

氏名（本籍）	丸山 智広（埼玉県）
学位の種類	博士(生命科学)
学位記番号	博 第 113 号
学位授与の日付	平成30年3月14日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	遺伝性痙性対麻痺原因因子DDHD2の生理機能の解析
論文審査委員	（主査） 多賀谷 光男 教授 田中 弘文 教授 馬場 広子 教授 山内 淳司 教授

論文内容の要旨

[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 A₁(PLA₁) ファミリータンパク質の1つである。通常 PLA₁ 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 PLA₁ 活性は同ファミリーの DDHD1/PA-PLA₁ 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で期待される。

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 *in 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 はミトコンドリ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。

審査結果の要旨

遺伝性痙性対麻痺（SPG）は進行性の下肢の痙性麻痺を主症状とし、様々な随伴症状を伴う遺伝性の疾患で、現在、80 近い SPG 遺伝子（遺伝子座）が同定されている。それらの遺伝子がコードするタンパク質は多岐に渡っており、軸索誘導、ミエリン化、小胞体の形態維持等に関与する。SPG54 は *DDHD2* 遺伝子の変異に由来し、この遺伝子はホスホリパーゼ A₁ をコードしている。このファミリーは、ほ乳類では 3 種のメンバー（*DDHD1*/*PA-PLA₁*、*DDHD2*/*KIAA0725*、*Sec23IP/p125*）が存在し、*DDHD1* もその変異によって SPG が発症する（SPG28）。*DDHD2* 遺伝子ノックアウトマウスは既に作製され、下肢麻痺と脳内に脂肪滴が蓄積するというヒトと同様の症状を示すことが報告されているが、この疾患の発症機構はまだわかっていなかった。丸山君は、独自に作製した *DDHD2* 遺伝子ノックアウトマウスと、そこから調製したマウス胎児線維芽細胞（MEF）を解析した。ノックアウトマウスは既報どおり、進行性の下肢の麻痺症状を示し、脳内に脂肪滴が蓄積していた。丸山君は月齢に伴って運動ニューロンが欠落することを示し、更に *DDHD2* ノックアウト MEF を用いた実験から、この遺伝子の欠損によってミトコンドリアから活性酸素が発生し、それによって細胞がアポトーシスを起こしやすくなっていることを見い出した。活性酸素の発生は、ノックアウト細胞に野生型の *DDHD2* を発現させると抑制されたが、活性部位変異体や SPG において報告されている変異体では抑制されなかった。また、*DDHD2* のノックアウト細胞では、ミトコンドリア脂質の酸化が起これ、ミトコンドリアの膜電位の低下と ATP 産生能が減弱していた。ミトコンドリアにおける酸化脂質の蓄積は、ミトコンドリア機能を障害し、活性酸素を発生させることが報告されているので、*DDHD2* は酸化脂質を切断することで、ミトコンドリアから活性酸素が過剰に発生することを抑制していると考えられる。本研究は、SPG の発症機構を明らかにしたという点で新規性があり、高く評価される。これらの成果および質疑応答は、博士（生命科学）の基準を十分満たしており、学位に値すると判断した。