

平成21年5月14日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19570136  
 研究課題名（和文） 上皮増殖因子受容体シグナル伝達におけるジアシルグリセロールキナーゼ $\delta$ の機能解析  
 研究課題名（英文） The study of functions of diacylglycerol kinase  $\delta$  in signal transduction of epidermal growth factor receptor  
 研究代表者  
 今井 伸一（IMAI SHIN-ICHI）  
 札幌医科大学・医学部・講師  
 研究者番号：20213209

研究成果の概要：上皮増殖因子受容体のシグナル伝達において、脂質リン酸化酵素ジアシルグリセロールキナーゼ(DGK) $\delta$ がどのような役割を果たしているかを解明するために、本研究では DGK $\delta$ とアダプター蛋白質 RACK1 (receptor for activated C kinase 1)の結合の解析を行った。その結果、RACK1はII型のDGKアイソザイムに選択的に結合し、I型とは結合しないこと、また複数のDGKアイソザイムとRACK1の結合が細胞外刺激によりダイナミックに調節されていることが明らかになった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：ジアシルグリセロールキナーゼ、ジアシルグリセロール、ホスファチジン酸、RACK1

## 1. 研究開始当初の背景

ジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)はジアシルグリセロール(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。基質のDGおよび反応産物のPAのどちらも生理活性脂質としてよく知られていることから、DGKはこれらの生理活性脂質の濃度を調節している細胞内情報伝達系におけるキーエンザイムの一つと考えられている。哺乳類のDGKは現在まで10種類のアイソザイムのcDNAがクローニングされ、これ

らのアイソザイムはそのドメイン構造の違いから5つのサブグループ(I～V型)に分類されている。

II型のサブグループには $\delta$ 、 $\eta$ 、 $\kappa$ の3つのアイソザイムが含まれており、 $\delta$ 及び $\eta$ にはそれぞれN端、C端の配列が異なるスプライスバリエーション( $\delta 1$ 、 $\delta 2$ 及び $\eta 1$ 、 $\eta 2$ )が存在する。II型アイソザイムはすべてのアイソザイムに共通の触媒ドメインと亜鉛フィンガーの他に、pleckstrin homologyドメイン、コイルドコイル構造、sterile  $\alpha$ -motif (SAM)ドメイ

ン( $\eta$ 1,  $\kappa$ アイソザイム以外)を持っている。このSAMドメインを介してII型アイソザイムはホモあるいはヘテロオリゴマーを形成しており、特にDGK $\delta$ 1のホモオリゴマーは細胞をホルボールエステルで刺激することでモノマーに変換し、細胞膜へと移行する事が明らかになっている。

最近、DGK $\delta$ のノックアウト(KO)マウスの研究から、DGK $\delta$ がプロテインキナーゼC(PKC)の活性を抑制することにより、上皮増殖因子(EGF)受容体のシグナル伝達を正に制御していることが明らかになった。しかし、その詳細な機構は明らかになっていない。

KOマウスの作製とは別に、我々は酵母のtwo-hybrid法によりDGK $\delta$ と結合する蛋白質としてRACK1(receptor for activated C kinase 1)をクローン化した。RACK1は複数のPKCアイソザイムを含む種々のシグナル蛋白質と結合することが報告されているアダプター蛋白質である。DGK $\delta$ とRACK1の結合がどのような生理機能に關与しているかは不明であるが、DGK $\delta$ によるEGF受容体シグナル伝達の調節にRACK1が關与していることも考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、EGF受容体、PKC、DGK $\delta$ 及びRACK1の相互作用の詳細な解析を行うことにより、EGF受容体シグナル伝達におけるDGK $\delta$ の機能の詳細を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 細胞培養及び発現-COS-7は10%ウシ胎仔血清を含むD'MEM培地で培養した。各種プラスミドDNAをトランスフェクションし、以後の実験に用いた。

(2) 免疫沈降実験-細胞溶解液に抗体を加えインキュベートし、プロテインA/Gアガロースを加えさらにインキュベートした。アガロースビーズを洗浄したのち、ウェスタンブロッティングに用いた。

(3) 蛍光顕微鏡観察-蛍光蛋白質を発現させた細胞を刺激した後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

## 4. 研究成果

(1) 哺乳動物細胞でのDGK $\delta$ とRACK1の結合-酵母two-hybrid法でクローン化したRACK1とDGK $\delta$ の結合について哺乳動物細胞を用いてさらに検討した。COS-7細胞にDGK $\delta$ 1あるいは $\delta$ 2とRACK1を共発現させ、一方の免疫沈降を行うと、もう一方も共沈し

てきた。また、他のDGKアイソザイムとRACK1との共沈実験を行ったところ、II型の $\eta$ 、 $\kappa$ アイソザイムとはいずれもRACK1は共沈したが、I型の $\alpha$ 、 $\gamma$ アイソザイムとは共沈しなかった。これらのことから、RACK1はII型DGKと選択的に結合することが明らかになった。しかし、RACK1とDGK $\delta$ がどの領域で結合しているのかを酵母two-hybrid法及び免疫沈降実験で検討したが、いずれの実験からもその領域を特定することができなかった。

DGK $\delta$ とRACK1の両者はいずれも複数のPKCアイソザイムと結合することから、DGK $\delta$ 、RACK1、PKCのいずれかが他の2つの蛋白質の結合に影響を与えるかを免疫沈降実験により検討したが、これらの3つの蛋白質の過剰発現はいずれも他の蛋白質の結合には影響を与えなかった。また、RACK1の過剰発現はDGK $\delta$ の酵素活性にも影響を与えなかった。

(2) DGK $\delta$ とRACK1の共局在-DGK $\delta$ とRACK1が共沈してくることから、DGK $\delta$ /RACK1複合体が細胞内のどこに局在しているかを検討した。過剰発現させたDGK $\delta$ はRACK1の発現の有無にかかわらず、そのほとんどがクラスリン被覆小胞に局在していた。しかし、過剰発現させたRACK1はDGK $\delta$ が発現していない時は細胞質や核に広く存在していたのに対し、DGK $\delta$ を共発現させることによりRACK1はその一部がクラスリン被覆小胞に移行し、DGK $\delta$ と共局在した。また、内在性のDGK $\delta$ とRACK1が細胞内小胞で共局在することも確認できた。

(3) ホルボールエステル刺激によるDGK $\delta$ 1とRACK1の結合調節-DGK $\delta$ 1はホルボールエステル刺激により細胞膜へと移行することから、DGK $\delta$ とRACK1の結合に対するホルボールエステルの影響を検討した。DGK $\delta$ 1とRACK1を共発現した細胞をホルボールエステル刺激後、DGK $\delta$ 1の免疫沈降を行ったところ、共沈してくるRACK1の量は未刺激時に比べて減少した。この時、両蛋白質の細胞内局在を観察するとDGK $\delta$ 1は細胞膜へと移行していたが、RACK1は移行していなかった。しかし、DGK $\delta$ 2とRACK1の共沈及び共局在にはホルボールエステル刺激は影響を与えなかった。これらのことから、DGK $\delta$ 1とRACK1の結合はホルボールエステルにより調節されることが示された。

(4) DGK $\eta$ とRACK1の結合-DGK $\eta$ はストレス刺激で細胞質から初期エンドソームに移行することから、DGK $\eta$ 2とRACK1の結合に対するストレス刺激の影響を検討した。未刺激の細胞では両者は細胞質に広く存在し

ていたが、ストレス（浸透圧）刺激により両者はクラスリン被覆小胞とは異なる細胞内顆粒、一部は初期エンドソーム、に移行した。このことから、DGK $\eta$ 2/RACK1 複合体は DGK $\delta$ 1/RACK1 複合体とは異なる調節を受けることが示された。

(5) 以上の結果から、DGK と RACK1 との結合は DGK アイソザイムに選択的であることが明らかになった。さらに、DGK $\delta$ 1 及び $\eta$ 2 と RACK1 の複合体形成は細胞外刺激により、ダイナミックに調節されていることも明らかになった。しかし、残念ながら今回の研究では当初の目的である EGF 受容体のシグナル伝達における DGK $\delta$  と RACK1 の結合の役割は明らかにできなかった。今後さらなる検討が必要である。

RACK1 はアダプター蛋白質として種々のシグナル蛋白質と結合することから、II 型 DGK が RACK1 を介して様々な（特定の）シグナル伝達に関与することによりその生理機能を果たしていると考えられる。本研究からもホルボールエステルやストレス刺激において DGK アイソザイムと RACK1 の結合及び共局在が変化することから、これらの刺激の際の細胞応答に DGK/RACK1 複合体が関与していることが推測される。また、今回行わなかった III、IV、V 型アイソザイムにおいてもその生理機能に RACK1 が関与している可能性があることから、これらのアイソザイムについても今後検討が必要である。

## 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 9 件）

- ① Imai S, Yasuda S, Kai M, Kanoh H, Sakane F. Diacylglycerol kinase  $\delta$  associates with receptor for activated C kinase 1, RACK1. *Biochim. Biophys. Acta* **1791** (2009) 246–253, 査読有.
- ② Sakane F, Imai S, Kai M, Yasuda S, Kanoh H. Diacylglycerol kinases as emerging potential drug targets for a variety of diseases. *Curr. Drug Targets* **9** (2008) 626–640, 査読有.
- ③ Harada B T, Knight M J, Imai S, Qiao F, Ramachander R, Sawaya M R, Gingery M, Sakane F, Bowie J U. Regulation of enzyme localization by polymerization: polymer formation by the SAM domain of diacylglycerol kinase  $\delta$ 1. *Structure* **16** (2008) 380–387, 査読有.
- ④ Yasuda S, Kai M, Imai S, Kanoh H, Sakane F. Phorbol ester and hydrogen peroxide

synergistically induce the interaction of diacylglycerol kinase  $\gamma$  with the Src homology 2 and C1 domains of  $\beta$ 2-chimaerin. *Biochem. J.* **409** (2008) 95–106, 査読有.

- ⑤ Kawakami A, Sakane F, Imai S, Yasuda S, Kai M, Kanoh H, Jin H-Y, Hirotsaki K, Yamashita T, Fisher D. E, Jimbow K. Rab7 regulates maturation of the melanosomal matrix protein gp100/Pmel17/Silv. *J. Invest. Dermatol.* **128** (2008) 143–150, 査読有.
- ⑥ Kai M, Yasuda S, Imai S, Kanoh H, Sakane F. Tyrosine phosphorylation of  $\beta$ 2-chimaerin by Src-family kinase negatively regulates its Rac-specific GAP activity. *Biochim. Biophys. Acta* **1773** (2007) 1407–1415, 査読有.
- ⑦ Sakane F, Imai S, Kai M, Yasuda S, Kanoh H. Diacylglycerol kinases: why so many of them? *Biochim. Biophys. Acta* **1771** (2007) 793–806, 査読有.
- ⑧ Yanagisawa K, Yasuda S, Kai M, Imai S, Yamada K, Yamashita T, Jimbow K, Kanoh H, Sakane F. Diacylglycerol kinase  $\alpha$  suppresses tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis of human melanoma cells through NF- $\kappa$ B activation. *Biochim. Biophys. Acta* **1771** (2007) 462–474, 査読有.
- ⑨ Yasuda S, Kai M, Imai S, Kanoh H, Sakane F. Diacylglycerol kinase  $\gamma$  interacts with and activates  $\beta$ 2-chimaerin, a Rac-specific GAP, in response to epidermal growth factor. *FEBS Lett.* **581** (2007) 551–557, 査読有.

〔学会発表〕（計 3 件）

- ① 今井伸一「ジアシルグリセロールキナーゼ  $\delta$  は RACK1 (receptor for activated C kinase 1) と会合する」第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会、2008 年 12 月 9 日、神戸
- ② 今井伸一「ジアシルグリセロールキナーゼ  $\delta$  は RACK1 (receptor for activated C kinase 1) と結合する」第 67 回日本癌学会学術総会、2008 年 10 月 28 日、名古屋
- ③ 今井伸一「ジアシルグリセロールキナーゼ  $\delta$  と RACK1 は互いの複数のドメインを介して結合している」第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会、2007 年 12 月 12 日、横浜

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

- 出願状況（計 0 件）
- 取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 伸一 (IMAI SHIN-ICHI)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：20213209

(2) 研究分担者

坂根 郁夫 (SAKANE FUMIO)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10183815

(3) 連携研究者

なし