

(様式4)

学位論文の内容の要旨

(荒木 麻理) 印

Enzymatic characterization of recombinant rat DDHD2,
a soluble diacylglycerol lipase

(可溶性ジアシルグリセロールリパーゼ、リコンビナントラットDDHD2の酵素学的解析)

2-アラキドノイルグリセロール(2-AG)は、脳内にあるカンナビノイド受容体(CB)の内在性リガンドである。興奮性シナプスにおける脱分極によって、グルタミン酸がシナプス前終末から放出され、シナプス後部にあるグルタミン酸受容体に結合すると、ホスホリパーゼC(PLC)が活性化される。PLCが sn -2位にアラキドン酸を有するホスファチジルイノシトール4,5-ビスリン酸をジアシルグリセロール(DG)に代謝すると、DGリパーゼがDGの sn -1位を加水分解して2-AGを産生する。2-AGはシナプス後部から放出され神経前終末のCBに作用してグルタミン酸の放出を抑制することで、神経伝達の逆行性調節を行う。この内在性カンナビノイドシグナル伝達経路は認知や記憶、鎮痛などの生理作用に関与している。従来、DGリパーゼとしては膜タンパク質であるDGL α とDGL β が報告されており、神経伝達の逆行性調節に関与するのはDGL α であると考えられていた。

一方で、共著者の麻生らはラット脳の可溶性画分にもDGL α とは異なるDGリパーゼ活性が存在することに着目し、カラムクロマトグラフィーによるDGリパーゼの精製を行った。最終部分精製標品を質量分析装置で分析すると、数百種類のタンパク質が確認されたがDGリパーゼの同定には至らなかった。申請者らは、それらのタンパク質からリパーゼ様タンパク質を数種類選定し、DGリパーゼ活性の有無を検証した。その結果、従来ホスホリパーゼA₁(PLA₁)と報告されていたDDHD2という酵素がDGリパーゼ活性を有することを見出し、さらにDDHD2が海馬の神経細胞に発現していることも明らかにした。これらのことからDDHD2は2-AGを介した神経伝達の逆行性調節に関与する可能性が示唆された(*Journal of Biochemistry*, *in press*)。

これまでの研究でDDHD2は、PLA₁活性を有しゴルジ体から細胞質への小胞輸送に関与することが知られている(Nakajima *et al.*, 2002, *J Biol Chem.* and Sato *et al.*, 2010, *FEBS*)。また、DDHD2の遺伝子変異は、ヒトの脳においてトリアシルグリセロール(TG)の蓄積を引き起こし、遺伝性痙性対麻痺(*hereditary spastic paraplegia; HSP*)を発症させることが報告された(*Am J Hum Genet*, 2012, Schuurs-Hoeijmalers *et al.*)。DDHD2のノックアウトマウスでもヒトと同様に脳にTGが蓄積し、HSPに類似した症状が確認された(*Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, Inloes *et al.*)。彼らは、*in vitro*においてDDHD2がTGリパーゼ活性を示したことから、TGリパーゼ活性の消失がこの疾患を引き起こしたと考えている。

このように、DDHD2はDGリパーゼ活性の他にも、PLA₁活性、TGリパーゼ活性を有することが報告されており、生理学的なDDHD2の基質について検証する必要があると考えられた。そこで本研究では、昆虫細胞に発現させてほぼ単一にまで精製したラットDDHD2の基質特異性を、液体クロマトグラフィー質量分析計を用いて詳細に検討した。基質として1-ステアロイル-2-アラキドノイルグリセロール [DG (18:0/20:4)]や1-ステアロイル-2-アラキドノイルホスファチジン酸 [PA (18:0/20:4)]、トリオレイン [TG (18:1/18:1/18:1)]を用いて、ラットDDHD2の酵素学的パラメーターを求めた。その結果、酵素活性の大きさの指標で

ある k_{cat}/K_m の値がDG (18:0/20:4)に対して顕著に高かった。界面活性剤であるデオキシコール酸ナトリウムやTriton X-100、n-デシル- β -D-マルトシドの存在下で基質特異性を検証すると、どの条件下でもDDHD2はTG (18:1/18:1/18:1)やPA (18:0/20:4)よりもDG (18:0/20:4)に対して高い酵素活性を示した。多様な分子種から成るDGの中では、sn-1位に飽和脂肪酸、sn-2位にアラキドン酸 (20:4)やドコサヘキサエン酸 (22:6)といった多価不飽和脂肪酸を含むDGに対して高い特異性を示した。さらに、DDHD2をCHO細胞に発現させ、細胞内の2-AG量をガスクロマトグラフィー質量分析計により定量したところ2-AG量が顕著に増加していた。

本研究結果は、DDHD2が生体内においてDGリパーゼとして2-AG産生に関与していることを示唆している。本研究は、内在性カンナビノイドシグナル伝達の研究の進展や、DDHD2の遺伝子変異により発症するHSPの病態機序の解明に寄与することが期待される。