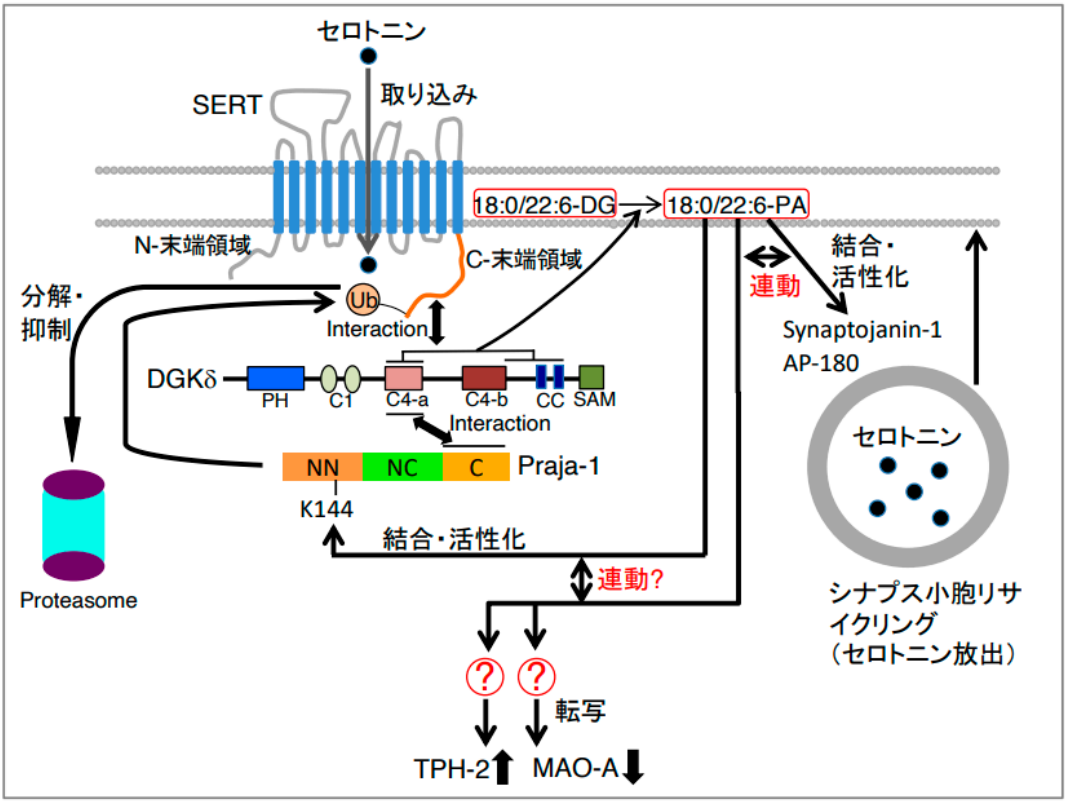
11　ドコサヘキサエン酸が脳機能を改善する新奇メカニズム	坂根　郁夫

【目的】長年ドコサヘキサエン酸（DHA、22:6）の摂取が不安やうつ、認知症に効果があるとされているが、そのメカニズムは未だハッキリしていない。我々は最近、その効果が DHA そのものではなく、DHA を取り込んだホスファチジン酸（18:0/22:6-PA）がセロトニントランスポーター（SERT）を分解する新奇経路を介することを示した（下図）。しかし、その分子メカニズムは未だ不明な点が多いので明らかにすることを試みた。
【方法】免疫沈降法やリポソーム沈降法を用いて、蛋白質 - 蛋白質相互作用、及び、蛋白質 - 脂質相互作用を検出した。
【結果】18:0/22:6-PA と結合して活性化する SERT ユビキチン（Ub）化酵素 Praja-1 は、18:0/22:6-PA と N 末領域（NN）で相互作用すること、更に、その中の Lys144 が結合に重要であることが明らかになった（下図）。また、Praja-1 は 18:0/22:6-PA 産生酵素ジアシルグリセロールキナーゼ（DGK）δ と C 末領域（C）で結合することが分かった。また、DGK δ は主に N 末側の触媒領域（C4-a）が Praja-1 と結合することが分かった（下図）。18:0/22:6-PA はシナプス小胞リサイクリングに関与する Synaptojanin-1（SYNJ1）と強く結合して、D4-phosphatase 活性を選択的に亢進した（下図）。18:0/22:6-PA はやはりシナプス小胞リサイクリングに関与する Clathrin coat assembly protein AP180 にも強く結合し、AP180 と clathrin との相互作用を阻害した（下図）。以上より、今回、DGK δ -18:0/22:6-PA による SERT の分解促進（セロトニンのシナプス間隙からの取り込み阻害）の分子機構の理解を一歩進めることができ、また、DGK δ -18:0/22:6-PA がシナプス小胞のリサイクリング（セロトニン放出）も連動して亢進している可能性も示した（下図）。

DGK δ -18:0/22:6-PA による serotonin 再取り込み・合成・分解とシナプス顆粒リサイクリングの連動制御



11. ドコサヘキサエン酸が脳機能を改善する新奇メカニズム

坂根　郁夫

千葉大学 大学院理学研究院 化学研究部門 生体機能化学研究室

Key words：ドコサヘキサエン酸，セロトニン，ジアシルグリセロールキナーゼ，ホスファチジン酸，Praja-1

緒　言

ドコサヘキサエン酸（DHA、22:6（X：Y＝炭素数：二重結合数）、ω-3）の摂取は不安やうつ、認知症に効果があることが報告されている。しかし、その効果は長年、膜流動性亢進や抗酸化作用を介すると説明されてきた。これらは間接的・物理化学的・非特異的なものばかりであり、万人が納得できるものではなかった。

ジアシルグリセロール（DG）キナーゼ（DGK）は DG をリン酸化してホスファチジン酸（PA）を産生する酵素である。DGK のδアイソザイム（DGKδ）はマウスにおいて神経ネットワーク形成が盛んな生後 1～4 週齢の間の脳で発現が顕著に上昇する。最近、脳特異的な DGKδ-ノックアウト（KO）マウスを作製し、脳における DGKδの機能を個体レベルで、世界に先駆けて解析した［1］。種々の行動解析の結果、強迫性障害（OCD）様行動（統合失調症にも類似）が顕著に増大することが明らかになった［1］。更に、OCD 治療薬 fluoxetine（セロトニントランスポーター（SERT）阻害剤）を投与したところ、上記の DGKδ-KO マウスの強迫性障害様行動が顕著に抑制された［1］。そして、一連の研究により、DGKδが、SERT と相互作用して SERT 蛋白質の減少（不安定化）を誘導し［2］、且つ、セロトニン量を増大させ［2］、また、その SERT の不安定化は Praja-1 E3 ユビキチン（Ub）蛋白質リガーゼを介する Ub 化によるものであることを明らかにした［3］。更に、転写制御によるセロトニンの合成酵素トリプトファンヒドロキシラーゼ（TPH）-2 の発現量の増加とセロトニン代謝分解酵素モノアミンオキシダーゼ（MAO）-A の発現量の減少を連動して制御していることを見出した［2］。

PA 分子種は脳内に 50 種以上存在するが、我々は最近、DGKδが選択的に DHA 含有 PA（18:0/22:6-PA）を産生し、18:0/22:6-PA は Praja-1 に特異的に結合して活性化することを明らかにした［4］。従って、DGKδ-18:0/22:6-PA 系はセロトニン神経系制御系の中心的因子として機能し、本系において極めて重要な役割を果たすことが初めて明らかになった。

SERT の過剰な活性・量や、セロトニン量の異常が関与する精神疾患・障害として、OCD、うつ病、アルツハイマー型認知症、統合失調症等がある。従って、DGKδ-18:0/22:6-PA 系による SERT 及びそれと連動する系の動態制御を分子レベルで知ることは、これらの精神疾患・障害の発症の分子機構解明や治療戦略立案へ向けての有用な知見となる可能性が出てきた。他方、上述の様に、長年 DHA（22:6）の摂取が不安やうつ、認知症に効果があるとされているが、そのメカニズムは未だハッキリしていない。我々の今回の発見で［1～4］、その効果が DHA そのもの（間接的・物理化学的・非特異的な作用）ではなく、DHA を取り込んだ PA（18:0/22:6-PA）を介した直接的・生物学的・特異的な作用であることが強く示唆された。しかし、DGKδ-18:0/22:6-PA 系による脳神経系（セロトニン神経系）制御の分子メカニズムの詳細は未だ明らかではないことも多い。そこで、DGKδ-18:0/22:6-PA 系による SERT 量制御の分子機構、及び、それと連動する系を明らかにすることを試みた。

方　法

1. 蛋白質-脂質相互作用解析

以前に報告したリポソーム沈降法［4］を用いて行った。ホスファチジルコリン（PC、中性リン脂質コントロール）、

ホスファチジルグリセロール（18:0/22:6-PG、 酸性リン脂質コントロール）、または、18:0/22:6-PA 含有リポソームを凍結融解法によって作製した。各種蛋白質を発現した COS-7 細胞破砕物溶液を PC、18:0/22:6-PG、18:0/22:6-PA 含有の各リポソームとインキュベートし、その後、超遠心分離により、リポソームを沈降させた。沈降物を再懸濁し、上清画分（S）と沈降画分（P）に含まれる蛋白質を SDS-PAGE により分子量毎に分離し、抗 FLAG 抗体を用いたウエスタンブロット法によって検出した。結合強度をバンドの強度から P÷（S＋P）×100 によって求め、各結合強度を比較した。

2. 蛋白質 - 蛋白質相互作用の解析

以前に報告した免疫沈降法［3］を用いて行った。COS-7 細胞に 3×FLAG-tag を融合した蛋白質と EGFP-tag を融合した蛋白質を共発現させた。次に、細胞を回収して超音波破砕を行い、その上清に抗 GFP 抗体と protein A/G protein を添加し、EGFP-tag 融合タンパク質を沈降させ、沈降物中のタンパク質をウェスタンブロッティング法（抗 GFP 抗体、および、抗 3×FLAG-tag 抗体）で検出および定量した。

3. D4-phosphatase 活性の測定

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［5］。

結　果

1.　Praja-1 の 18:0/22:6-PA 結合部位の同定

SERT の E3 Ub 蛋白質リガーゼ Praja-1 は、18:0/22:6-PA と相互作用して活性化されることを報告している［4］。そこで、Praja-1 の 18:0/22:6-PA 相互作用領域を同定することを試みた。N 末領域（NN）、中間領域（NC）と C 末領域（C）の 3 つの領域に分け（要旨図参照）、18:0/22:6-PA との結合を測定した。その結果、N 末領域（NN）を介して相互作用することが明らかになった（図 1）（要旨図参照）。更に、NN 中の幾つかの塩基性アミノ酸残基に点変異を導入して解析したところ、Lys144 が結合に重要であることが明らかになった（要旨図参照）。

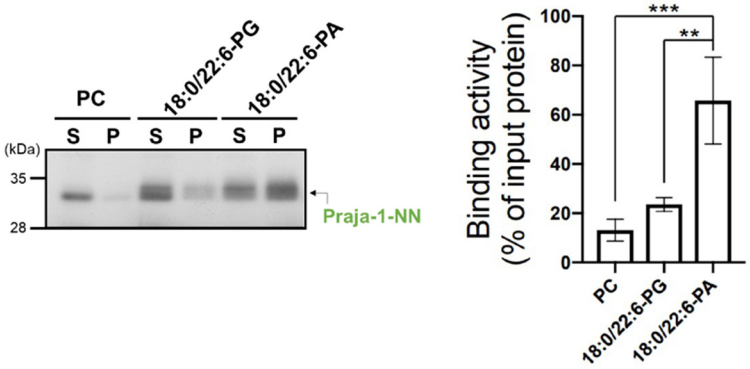


図 1. Praja-1 は N 末領域（NN）を介して 18:0/22:6-PA と相互作用する
Praja-1 の N 末領域（NN）は 18:0/22:6-PA と強く結合するが、コントロールのホスファチジルコリン（PC、脂肪酸は混合物）や 18:0/22:6-ホスファチジルグリセロールとは弱くしか結合しなかった。平均±標準偏差（n＝3）、 統計処理法 : ANOVA-Tukey、*** P＜0.005、** P＜0.01。

2.　Praja-1 と DGK δ の結合領域の同定

既に我々は、Praja-1 が 18:0/22:6-PA 産生酵素 DGK δ と相互作用することを報告している［4］。N 末領域（NN）と中間領域（NC）を合わせた領域（N）と C 末領域（C）の 2 つの領域に分け（要旨図参照）、DGK δ との結合を測定した。その結果、Praja-1 はその C 末領域（C）を介して DGK δ と結合することが分かった（図 2）（要旨図参照）。また、DGK δ を様々な領域に分けた変異体を作製して Praja-1-C との結合を測定した。その結果、DGK δ は主に N 末側の触媒領域（C4-a）を介して Praja-1 と結合することが分かった（要旨図参照）。

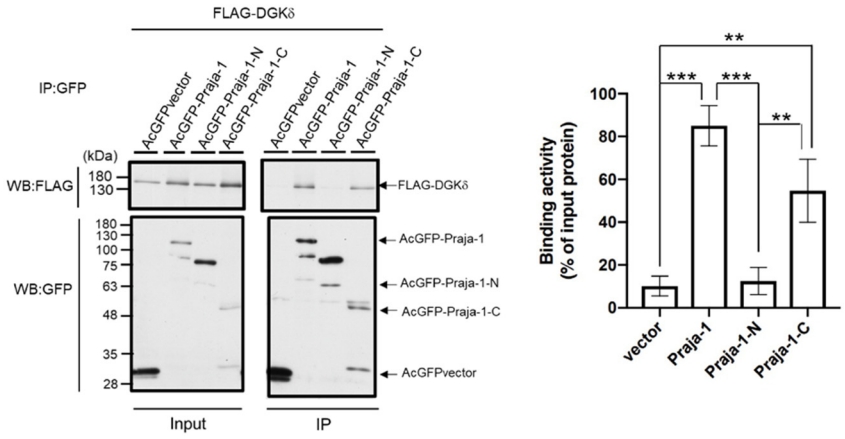


図 2. Praja-1 は C 末領域（C）を介して DGK δ と相互作用する

Praja-1 の全長と C 末領域（C）は DGK δ と強く結合するが、N 末領域（NN）と中間領域（NC）を合わせた領域（N）と殆ど結合しなかった。平均±標準偏差（n＝3）、統計処理法 : ANOVA-Tukey、*** P＜0.005、** P＜0.01。

3. 18:0/22:6-PA の Synaptojanin-1（SYNJ1）との結合とその活性制御［5］

マウス脳を用いて 18:0/22:6-PA に対する結合タンパク質をスクリーニングしたところ、パーキンソン病関連蛋白質の一つである SYNJ1 を同定した。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 clathrin 依存性シナプス小胞輸送・リサイクリングを促進する（要旨図参照）。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。更に、PA 分子種の中でも 18:0/20:4-PA および 18:0/22:6-PA などの多価不飽和脂肪酸含有 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 などの飽和脂肪酸/一価不飽和脂肪酸含有 PA とは結合しなかった。更に、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、18:0/22:6-PA は SYNJ1 の SAC1 ドメインに結合することで SAC1 ドメインの D4-phosphatase 活性を選択的に亢進し（図 3）、一方、D5-phosphatase 活性に影響しなかった。

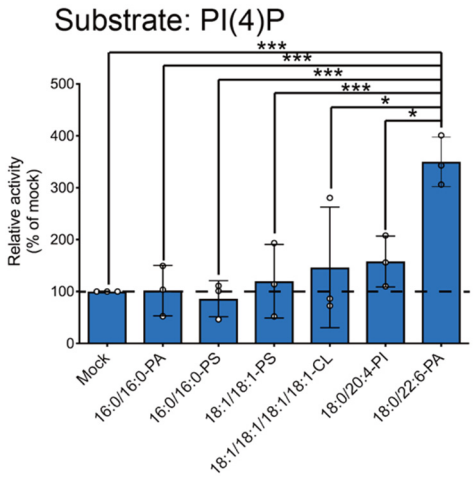


図 3. 18:0/22:6-PA は SYNJ1 の D4-phosphatase 活性を亢進する

16:0/16:0-PA、16:0/16:0-ホスファチジルセリン（PS）、18:1/18:1-PS、18:1/18:1/18:1/18:1-カルジオリピン（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 PI(4)P と転倒混和した SYNJ1 を発現する COS-7 細胞溶解物から生成された遊離リン酸を測定した。平均±標準偏差（n＝3）、統計処理法 : ANOVA-Tukey、*** P＜0.005、* P＜0.05。

4.　18:0/22:6-PA の clathrin coat assembly protein AP180 との結合とその機能制御［6］

Clathrin coat assembly protein AP180 は神経終末の clathrin 依存性エンドサイトーシス・小胞輸送・リサイクリングを促進する（要旨図参照）。AP180 は調べたリン脂質の中で 18:0/22:6-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。更に、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）が結合に不可欠であることが分かり、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衰させたが、PI(4,5)P2 はそのような効果を示さなかった（図 4）。また、lysine-rich motif の Lys38、Lys39、Lys40 を Glu に変えた変異体 AP180-KE では 18:0/22:6-PA の clathrin との相互作用阻害効果はなかった。更に、DGK δ は細胞内で clathrin や初期エンドソームマーカーと強く共局在していた。

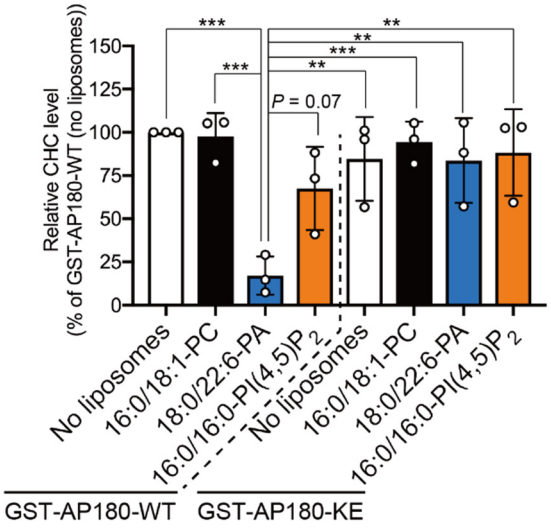


図 4.　18:0/22:6-PA は AP180 と clathrin の相互作用を阻害する
16:0/18:1-PC、18:0/22:6-PA、または、16:0/16:0-PI(4,5)P2-リポソームの存在下または非存在下において AP180 と clathrin heavy chain（CH）の相互作用を測定した．AP180-KE（K38E-K39E-K40E）でも同様に測定した。平均±標準偏差（n＝3）、統計処理法：ANOVA-Tukey、*** P＜0.005、** P＜0.01。

考　察

今回の研究によって、DGK δ –18:0/22:6-PA 系による Praja-1 E3 Ub 蛋白質リガーゼを介した SERT 量制御の機構の分子レベルでの理解が一歩進んだ。更に、SERT 量制御と連動する系として、DGK δ –18:0/22:6-PA 系が SYNJ1 と AP180 の活性を制御する可能性が示された。これらの制御によって、シナプス小胞のリサイクリングが促進され、セロトニンのシナプス間隙への分泌が亢進することが予想される。従って、DGK δ –18:0/22:6-PA 系は SERT 量の減少［2～4］、セロトニン量の増加（セロトニン産生酵素 TPH-2 の発現量増加とセロトニン代謝分解酵素 MAO-A の減少）［2］、シナプス小胞のリサイクリングの促進（セロトニンのシナプス間隙への分泌亢進）を連動させて、セロトニン神経系の活性を亢進していると考えられた。

今後、更に研究を進めることで、これまで脳神経系の鍵因子として全く知られていなかった DGK δ ・18:0/22:6-PA 系を起点とした、DHA の栄養学的価値の再評価や、DHA によるセロトニン神経系制御に関する別視点の新奇知見を得ることができると考える。また、 DHA-PA、又は、DGK δ 蛋白質量の増加による脳機能亢進法の開発も目指し、上記の脳機能の障害・精神的疾患の治癒や予防の可能性も探って行きたい。現代社会はストレス社会で、不安やうつ病・

うつ傾向を示す働き盛りの人々が増える一方であることが大変大きな問題となっている。また、超高齢化社会を迎え、高齢者のアルツハイマー病やそれに伴う認知症の増加も大変大きな問題となっている。従って、DHA-PA がセロトニン神経系機能を高めることでこれらを予防することができれば、ストレス社会及び超高齢化社会に有用性が極めて高いものとなるに考えられる。

文　献

1) Usuki T, Takato T, Lu Q, Sakai H, Bando K, Kiyonari H, Sakane F. Behavioral and pharmacological phenotypes of brain-specific diacylglycerol kinase δ-knockout mice. Brain Res. 2016 Oct 1;1648(Pt A):193-201. doi: 10.1016/j.brainres.2016.07.017. Epub 2016 Jul 14. PMID: 27423518

2) Lu Q, Komenoi S, Usuki T, Takahashi D, Sakane F. Abnormalities of the serotonergic system in diacylglycerol kinase δ-deficient mouse brain. Biochem Biophys Res Commun. 2018 Mar 18;497(4):1031-1037. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.02.165. Epub 2018 Feb 24. PMID: 29486157

3) Lu Q, Murakami C, Hoshino F, Murakami Y, Sakane F. Diacylglycerol kinase δ destabilizes serotonin transporter protein through the ubiquitin-proteasome system. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids. 2020 Mar;1865(3):158608. doi: 10.1016/j.bbalip.2019.158608. Epub 2019 Dec 28. PMID: 31891772

4) Lu Q, Murakami C, Murakami Y, Hoshino F, Asami M, Usuki T, Sakai H, Sakane F. 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. 2020 Jun;594(11):1787-1796. doi: 10.1002/1873-3468.13765. Epub 2020 Mar 19. PMID: 32134507

5) Hoshino F, Sakane F. The SAC1 phosphatase domain of synaptojanin-1 is activated by interacting with polyunsaturated fatty acid-containing phosphatidic acids. FEBS Lett. 2021 Oct;595(19):2479-2492. doi: 10.1002/1873-3468.14177. Epub 2021 Aug 24. PMID: 34387861

6) Hoshino F, Sakane F. Docosahexaenoic acid-containing phosphatidic acid interacts with clathrin coat assembly protein AP180 and regulates its interaction with clathrin. Biochem Biophys Res Commun. 2022 Jan 8;587:69-77. doi: 10.1016/j.bbrc.2021.11.097. Epub 2021 Nov 29. PMID: 34864549