

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460265

研究課題名(和文)脂質代謝異常の分子メカニズム-脂質メディエーター制御因子の形態学的解析-

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of the impairment in lipid metabolism

研究代表者

中野 知之(Tomoyuki, Nakano)

山形大学・医学部・准教授

研究者番号：00333948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：DGK 遺伝子欠損(KO)マウスを高脂肪食で40日間給仕すると、急激な脂肪沈着および耐糖能異常が認められた。組織学的解析の結果、DGK KOマウスの脂肪細胞は野生型マウスよりも大型化していることが明らかとなった。DGK 欠損脂肪細胞では、ウェスタンブロット解析により中性脂質分解酵素の発現が低下しており、その結果、脂質沈着量が増大し、個体レベルで肥満を呈する可能性が考えられた。さらに、DGK KOマウスではプロテインキナーゼC(PKC)の活性化が生じていた。PKCはインスリンシグナルを障害することが知られ、この結果としてDGK KOマウスでは耐糖能異常が生じていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Present study revealed that mice lacking diacylglycerol kinase epsilon (DGKe) causes abnormal fat deposition and high glucose levels under 40 days of high fat diet (HFD) feeding conditions. Histological examination showed that the size of adipocytes in DGKe-KO mice was greater than those in WT mice. Immunoblot analysis showed the reduced expression of lipolytic enzymes in fat tissue of DGKe-KO mice under HFD conditions. Decreased expression of lipolytic enzymes causes hypertrophy of the adipocytes, leading to obesity. In addition, activation of protein kinase C (PKC) was induced in DGKe-deficient adipocytes. PKC is known to interfere insulin signaling. It suggests that DGKe-KO mice exhibit insulin intolerance via PKC activation.

研究分野：解剖学・組織学

キーワード：脂肪細胞 ジアシルグリセロールキナーゼ 中性脂質 肥満 耐糖能異常

1. 研究開始当初の背景

本邦においても、肥満、糖尿病や脂肪肝などいわゆる生活習慣病が問題となって久しい。摂取エネルギー過多やエネルギー消費不足に起因する前述の3つの病態はその発症機序は互いに密接に関係すると言われている。生体は、余剰な摂取エネルギーを中性脂質(TG)として主に脂肪細胞に貯蔵することで血中脂質のホメオスタシスを維持している。しかし摂取エネルギー過剰状態もしくはエネルギー消費が少ない場合、結果として貯蔵エネルギー過多に陥り、いわゆる肥満状態となる。しかしながらこの肥満発症の機序に関する分子メカニズムの解明は、特に脂質代謝酵素の機能的役割については未だ十分とは言えないままである。

これまで研究代表者は、ジアシルグリセロール(DG)のリン酸化酵素DGキナーゼ(DGK)の発現局在および機能解析を行ってきた。DGKの基質であるDGはTG合成の中間産物(第一分解産物)である。さらにDGはプロテインキナーゼC(PKC)やRasGRPなどを活性化し、細胞内二次伝達物質として機能することが知られ、DGKはいわば脂質代謝系と細胞内情報伝達系のハブとして機能することが考えられる。細胞内情報伝達におけるDGKの機能的役割に関する研究は進んでいるが、DGKの脂質代謝メカニズムにおける機能的役割については十分な解析が行われていない。

2. 研究の目的

前項のとおり、DGKは細胞内情報伝達系と脂質代謝系の双方を調整する機能分子として考えられている。しかしながらその“ハブ”

としてのDGK機能に関する詳細な研究は十分ではない。そこで、本研究では全10種あるDGKアイソザイムのうち、広範な発現プロフィールが認められる型および型DGKに注目し、脂質代謝機構における機能的役割の解明を目的として、主に遺伝子欠損マウスを用いた解析を行った。

3. 研究の方法

6~8週齢の雄野生型、型および型ジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)遺伝子欠損(KO)マウスを高脂肪食(HFD-60、オリエンタル酵母)および通常食で40日間給仕した。この期間における体重変化や餌の摂取量を計測し、40日目に以下の実験を行った。グルコース負荷試験(GTT): 6時間の絶食後にD-グルコースを1.5g/kgで腹腔注射し、継時的(0, 15, 30, 60, 120分後)に血糖値を測定した。

麻酔下でマウスを屠殺し、経心臓的に採血して血清中のインスリン、中性脂質、総コレステロールレベルを測定した。マウスから精巢上体周囲白色脂肪、肝臓および骨格筋を摘出し、4%パラホルムアルデヒド固定を施した。固定した臓器からパラフィンおよび凍結切片を作製して組織学的解析(HE、脂肪染色および種々の特異抗体を用いた免疫組織化学)を行った。また摘出した組織の一部は凍結保存し、ウェスタンブロット法による脂質代謝系および細胞内情報伝達系の関連分子の発現解析を行った。

4. 研究成果

本研究を計画するにあたって、DGK KOマウスを高脂肪食(HFD)で40日間

給仕すると、急激な体重増加および肝臓における異常な脂肪滴沈着の亢進が認められること、および耐糖能異常が現れることを予備データとして有していた。本プロジェクトでは肝臓以外の脂質および糖代謝に関与する器官として、脂肪と骨格筋も含めて、前述の現象を説明するために以下の2つの仮説を立て、その検証を行った。「仮説1. HFD給仕下でDGK KOマウスはTG合成能が異常に亢進している」、「仮説2. TGの代謝が機能不全に陥っている」。仮説1の検証実験として、脂肪組織における中性脂質合成酵素の発現をウェスタンブロット法で解析した結果、DGK KOマウスと野生型マウスの間に差が認められなかった。このことから、仮説1が正しい可能性は低いと考え、仮説2の検証実験を行った。仮説2の検証実験として、中性脂質分解酵素の発現解析を行った結果、DGK KOマウスにおいて、野生型に比べて大きく減弱していた。よってDGK KOマウスに認められる体重増加は中性脂質分解の機能不全に起因することが考えられた。血清TGレベルにおいては、DGK 欠損マウスで高値を示していた。組織学的解析から、同マウスの脂肪細胞は野生型に比べ、1.5倍の大きさとなっており、これは、前述の原因により貯蔵脂肪量が増大した結果と考えられた。さらに、このマウスの脂肪組織ではPKCの活性化が生じていた。PKC活性化はインスリンシグナルを障害することが知られていることから、DGK KOマウスで認められる耐糖能異常は、DG蓄積によるPKC活性化に起因すると考えられた。これらの現象は肝臓や骨格筋では認められなかった。HFD給仕による体

重増加等の現象は、DGK KOマウスでは認められなかったことから、HFD給仕による肥満や耐糖能異常は、DGK 遺伝子欠損特異的に起こる現象であることが明らかとなった。

本研究の結果から、高脂肪食給仕下でDGK 欠損状態は脂質代謝異常を惹起することが明らかとなった。しかしながら、なぜDGKファミリーのうち、DGK が責任分子となるのかについては不明のままであり、今後のさらなる研究が必要とされる。

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 6 件)

1. T. Shimomura, T. Nakano, K. Goto and I. Wakabayashi (2017) R59949, a diacylglycerol kinase inhibitor, inhibits inducible nitric oxide production through decreasing transplasmalemmal L-arginine uptake. *Nauryn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 390: 207-214. 査読有
2. T. Nakano, H. Matsui, T. Tanaka, Y. Hozumi, K. Iseki, K. Kawamae and K. Goto (2016) Arachidonoyl-specific diacylglycerol kinase ϵ and the endoplasmic reticulum. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4:132. 査読有
3. Y. Hozumi, T. Nakano, T. Tanaka and K. Goto (2016) Localization of diacylglycerol kinase ζ in rat pancreatic islet cells under normal and streptozotocin-induced stress condition. *Archives of Histology and*

Cytology, 76:23-33. 査読有

4. **T. Nakano** (2015) Roles of lipid modulating enzymes DGK and COX in pathophysiological condition. *Anatomical Science International*, 90:22-32. 査読有
5. T. Tanaka, R. Tsuchiya, Y. Hozumi, **T. Nakano**, M. Okada and K. Goto (2015) Reciprocal regulation of p53 and NF-kappaB by diacylglycerol kinase ζ *Advances in Biological Regulation*, 60:15-21. 査読有
6. Y. Hozumi, T. Tanaka, **T. Nakano**, H. Matsui, T. Nasu, S. Koike, S. Kakehata, T. Ito and K. Goto (2015) Orotate phosphoribosyl transferase localizes to the Golgi complex and its expression levels affect the sensitivity to anti-cancer drug 5-fluorouracil. *Biomedical Research*, 36:403-409. 査読有

〔学会発表〕(計 8 件)

1. **T. Nakano** and K. Goto, Deletion of DGK ϵ attenuates lipolytic activity in adipocytes under high fat conditions. *56th annual meeting of American Society for Cell Biology*, Dec.2016, San Francisco, CA, USA
2. **中野知之**、後藤 薫 DGK ϵ 欠損による白色脂肪組織の褐色化メカニズムの解析、第122回日本解剖学会総会、2017年3月、長崎(長崎大学)
3. **中野知之**、後藤 薫、高脂肪食により惹起されるDGK ϵ 欠損脂肪組織の形質転換、第62回日本解剖学会東北・北海道連合支部学術集会、2016年9月、帯広(帯広畜産大学)
4. **中野知之**、後藤 薫、中性脂質代謝機構

における DGK ϵ ノックアウトの効果-長期高脂肪食負荷による脂肪沈着メカニズムの解析-、第121回日本解剖学会総会、2016年3月、郡山(福島県立医大)

5. **中野知之**、後藤 薫 DGK ϵ 遺伝子欠損マウス脂肪組織に認められる脂質分解系の機能不全-脂肪滴増大メカニズムの解析-、第61回日本解剖学会東北・北海道連合支部学術集会、2015年8月、盛岡(岩手医科大学)
6. **中野知之**、後藤 薫、若林 一郎、Diacylglycerol kinase による iNOS 発現制御機構の解析、第15回NO学会、2015年6月、豊中(兵庫医大)
7. **T. Nakano** and K. Goto, DGK ϵ deletion induces lipid metabolism impairment and adipose tissue insulin insensitivity. 第120回日本解剖学会総会、2015年3月(京都府立医大)
8. **中野知之**、後藤 薫、 ϵ 型ジアシルグリセロールキナーゼ欠損マウスにおける臓器特異的糖脂質代謝異常と肥満について、第60回日本解剖学会東北・北海道連合支部学術集会、2014年9月、福島(福島県立医大)

〔図書〕(計 1 件)

1. **T. Nakano** and K. Goto (2017) Diacylglycerol kinase. In: Sangdun Choi, editor. *Encyclopedia of signaling molecules*. Springer, in press

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

研究者番号：

(4)研究協力者

()

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

中野 知之 (Tomoyuki Nakano)

山形大学・医学部・准教授

研究者番号：00333948

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()