遺伝性痙性対麻痺原因因子 DDHD2 の生理機能の解析

分子細胞生物学研究室
指導教官　多賀谷光男
学位申請者　丸山智広

[序論]

脂質は生体膜の主要な構成成分である一方、細胞内の様々なオルガネラ形成に関与し、その機能調節が重要な役割を果たす。生体膜の脂質の均衡性が崩れ、その恒常性が破綻すると癌、糖尿病、動脈硬化、炎症、神経疾患など様々な疾患が誘発される。

DDHD2/KIAA0725p は哺乳類細胞内型ホスホリパーゼ A_1(PLA$_1$)ファミリータンパク質の１つである。通常 PLA$_1$はリン脂質の１位のエステル結合を加水分解し、2-アシルリゾリン脂質と脂肪酸を産生する酵素であるが、DDHD2 の PLA$_1$活性は同ファミリーの DDHD1/PA-PLA$_1$と比べると著しく低く、トリアシルグリセロールやジアシルグリセロールを加水分解するリパーゼ活性を持つことが報告されている。興味深いことに、この遺伝子の欠失や変異は緩徐進行性の下肢痙縮を特徴とする遺伝性痙性対麻痺(HSP)という神経変性疾患を引き起こす。現在では約 70 種類の HSP 原因因子が報告されているが、この病気は根本的な治療薬が存在せず、原因因子によって発症メカニズムが異なるなどの問題点が多数存在する。これらの知見から、DDHD2 が関与する脂質代謝は神経細胞の生存や恒常性維持に極めて重要と考えられるが、それらは明らかでない。DDHD2 の生体内での働きを解明することは、HSP の治療法開発につながることが期待される。

DDHD2 ノックアウト (KO) マウスについては 2014 年に Cravatt のグループが報告しており、HSP の場合と同様に、下肢運動機能の低下および脳内に脂肪滴が蓄積する (Inloes et al.(2014) PNAS 111, 14924)。一方、DDHD1 においてもその変異によって HSP が引き起こされるが、KO マウスでは顕著な下肢運動機能の低下は認められない (Baba et al.(2014) JBC 289,11497)。本研究では DDHD2 を欠失した KO マウスを独自に作製し、DDHD2 の生体内の役割を解析した。その結果、DDHD2 の欠失はミトコンドリアでの活性酸素 (ROS) や過酸化脂質を増加させ、それが運動ニューロン細胞死を引き起こす主因であることが判明した。

[結果]

DDHD2 KO マウスは加齢依存性の運動機能障害・運動神経の脱落を示す

作製した DDHD2 KO マウスは、加齢性の尻尾吊り下げ時の下肢伸展反射の低下や歩行障害を示した。組織解析結果から、DDHD2 KO マウスの脊髄では運動ニューロンが加齢依存的に減少していることが分かった。また、DDHD2 KO のマウス胎児から調製した初代運動ニューロンはほとんど全て死滅し、生存不可能であった。このことは、加齢に伴う運動ニューロン減少前に、既に胎児の段階で運動ニューロンに生存を阻害するストレスがかかっていることを示唆している。

DDHD2 の欠失は in vitro および in vivo においてアポトーシスを亢進させる

筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病などの神経変性疾患ではアポトーシスが神経細胞死の要因の１つと考えられている。運動ニューロンが加齢依存的に減少していたことから、DDHD2 欠失時におけるアポトーシスの有無を検討した。DDHD2 KO マウスの脊髄切片には、野生型マウスにはほとんど存在しない TUNEL 陽性および活性型カスパーゼ 3 陽性細胞が検出され、それらは月齢に伴い増加していた。DDHD2 KO から不死化させた胎児繊維芽細胞（MEF）を樹立し、アポトーシス刺激剤であるスタウロスポリン（STS）で処理すると、DDHD2 KO MEF は野生型よりも多くの細胞でアポトーシス起こった。これらの結果から、DDHD2 の欠失は in vivo および vitro においてアポトーシスの感受性を高めることが明らかとなり、それが運動神経低下の原因の一端であると考えられた。

DDHD2 の欠失は細胞内に活性酸素（ROS）を増加させる

ROS は過剰に産生されるとは細胞死を引き起こし、神経変性疾患の原因の１つとして考えられている。そこで、DDHD2 の欠失により、ROS が増加しているかを調べた。DDHD2 KO MEF において ROS 検出用蛍光試薬である CellROX を細胞に取り込ませて調べたところ、DDHD2 KO MEF では CellROX の蛍光強度が野生型 MEF より増加していた。この現象は DDHD2 を外来的に発現させると回復し、酵素活性が欠失した変異体及びヒト HSP で報告された変異体の発現では回復しなかった。更にアンチマイシン・ロテノン及びパラコートなどの ROS を産生する試薬で処理すると、DDHD2 KO MEF は野生型よりアポトーシスを起こす細胞が増加した。これらの結果から、DDHD2 は酵素活性依存的に ROS を除去することで、ROS 誘導性の細胞死を抑制していると考えられた。

DDHD2 の欠失はミトコンドリア機能異常をもたらす

生体内における ROS の大部分はミトコンドリアから発生し、ROS はミトコンドリア自身と反応し、その機能低下を引き起こす。DDHD2 KO MEF で観察される CellROX 陽性の ROS はミトコンドリアマーカーであるシトクロム c や TOM20 とほとんど一致した。ミトコンドリアにおいて ROS が産生されていることは MitoSOX によっても確認された。ROS 産生に伴い、DDHD2 KO MEF は野生型に比べ ATP 産生量および膜電位が低下していた。これらの結果から、DDHD2 の欠失はミトコンドリア ROS 産生を引き起こし、ミトコンドリア機能低下を起こしていることが示唆された。

DDHD2 の欠失は細胞内に過酸化脂質を蓄積させる

DDHD2 は脂質を加水分解する酵素であることから、直接 ROS を除去するとは考えにくい。ROS は脂質と反応し、過酸化脂質を産生することが知られている。そこで、DDHD2 が過酸化脂質を分解することで、ミトコンドリアの機能を維持し、ROS の発生を抑制していると推測した。まず DDHD2 欠失時に過酸化脂質が蓄積しているかどうかを、過酸化脂質を特異的に認識するプローブである MitoPeDPP（ミトコンドリアの過酸化脂質特異的）及び Bodipy581/591 C11 を細胞に取り込ませて調べた。その結果、DDHD2 KO MEF では 2 種類の過酸化脂質プローブで検出される過酸化脂質量が増加していた。この過酸化脂質の増加は DDHD2 の安定発現では抑制されたが、酵素活性失活変異体では抑制されなかった。更に DDHD2 KO マウスの脊髄に過酸化脂質が蓄積しているかを免疫染色およびウエスタンブロット法により検討したところ、DDHD2 KO では過酸化脂質の分解物である 4-ヒドロキシ-2-ノネナールが野生型よ

り増加していた。これらの結果から、in vivo および vitro において、DDHD2 は酵素活性依存的に過酸化脂質を分解する可能性が示唆された。

DDHD2 は ROS 産生増加に伴いドット状構造体となり、その一部はミトコンドリアに集積する

DDHD2 は小胞体、ゴルジ体、サイトゾルなどに存在することが報告されている（Nakajima et al.(2002) JBC 277,11329; Sato et al.(2010) FEBS Lett 584,4389; Inoue et al.(2012) BBA 1823,930）が、ミトコンドリア局在は明確ではない。そこで、ROS 産生増加に伴いミトコンドリア上に DDHD2 が移行するか検討した。抗 DDHD2 抗体を用いた免疫染色法では、MEF における内在性 DDHD2 は以前の報告通りに主にサイトゾルに存在し、ミトコンドリアマーカーであるシトクロム c とはほとんど一致しなかった。しかしながら、アンチマイシン A･ロテノン、パラコート、tert-ブチルヒドロペルオキシドなどの ROS 誘導剤で細胞を処理すると、ほとんどの DDHD2 はミトコンドア近傍にドット状構造体を形成し、その一部はミトコンドリアと共局在を示した。

DDHD2 は過酸化脂質に移行する

Live cell imaging により、DDHD2 とミトコンドリアの過酸化脂質の動態を可視化した。DDHD2-mCherry が安定発現した DDHD2 KO MEF において、過酸化脂質を増加させる試薬である tert-ブチルヒドロペルオキシドで処理すると、DDHD2 が過酸化脂質に移行し、一過的に共に移動する様子が観察された。一方、酵素活性が失活する変異体 S351A では、DDHD2-S351A は過酸化脂質から離れず、留まったままであった。これらの結果は、DDHD2 がミトコンドリア膜上の過酸化脂質に移行し、酵素活性依存的に過酸化脂質を除去する可能性を裏付けた。

[結論]

DDHD2 はトリアシルグリセロール分解活性を有し、その欠質や変異は下肢痙縮と共に、脳内に脂肪滴を蓄積させることが報告されていたが、なぜ HSP が発症するのか不明であった。本研究では、DDHD2 KO マウスから作製した MEF や初代運動ニューロンが増殖できず、DDHD2 の欠失が過酸化脂質の産生を引き起こし、それが細胞に直接障害をもたらしていることを明らかにした。DDHD2 は ROS と反応して生成する過酸化脂質を酵素活性依存的に取り除き、それによってミトコンドリア機能を維持し、酸化ストレスを減弱させていると考えられる。本研究で作製された DDHD2 KO マウスは HSP モデルマウスとして有用なツールであり、このマウスを用いることで HSP 発症メカニズム及びその治療法を確立する道が開かれることが期待される。