

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14470

研究課題名(和文) 活性発見後30年間分子実体不明のホスファチジルコリン特異的ホスホリパーゼCの同定

研究課題名(英文) Identification of phosphatidylcholine-specific phospholipase C

研究代表者

坂根 郁夫 (Sakane, Fumio)

千葉大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：10183815

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類のホスファチジルコリン-特異的ホスホリパーゼC(PC-PLC)の活性は約30年前に確認されたが、単離する手段が無かったため、その分子実体は未解明である。我々は最近、ジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)のアイソザイムがPC-PLCと相互作用することを明らかにしたので、DGKの相互作用を利用したPC-PLCの同定を目指した。本研究によって、DGKのコイルドコイルを有する領域がPC-PLCと強く相互作用することが示された。今後この領域を用いてPC-PLCの同定を試みる。また、液体クロマトグラフィー/質量分析を用いた、感度が高く定量性の良い新規PC-PLC活性測定法を確立した。

研究成果の概要(英文)：Although the activity of mammalian phosphatidylcholine (PC)-specific phospholipase C (PC-PLC) was discovered approximately 30 years ago, neither the protein nor its gene has been identified. Because we recently revealed that diacylglycerol kinase (DGK) delta bound to PC-PLC, we attempted to identify PC-PLC using the interaction. In the present study, we found that the coiled-coil region in DGKdelta interacted with PC-PLC. Moreover, we established a new LC-MS-based PC-PLC assay, which has better analytical parameters, such as a lower background (0.02% versus 94%), higher S/B (4242 versus 1.06), and lower limit of quantitation (0.04 pmol versus 0.69 pmol of PC-PLC), than the conventional, indirect fluorometric assay.

研究分野：生化学

キーワード：ホスファチジルコリン-特異的ホスホリパーゼC ジアシルグリセロールキナーゼ 生体膜 動脈硬化

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類のホスファチジルコリン特異的ホスホリパーゼ C (PC-PLC) の活性は約 30 年前に発見された。また、その活性上昇等から動脈硬化症との関連が *in vivo*(マウス個体レベル)を含め多数報告されている。しかし、PC-PLC タンパク質は精製が難しく、即ち、これまでずっと単離する手段(単離分子)が無かったため、その分子実体(遺伝子・タンパク質)を同定することが出来なかった。

最近我々は、ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) の δ アイソザイム (DGK δ) の研究過程で、偶然、DGK δ と PC-PLC が相互作用し(図 1)、DGK δ 特異的抗体で DGK δ を沈降すると PC-PLC 活性も共沈することを見出した [Sakai, Sakane *et al. J. Biol. Chem.* 2014; 289: 26607]。従って、DGK δ が長年探し求められていた PC-PLC 分子の単離分子として機能することが明らかになった。

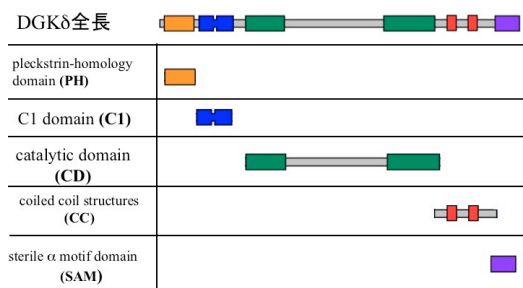
2. 研究の目的

そこで、世界に先駆けて、30 年間以上不明だった PC-PLC の分子実体の同定を目指した。

3. 研究の方法

DGK δ を pleckstrin-homology domain (PH), C1 domain (C1), 介在領域を含めた catalytic domain (CD), 2つの coiled-coil structure を含む領域 (CC), sterile α motif domain (SAM) の 5 つに分け (Fig. 1), polyhistidine tag (His tag) と可溶化タグの trigger factor を融合させ、cold shock 発現系を用いて発現させた。更に、Ni イオン固定化担体で Ni²⁺ と His tag の親和性を利用して精製した。PC-PLC 活性が強い器官である脳を C57BL/6 マウスから摘出し、破碎した。破碎物と融合タンパク質をインキュベートし、精製と同様に Ni イオン固定化担体でタンパクを単離した。

Fig. 1 変異体による相互作用部位の同定



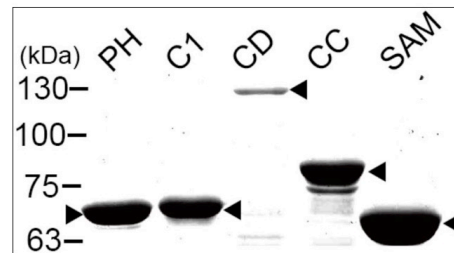
4. 研究成果

「研究の目的」, 「研究実施計画」に沿って幾つかの興味ある知見が得られた。

(1) DGK δ を PH, C1, CD, CC, SAM の 5 つに分け、発現させ、更に、Ni イオン固定化

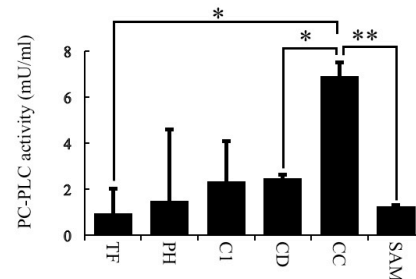
担体で Ni²⁺ と His tag の親和性を利用して精製した (Fig. 2)。そして、可溶化した

Fig.2 変異体融合タンパクの精製



マウス脳破碎物を用いてプルダウンアッセイを行い、PC-PLC 活性沈降能の強さを解析した。PC-PLC 活性は CC による沈降物が最も高く、対照と比較して有意な差があり、約 7 倍の活性を示した (Fig. 3)。一方、他の変異体 (PH, C1, CD, SAM) では沈降した PC-PLC 活性が低く、対照と有意な差は認められなかった。そして今後、DGK δ -CC との相互作用を利用して PC-PLC の分子実体の解明を目指したい。

Fig.3 変異体融合タンパク質による Pull down assay後のPC-PLC活性



n=3, *p<0.05, **p<0.01, data means \pm SEM

(2) 従来の PC-PLC 活性測定法では、バックグラウンド活性が高く、弱い PC-PLC 活性を定量性良く測定することが困難であった。そこで、液体クロマトグラフィー/質量分析を用いた、感度が高く定量性の良い測定法を確立した [論文①]。すなわち、本法は従来法に比べ、低いバックグラウンド活性 (0.02% 対 91%), 高いシグナル/ノイズ比 (7294 対 4.4), 高い感度 (32 倍以上), 低い定量限界 (0.04 pmol 対 0.69 pmol of PC-PLC) を持っていた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

① Murakami, C., Mizuno, S., Kado, S. and Sakane, F. Development of a liquid chromatography-mass spectrometry based enzyme activity assay for phosphatidylcholine-specific phospholipase

- C. Anal. Biochem.*, **526**, 43–49 (2017) 査読有 (DOI: 10.1016/j.ab.2017.03.010)
- ② Mizuno, S., Sasai, H., Kume, A., Takahashi, D., Satoh, M., Kado, S. and Sakane, F. Dioleoyl-phosphatidic acid selectively binds to α -synuclein and strongly induces its aggregation. *FEBS Lett.*, **591** (5), 784–791 (2017) 査読有 (DOI: 10.1002/1873-3468.12592)
- ③ Mizuno, S., Kado, S., Goto, K., Takahashi, D. and Sakane, F. Diacylglycerol kinase ζ generates dipalmitoyl-phosphatidic acid species during neuroblastoma cell differentiation. *Biochem. Biophys. Rep.*, **8**, 352–359 (2016) 査読有 (DOI: 10.1016/j.bbrep.2016.10.004)
- ④ Murakami, E., Shionoya, T., Komenoi, S., Suzuki, Y. and Sakane, F. Cloning and characterization of novel testis-specific diacylglycerol kinase η splice variant 3 and 4. *PLOS ONE* **11** (9), Article e0162997, 1–14 (2016) 査読有 (DOI: 10.1371/journal.pone.0162997)
- ⑤ Sakane, F., Mizuno, S. and Komenoi, S. Diacylglycerol kinases as emerging potential drug targets for a variety of diseases: An update. Research Topic in 2016 "Diacylglycerol Kinase Signalling", *Front. Cell Dev. Biol.* **4**, Article 82, 1–8 (2016) 査読有 (DOI: 10.3389/fcell.2016.00082)
- ⑥ Kamiya, Y., Mizuno, S., Komenoi, S., Sakai, H., and Sakane, F. Activation of conventional and novel protein kinase C isozymes by different diacylglycerol molecular species. *Biochem. Biophys. Rep.* **7**, 361–366 (2016) 査読有 (DOI: 10.1016/j.bbrep.2016.07.017)
- ⑦ Usuki, T., Takato, T., Lu Q., Sakai, H., Bando, K., Kiyonari, H. and Sakane, F. Behavioral and pharmacological phenotypes of brain-specific diacylglycerol kinase δ -knockout mice. *Brain Res.* **1648** (Part A), 193–201 (2016) 査読有 (DOI: 10.1016/j.brainres.2016.07.017)
- ⑧ Sato, Y., Murakami, C., Yamaki, A., Mizuno, S., Sakai, H. and Sakane, F. Distinct 1- and 2-monoacylglycerol kinase activities of diacylglycerol kinase isozymes. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1864** (9), 1170–1176 (2016) 査読有 (DOI: 10.1016/j.bbapap.2016.06.012)
- ⑨ Wada, Y., Sakiyama, S., Sakai, H. and Sakane, F. Myristic acid enhances diacylglycerol kinase δ -dependent glucose uptake in myotubes. *Lipids* **51** (8), 897–903 (2016) 査読有 (DOI: 10.1007/s11745-016-4162-9)
- ⑩ Isozaki, T., Komenoi, S., Lu Q., Usuki, T., Tomokata, S., Matsutomo, D., Sakai, H. Bando, K., Kiyonari, H. and Sakane, F. Deficiency of diacylglycerol kinase η induces lithium-sensitive mania-like behaviors. *J. Neurochem.* **138** (3), 448–456 (2016) 査読有 (DOI: 10.1111/jnc.13661)
- ⑪ Kume, A., Kawase, K., Komenoi, S., Usuki, T., Takeshita, E., Sakai, H. and Sakane, F. The pleckstrin homology domain of diacylglycerol kinase η strongly and selectively binds to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* **291** (15), 8150–8161 (2016) 査読有 (DOI:10.1074/jbc.M115.648717)
- ⑫ Liu, K., Kunii, N., Sakuma, M., Yamaki, A., Mizuno, S., Sato, M., Sakai, H., Kado, S., Kumagai, K., Kojima, H., Okabe, T., Nagano, T., Shirai, Y. and Sakane, F. A novel diacylglycerol kinase α -selective inhibitor, CU-3, induces cancer cell apoptosis and enhances immune response. *J. Lipid Res.* **57** (3), 368–379 (2016) 査読有 (DOI:10.1194/jlr.M062794)
- ⑬ Komenoi, S., Takemura, F., Sakai, H. and Sakane, F. Diacylglycerol kinases $\eta 1$ is a high affinity isozyme for diacylglycerol. *FEBS Lett.* **589** (11), 1272–1277 (2015) 査読有 (DOI: 10.1016/j.febslet.2015.03.032)
- [学会発表] (計 33 件)
- ① Sakane, F., Mizuno, S. and Sakai, H., Diacylglycerol kinase utilizes diacylglycerol species from phosphatidylinositol turnover-independent pathways. In: the 58th Advances in Biological Regulation Symposium in Bologna “Biological Regulation and Enzyme Activity in Normal and Neoplastic Tissues”: Bologna, Italy: October 2–3, 2017 (Invited speaker)
- ② 陸強, 臼木貴子, 高戸珠恵, 坂根郁夫: 脳におけるジアシルグリセロールキナーゼ δ の欠損は強迫性障害様の行動を引き起こす. 平成 29 年度 日本生化学会関東支部例会, 2017 年 6 月 17 日, 東京
- ③ 堺弘道, 松本健一, 坂根郁夫: ジアシルグリセロールキナーゼ δ は C2C12 筋芽細胞の筋分化誘導のために cyclin D1 の発現を制御する. 第 59 回日本脂質生化学会, 2017 年 6 月 15–16 日, 京都
- ④ 岩田海, 高戸珠恵, 和田祐子, 坂根郁夫: ミリスチン酸の持続的投与はII型糖尿病モデルマウスの血糖値上昇を防ぐ. 第 59 回日本脂質生化学会, 2017 年 6 月 15–16 日, 京都
- ⑤ 水野悟, 坂根郁夫: 18:1/18:1-ホスファチジン酸は α -シヌクレインと強く結合し凝集を促進する. 第 59 回日本脂質生化学会, 2017 年 6 月 15–16 日, 京都

- ⑥ Murakami, C. and Sakane, F., New evaluation method of diacylglycerol-generating activity of phosphatidylcholine-specific phospholipase C using mass spectrometry. In: The 7th International Symposium on Diacylglycerol Kinase: Kobe: March 13, 2017
- ⑦ Takahashi, D., Satoh, E. and Sakane, F., Expression and purification of diacylglycerol kinase α catalytic domain for crystallographic studies. In: The 7th International Symposium on Diacylglycerol Kinase: Kobe: March 13, 2017
- ⑧ Sakane, F., Roles of diacylglycerol kinase isozymes and phosphatidic acid species in neurological functions and disorders. In: The 7th International Symposium on Diacylglycerol Kinase: Kobe: March 13, 2017 (Invited speaker)
- ⑨ 坂根郁夫, 水野悟. 神経細胞で産生されるホスファチジン酸分子種とその結合蛋白質 α シヌクレイン. 第5回 大学連携研究設備ネットワーク 研究成果報告会 ～質量分析を中心とした最新の研究展開～: 2017年3月8日, 千葉
- ⑩ 八巻篤実, 劉可, 国井奈央子, 坂根郁夫: メラノーマ細胞に対するジアシルグリセロールキナーゼ α 選択的活性制御化合物の細胞死誘導効果, 第89回日本生化学会大会, 2016年9月25~27日, 仙台
- ⑪ 川瀬功暉, 坂根郁夫: ジアシルグリセロールキナーゼ η のプレクストリン相同ドメインの精製とその性質, 第89回日本生化学会大会, 2016年9月25~27日, 仙台
- ⑫ 陸強, 磯崎丈志, 米野井優, 坂根郁夫: ジアシルグリセロールキナーゼ η 欠損によるリチウム感受性躁様行動の誘導, 第89回日本生化学会大会, 2016年9月25~27日, 仙台
- ⑬ 村上千明, 水野悟, 坂根郁夫: 質量分析法を用いた新規ホスファチジルコリン特異的ホスホリパーゼ C 活性測定法の開発, 第89回日本生化学会大会, 2016年9月25~27日, 仙台
- ⑭ 米野井優, 坂根郁夫: ジアシルグリセロールキナーゼ η ノックアウトマウスのそう様行動惹起の分子メカニズム, 第89回日本生化学会大会, 2016年9月25~27日, 仙台
- ⑮ 水野悟, 坂根郁夫: 神経分化誘導時に産生されるジアシルグリセロール及びホスファチジン酸分子種の解析, 第89回日本生化学会大会, 2016年9月25~27日, 仙台
- ⑯ 陸強, 磯崎丈志, 米野井優, 坂根郁夫: ジアシルグリセロールキナーゼ η 欠損によるリチウム感受性躁様行動の誘導, 第58回日本脂質生化学会, 2016年6月9~10日, 秋田
- ⑰ 水野悟, 坂根郁夫: 神経分化誘導時に産生されるジアシルグリセロール及びホスファチジン酸分子種の解析, 第58回日本脂質生化学会, 2016年6月9~10日, 秋田
- ⑱ 堺弘道, 松本健一, 坂根郁夫: C2C12 筋芽細胞の筋分化におけるジアシルグリセロールキナーゼ δ の機能, 第58回日本脂質生化学会, 2016年6月9~10日, 秋田
- ⑲ Mizuno, S. and Sakane, F., Diacylglycerol kinase ζ produces 16:0-containing phosphatidic acid molecular species during neuroblastoma cell differentiation. In: 2016 Annual Meeting of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology at Experimental Biology 2016: San Diego, California, USA: April 2-6, 2016
- ⑳ Yamaki, A., Liu, Ke., Kunii, N., Mizuno, S. and Sakane, F., A novel diacylglycerol kinase α -selective inhibitor, CU-3, induces cancer cell apoptosis and enhances immune response. Joint Workshop on Chirality in Chiba University and on Soft-Molecule Activation. Chiba: March 17, 2016
- ㉑ 村上絵梨, 塩谷貴生, 坂根郁夫: 精巢に特異的に発現する新規 DGK η スプライシングバリエント DGK η 3 遺伝子のクローニング. In: Biochemistry and Molecular Biology 2015 (第88回日本生化学会大会・第38回日本分子生物学会年会): 神戸: December 1-4, 2015
- ㉒ 水野悟, 坂根郁夫: 神経分化時に産生されるホスファチジン酸分子種とその産生酵素の同定. In: Biochemistry and Molecular Biology 2015 (第88回日本生化学会大会・第38回日本分子生物学会年会): 神戸: December 1-4, 2015
- ㉓ 和田祐子, 堺弘道, 崎山静花, 坂根郁夫: ミリスチン酸は筋管細胞のジアシルグリセロールキナーゼ δ の発現とグルコース取り込み能を亢進する. In: Biochemistry and Molecular Biology 2015 (第88回日本生化学会大会・第38回日本分子生物学会年会): 神戸: December 1-4, 2015
- ㉔ 米野井優, 堺弘道, 坂根郁夫: ジアシルグリセロールキナーゼ η はジアシルグリセロール高親和性のアイソザイムである. In: Biochemistry and Molecular Biology 2015 (第88回日本生化学会大会・第38回日本分子生物学会年会): 神戸: December 1-4, 2015
- ㉕ 神谷侑那, 水野悟, 堺弘道, 坂根郁夫: ジアシルグリセロールキナーゼによって代謝されるジアシルグリセロール分子種のプロテインキナーゼ C 活性化能. In: Biochemistry and Molecular Biology 2015 (第88回日本生化学会大会・第38

- 回日本分子生物学会年会) : 神戸 :
December 1-4, 2015
- ②⑥ 佐藤優里子, 坂根郁夫: 脂質代謝酵素ジアシルグリセロールキナーゼの多様なモノアシルグリセロールキナーゼ活性.
In: *Biochemistry and Molecular Biology 2015* (第 88 回日本生化学会大会・第 38 回日本分子生物学会年会) : 神戸 :
December 1-4, 2015
- ②⑦ 臼木貴子, 高戸珠恵, 堺弘道, 坂根郁夫: 発達中マウスの脳における diacylglycerol kinase δ の発現とその脳特異的欠損マウスの表現型解析. In: *Biochemistry and Molecular Biology 2015* (第 88 回日本生化学会大会・第 38 回日本分子生物学会年会) : 神戸 :
December 1-4, 2015
- ②⑧ 坂根郁夫: インスリン抵抗性とジアシルグリセロールキナーゼ δ . In: *Biochemistry and Molecular Biology 2015* (第 88 回日本生化学会大会・第 38 回日本分子生物学会年会) ワークショップ「DG シグナリングと糖尿病関連疾患」: 神戸 :
December 1-4, 2015
- ②⑨ Komenoi, S., Sakai, H. and Sakane, F., Diacylglycerol kinases $\eta 1$ is a high affinity isozyme for diacylglycerol. In: 14th International Conference on Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation and Related Diseases. Budapest, Hungary: July 12-15, 2015
- ③⑩ Usuki, T. and Sakane, F., Expression and localization of diacylglycerol kinase δ in the developing mouse brain and phenotype of its brain-specific knockout mice. In: 14th International Conference on Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation and Related Diseases. Budapest, Hungary: July 12-15, 2015
- ③⑪ 劉可, 国井奈央子, 佐藤麻由, 白井康仁, 坂根郁夫: ジアシルグリセロールキナーゼ α の選択的活性阻害化合物の同定, 第 57 回日本脂質生化学会, 2015 年 5 月 28 ~29 日, 東京
- ③⑫ 水野 悟, 坂根郁夫: 神経分化時に産生されるホスファチジン酸分子種とその産生酵素の同定, 第 57 回日本脂質生化学会, 2015 年 5 月 28~29 日, 東京
- ③⑬ 米野井優, 堺弘道, 坂根郁夫: ジアシルグリセロールキナーゼ η はジアシルグリセロール高親和性のアイソザイムである, 第 57 回日本脂質生化学会, 2015 年 5 月 28~29 日, 東京

[図書] (計 1 件)

- ① 坂根郁夫, 第 3 節 ジアシルグリセロールキナーゼ, 尾池雄一, 佐々木雄彦編, *Series モデル動物利用マニュアル 疾患モデルの作成と利用-脂質代謝異常と関連疾患* 第 6 章 細胞内脂質シグ

ナル関連因子, pp293-302, エル・アイ・シー, 東京 (2015)

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

名称: 糖尿病予防・治療用医薬製生物, 血糖値改善用食品組成物, 及び, 糖尿病の予防・治療方法
発明者: 坂根郁夫
権利者: 国立大学法人千葉大学
種類: 特許権
番号: 特願 2017-090872
出願年月日: 平成 29 年 4 月 28 日
国内外の別: 国内

名称: DGK δ ノックアウトマウス及びこれをを用いた方法
発明者: 坂根郁夫
権利者: 国立大学法人千葉大学
種類: 特許権
番号: 特願 2017-004729
出願年月日: 平成 29 年 1 月 13 日
国内外の別: 国内

名称: DGK η ノックアウトマウス及びこれをを用いた方法
発明者: 坂根郁夫
権利者: 国立大学法人千葉大学
種類: 特許権
番号: 特願 2016-220080
出願年月日: 平成 28 年 11 月 10 日
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://sakane32.wixsite.com/biofunctionchemistry>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂根 郁夫 (SAKANE FUMIO)
千葉大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号: 10183815

(3) 連携研究者

堺 弘道 (SAKAI HIROMICHI)
島根大学・総合科学研究支援センター・助教
研究者番号: 00375255