質二重層膜の微小環境に非常に敏感であることが示唆されている。ただし、種々のリポソームの直径によって形成される正の曲率が、SYNJ1 と 18:0/22:6-PA との相互作用に影響を与える可能性は低い (Figure 2E-H)。我々は SYNJ1 が *in vitro* で PUFA-PA に選択的に結合することを示したが、生理学的膜条件下における SYNJ1 のリン脂質選択性を明らかにするためにはさらなる研究が必要である。

SYNJ1 は、clathrin を介したエンドサイトーシスとエンドソームリサイクリングにおいて重要な役割を果たす [15,16]。SYNJ1 は 2 つのホスホイノシチドホスファターゼ活性 (D5-、および、D4-ホスファターゼ活性) を有しており、どちらも clathrin の解離とホスホイノシチドシグナル伝達の停止を促進する [17, 18, 28]。SYNJ1 欠損マウスは神経学的障害を示し、出生直後に死亡する。また、SYNJ1 欠損マウスのニューロンでは、PI(4,5)P₂ レベルが上昇し、clathrin でコーティングされた小胞が蓄積することがわかっている [26,33]。興味深いことに、18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PA は、SAC1 ドメインの D4-ホスファターゼ活性のみを選択的に活性化し、D5-ホスファターゼ活性は活性化しなかった (Figure 4、5E、および、5F)。我々は以前、DGK δ が脳において 18:0/22:6-DG を選択的に利用して 18:0/22:6-PA を産生し [34]、また、COS-7 細胞で clathrin 重鎖と共局在することを明らかにした [35]。また、Kawasaki らは、DGK δ がキナーゼ活性依存的に clathrin 依存性エンドサイトーシスを調節することを報告した [36]。

これらの報告は、DGK δ によって産生される 18:0/22:6-PA が SYNJ1 活性を制御することによって clathrin 依存性エンドサイトーシスの調節に参与していることを示唆している。PLD は、主に SFA と MUFA を含有する PC 分子種を加水分解する。したがって、PLD は PUFA を含む PA を産生する可能性は低いと考えられる。

Ser1163 (PRD 内) における SYNJ1 のリン酸化は、SYNJ1 の D5-ホスファターゼ活性を増強し、SYNJ1 とエンドフィリン間の相互作用を促進し、効率的なエンドサイトーシスを促進する [37,38]。しかしながら、SYNJ1 の D4-ホスファターゼ活性の調節因子に関しては不明点が多い。本研究では、18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PA が全長 SYNJ1 (Figure 4)、および、その SAC1 ドメインのみ (Figure 5) の D4-ホスファターゼ活性を著しく増加させることを示した。SYNJ1 には、エンドフィリンなどの SH3 ドメインを含むタンパク質と相互作用する PRD が含まれている [39]。さらに、SYNJ1 は、PRD を介したタンパク質間相互作用によって PI(4,5)P₂ に富む細胞膜に誘導される [40]。本研究で我々は SYNJ1 が SAC1 ドメインを介して PUFA-PA と相互作用し (Figure 3、および、5)、それらによって活性化されることを示した (Figure 4、および、5)。したがって、PUFA-PA は、PRD-SH3 ドメインの相互作用によって細胞膜に誘導された SYNJ1 による PI(4)P の脱リン酸化を促進する可能性がある。さらに、SH3 ドメインを含むタンパク質に加えて、PUFA-PA は SYNJ1 をシナプス小胞膜に誘導する可能性が考えられる (Figure 5G)。脳のリン脂質は長鎖 PUFA が豊富に存在しており [41]、さらに、Marza らは、長鎖 PUFA の枯渇は、シナプスでの SYNJ1 の局在を調節することにより、効率的なシナプス小胞のリサイクルに欠陥を誘発することを報告した [42]。これらの報告は、SYNJ1 が神経終末でのエンドサイトーシスを促進するために PUFA-PA の標的となるという我々の報告を裏付けている。

以上をまとめると、本研究で我々は初めて、PUFA-PA (18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PA) が N 末端 SAC1 ドメインを介して SYNJ1 と特異的に相互作用することを示した (Figure 5G)。さらに、PUFA-PA は SYNJ1 の D4-ホスファターゼ活性を増強したが、D5-ホスファターゼ活性を変化させなかった。これまで、SYNJ1 の D4-、および、D5-ホスファターゼ活性の重要性が繰り返し示唆されてきた。しかし、その酵素学的性質、特に活性化因子に関しては不明点が多かった。本研究では PUFA-PA が SYNJ1 を特異的に標的とする活性化因子であることを示した。

【参考文献】

- [1] Kooijman, E.E. and Burger, K.N.J. (2009). Biophysics and function of phosphatidic acid: A molecular perspective. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **1791**, 881-888.
- [2] Sakane, F., Hoshino, F. and Murakami, C. (2020). New Era of Diacylglycerol Kinase, Phosphatidic Acid and Phosphatidic Acid-Binding Protein. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 6794
- [3] Stace, C.L. and Ktistakis, N.T. (2006). Phosphatidic acid- and phosphatidylserine-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1761**, 913-26.
- [4] Zhukovsky, M.A., Filograna, A., Luini, A., Corda, D. and Valente, C. (2019). Phosphatidic acid in membrane rearrangements. *FEBS Lett.* **593**, 2428-2451.
- [5] Bruntz, R.C., Lindsley, C.W. and Brown, H.A. (2014). Phospholipase D signaling pathways and phosphatidic acid as therapeutic targets in cancer. *Pharmacol. Rev.* **66**, 1033-79.
- [6] Kim, S.C. and Wang, X. (2020). Phosphatidic acid: an emerging versatile class of cellular mediators. *Essays Biochem.* **64**, 533-546.
- [7] Sakane, F., Imai, S., Kai, M., Yasuda, S. and Kanoh, H. (2007). Diacylglycerol kinases: why so many of them? *Biochim. Biophys. Acta* **1771**, 793-806.
- [8] Peng, X. and Frohman, M.A. (2012). Mammalian phospholipase D physiological and pathological roles. *Acta Physiol. (Oxf.)* **204**, 219-26.
- [9] Bradley, R.M. and Duncan, R.E. (2018). The lysophosphatidic acid acyltransferases (acylglycerophosphate acyltransferases) family: one reaction, five enzymes, many roles. *Curr. Opin. Lipidol.* **29**, 110-115.
- [10] Frohman, M.A. (2015). The phospholipase D superfamily as therapeutic targets. *Trends Pharmacol. Sci.* **36**, 137-44.
- [11] Douvas, M.G., Hogan, K.N., Ji, Y., Hollenback, D., Bonham, L., Singer, J.W. and Mitchell, B.S. (2006). Effect of lysophosphatidic acid acyltransferase-beta inhibition in acute leukemia. *Leuk. Res.* **30**, 1027-36.
- [12] Springett, G.M. et al. (2005). Lysophosphatidic acid acyltransferase-beta is a prognostic marker and therapeutic target in gynecologic malignancies. *Cancer Res.* **65**, 9415-25.
- [13] Sakane, F., Mizuno, S. and Komenoi, S. (2016). Diacylglycerol Kinases as Emerging Potential Drug Targets for a Variety of Diseases: An Update. *Front. Cell Dev. Biol.* **4**, 82.
- [14] Krebs, C.E. et al. (2013). The Sac1 domain of SYNJ1 identified mutated in a

- family with early-onset progressive Parkinsonism with generalized seizures. *Hum. Mutat.* **34**, 1200-7.
- [15] McPherson, P.S., Czernik, A.J., Chilcote, T.J., Onofri, F., Benfenati, F., Greengard, P., Schlessinger, J. and De Camilli, P. (1994). Interaction of Grb2 via its Src homology 3 domains with synaptic proteins including synapsin I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 6486-90.
- [16] Vidyadhara, D.J., Lee, J.E. and Chandra, S.S. (2019). Role of the endolysosomal system in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **150**, 487-506.
- [17] Guo, S., Stolz, L.E., Lemrow, S.M. and York, J.D. (1999). SAC1-like domains of yeast SAC1, INP52, and INP53 and of human synaptojanin encode polyphosphoinositide phosphatases. *J. Biol. Chem.* **274**, 12990-5.
- [18] Hughes, W.E., Cooke, F.T. and Parker, P.J. (2000). Sac phosphatase domain proteins. *Biochem. J.* **350** Pt 2, 337-52.
- [19] Mayer, L.D., Hope, M.J., Cullis, P.R. and Janoff, A.S. (1985). Solute distributions and trapping efficiencies observed in freeze-thawed multilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **817**, 193-6.
- [20] Julkowska, M.M., Rankenberg, J.M. and Testerink, C. (2013). Liposome-binding assays to assess specificity and affinity of phospholipid-protein interactions. *Methods Mol. Biol.* **1009**, 261-71.
- [21] Hoshino, F. and Sakane, F. (2020). Polyunsaturated fatty acid-containing phosphatidic acids selectively interact with L-lactate dehydrogenase A and induce its secondary structural change and inactivation. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **1865**, 158768.
- [22] Bruni, A., Pitotti, A., Contessa, A.R. and Palatini, P. (1971). Role of phosphatidylserine and phosphatidylcholine in the dicyclohexylcarbodiimide-induced inhibition of mitochondrial ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **44**, 268-74.
- [23] Marquardt, D., Geier, B. and Pabst, G. (2015). Asymmetric lipid membranes: towards more realistic model systems. *Membranes (Basel)* **5**, 180-96.
- [24] Satoh, M., Haruta-Satoh, E., Yamada, M., Kado, S. and Nomura, F. (2013). Overexpression of hydroxymethylglutaryl CoA synthase 2 and 2,4-dienoyl-CoA reductase in rat pancreas following chronic alcohol consumption. *Pancreas* **42**, 475-82.
- [25] Yamada, H., Mizuno, S., Honda, S., Takahashi, D. and Sakane, F. (2020). Characterization of α -synuclein N-terminal domain as a novel cellular phosphatidic acid sensor. *FEBS J.* **287**, 2212-2234.

- [26] Cremona O, Di Paolo G, Wenk MR, Lüthi A, Kim WT, Takei K, Daniell L, Nemoto Y, Shears SB, Flavell RA, McCormick DA and De Camilli P. (1999). Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell* **99**, 179-88.
- [27] McPherson PS, Garcia EP, Slepnev VI, David C, Zhang X, Grabs D, Sossin WS, Bauerfeind R, Nemoto Y, De Camilli P. (1996). A presynaptic inositol-5-phosphatase. *Nature* **379**, 353-7.
- [28] Mani, M., Lee, S.Y., Lucast, L., Cremona, O., Di Paolo, G., De Camilli, P. and Ryan, T.A. (2007). The dual phosphatase activity of synaptojanin1 is required for both efficient synaptic vesicle endocytosis and reavailability at nerve terminals. *Neuron* **56**, 1004-18.
- [29] Zhong, S., Hsu, F., Stefan, C.J., Wu, X., Patel, A., Cosgrove, M.S. and Mao, Y. (2012). Allosteric activation of the phosphoinositide phosphatase Sac1 by anionic phospholipids. *Biochemistry* **51**, 3170-7.
- [30] Hoshino, F., Murakami, C., Sakai, H., Satoh, M. and Sakane, F. (2019). Creatine kinase muscle type specifically interacts with saturated fatty acid- and/or monounsaturated fatty acid-containing phosphatidic acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **513**, 1035-1040.
- [31] Feller, S.E. and Gawrisch, K. (2005). Properties of docosahexaenoic-acid-containing lipids and their influence on the function of rhodopsin. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**, 416-22.
- [32] Chang-Ileto, B., Frere, S.G., Chan, R.B., Voronov, S.V., Roux, A. and Di Paolo, G. (2011). Synaptojanin 1-mediated PI(4,5)P₂ hydrolysis is modulated by membrane curvature and facilitates membrane fission. *Dev. Cell* **20**, 206-18.
- [33] Cao, M., Park, D., Wu, Y. and De Camilli, P. (2020). Absence of Sac2/INPP5F enhances the phenotype of a Parkinson's disease mutation of synaptojanin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **117**, 12428-12434.
- [34] Lu, Q., Murakami, C., Murakami, Y., Hoshino, F., Asami, M., Usuki, T., Sakai, H. and Sakane, F. (2020). 1-Stearoyl-2-docosahexaenoyl-phosphatidic acid interacts with and activates Praja-1, the E3 ubiquitin ligase acting on the serotonin transporter in the brain. *FEBS Lett.* **594**, 1787-1796.
- [35] Imai, S., Yasuda, S., Kai, M., Kanoh, H. and Sakane, F. (2009). Diacylglycerol kinase delta associates with receptor for activated C kinase 1, RACK1. *Biochim. Biophys. Acta* **1791**, 246-53.
- [36] Kawasaki, T., Kobayashi, T., Ueyama, T., Shirai, Y. and Saito, N. (2008). Regulation of clathrin-dependent endocytosis by diacylglycerol kinase delta:

- importance of kinase activity and binding to AP2alpha. *Biochem. J.* **409**, 471-9.
- [37] Geng, J., Wang, L., Lee, J.Y., Chen, C.K. and Chang, K.T. (2016). Phosphorylation of Synaptojanin Differentially Regulates Endocytosis of Functionally Distinct Synaptic Vesicle Pools. *J. Neurosci.* **36**, 8882-94.
- [38] Lee, S.Y., Wenk, M.R., Kim, Y., Nairn, A.C. and De Camilli, P. (2004). Regulation of synaptojanin 1 by cyclin-dependent kinase 5 at synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 546-51.
- [39] Song, W. and Zinsmaier, K.E. (2003). Endophilin and synaptojanin hook up to promote synaptic vesicle endocytosis. *Neuron* **40**, 665-7.
- [40] Slepnev, V.I. and De Camilli, P. (2000). Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis. *Nat. Rev. Neurosci.* **1**, 161-72.
- [41] Choi, J., Yin, T., Shinozaki, K., Lampe, J.W., Stevens, J.F., Becker, L.B. and Kim, J. (2018). Comprehensive analysis of phospholipids in the brain, heart, kidney, and liver: brain phospholipids are least enriched with polyunsaturated fatty acids. *Mol. Cell. Biochem.* **442**, 187-201.
- [42] Marza, E., Long, T., Saiardi, A., Sumakovic, M., Eimer, S., Hall, D.H. and Lesa, G.M. (2008). Polyunsaturated fatty acids influence synaptojanin localization to regulate synaptic vesicle recycling. *Mol. Biol. Cell.* **19**, 833-42.

第 4 章

Clathrin coat assembly protein AP180 は
多価不飽和脂肪酸を含有する
ホスファチジン酸分子種と相互作用して
機能的に制御される

【概要】

Clathrin coat assembly protein AP180 は神経細胞に強く発現して clathrin-mediated endocytosis (CME) を促進する。CME は細胞膜受容体の内在化、神経伝達物質の取り込み、SARS-CoV-2 などのウイルスの侵入、シナプス小胞輸送など様々な生理機能に関与する。さらに、AP180 の機能不全は、アルツハイマー病の発症に関連がある。AP180 は PI(4,5)P₂ と結合して clathrin を細胞膜の特定の場に蓄積することで CME を誘導する。さらに、内在化した clathrin-coated vesicle は clathrin の解離によって初期エンドソームと融合し、分解、または、再利用される。しかし、clathrin の蓄積に比べて解離のメカニズムについては不明点が多い

リポソーム沈降法によって AP180 の脂質結合能を解析したところ、AP180 は調べたリン脂質の中で 18:0/22:6-PA と PI(4,5)P₂ と強く結合し、その結合活性は同程度であった。さらに、18:0/22:6-PA と AP180 との結合領域を検証したところ、N 末端領域 (1-289) の lysine-rich motif (K38-K39-K40) が相互作用に大きく寄与することがわかり、これにより、PI(4,5)P₂ と共通の結合領域を有することを明らかにした。興味深いことに、18:0/22:6-PA は、AP180 と clathrin の相互作用を大幅に減少させたが、PI(4,5)P₂ はそのような効果を示さなかった。

以上より、18:0/22:6-PA は AP180 の N 末端領域に位置する lysine-rich motif (K38-K39-K40) を介して結合することで標的とし、clathrin との相互作用を阻害する機能を有することを示した。

【緒言】

Clathrin coat assembly protein AP180 は、脳に強く発現して clathrin-mediated endocytosis (CME) の制御に関与するアダプタータンパク質の 1 つである [1]。AP180 N-terminal homology domain (ANTH) は phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂) に結合することにより、細胞膜に誘導される [2]。さらに、AP180 の C-terminal intrinsically disordered domain (CID) には、いくつかの clathrin 結合モチーフが含まれており、これらは細胞膜の特定の部位に clathrin を蓄積するため機能する [3]。したがって、AP180 は細胞膜に clathrin を含むケージを形成し、CME を促進するために不可欠である。

CME はすべての真核細胞で重要な機能を持ち、受容体の内在化、神経伝達物質の取り込み、シグナル伝達、病原体の排除など、多くの重要な生理学的機能を調節する [4]。さらに、CME は SARS-CoV-2 やインフルエンザウイルスなどのウイルスの侵入に不可欠なメカニズムでもある [5]。また、CME はアルツハイマー病 (AD) の発症に関連していると報告されている [6]。この場合、CME は神経細胞に毒性のある細胞外アミロイド前駆体タンパク質の内在化メカニズムに密接に関与していると言われている [7]。CME は上記のように生理学的、および、病理学的に重要である。特に、CME の一連のプロセスのうち、AP180/clathrin 含有ケージの分解メカニズムは不明点が多い。エンドサイトーシス機構タンパク質が clathrin 被覆小胞から解離することは別のエンドサイトーシスを開始するために必要であり、コーティングされていない小胞が初期エンドソームと融合して細胞内輸送イベントを促す可能性があるため、AP180/clathrin 含有ケージの集積、および、解離のメカニズムを理解することは重要である [8]。

哺乳類において 10 種類の isozyme が存在する DGK は DG をリン酸化してホスファチジン酸 (PA) を産生する [9,10]。近年、DGK の δ isozyme が、脳にお

いてドコサヘキサエン酸を含む PA 分子種 (18:0/22:6-PA) (X:Y = 炭素原子の総数:グリセロール骨格の脂肪アシル部分の二重結合の総数) [11]を選択的に産生することを見出した [11]。しかし、脳と神経細胞における 18:0/22:6-PA 分子種の生理学的機能と標的タンパク質はほとんどわかっていない [12]。したがって、本研究では、マウス脳を用いて 18:0/22:6-PA の標的タンパク質を探索した。

本研究では、AP180 を 18:0/22:6-PA 結合タンパク質として同定した。興味深いことに、種々のリン脂質、および、PA 分子種を含むリポソームを使用した脂質結合解析により、AP180 は PI(4,5)P₂ と同程度に 18:0/22:6-PA に最も強く結合することを明らかにした。さらに、18:0/22:6-PA は AP180 と clathrin の相互作用を阻害した。これらの結果は、18:0/22:6-PA が AP180 を標的にして CME における clathrin 含有ケージの分解を促進する新しいメカニズムの存在を示唆している。

【手法】

試薬

脂質：1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (16:0/18:1-PC)、1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphate (16:0/16:0-PA)、1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphate (16:0/18:1-PA)、1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphate (18:1/18:1-PA)、1-stearoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphate (18:0/18:1-PA)、1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphate (18:0/18:0-PA)、1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphate (18:0/20:4-PA)、1-stearoyl-2-docosahexaenoyl-sn-glycero-3-phosphate (18:0/22:6-PA)、1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (18:1/18:1-PE)、1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoserine (18:1/18:1-PS)、1,3-bis[1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho]glycerol (18:1/18:1/18:1/18:1-CL)、1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphatidylinositol (18:0/20:4-PI)、1-stearoyl-2-docosahexaenoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (18:0/22:6-PG)、および、1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (18:0/20:4-PI(4,5)P₂) は、Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) から購入した。コレステロール (Chol) は Wako Pure Chemicals (Tokyo, Japan) から購入した。1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (16:0/16:0-PI(4,5)P₂) は、Echelon Biosciences (Salt Lake City, UT, USA) から購入した。

抗体：マウスモノクローナル抗 6×His 抗体 (D291-3S)、および、ウサギポリクローナル抗 GST 抗体 (PM013) は、Medical & Biological Laboratories, Nagoya, Japan から購入した。マウスモノクローナル抗 clathrin heavy chain (CHC) 抗体 (610499) は、BD Transduction Laboratories (Lexington, KY) から購入した。

組換えタンパク質の発現

マウス脳 cDNA からプライマー 5'-GGTGGTCATATGTCTGGGCCAAACGCTC-3'、および、5'-GGTCTCGAGTTACAAGAAATCCTTGATGTTAAG-3'を使用してマウス AP180 の cDNA を増幅し、pET-28a、または、pGEX-6P-1 ベクターとライゲーションして Rosetta2-DE3 大腸菌細胞 (Novagen、Merck、Darmstadt、Germany) にトランスフェクトした。6×His タグ、および、GST タグ融合タンパク質の発現と精製は以前に記載されたように実施した [13,14]。

Western blotting

前章に記載されているようにウエスタンブロットティングを行った [15]。

リポソームの作製

超音波処理によるリポソームの作製は、前章に記載されたように実施した [16]。直径が 100nm、400 nm、または、1000 nm の異なるリポソームは、Mini Extruder (Avanti Polar Lipids: Alabaster, AL, USA) によって形成した [17]。

リポソーム沈降法

リポソーム沈降法は、以前に記載されたように実施した [16–18]。精製した 6×His タグタンパク質 (0.2 μM) を 25 mM HEPES バッファー (pH 7.4) [100 mM NaCl、1 mM DTT] に溶解し、リポソームとともに 4°C で 30 分間転倒混和した。インキュベーション後、サンプルを 200,000 × g、4°C で 1 時間、超遠心分離によりリポソームを沈降させた。沈降画分を 25 mM HEPES バッファー (pH 7.4) [100 mM NaCl、1 mM DTT] で再懸濁した。

Neuro-2a 細胞培養

Neuro-2a マウス神経芽細胞腫細胞は下記 [19] を参考にして実施した。Neuro-2a 細胞を 10% ウシ胎児血清 (Biological Industries, Beit-Haemek, Israel)、100 units/mL ペニシリン、および、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトマイシンを添加したダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM、Wako Pure Chemicals (Tokyo, Japan)) で、37°C、5%CO₂ 含有雰囲気下において培養した。

Glutathione S-transferase (GST) pull-down assay

GST プルダウンアッセイは Louche らの手法を参考にして実施した [20]。まず、下記のようにプルダウンバッファーを調製した [20 mM Tris (pH 7.4 (HCl)、150 mM NaCl、1 mM PMSF、cOmplete EDTA free protease inhibitor cocktail、1 mM EDTA、1 mM EGTA]。Neuro-2a 細胞溶解液 500 μL に対して、10 μg の GST alone、GST-AP180-WT、または、GST-AP180-KE を加え、4°C で 90 分、転倒混和した。その後、40 μL (NET20 μL) のグルタチオンセファロースビーズを加え、4°C で 90 分、転倒混和した。次に、7,700 $\times g$ 、4°C、10 秒間遠心分離して上清を捨てた後、500 μL のプルダウンバッファーを加えて転倒混和した。7,700 $\times g$ 、4°C、10 秒間遠心分離して上清を捨てた後、ビーズに 2 \times SDS サンプルバッファーを 50 μL 加え、95°C で 10 分間煮沸した。得られたサンプルは SDS-PAGE した後、CBB 染色、または、抗 clathrin heavy chain 抗体を用いた WB によって解析した。

統計解析

全てのデータは 平均値 \pm SD で示し、one-way ANOVA 後に Tukey's post hoc test で統計処理を行い、有意差があるのかどうかを比較解析した。統計処理には GraphPad Prism 8 (GraphPad) を用いて、 $p < 0.05$ の時に有意差があると判定した。

【結果】

AP180 は 18:0/22:6-PA および PI(4,5)P₂ と選択的に相互作用し、他のリン脂質とは相互作用しない

マウス脳ホモジネートから 18:0/22:6-PA 含有リポソームと共沈降したタンパク質を回収した後 [17]、液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析により、clathrin coat assembly protein AP180 を同定した。SCORE (同定の確からしさ) と *emPAI* は、それぞれ 513 と 0.63 であった (Figure 1A)。AP180 は、PI(4,5)P₂ に結合する ANTH (289 aa) と、clathrin と相互作用してケージを形成する CID (612 aa) で構成され、CME に不可欠である (Figure 1B) [2,3]。

マウス脳 mRNA の逆転写産物から AP180 の cDNA をクローニングし、pET-28a ベクターとライゲーションした。6×His タグ融合 AP180 タンパク質を大腸菌細胞で発現させ、Ni²⁺アフィニティークロマトグラフィーで精製した。SDS-PAGE、および、CBB 染色により、6×His-AP180 (約 150 kDa) が高純度に精製されたことを確認した (Figure 1C)。さらに、抗 6×His 抗体を用いたウエスタンブロットティング (WB) により、計算分子量 (91 kDa) (Figure 1A) よりも大きい 150 kDa バンドが 6×His-AP180 (Figure 1C) であることを確認した。

いくつかのリン脂質、PC、PE、PS、CL、PI、PG、PI(4,5)P₂、または、PA に対する AP180 の結合活性を調べるために、リポソーム沈降法を行なった。Figure 1D、および、E に示すように、18:0/22:6-PA、16:0/16:0-PI(4,5)P₂、および、18:0/20:4-PI(4,5)P₂ リポソームを用いた場合、6×His-AP180 の 30%以上が沈降画分で検出された。一方、PC、PE、PS、PI、CL、および、PG リポソームの場合、タンパク質は主に上清画分に存在した。6×His-AP180 の約 70%、30%、および、80%が 18:0/22:6-PA、16:0/16:0-PI(4,5)P₂、および、18:0/20:4-PI(4,5)P₂ リポソームそれぞれと相互作用した (Figure 1E)。

PA 分子種の脂肪酸側鎖の組成が AP180 の結合活性に影響を与える可能性があるため、16:0/16:0-PA、16:0/18:1-PA、18:1/18:1-PA、18:0/18:1-PA、18:0/18:0-PA、18:0/20:4-PA、または、18:0/22:6-PA を含有するリポソームを用いてリポソーム沈降法を行なった。Figure 1F、および、G に示すように、調べた PA 分子種は、AP180 に対して少なくとも 15% の結合活性を示した。その中で、18:0/18:0-PA は 18:0/22:6-PA と同程度に AP180 と相互作用した (Figure 1F、および、G)。

18:0/18:0-PA および 18:0/22:6-PA は AP180-ANTH の lysine-rich motif を介して相互作用する

AP180 の PA 相互作用領域を決定するために、大腸菌細胞で発現し、Ni²⁺アフィニティークロマトグラフィーで精製した AP180 の 2 つの欠失変異体 (6×His-ANTH (aa 1-289) と 6×His-CID (aa 290-901)) を使用してリポソーム沈降法を行なった (Figure 2A、および、B)。Figure 2C、および、D に示すように、18:0/18:0-PA、18:0/22:6-PA、および、PI(4,5)P₂ は、6×His-ANTH に対して強い結合活性を示した。一方、6×His-CID は、18:0/18:0-PA、18:0/22:6-PA、または、PI(4,5)P₂ と相互作用しなかった (Figure 2E、および、F)。

以前の研究により、ANTH は lysine-rich motif (Lys38-Lys39-Lys40) を介して PI(4,5)P₂ と直接相互作用することが示されている [2]。6×His-AP180-KE (Lys38-Lys39-Lys40 を Glu38-Glu39-Glu40 に変異) は、18:0/18:0-PA、18:0/22:6-PA、および、PI(4,5)P₂ との相互作用が著しく減少した (Figure 2G、および、H)。したがって、これらの結果は、ANTH の lysine-rich motif が PI(4,5)P₂ だけでなく PA との相互作用にも不可欠であり、PI(4,5)P₂ と PA が同じ部位を介して AP180 に結合することを示している。

AP180 と PA 分子種との詳細な相互作用様式の解析

PA や PI(4,5)P₂ などの酸性リン脂質の物理化学的特性は pH の影響を受ける [21,22]。Figure 3A、および、B に示すように、PI(4,5)P₂ への AP180 の結合活性は、以前に報告されたように、pH の増加とともに徐々に減少した [23]。一方、18:0/18:0-PA および 18:0/22:6-PA は、CME が起こる pH6.2–7.4 の範囲で AP180 に強く結合した。

clathrin 被覆小胞の直径は 60–120 nm である [24]。そこで、次に、100 nm、400 nm、または、1000 nm の異なる粒径のリポソームを使用してリポソーム沈降法を行なった。Figure 3C、および、D に示すように、AP180 はリポソームの粒径に関係なく PI(4,5)P₂ に強く結合した。一方、18:0/18:0-PA、および、18:0/22:6-PA の結合活性は、リポソームの粒径によって中程度の影響を受けた。

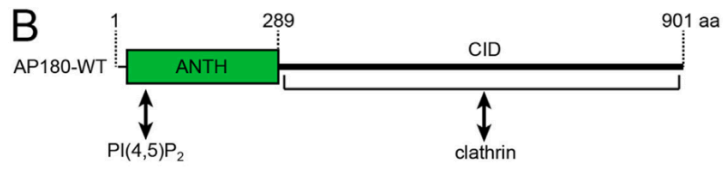
生体膜に存在する PI(4,5)P₂ と PA の濃度は、それぞれ総脂質のうちの 0.2–1%、および、1–5% である (mol%) [25,26]。そこで、次に、PA、または、PI(4,5)P₂ の含量が異なるリポソームを使用してリポソーム沈降法を行なった。AP180 の約 95%、および、約 30% が、それぞれ 5 mol% (Figure 3E、および、F)、および、1 mol% (Figure 3G、および、H) の PI(4,5)P₂ 含有リポソームと相互作用した。さらに、AP180 は、5 mol% (Figure 3E、および、F)、および、1 mol% (Figure 3G および H) の 18:0/22:6-PA 含有リポソームに対して約 55%、および、約 10% の結合活性を示した。これらの結果は、AP180 が生理学的条件下 (PA と phosphoinositides の生理的濃度) で PI(4,5)P₂、および、18:0/22:6-PA に結合できることを示している。さらに、低濃度では、18:0/22:6-PA は 18:0/18:0-PA よりも AP180 とより強く相互作用した (Figure 3E–H)。これらの結果は、18:0/22:6-PA の AP180 に対する親和性は 18:0/18:0-PA のものと比較して高いことを示している。

18:0/22:6-PA は AP180 と clathrin 重鎖との相互作用を減弱する

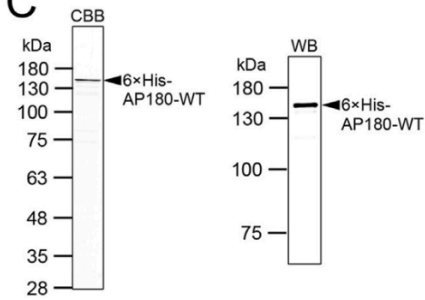
clathrin と AP180 の相互作用、および、clathrin からの解離に対する 18:0/22:6-PA の生理学的機能を解明するために、GST プルダウン法を行なった。GST-AP180-WT、および、GST-AP180-KE を大腸菌細胞で発現し、Ni²⁺アフィニティークロマトグラフィーによって精製した (Figure 4A)。GST-AP180-WT、および、GST-AP180-KE は、PC、PI(4,5)P₂、または、18:0/22:6-PA を含むリポソームとプレインキュベートし、その後、clathrin heavy chain (CHC) を含む Neuro-2a 細胞溶解物と転倒混和した。CHC は GST-AP180-WT と GST-AP180-KE の両方と相互作用したが、GST alone とは相互作用しなかった (Figure 4B、および、C)。一方、18:0/22:6-PA は、AP180 と clathrin の相互作用を大幅に減少させた (Figure 4B、および、C)。しかし、18:0/22:6-PA、および、PI(4,5)P₂ 結合活性を欠損させた AP180-KE (Figure 2G および H) を使用した場合 AP180 と clathrin の相互作用を減少させるような効果は得られなかった (Figure 4B、および、C)。さらに、AP180 と clathrin との相互作用に対する PI(4,5)P₂ の効果は見られなかった (Figure 4B、および、C)。これらの結果は、18:0/22:6-PA が AP180 と clathrin の相互作用を選択的かつ効果的に阻害することを示している。

A

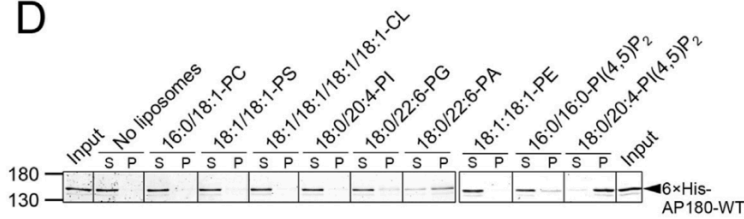
Protein name	M. M. (kDa)	SCORE	emPAI
Clathrin coat assembly protein AP180 (AP180)	91	513	0.63



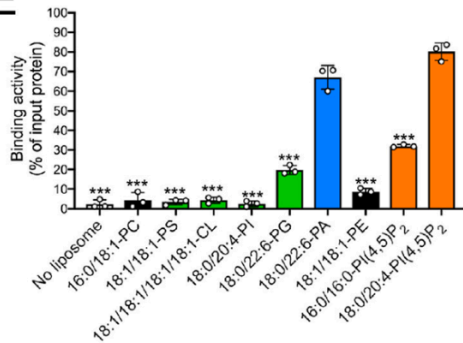
C



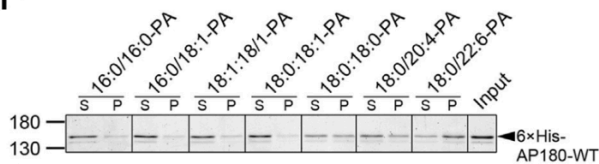
D



E



F



G

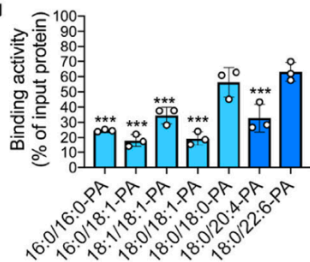


Figure 1. PA 結合タンパク質としての AP180 の同定

(A) LC-MS/MS によって同定した AP180 の *SCORE* (同定の確からしさ)、および、*emPAI*。(B) AP180-WT の構造の概略。(C) 大腸菌細胞で発現した 6×His-AP180 タンパク質を精製し、SDS-PAGE (6%アクリルアミド) で分離した後、CBB で染色するか、抗 6×His タグ抗体を用いた WB で検出した。(D、および、E) 16:0/18:1-PC、18:1/18:1-PS、18:1/18:1/18:1/18:1-CL、18:0/20:4-PI、18:0/22:6-PG、18:0/22:6-PA、18:1/18:1-PE、16:0/16:0-PI(4,5)P₂、および、18:0/20:4-PI(4,5)P₂ リポソームを使用して 6×His-AP180 のリポソーム沈降法を行なった (X/PC/Chol = 10/60/30 mol% (X=PC、PS、CL、PI、PG、PE、PI(4,5)P₂))、および、(F、および、G) 16:0/16:0-PA、16:0/18:1-PA、18:1/18:1-PA、18:0/18:1-PA、18:0/18:0-PA、18:0/20:4-PA、および、18:0/22:6-PA リポソーム (PA/PC/Chol = 10/60/30 mol%)。精製した 6×His-AP180 (0.2 μM) を各リポソーム (総脂質 1 mM) と転倒混和し、超遠心分離によりリポソームを沈降させた。SDS-PAGE (6%アクリルアミド) を行い、分離したタンパク質を CBB で染色した。6×His-AP180 の位置は矢印で示した。上清画分 (S)、および、沈降画分 (P) 中のタンパク質のバンド強度は Image J software (E、および、G) を使用したデンシトメトリーによって定量した。Binding activity (結合活性) は、上清画分、および、沈降画分のバンド強度の総和に対する沈降画分のバンド強度の比率として算出した。(平均値±SD、n=3)、*P<0.05、**P<0.01、***P<0.005 (vs. 18:0/22:6-PA)

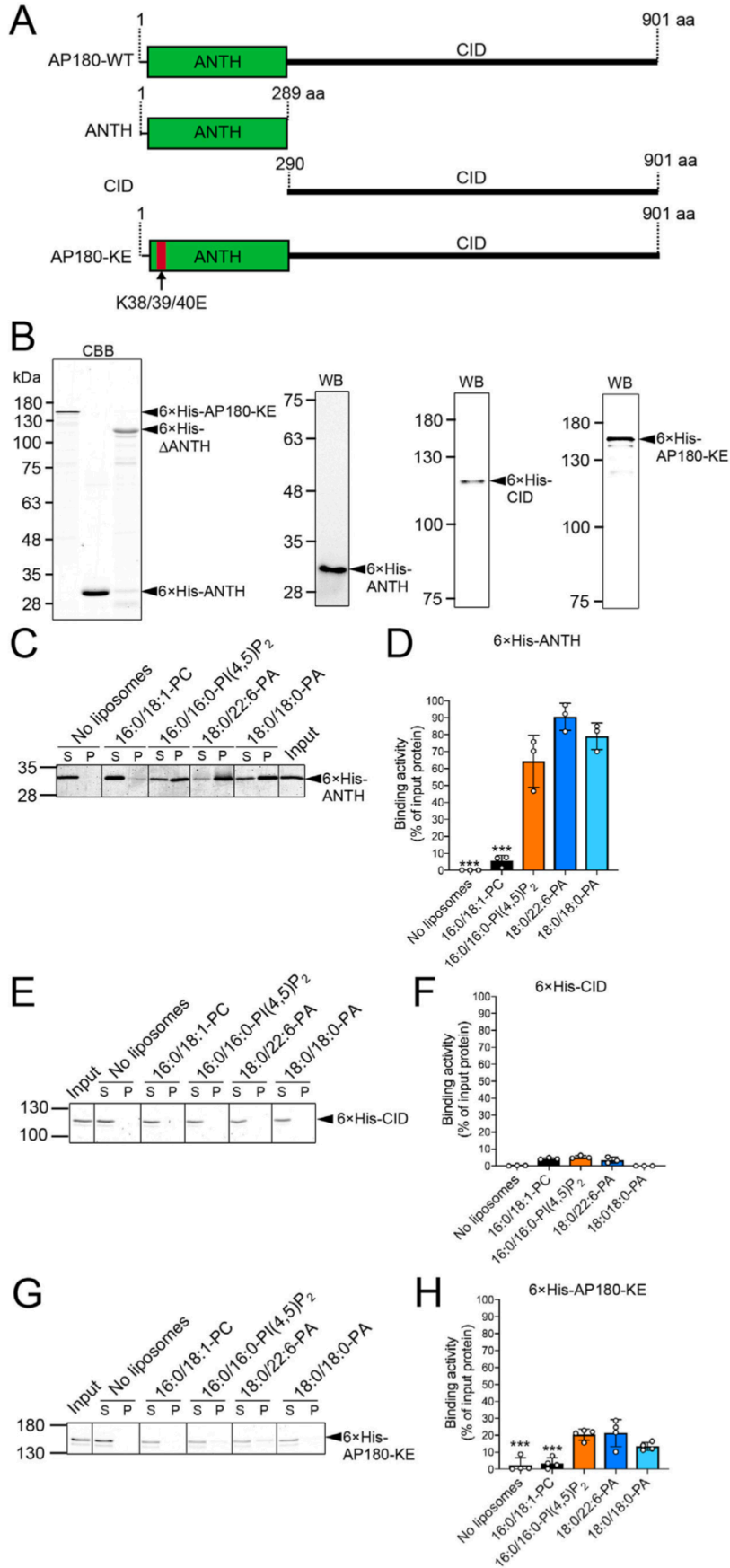


Figure 2. 18:0/18:0-PA、18:0/22:6-PA および PI(4,5)P₂ は ANTH を介して AP180 と結合する

(A、および、B) 大腸菌細胞で発現した 6×His-ANTH (aa 1-289)、6×His-CID (aa 290-901)、および、6×His-AP180-KE (Lys38/39/40Glu) タンパク質を精製した。SDS-PAGE (10%アクリルアミド) で分離した後、CBB で染色するか、抗 6×His タグ抗体を用いた WB によって検出した。(C、および、D) 6×His-ANTH、(E、および、F) 6×His-CID、(G、および、H) 6×His-AP180-KE を用いてリポソーム沈降法を行なった。16:0/16:0-PI(4,5)P₂、18:0/18:0-PA、または、18:0/22:6-PA リポソーム (X/PC/Chol = 10/60/30 mol% (X = PC、PA、または、PI(4,5)P₂)) (1 mM 総脂質)。精製した (C) 6×His-ANTH、(E) 6×His-CID、または、(G) 6×His-AP180-KE (0.2 μM) を各リポソーム (1 mM 総脂質) と転倒混和し、超遠心分離によりリポソームを沈降させた。SDS-PAGE (12%、または、6%アクリルアミド) を行い、分離したタンパク質を CBB で染色した。(D、F、および、H) 上清画分 (S)、および、沈降画分 (P) 中のタンパク質のバンド強度は Image J software を使用したデンシトメトリーによって定量した。Binding activity (結合活性) は、上清画分、および、沈降画分のバンド強度の総和に対する沈降画分のバンド強度の比率として算出した。(平均値±SD、n = 3)、*P<0.05、**P<0.01、***P<0.005 (vs. 18:0/22:6-PA)

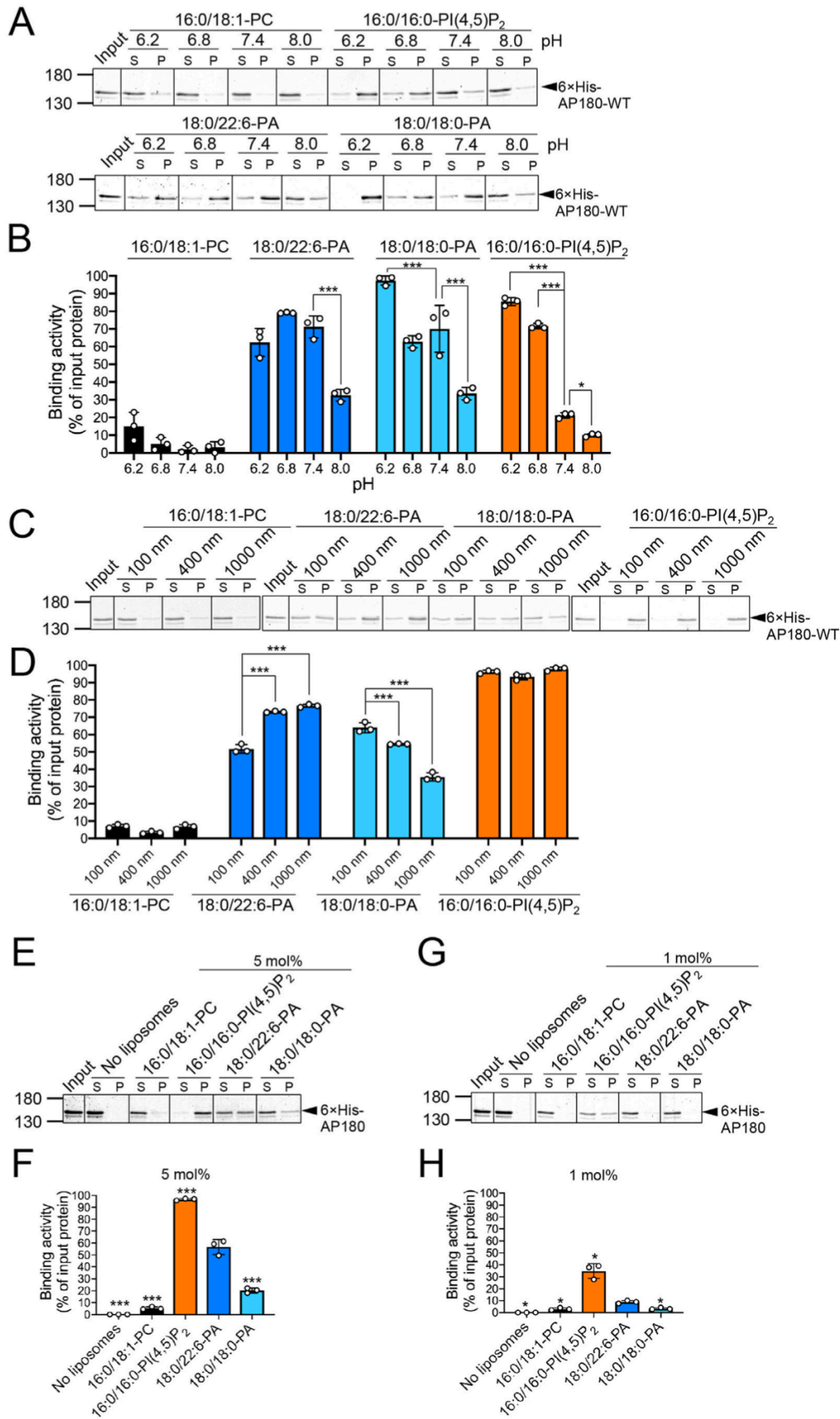


Figure 3. AP180 と PA 間の相互作用の特性

(A、および、B) 精製した 6×His-AP180 を 25 mM HEPES バッファー (pH 7.4、または、8.0) [100 mM NaCl、1 mM DTT]、または、100 mM MES バッファー (pH 6.8、または、6.2) [100 mM NaCl、1 mM DTT] で希釈した。16:0/18:1-PC、16:0/16:0-PI(4,5)P₂、18:0/18:0-PA、または、18:0/22:6-PA リポソーム (X/PC/Chol=10/60/30 mol% (X=PC、PA、または、PI(4,5)P₂)) 各リポソーム (1 mM 総脂質) と 0.2 μM の 6×His-AP180 とを転倒混和した後、超遠心分離によりリポソームを沈降させた。(C、および、D) Mini extruder によって形成した 100 nm、400 nm、または、1000nm の異なる粒径のリポソームを使用した 6×His-AP180 のリポソーム沈降法は、Figure 1D–G に記載されているのと同じ実験手順を使用して行なった。(E、および、F) 16:0/18:1-PC、16:0/16:0-PI(4,5)P₂、18:0/18:0-PA、または、18:0/22:6-PA リポソームを使用した 6×His-AP180 のリポソーム沈降法 (E、および、F) (X/PC/Chol=5/65/30 mol% (X=PC、PA、または、PI(4,5)P₂)) および (G、および、H) (X/PC/Chol=1/69/30 mol% (X=PC、PA、または、PI(4,5)P₂)) 各リポソーム (1 mM 総脂質) を 0.2 μM の 6×His-AP180 と転倒混和した後、超遠心分離によりリポソームを沈降させた。SDS-PAGE (6%アクリルアミド) を行い、分離したタンパク質を CBB (C、E、および、G) で染色した。上清画分、および、沈降画分の 6×His-AP180 のバンド強度は、Image J software (D、F、および、H) を使用したデンストメトリーによって定量した。Binding activity (結合活性) は、上清画分、および、沈降画分のバンド強度の総和に対する沈降画分のバンド強度の比率として算出した。(平均値±SD、n=3)、*P<0.05、**P<0.01、***P<0.005 (vs. 18:0/22:6-PA)

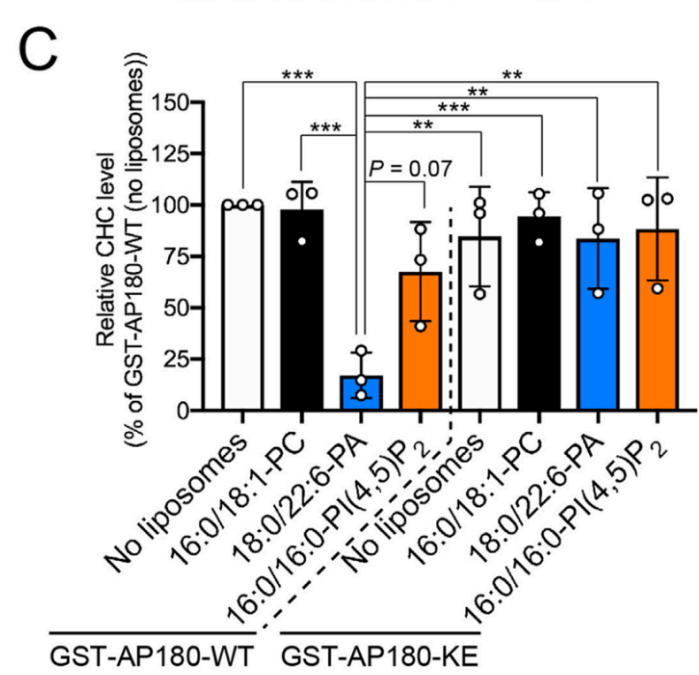
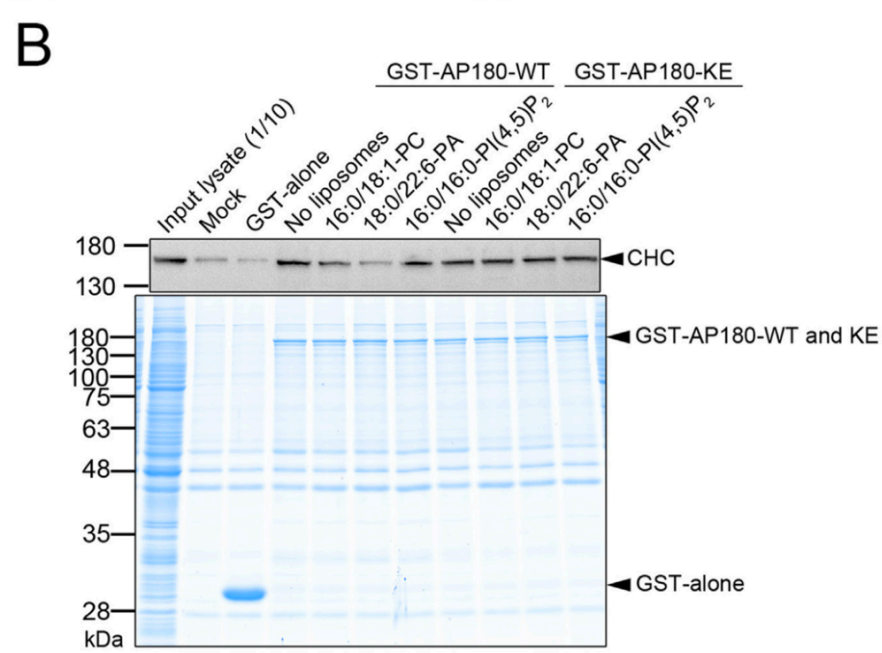
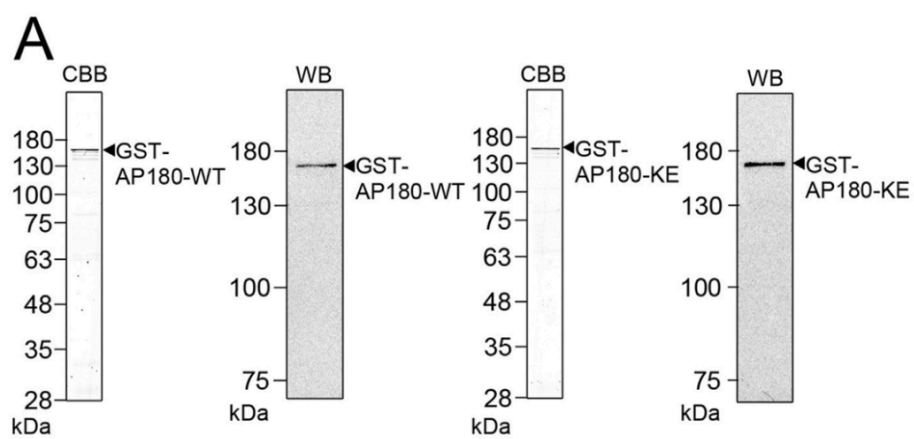


Figure 4. 18:0/22:6-PA は clathrin と AP180 の間の相互作用を阻害する

(A) 大腸菌細胞で発現した GST-AP180-WT、および、GST-AP180-KE (Lys38/39/40Glu) を精製し、SDS-PAGE (6%アクリルアミド) で分離し、CBB で染色するか、抗 GST タグ抗体を用いた WB で検出した。(B、および、C) Neuro-2a 細胞溶解物を 10 μ g の精製 GST alone、GST-AP180-WT、または、GST-AP180-KE タンパク質と転倒混和し、次に 20 μ L のグルタチオン-セファロースビーズを加えた。プルダウンバッファー (20 mM Tris- HCl (pH 7.4)、150 mM NaCl、1 mM PMSF、1 mM EDTA、1 mM EGTA、cOmplete EDTA free protease inhibitor cocktail)。粒径が 100 nm のリポソーム (16:0/18:1-PC、16:0/16:0-PI(4,5)P₂、または、18:0/22:6-PA リポソーム (X/PC/Chol=10/60/30 mol% (X=PC、PA、または、PI(4,5)P₂)) (0.1 mM 総脂質)を使用した。ビーズを洗浄し、低速遠心分離によって回収した。(B) SDS-PAGE (10%アクリルアミド) を行い、分離したタンパク質を CBB で染色、または、抗 CHC 抗体を使用した WB で分析した。(C) 沈降画分の CHC のバンド強度は、Image J software を使用したデンシトメトリーによって定量した。相対的な CHC レベルは、リポソームなしの GST-AP180-WT でプルダウンしたバンド強度と比較した、各リポソームあり、または、なしの GST-AP180-WT、または、GST-AP180-KE でプルダウンした CHC バンド強度の比率として算出した。(平均値 \pm SD、n = 3)、**P<0.01、***P<0.005

【考察】

Clathrin coat assembly protein AP180 は、CME で重要な役割を果たす。CME では、clathrin の集積だけでなく、その解離も重要である [8]。しかし、clathrin の集積機構と比較して、clathrin の解離メカニズムについてはほとんど知られていない [8]。本研究では、18:0/22:6-PA が PI(4,5)P₂ と同程度に AP180 に選択的かつ強力に結合することを初めて明らかにした (Figure 1、および、3)。なお、PI(4,5)P₂ は AP180 と強く相互作用し、clathrin 被覆ピットの形成に必須であることが報告されている [1-3]。さらに、PI(4,5)P₂ ではなく 18:0/22:6-PA によって AP180 と clathrin の相互作用が選択的かつ効果的に阻害されることを見出した (Figure 4)。したがって、18:0/22:6-PA と PI(4,5)P₂ は同じ ANTH の lysine-rich motif (Lys38-Lys39-Lys40) (Figure 2) を介して AP180 に結合するが、18:0/22:6-PA が AP180 に対して発揮する機能は PI(4,5)P₂ とは異なる。

PI(4,5)P₂ の D4-、および、D5-リン酸基と PA のリン酸基の pKa 値は、それぞれ 6.5、7.7、および、7.9 である [21,22]。実際、以前の研究 [23] と一致して、PI(4,5)P₂ の AP180 への結合活性は pH (6.2-7.4) に依存して減少した (Figure 3A、および、B)。一方、pH (6.2-7.4) は、18:0/18:0-PA、および、18:0/22:6-PA の AP180 に対する結合活性にほとんど影響しなかった。したがって、18:0/18:0-PA、および、18:0/22:6-PA は CME が起こる pH 範囲で AP180 とより強く相互作用する可能性がある。

AP180 と PI(4,5)P₂ との相互作用は、PI(4,5)P₂ を含有するリポソームの粒径 (100-1000 nm) に依存しなかった。しかしながら、18:0/18:0-PA、および、18:0/22:6-PA との AP180 の結合活性は、リポソームの粒径に応じて変化した (Figure 3C、および、D)。具体的には、18:0/22:6-PA の場合、AP180 はより大きな粒径のリポソームでより強い結合活性を示し、18:0/18:0-PA の場合、AP180 はより小さな粒

径のリポソームで強い結合活性を示した。したがって、AP180 と 18:0/22:6-PA との結合は、clathrin でコーティングされた小胞 (直径: ~100 nm) ではなく、初期エンドソーム (直径: 400-1000 nm) と融合した clathrin が解離した小胞の曲率の低い膜環境と親和性が高い可能性がある。

全細胞脂質中の PA (1-5%) の量は、PI(4,5)P₂ (0.2-1%) の約 5 倍である [25,26]。AP180 は、5 mol% の 18:0/22:6-PA 含有リポソームに対して約 55% の結合活性を示し、一方で、1 mol% の PI(4,5)P₂ 含有リポソームに対しては約 30% の結合活性を示した (Figure 3E-H)。さらに、18:0/22:6-PA の量は、神経突起伸長の際に大幅に増加することが報告されている [27]。したがって、神経突起伸張という特定の条件下において 18:0/22:6-PA は PI(4,5)P₂ よりも AP180 とより強く相互作用する可能性があり、AP180 の機能に対する 18:0/22:6-PA の生理学的寄与度は同等か、もしくは、それ以上である可能性がある。

これまで、DGK の阻害が CME を弱めることが報告されている [28]。興味深いことに、DGK isozyme の中で、DGK δ はゲノムワイド関連解析 [29] により、CME に関連することが示されており、さらに、clathrin 小胞 [30]、および、初期エンドソームに分布している。さらに、DGK δ のノックダウンは酵素活性に依存して CME を阻害した [30]。また、我々は、DGK δ が脳内で 18:0/22:6-PA を選択的に産生することを見出した [11]。本研究では、18:0/22:6-PA は AP180 の clathrin 集積能を大幅に減少させた (Figure 4)。また、我々は、PI(4,5)P₂ を脱リン酸化して AP180 を細胞膜から離脱させ、clathrin 解離において主要な役割を担う synaptojanin-1 [31] が、18:0/22:6-PA によって活性化されることを示した [17]。したがって、DGK δ によって産生された 18:0/22:6-PA は、AP180 と synaptojanin-1 という異なる標的タンパク質を介して CME における clathrin の解離を効果的に調節する可能性がある。また、DGK 以外の PA 産生酵素である phospholipase D

(PLD) を阻害すると、CME も低下する [32]。ただし、PLD は主に飽和、および、一価不飽和脂肪酸を含む PC を加水分解するため、PLD は 18:0/22:6-PA の産生に寄与しない可能性がある。

以上をまとめると、本研究では、AP180 を新規 18:0/22:6-PA 結合タンパク質として同定した。さらに、PI(4,5)P₂ ではなく 18:0/22:6-PA が AP180 と clathrin 間の相互作用を阻害する機能を有することを見出した。したがって、18:0/22:6-PA 分子種が選択的かつ効果的に AP180/clathrin 複合ケージから clathrin の解離を促進することを強く示唆している。さらに、これらの結果は、受容体の内在化、神経伝達物質の取り込み、シグナル伝達、病原体の排除、ウイルスの侵入、AD などの多くの生理学的、および、病理学的機能に密接に関連している CME において、PUFA を含有する PA 分子種という特定の脂質が AP180 /clathrin 含有ケージの新しい分解を制御するという新しいメカニズムを見出したことを示している。

【参考文献】

- [1] M.H. Dreyling, J.A. Martinez-Climent, M. Zheng, J. Mao, J.D. Rowley, S.K. Bohlander, The t(10;11)(p13;q14) in the U937 cell line results in the fusion of the AF10 gene and CALM, encoding a new member of the AP-3 clathrin assembly protein family, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** (1996) 4804-4809.
- [2] M.G. Ford, B.M. Pearse, M.K. Higgins, Y. Vallis, D.J. Owen, A. Gibson, C.R. Hopkins, P.R. Evans, H.T. McMahon, Simultaneous binding of PtdIns(4,5)P₂ and clathrin by AP180 in the nucleation of clathrin lattices on membranes, *Science* **291** (2001) 1051-1055.
- [3] L. Moshkanbaryans, L.S. Chan, M.E. Graham, The Biochemical Properties and Functions of CALM and AP180 in Clathrin Mediated Endocytosis, *Membranes (Basel)* **4** (2014) 388-413.
- [4] H.T. McMahon, E. Boucrot, Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12** (2011) 517-533.
- [5] A. Bayati, R. Kumar, V. Francis, P.S. McPherson, SARS-CoV-2 infects cells after viral entry via clathrin-mediated endocytosis, *J. Biol. Chem.* **296** (2021) 100306.
- [6] F. Wu, P.J. Yao, Clathrin-mediated endocytosis and Alzheimer's disease: an update, *Ageing Res. Rev.* **8** (2009) 147-149.
- [7] E.H. Koo, S.L. Squazzo, Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway, *J. Biol. Chem.* **269** (1994) 17386-17389.
- [8] M. Kaksonen, A. Roux, Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19** (2018) 313-326.
- [9] H. Sakai, F. Sakane, Recent progress on type II diacylglycerol kinases: the physiological functions of diacylglycerol kinase δ , η and κ and their involvement in disease, *J. Biochem.* **152** (2012) 397-406.
- [10] F. Sakane, S. Imai, M. Kai, S. Yasuda, H. Kanoh, Diacylglycerol kinases: why so many of them?, *Biochim. Biophys. Acta* **1771** (2007) 793-806.
- [11] Q. Lu, C. Murakami, Y. Murakami, F. Hoshino, M. Asami, T. Usuki, H. Sakai, F. Sakane, 1-Stearoyl-2-docosahexaenoyl-phosphatidic acid interacts with and activates Praja-1, the E3 ubiquitin ligase acting on the serotonin transporter in the brain, *FEBS Lett.* **594** (2020) 1787-1796.
- [12] F. Sakane, F. Hoshino, C. Murakami, New Era of Diacylglycerol Kinase, Phosphatidic Acid and Phosphatidic Acid-Binding Protein, *Int. J. Mol. Sci.* **21** (2020).
- [13] A. Kume, K. Kawase, S. Komenoi, T. Usuki, E. Takeshita, H. Sakai, F. Sakane, The Pleckstrin Homology Domain of Diacylglycerol Kinase η Strongly and Selectively

- Binds to Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate, *J. Biol. Chem.* **291** (2016) 8150-8161.
- [14] D. Takahashi, F. Sakane, Expression and purification of human diacylglycerol kinase α from baculovirus-infected insect cells for structural studies, *PeerJ* **6** (2018) e5449.
- [15] S. Imai, M. Kai, K. Yamada, H. Kanoh, F. Sakane, The plasma membrane translocation of diacylglycerol kinase delta 1 is negatively regulated by conventional protein kinase C-dependent phosphorylation at Ser-22 and Ser-26 within the pleckstrin homology domain, *Biochem. J.* **382** (2004) 957-966.
- [16] F. Hoshino, F. Sakane, Polyunsaturated fatty acid-containing phosphatidic acids selectively interact with L-lactate dehydrogenase A and induce its secondary structural change and inactivation, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Biol. Lipids* **1865** (2020) 158768.
- [17] F. Hoshino, F. Sakane, The SAC1 phosphatase domain of synaptojanin-1 is activated by interacting with polyunsaturated fatty acid-containing phosphatidic acids, *FEBS Lett.* **595** (2021) 2479-2492.
- [18] F. Hoshino, C. Murakami, H. Sakai, M. Satoh, F. Sakane, Creatine kinase muscle type specifically interacts with saturated fatty acid- and/or monounsaturated fatty acid-containing phosphatidic acids, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **513** (2019) 1035-1040.
- [19] H. Yamada, F. Hoshino, Q. Lu, F. Sakane, Cellular phosphatidic acid sensor, α -synuclein N-terminal domain, detects endogenous phosphatidic acid in macrophagic phagosomes and neuronal growth cones, *Biochem. Biophys. Rep.* **22** (2020) 100769.
- [20] A. Louche, S.P. Salcedo, S. Bigot, Protein-Protein Interactions: Pull-Down Assays, *Methods Mol. Biol.* **1615** (2017) 247-255.
- [21] E.E. Kooijman, K.E. King, M. Gangoda, A. Gericke, Ionization properties of phosphatidylinositol polyphosphates in mixed model membranes, *Biochemistry* **48** (2009) 9360-9371.
- [22] J.J. Shin, C.J. Loewen, Putting the pH into phosphatidic acid signaling, *BMC Biol.* **9** (2011) 85.
- [23] R.A. Hom, M. Vora, M. Regner, O.M. Subach, W. Cho, V.V. Verkhusha, R.V. Stahelin, T.G. Kutateladze, pH-dependent binding of the Epsin ENTH domain and the AP180 ANTH domain to PI(4,5)P2-containing bilayers, *J. Mol. Biol.* **373** (2007) 412-423.
- [24] Y. Cheng, W. Boll, T. Kirchhausen, S.C. Harrison, T. Walz, Cryo-electron tomography of clathrin-coated vesicles: structural implications for coat assembly, *J. Mol. Biol.* **365** (2007) 892-899.

- [25] T. Balla, Phosphoinositides: tiny lipids with giant impact on cell regulation, *Physiol. Rev.* **93** (2013) 1019-1137.
- [26] M.E. Sztolsztener, A. Dobrzyn, S. Pikula, A. Tylki-Szymanska, J. Bandorowicz-Pikula, Impaired dynamics of the late endosome/lysosome compartment in human Niemann-Pick type C skin fibroblasts carrying mutation in NPC1 gene, *Mol. Biosyst.* **8** (2012) 1197-1205.
- [27] E. Tanguy, Q.L. Wang, P.C. De Bagneaux, L. Fouillen, T. Thahouly, M.R. Ammar, N. Vitale, Different species of phosphatidic acid are produced during neuronal growth and neurosecretion, *Ocl-Oilseeds and Fats Crops and Lipids* **25** (2018) D408.
- [28] C.N. Antonescu, G. Danuser, S.L. Schmid, Phosphatidic acid plays a regulatory role in clathrin-mediated endocytosis, *Mol. Biol. Cell* **21** (2010) 2944-2952.
- [29] L. Pelkmans, E. Fava, H. Grabner, M. Hannus, B. Habermann, E. Krausz, M. Zerial, Genome-wide analysis of human kinases in clathrin- and caveolae/raft-mediated endocytosis, *Nature* **436** (2005) 78-86.
- [30] T. Kawasaki, T. Kobayashi, T. Ueyama, Y. Shirai, N. Saito, Regulation of clathrin-dependent endocytosis by diacylglycerol kinase delta: importance of kinase activity and binding to AP2alpha, *Biochem. J.* **409** (2008) 471-479.
- [31] P.S. McPherson, E.P. Garcia, V.I. Slepnev, C. David, X. Zhang, D. Grabs, W.S. Sossin, R. Bauerfeind, Y. Nemoto, P. De Camilli, A presynaptic inositol-5-phosphatase, *Nature* **379** (1996) 353-357.
- [32] A. Norambuena, C. Metz, J.E. Jung, A. Silva, C. Otero, J. Cancino, C. Retamal, J.C. Valenzuela, A. Soza, A. González, Phosphatidic acid induces ligand-independent epidermal growth factor receptor endocytic traffic through PDE4 activation, *Mol. Biol. Cell* **21** (2010) 2916-2929.

【謝辞】

本研究を行うにあたり、指導教官の坂根郁夫教授に丁寧かつ熱心なご指導を賜りました。ここに深謝の意を表します。また、千葉大学共用機器センターLC-MS/MSを使用するにあたり様々な指導を頂きました本学共通機器センター技術職員の荷堂清香氏と本学医学部附属病院の佐藤守特任准教授に心より感謝の意を表します。

また、本研究に関して有意義な議論と適切な助言を下さった堺弘道助教 (島根大学医学部)、高橋大輔助教 (九州大学薬学研究院) に謝意を表します。

本研究の一部は千葉大学ベンチャービジネスラボラトリー なのはな賞 (なのはなコンペ 2020、正賞)、本学大学院先進科学プログラム海外渡航支援事業、JSPS 科研費 20J21123 の助成を受けたものです。

最後に、私をあたたく応援してくれた両親と友人、日常の議論を通じて多くの知識や示唆を頂き、研究活動を支えて下さった生体機能化学研究室的の皆様に深謝の意を表します。