

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 2 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860042

研究課題名(和文)ジアシルグリセロールキナーゼ を分子標的とした2型糖尿病治療法開発への基盤構築

研究課題名(英文)Basic studies for development of type 2 diabetes therapy targeting diacylglycerol kinase delta

研究代表者

堺 弘道(Sakai, Hiromichi)

千葉大学・理学(系)研究科(研究院)・特任研究員

研究者番号：00375255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：2型糖尿病患者の骨格筋でのジアシルグリセロール(DAG)キナーゼ(DGK)の発現低下(半減)は本症増悪化の重要な決定因子である。本研究は、DGKを分子標的とした新たな2型糖尿病治療法開発(新規薬剤・食餌療法の開発)のために、薬剤スクリーニングに有効なDGKを精製することに成功し、一方で、DGK発現量を正に制御し、グルコースの取り込みを増加させる脂肪酸(ミリスチン酸)を同定した。さらに、グルコースに応答してDGKはホスファチジルコリン特異的ホスホリパーゼCによって供給されるパルミチン酸含有DAG分子種を選択的に代謝することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Decreased expression of diacylglycerol (DAG) kinase (DGK) in skeletal muscles is closely related to the pathogenesis of type 2 diabetes. To develop type 2 diabetes therapies targeting DGK, we showed that the purified DGK expressed DGK activity, indicating that the protein is available for the drug screening, and myristic acid significantly increased DGK protein expression and glucose uptake. Moreover, we revealed that DGK preferably metabolizes palmitic acid-containing DAG species supplied from phosphatidylcholine-specific phospholipase C pathway in response to high glucose levels.

研究分野：脂質生化学

キーワード：ジアシルグリセロールキナーゼ 2型糖尿病 薬物療法 食餌療法 ホスファチジン酸 脂肪酸

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(DAG)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。現在までに、DGKはI-Vの5つのサブタイプに分類される10種類のisozyme($\alpha, \beta, \gamma, \delta, \eta, \kappa, \epsilon, \zeta, \iota, \theta$)が同定されている。DGKの基質DAGとその産物PAは共に細胞内シグナリングのためのセカンドメッセンジャーであることから、DGKはこれら二つのメッセンジャーを代謝・制御する“key enzyme”であり、極めて重要な生理的役割を担っていると考えられてきた。実際に、最近、これらのDGK isozymeが細胞増殖・分化や糖代謝などの多彩な生理現象に関わること、そして、癌や2型糖尿病、アレルギーなどの難治性病態形成に決定的な役割を果たすことが明らかになっている。

申請者のグループは、以前より各DGK isozymeの生理機能についての解明を試みてきた。そして、DGK δ が糖代謝に関与し、その2型糖尿病患者の骨格筋での発現低下(半減)は本症増悪化の重要な決定因子であることを明らかにした(引用文献)。そのメカニズムとして、DGK δ の発現低下により基質DAGが代謝(消費)されずに細胞内のDAG量が増加し、増加したDAGによりPKC(protein kinase C)が活性化される。そして、PKCの活性化によりIRS1(insulin receptor substrate1)のSer残基がリン酸化され、最終的に糖の取り込みが抑制されることが明らかとなっている。従って、2型糖尿病患者において、残存した約半分のDGK δ の活性賦活やDGK δ の発現量増加が可能になれば2型糖尿病の治療に繋がると考えられる。しかしながら、DGK δ の活性を賦活化するような薬剤やDGK δ の発現量を増加させるような因子は未だに見つかっていない。

2. 研究の目的

2型糖尿病患者でのDGK δ の発現半減が本症の増悪化を促進する。従って、残存した約半分のDGK δ の活性賦活やDGK δ の発現量増加が可能になれば2型糖尿病の治療に繋がると考えられる。本研究では、DGK δ を分子標的とした新たな2型糖尿病治療法開発へ向けて総合的にアプローチするために、新規薬剤開発のためのDGK δ 特異的活性賦活剤のスクリーニング・開発を目指し、(1)スクリーニングに有効なDGK δ タンパク質の精製を行った。また、エネルギー調整食とは異なる新たな食餌療法の開発に向けた基礎的情報を得るために、(2)DGK δ 転写・発現を調節する栄養因子(脂肪酸)の同定を行い、(3)グルコース代謝時にDGK δ が選択的に代謝するDAG分子種を明らかにした。

3. 研究の方法

(1)DGK δ のタンパク発現・精製

DGK δ は大腸菌低温発現系を用いて発現させ、

硫酸分画により濃縮した後、陰イオン交換クロマトグラフィー及びNi樹脂を用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。

(2)DGK活性測定

DGK活性は煩雑な従来法を凌駕するマイクロプレート・ADP-発光検出系を用いた独自のハイスループット(HTP)DGK活性測定系(雑誌論文)を用いて測定した。

(3)脂肪酸添加によるDGKの発現解析とグルコースの取り込み評価

C2C12筋芽細胞を分化させた筋管細胞に炭素数や不飽和度の異なる種々の脂肪酸を24時間添加し、DGK δ の発現量の変化を調べた。また、このときのグルコースの細胞内への取り込みは、2-NBDGを用いて評価した。

(4)DGK δ のDAG脂肪酸鎖選択性の同定

DGK δ のDAG脂肪酸鎖選択性を見出すために、申請者らが開発したPA分子種分析のための極めて再現性且つ定量性に優れた液体クロマトグラフィー/質量分析(LC/ESI-MS)法(引用文献)を用いた。

4. 研究成果

(1)スクリーニングに有効なDGK δ タンパク質の精製

DGK δ 特異的活性賦活剤のスクリーニングには大量のDGK δ の精製タンパクを必要とする。そこで、大腸菌低温発現系を用いて発現させたDGK δ を硫酸分画により濃縮した後、陰イオン交換クロマトグラフィー及びNi樹脂を用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いることにより、高純度(純度90%以上)のDGK δ を精製した。さらに精製したDGK δ の活性をHTP-DGK活性測定系を用いて測定したところ、DGK δ はS/B比(Signal/background ratio)が3.1、Z'-factor(アッセイ系の質を示す)が0.79を示し、精製したDGK δ タンパクはDGK δ 特異的活性賦活剤のスクリーニングに利用できることがわかった。今後、このDGK δ を大量に精製し薬剤スクリーニングを行っていくことが新規薬剤開発のために重要である。

(2)DGK δ 転写・発現を調節する栄養因子(脂肪酸)の同定

Exon 1近傍の配列を用いて、data baseより脂肪酸に関連する転写因子PPAR α を類推した。従って、マウスC2C12筋芽細胞を筋管細胞に分化させた後、炭素数や不飽和度の異なる種々の脂肪酸を添加し(24時間)、DGK δ の発現量の変化を調べた。その結果、ミリスチン酸(14:0)はDGK δ のタンパク発現量を濃度依存的に増加させ(濃度1 mMで2倍程度の発現量増加、EC50 = 0.16 mM)(図1, 2)、さらに、mRNA量も増加させたことから、DGK δ はミリスチン酸により転写段階において正に発現制御されることが明らかとなった(雑誌論文)。一方で、 ω 9系の一価の不飽和脂肪酸(オレイン酸(18:1)、エイコセン

酸 (20:1), エルカ酸 (22:1)) を添加したときには, DGK δ のタンパク発現量は半分程度に抑制されたことから (図 1), ω 9 系の一価の不飽和脂肪酸は DGK δ の発現を負に制御することが示唆された (雑誌論文). これらの結果から, DGK δ の発現は, 種々の脂肪酸により異なる機構で制御される可能性が考えられた. さらに, ミリスチン酸添加による DGK δ 発現量の増加時にはグルコースの取り込みが増加することをわかった. これらの結果から, ミリスチン酸による DGK δ の発現量の増加はグルコースの取り込みを正に制御する可能性が考えられた. 今後, ミリスチン酸が関与する転写因子の同定を試み, DGK δ の転写調節機構の解明を行う予定である.

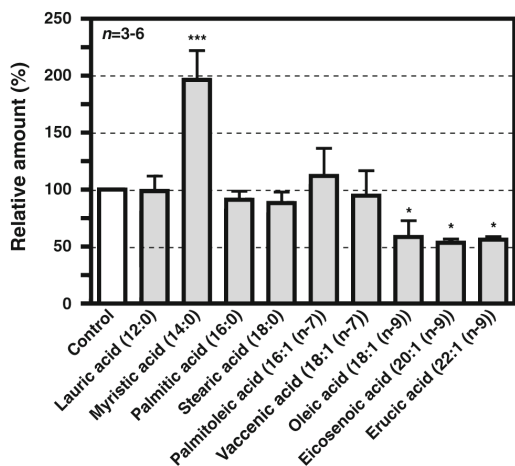


図 1 種々の脂肪酸添加 (1 mM) 時の DGK δ の発現変化

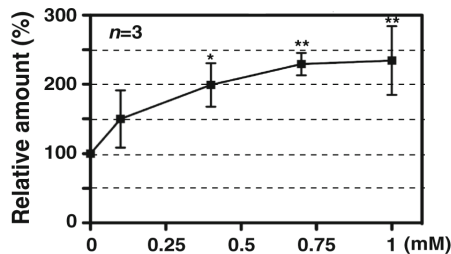


図 2 各濃度のミリスチン酸添加時の DGK δ の発現変化

(3) グルコース代謝時に DGK δ が選択的に代謝する DAG 分子種の同定 (雑誌論文)

DGK δ は筋細胞において高濃度 (25 mM) のグルコース刺激 (5 分) により活性を増加させ, 最終的にグルコースの取り込みを正に制御する. 従って, C2C12 筋芽細胞において高濃度グルコース刺激時の DGK 産生物 PA 分子種の増加を LC/ESI-MS 法を用いて調べた. その結果, PA に結合する二つの脂肪酸の炭素数の和が 30-36 までの PA 分子種の殆どがグルコースに反応して量的に増加することがわかった (図 3).

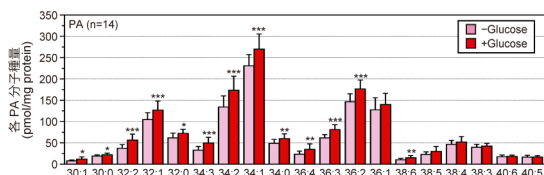


図 3 高濃度グルコースに反応した PA 分子種量の变化

次に, DGK δ 特異的 siRNA を用いて DGK δ の発現量を抑制したときには, 30:0-, 32:0-, 34:1-, 34:0-PA のグルコースに反応した量的産生が有意に抑制された (図 4A). ESI-MS/MS 解析により, これらの PA 分子種は一つ以上のパルミチン酸 (16:0) を含有することがわかった. 逆に, DGK δ の高発現時には 30:0-, 32:0-, 34:0-PA の産生が増加することを示した (図 4B). これらの結果から, DGK δ はグルコースに反応してパルミチン酸を含有する DAG 分子種を選択的に代謝することが強く示唆された.

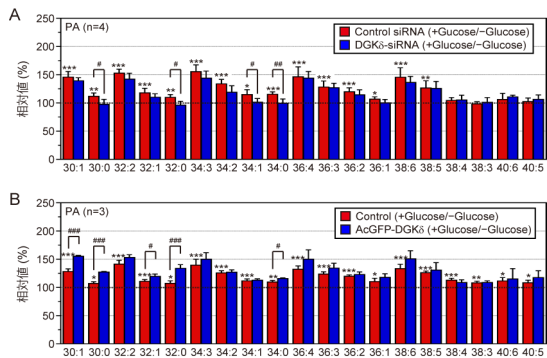


図 4 DGK δ の発現抑制 (A) と発現増加時 (B) のグルコース刺激依存的な PA 分子種産生への影響

さらに, DGK δ が基質とする DAG 分子種の供給経路を調べた. その結果, ホスファチジルコリン (PC) 特異的ホスホリパーゼ C (PC-PLC) の阻害剤である D609 は, グルコースに反応した 30:0-, 32:0-, 34:0-PA の産生を抑制し, また, 30:0-, 32:0-, 34:0-DAG 量も減少させることがわかった (図 5A, B). このとき, DGK δ の発現を抑制しても, D609 による 30:0-, 32:0-, 34:0-PA の産生抑制には影響しなかった (図 5C). このことから, DGK δ が基質とする DAG 分子種の少なくとも一部は PC の加水分解により供給されることが示唆された (図 6).

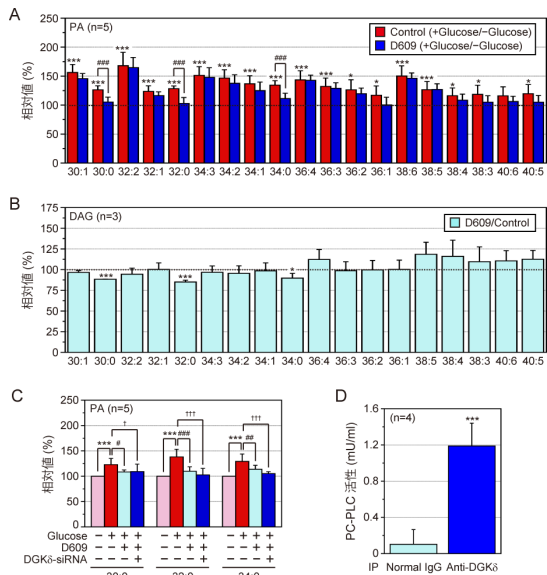


図 5 PC-PLC 阻害剤 D609 の PA 分子種産生 (A, C) と DAG 分子種量 (B) への影響及び抗 DGK δ 抗体を用いた免疫沈降物の PC-PLC 活性

また、抗 DGK δ 抗体を用いた DGK δ の免疫沈降物は PC-PLC 活性を示したことから (図 5D), DGK δ は PC-PLC と直接もしくは間接的に相互作用している可能性が示唆された (図 6). PC-PLC は哺乳動物において未だ同定されておらず, その機能の詳細は不明のままであるが, 今後, グルコースに応答した PC-PLC の機能について解明していくことが, DGK δ が制御するグルコース代謝機構を明らかにする上で重要である.

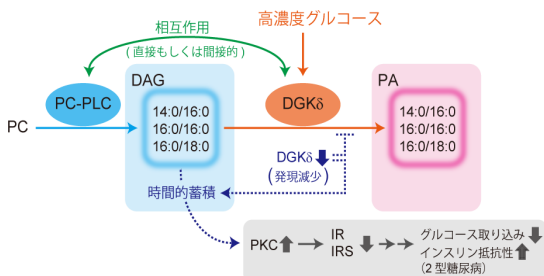


図 6 DGK δ を介した脂質代謝モデル

< 引用文献 >

Chibalin, A.V., Leng, Y., Vieira, E., et al. „Downregulation of diacylglycerol kinase delta contributes to hyperglycemia-induced insulin resistance. *Cell*, 132, 375-386, 2008.
Mizuno, S., Sakai, H., Saito, M., Kado, S., and Sakane, F., Diacylglycerol kinase-dependent formation of phosphatidic acid molecular species during interleukin-2 activation in CTLL-2 T-lymphocytes. *FEBS Open Bio*, 2, 267-272, 2012.

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)

Sakai, H., Kado, S., Taketomi, A., and Sakane, F., Diacylglycerol kinase δ phosphorylates phosphatidylcholine-specific phospholipase C-dependent, palmitic acid-containing diacylglycerol species in response to high glucose levels. *J. Biol. Chem.*, 289, 26607-26617, 2014. doi: 10.1074/jbc.M114.590950. 査読有り
Sakiyama, S., Usuki, T., Sakai, H., and Sakane, F., Regulation of diacylglycerol kinase $\delta 2$ expression in C2C12 skeletal muscle cells by free fatty acids. *Lipids*, 49, 633-640, 2014. doi: 10.1007/s11745-014-3912-9. 査読有り
Sato, M., Liu, K., Sasaki, S., Kunii, N., Sakai, H., Mizuno, H., Saga, H., Sakane, F., Evaluations of the selectivities of the diacylglycerol kinase inhibitors R59022 and R59949 among diacylglycerol kinase isozymes using a new non-radioactive assay method. *Pharmacology*, 92, 99-107, 2013. doi: 10.1159/000351849. 査読有り

[学会発表](計 24 件)

Hiromichi Sakai and Fumio Sakane, 6th international conference on Phospholipase A₂ and Lipid Mediators, Tokyo, February 10-12 2015 「Diacylglycerol kinase δ phosphorylates phosphatidylcholine-specific phospholipase C-dependent, palmitic acid-containing diacylglycerol species in response to high glucose levels」

堺 弘道, 坂根 郁夫 第 87 回日本生化学会, 京都, 2014 年 10 月 15-18 日 「ジアシルグリセロールキナーゼ δ はホスファチジルコリンに由来するパルミチン酸含有ジアシルグリセロール分子種を選択的にリン酸化する」

竹村 文花, 米野井 優, 佐藤 優里子, 堺 弘道, 坂根 郁夫 第 87 回日本生化学会, 京都, 2014 年 10 月 15-18 日 「Cold shock-trigger factor 系を用いたジアシルグリセロールキナーゼ α, δ, η の発現・精製と活性測定」

堺 弘道, 坂根 郁夫 第 56 回日本脂質生化学会, 大阪, 2014 年 6 月 6-7 日 「グルコース刺激時におけるジアシルグリセロールキナーゼ δ のパルミチン酸含有ジアシルグリセロール分子種の選択的代謝」

堺 弘道, 坂根 郁夫 千葉疾患プロテオミクス研究会 (招待講演), 東京, 2013 年 11 月 9 日 「糖代謝に関わる脂質代謝酵素ジアシルグリセロールキナーゼ δ の基質選択性の同定」

Fumio Sakane and Hiromichi Sakai, The 86th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, Yokohama, September 11-13 2013

「Cell stimulation-dependent phosphorylation/consumption of various diacylglycerol species by diacylglycerol kinase isozymes」(日本生化学会 インターナルセッション)

堺 弘道, 坂根 郁夫 第 86 回日本生化学会, 横浜, 2013 年 9 月 11-13 日 「グルコース刺激時にジアシルグリセロールキナーゼ δ が代謝するジアシルグリセロール分子種」

水野 悟, 堺 弘道, 坂根 郁夫 第 86 回日本生化学会 横浜 2013 年 9 月 11-13 日 「インターロイキン-2 に応答したジアシルグリセロールキナーゼ α の基質選択性の解析」

米野井 優, 斎藤 雅文, 堺 弘道, 坂根 郁夫 第 86 回日本生化学会 横浜 2013 年 9 月 11-13 日 「脂質代謝酵素ジアシルグリセロールキナーゼ δ, η の大腸菌を利用した大量発現・精製・性質解析」

崎山 静花, 堺 弘道, 坂根 郁夫 第 86 回日本生化学会 横浜 2013 年 9 月 11-13 日 「ジアシルグリセロールキナーゼ δ の脂肪酸による発現制御」

堺 弘道, 坂根 郁夫 新学術領域「自

然炎症」+「脂質マシナリー」合同若手ワークショップ，徳島，2013年7月2-4日
「インスリン抵抗性を制御する DGK δ による糖応答性 DG 分子種選択的代謝」
水野 悟，堺 弘道，坂根 郁夫 第55回日本脂質生化学会，宮城，2013年6月6-7日
「LC/ESI-MS を用いたホスファチジン酸分子種の定量的分析法の確立とジアシルグリセロールキナーゼ α の基質選択性の解析」

〔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〕

ホームページ等

http://biofunction.chem.chiba-u.jp/bfc/Top_Page.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堺 弘道 (SAKAI HIROMICHI)

千葉大学・大学院理学研究科・特任研究員

研究者番号：00375255

(4) 研究協力者

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