

平成 21 年 4 月 23 日現在

研究種目： 若手研究(B)  
 研究期間： 2007～2008  
 課題番号： 19790065  
 研究課題名（和文） ジアシルグリセロールキナーゼ $\gamma$ による細胞骨格制御機構の解明  
 研究課題名（英文） Elucidation of the mechanism by which diacylglycerol kinase  $\gamma$  regulates cytoskeleton reorganization.  
 研究代表者  
 安田 智 (YASUDA SATOSHI)  
 札幌医科大学・医学部・助教  
 研究者番号： 20381262

研究成果の概要：細胞骨格系の制御は細胞の伸展や遊走に深く関わっている。Rho ファミリー低分子量 G タンパク質である Rac の活性化は、細胞骨格の構成分子であるアクチンの再構築を促し、葉状仮足形成を引き起こす。脂質代謝酵素ジアシルグリセロールキナーゼ $\gamma$  (DGK $\gamma$ ) は、Rac を不活性化し葉状仮足形成を抑制するが、そのメカニズムは不明であった。本研究によって、Rac を不活性化する  $\beta$ 2-chimaerin を DGK $\gamma$  が活性化する機構が明らかとなった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：脂質、細胞内情報伝達、酵素

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) は、細胞を構成する脂質成分を産生するというよりも、むしろ細胞内の限られた場においてセカンドメッセンジャーであるジアシルグリセロール (DAG) を積極的に代謝することによりシグナル伝達と細胞機能を制御していると考えられている。DGK には 10 種類のアイズォイムが存在する事から、DGK はシグナル伝達において非常に多岐にわたる役割を担っていることが考

えられる。

(2) Rho ファミリー低分子量 G タンパク質である Rho、Rac、Cdc42 はアクチンの再構築を促し細胞形態を制御する因子として非常に重要であることがよく知られている。

(3) Rho ファミリー G タンパク質と DGK は互いの活性を調節し細胞機能を制御していることが近年報告されている。また当研究室でも、DGK $\gamma$  が Rac 活性を抑制することを報告

している。しかしながら、DGK と Rho ファミリー G タンパクはどのようなメカニズムで互いを制御するのか、まだ不明な点も多い。

## 2. 研究の目的

(1)  $\beta$ 2-chimaerin は Rac 特異的 GTPase activating protein (GAP) であり、Rac 活性を抑制する分子である。また、 $\beta$ 2-chimaerin はホルボールエステルと DAG に応答性を示す C1 ドメインを有し、ホスファチジン酸 (PA) により活性化される。これらのことにより、我々は DGK  $\gamma$  のエフェクター分子として  $\beta$ 2-chimaerin に着目し、DGK  $\gamma$  が  $\beta$ 2-chimaerin を介して Rac 活性を制御する可能性を考えた。また最近、 $\beta$ 2-chimaerin は上皮増殖因子 (EGF) および血小板由来増殖因子 (PDGF) の刺激に応答して Rac 活性を抑制することが報告されている。増殖因子に応答した DGK  $\gamma$  による  $\beta$ 2-chimaerin の活性制御機構の解明を目的として解析を行う。

(2) EGF 刺激によって DGK  $\gamma$  と  $\beta$ 2-chimaerin の相互作用が促進することが明らかとなったため、さらに詳細にその相互作用のメカニズムの解明を行う。EGF 刺激により細胞内 DAG 濃度および活性酸素濃度が上昇することが報告されている。我々は、DAG アナログであるホルボールエステルと過酸化水素で細胞を刺激すると、相乗的に DGK  $\gamma$  と  $\beta$ 2-chimaerin の相互作用が増強されることを見出した。DGK  $\gamma$  と  $\beta$ 2-chimaerin の相互作用におけるホルボールエステルと過酸化水素の役割を見つけ出すことを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 細胞培養および発現-COS7 細胞に DGK  $\gamma$  と  $\beta$ 2-chimaerin をコードするプラスミドをトランスフェクトし、EGF、ホルボールエステルまたは過酸化水素で刺激を行った。

(2) Rac-GTP 定量-細胞溶解液に GST と融合した PAK 1 の p21-binding domain とグルタチオンセファロースを加えインキュベートした。沈降した Rac-GTP は抗 Rac 1 抗体を用いたウェスタンブロッティングで検出した。

(3) 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。ビーズを洗浄した後、ウェスタンブロッティングに用いた。

(4) 蛍光顕微鏡観察-蛍光タンパク質を細胞に発現させ刺激を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(5) 亜鉛濃度測定-C1 ドメインを含むタンパク質を大腸菌で発現させアフィニティー精製し、ホルボールエステルまたは過酸化水素とインキュベートした。FluoZin-3 により遊離した亜鉛濃度を測定した。

## 4. 研究成果

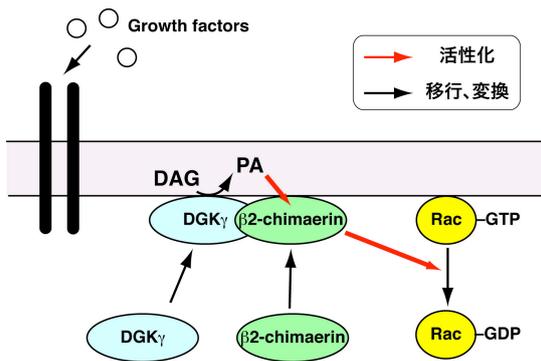
(1)① COS7 細胞に DGK  $\gamma$  と  $\beta$ 2-chimaerin を発現させ EGF 刺激を行い、Rac1 活性に対する影響を見た。DGK  $\gamma$  は  $\beta$ 2-chimaerin と共発現させたとき、EGF 刺激依存的に Rac1 活性を抑制した。また  $\beta$ 2-chimaerin と共発現しないときには、DGK  $\gamma$  は Rac1 活性に影響を及ぼさなかった。

(1)② DGK  $\gamma$  と  $\beta$ 2-chimaerin を共発現させた COS7 細胞を、EGF 刺激し DGK  $\gamma$  を免疫沈降したところ、 $\beta$ 2-chimaerin の共沈降が見られた。DGK  $\gamma$  と  $\beta$ 2-chimaerin の相互作用の程度は、EGF 刺激後 2 分で最大となり、10 分後までには元のレベルに戻った。これらの結果から EGF シグナルによって、DGK  $\gamma$  と  $\beta$ 2-chimaerin の相互作用はダイナミックに制御されることが示された。

(1)③ COS7 細胞に GFP-DGK  $\gamma$  と DsRed- $\beta$ 2-chimaerin を発現させ、蛍光顕微鏡で観察を行った。EGF 刺激により  $\beta$ 2-chimaerin は細胞膜へと移行した。さらに DGK  $\gamma$  を発現させることにより、 $\beta$ 2-chimaerin の細胞膜への移行が増強された。

(1)④ 以上より、EGF 刺激により DGK  $\gamma$  と  $\beta$ 2-chimaerin は細胞膜で相互作用し、DGK  $\gamma$  が  $\beta$ 2-chimaerin を活性化することが考えられた。以下にモデル図を示す。

図1 DGK $\gamma$ の $\beta$ 2-chimaerin活性化機構



(2)① COS7 細胞に DGK $\gamma$  と  $\beta$ 2-chimaerin を発現させ、ホルボールエステルと過酸化水素で細胞刺激を行った。DGK $\gamma$  を免疫沈降したところ、ホルボールエステルおよび過酸化水素刺激で  $\beta$ 2-chimaerin の共沈降が見られた。興味深いことに、ホルボールエステルと過酸化水素の効果は相乗的であった。

(2)② COS7 細胞に DGK $\gamma$  と開放型  $\beta$ 2-chimaerin 変異体を発現させたところ、ホルボールエステルと過酸化水素の相互作用に対する相乗効果は消失した。すなわち、過酸化水素のみの刺激により、DGK $\gamma$  と開放型  $\beta$ 2-chimaerin 変異体は強く相互作用した。また選択的な亜鉛キレーターである TPEN で細胞を処理することにより、過酸化水素の効果を模倣することができた。

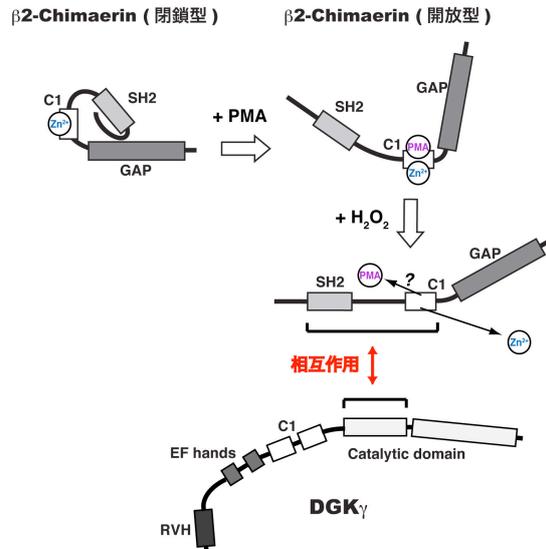
(2)③ 精製した DGK $\gamma$  と  $\beta$ 2-chimaerin のリコンビナント蛋白質を過酸化水素とインキュベートすると、C1 ドメインからの亜鉛の遊離が確認された。

(2)④ DGK $\gamma$  と  $\beta$ 2-chimaerin の段階的にドメインを削除した変異体を用いた解析から、DGK $\gamma$  の触媒部位 N 末端側と  $\beta$ 2-chimaerin の SH2 および C1 ドメインが相互作用することが分かった。またその相互作用は、チロシンリン酸に非依存的であった。

(2)⑤ 以上より、DGK $\gamma$  と  $\beta$ 2-chimaerin の相互作用には、 $\beta$ 2-chimaerin の DAG/ホルボー

ルエステルによる開放型への変換と C1 ドメインからの亜鉛の遊離が重要であることが明らかとなった。以下にモデル図を示す。

図2 DGK $\gamma$  と  $\beta$ 2-chimaerin の相互作用機構



(3)①  $\beta$ 2-chimaerin は乳がん細胞において発現が減少していることが報告されている。また  $\beta$ 2-chimaerin は Rac 活性を抑制することにより、細胞の遊走を阻害することも知られている。今回の研究により、DGK $\gamma$  が  $\beta$ 2-chimaerin を活性化することが明らかとなり、DGK $\gamma$  のがん抑制因子としての役割が示唆された。

(3)② DGK $\gamma$  は  $\beta$ 2-chimaerin と同様に小脳での発現が高いことが知られている。また Rac は神経細胞の成長円錐形成に重要な役割を果たしている。DGK $\gamma$  の神経細胞における働きも非常に興味深く、今後の検討課題である。

### 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 7 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*

- *Mol. Cell Biol. Lipids* 1791, 246-253 (2009). 査読あり

- 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, 626-640 (2008). 査読あり
- ③ 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, 95-106, (2008). 査読あり
- ④ Kawakami A, Sakane F, Imai S, Yasuda S., Kai M, Kanoh H, Jin H-Y, Hirosaki K, Yamashita T, Fisher DE, Jimbow K. Rab7 regulates maturation of the melanosomal matrix protein gp100/Pmel17/Silv. *J. Invest. Dermatol.* 128, 143-150, (2008). 査読あり
- ⑤ 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 - Mol. Cell Res.* 1773, 1407-1415 (2007). 査読あり
- ⑥ Sakane F, Imai S., Kai M., Yasuda S., Kanoh H. Diacylglycerol kinases: Why so many of them? *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1771, 793-806 (2007). 査読あり
- ⑦ 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 - Mol. Cell Biol. Lipids* 1771, 462-474 (2007). 査読あり

[学会発表] (計 4 件)

- ① 安田 智, 今井 伸一, 甲斐 正広, 豊田 実, 坂根 郁夫 ジアシルグリセロールキナーゼ  $\eta$  は上皮増殖因子に応答して C-RAF を活性化し、細胞増殖を促進する。BMB2008 2008 年 12 月 9 日 神戸
- ② 安田 智, 今井 伸一, 甲斐 正広, 鈴木 拓, 今井 浩三, 豊田 実, 坂根 郁夫 ジアシル

グリセロールキナーゼ  $\eta$  は上皮増殖因子に  
応答した RAF-MEK-ERK 経路を活性化し、  
細胞増殖を促進する。第 67 回日本癌学会学  
術総会 2008 年 10 月 28 日名古屋

- ③ 安田 智, 甲斐 正広, 今井 伸一, 坂根 郁夫,  
加納 英雄 細胞刺激に応答したジアシルグ  
リセロールキナーゼ  $\gamma$  による  $\beta$   
2-chimaerin 活性化機構 BMB2007 2007  
年 12 月 12 日 横浜
- ④ 安田 智, 甲斐 正広, 今井 伸一, 坂根 郁夫,  
加納 英雄 ジアシルグリセロールキナーゼ  
 $\gamma$  は細胞刺激に応答し  $\beta$ 2-chimaerin (Rac  
特異的 GAP) を活性化する。日本脂質生化学  
学会 2007 年 6 月 6 日 札幌

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

安田 智 (YASUDA SATOSHI)  
札幌医科大学・医学部・助教  
研究者番号：20381262