

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460266

研究課題名(和文) 脂質二次メッセンジャー代謝酵素の神経細胞および網膜における形態学的機能解析

研究課題名(英文) Morphological and functional analysis of diacylglycerol kinase isozymes in neurons and retinal cells

研究代表者

八月朔日 泰和 (Hozumi, Yasukazu)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00372334

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)：中枢神経系において、野生型と比べDGKbノックアウト(KO)マウスの線条体投射ニューロン樹状突起における棘突起数が減少していた。また、DGKbとAMPA型グルタミン酸受容体のサブユニットの一つであるGluA2は、DGKbのカルボキシル端で結合していた。さらにDGKb-KOマウスの線条体において野生型に比して減少する分子が認められ、DGKbはGluA2を介して棘突起形成に関与する可能性が示唆された。次に、中枢神経系におけるDGKeの機能解析を行い、DGKeがプルキンエ細胞の樹状突起形質膜直下の滑面小胞体であるsubsurface cisterns(表面下槽)に局在することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Results show that striatal medium spiny neurons (MSNs) of DGKb-KO mice exhibited lower dendritic spine density at distal dendrites than wild-type mice did. We identified the GluA2 AMPA receptor subunit as a novel DGKb binding partner. In addition, DGKb-deficient brain exhibits significant reduction of TARPg-8. These findings suggest that DGKb regulates the spine formation at distal dendrites in MSNs. Next, we investigated the cellular expression and subcellular localization of DGKe in the brain using specific DGKe antibody. In Purkinje cells, DGKe was localized to the subsurface cisterns. Behaviorally, DGKe-KO mice exhibited hyper-locomotive activities and impaired motor coordination and learning. These findings suggest that DGKe plays an important role in neuronal and brain functions through its distinct neuronal expression and subcellular localization, and also through coordinated arrangement with other molecules involving the phosphoinositide signaling pathway.

研究分野：医歯薬学

キーワード：特異抗体免疫組織化学染色 免疫電子顕微鏡法 表面下槽 TARP 行動解析 ラット ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

イノシトールリン脂質代謝系により産生されるジアシルグリセロールジアシルグリセロール(DG)は、プロテインキナーゼCの数種のサブタイプを活性化する。このDGをリン酸化する酵素がDGキナーゼ(DGK)であり、申請者が以前所属していた教室では、現在までラット脳cDNAライブラリーから5種のDGKアイソザイム(DGK α , β , γ , ζ , ι)をクローニングした。

申請者は自らが確立した抗DGK β 抗体を用いた免疫電子顕微鏡法により、DGK β は線条体投射ニューロンおよび海馬ニューロンにおいて、興奮性シナプスを構成する棘突起のシナプス後膜肥厚に非常に近接した細胞膜領域に局在すること、またDGK β のニューロンの発達における機能的役割を報告してきた。申請者はまたDGK ϵ に対する特異抗体作製にも成功した。

さらに申請者は、末梢器官におけるDGKアイソザイムの発現局在解析を行い、網膜における発現局在について以下の2点について報告した。

- ① DGK β は外網状層(OPL)に強く発現が認められ、双極細胞および水平細胞に局在する。
- ② DGK ϵ は外境界膜(OLM)に発現する。またDGK ϵ はDGKアイソザイムのうち唯一、光受容細胞に発現するDGKである。

2. 研究の目的

上述したデータより、DGK β とDGK ϵ は両者とも中枢神経系ならびに末梢感覚受容細胞において各々の局在領域で機能する可能性が高いが、詳細な細胞内局在や機能的役割は未だ不明である。本研究ではこの点に関し、細胞内での普遍的および細胞特異的な機能におけるDGKの生理学および病態学的役割を追求することを研究課題とする。

1) 神経細胞と網膜におけるDGK β とDGK ϵ の詳細な局在の比較検討

①DGK β とDGK ϵ の神経細胞内微細局在および網膜における発現局在解析

DGK β : 網膜における詳細な細胞内微細局在解析を行う。

DGK ϵ : 小脳および網膜における発現細胞の同定および細胞内微細局在解析を行う。

DGK ϵ はsn-2にアラキドン酸を有するDGを特異的にリン酸化する特異な特徴を持つ。これは、DGK ϵ が内在性カンナビノイド(脳内マリファナ)である2-AGを産生する主酵素・ジアシルグリセロールリパーゼ α (DGL α)と基質を共有する可能性を示唆する。よって、小脳および網膜におけるDGK ϵ とDGL α の相互関係についても解析する。

② 明暗条件下でのDGKの網膜における発現局在変化の解析

光刺激による、DGK β やDGK ϵ を含めたDGK

や他の関連分子の局在変化を検討する。

2) DGK β およびDGK ϵ -KOマウスの神経細胞および網膜の形態学的解析

DGK β およびDGK ϵ -KOマウスを用いて、神経細胞および網膜における野生型マウスとの形態学的相違につき検討する。またDGK関連分子の局在変化の解析を行う。

3) DGK β およびDGK ϵ の細胞内シグナル伝達系における役割の解析

DGK β はGluA2(GluR2)との結合部位の同定を行う。DGK ϵ について、特異抗体を用いた免疫沈降法による質量分析・ウェスタンブロット解析を行い、結合タンパクの同定を行う。

4) 本研究計画の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義は、以下の点である。

- ① DGK β 抗体およびDGK ϵ 抗体を用いた形態学的解析により、神経細胞および網膜での細胞内シグナル伝達における両者の詳細な作用点の解明が進むと予想される。
- ② 共通起源を持つとされる中枢神経系と網膜が、共有あるいは各々独自に有する細胞内情報伝達機構の解明の一助となることが期待される。
- ③ DGK β のスプライス変異体が躁鬱病患者の脳で報告されており、躁鬱病の発症メカニズムや病態解明の一助となることが期待される。またDGK ϵ に関しては、脳内マリファナとして機能する2-AG産生の調節機構との関連が興味深い。

3. 研究の方法

<要旨>

- ① DGK β とDGK ϵ の神経細胞および網膜における発現・微細局在解析
- ② DGK β およびDGK ϵ の網膜における明暗条件下における局在変化の解析
- ③ DGK β -KOとDGK ϵ -KOマウスの神経細胞および網膜の形態変化に関する比較解析
- ④ 特異抗体を用いたDGK β およびDGK ϵ のシグナル伝達複合体の解明

<平成26年度>

1. 野生型マウスにおけるDGK ϵ の神経細胞内発現および微細局在解析

DGK ϵ の発現細胞同定と神経細胞内微細局在解析を行う。

1) 蛍光多重染色法による解析

主にDGK ϵ が豊富に発現する小脳に注目し、共焦点レーザー顕微鏡で蛍光多重染色法を行う。

各種マーカーは以下の通りとする。

シナプス前終末: VGluT1, VGluT2, VGAT

シナプス後終末: PSD-95, Homer1

投射ニューロン(プルキンエ細胞):

calbindin

抑制性介在ニューロン: GAD

バグマングリア: GLAST

細胞内小器官：IP3R（小胞体）
 イノシトールリン脂質代謝関連分子：
 mGluR1, Gαq/11, PLCβ3, PLCβ4
 DGKεは、内在性カンナビノイドである
 2-AG を産生する主な酵素 DGLαと基質を
 共有すると考えられるので、DGKεと DGLα
 の神経細胞内局在を比較検討する。

2) 免疫電子顕微鏡法による解析
 包埋前 DAB・銀増感免疫電子顕微鏡法と
 包埋後免疫電子顕微鏡法により、DGKεの
 神経細胞内微細局在の解析を行う。

<平成 27 年度>

1. DGKβと DGKεの網膜における微細局在解析
 と明暗条件下での発現および局在変化の
 解析

1) DGKβと DGKεの網膜における細胞内微細
 局在解析

包埋前 DAB・銀増感免疫電子顕微鏡法と
 包埋後免疫電子顕微鏡法により、双極細胞
 と水平細胞樹状突起については DGKβ
 の、また光受容細胞においては DGKεの
 細胞内局在の解析を行う。

2) 明暗条件の相違による DGKβと DGKεの
 網膜内発現および局在変化の解析

申請者の免疫組織化学的解析から、イノ
 シトールリン脂質代謝系シグナル伝達は
 哺乳動物網膜で駆動すると考えられる。
 関連分子のうち Gq タンパクなどの網膜
 における発現および局在が、明暗条件下
 の相違により変化することが報告されて
 いる。DGKβおよび DGKεの明暗条件下にお
 ける発現局在の変化について検討する。

2. 特異抗体を用いた DGKβおよび DGKεのシグ
 ナル伝達複合体の解明

1) DGKβ： GluA2 との結合部位の同定
 申請者は DGKβが GluA2 と結合するこ
 とを見出している。DGKβ変異体発現ベク
 ターを用い、GluA2 との結合部位を探
 索する。

2) DGKε： 結合タンパクの同定
 DGKε特異抗体を用いて免疫沈降法を行
 い、得られた免疫複合体に対して質量
 分析を行う。

各 KO マウスをコントロールに用いて正
 確を期す。

<平成 28 年度>

1. DGKβ-KO, DGKε-KO マウスの神経細胞お
 よび網膜の形態比較解析

1) 神経細胞の解析

① ゴルジ渡銀法による解析
 DGKε-KO マウス脳にゴルジ渡銀法を施
 行し、小脳プルキンエ細胞の棘突起数
 や形態変化を解析する。

② 初代培養細胞による解析
 EGFP-Tg マウスとの掛け合わせにより、
 EGFP を発現する DGKε-KO マウスを作製
 する。EGFP で細胞形態が描出される小
 脳プルキンエ細胞を初代培養し、
 pDsRed2-ER 等の ER 内発現ベクターに
 より ER を描出し、樹状突起と棘突起

内における sER の変化を解析する。

③ 電子顕微鏡による解析

電子顕微鏡にて DGKβおよび DGKε-KO マ
 ウスの細胞および細胞内小器官の形
 態変化を、野生型マウスと比較検討す
 る。

2) 網膜形態の比較解析

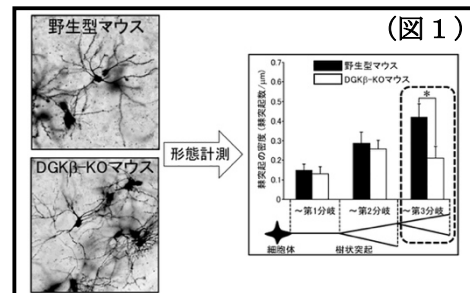
ショウジョウバエにおいて、DGK の網膜
 変性への関与が報告されている。共焦点
 レーザー顕微鏡および電子顕微鏡によ
 り、DGKβと DGKε-KO マウスを用いて、網
 膜における細胞の形態変化の解析を行
 う。

4. 研究成果

1) 中枢神経系における DGKβの機能解析

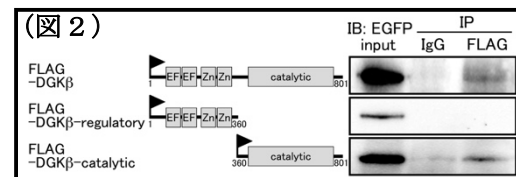
① 形態解析

申請者は DGKβ-KO マウスを用いたゴルジ
 渡銀法による解析から、野生型に比して
 DGKβ-KO マウスの線条体投射ニューロン
 樹状突起における棘突起数が減少して
 いることを、形態学的、統計的に明ら
 かにした (図 1)。



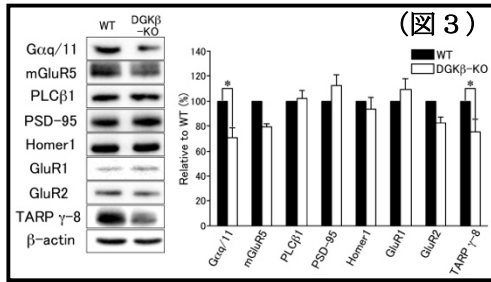
② シグナル伝達系

免疫沈降法により、DGKβと AMPA 型グル
 タミン酸受容体のサブユニットの 1 つ
 である GluA2 の結合を見出している。さ
 らに培養細胞へのタンパク発現実験お
 よび免疫沈降法により GluA2 は DGKβのカル
 ボキシル端側と結合することが明らか
 となった (図 2)。



また、DGKβ欠失による線条体における関
 連分子の量的変化につき検討したところ、
 GluA2 の量的変化は認めなかったものの、
 DGKβ-KO マウスにおいて Gq タンパクαサ
 ブユニットのうち Gαq/11、また AMPA 型
 グルタミン酸受容体の機能制御を行う
 TARPγ-8 の発現が有意に減少しているこ
 とが明らかとなった (図 3)。

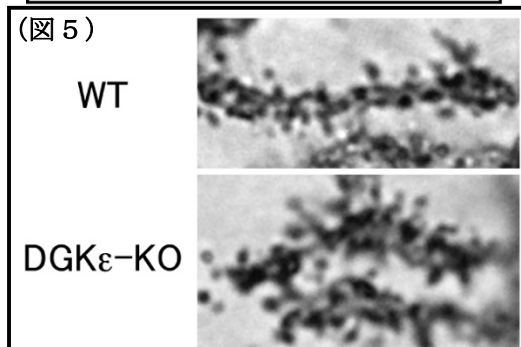
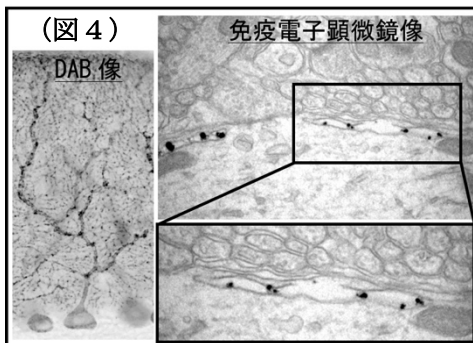
以上より、DGKβは線条体 MSN の棘突起にお
 いて GluA2 と結合し、GluA2 を介して棘突
 起形成に関与する可能性が示唆された。



2) 中枢神経系における DGKε の機能解析

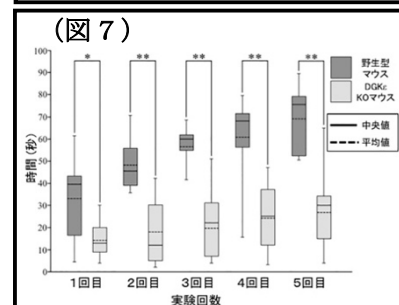
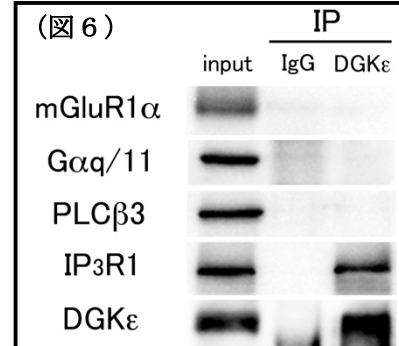
① 形態解析

特異抗体を用いた DAB および蛍光多重染色による解析において、DGKε 免疫反応は大脳皮質、海馬、線条体および小脳の投射ニューロンにおいて顆粒状構造物として検出された。さらに 1 型イノシトール三リン酸 受容体 (IP3R1) と DGKε が共存すること、また基質を共有すると考えられるジアシルグリセロールリパーゼ α (DGLα) と DGKε が非常に近接して局在することが明らかとなった。DGKε が豊富に発現する小脳について包埋前金コロイド銀増感免疫電子顕微鏡法を施行したところ、DGKε はプルキンエ細胞の樹状突起形質膜直下の滑面小胞体である subsurface cisterns (表面下槽) 内部に検出された (図 4)。ゴルジ鍍銀法により DGKε-KO マウス小脳プルキンエ細胞を解析したところ、棘突起の数が野生型マウスに比べ増加している傾向が認められた (図 5)。DGKβ-KO マウスの線条体投射ニューロンの棘突起は野生型に比べ減少することが報告者により明らかになっており、DGKε の機能解明をさらに進める上で非常に興味深い。



② シグナル伝達系

形態的に IP3R と DGKε が共存することが明らかになったが、さらに免疫沈降法により、IP3R と DGKε が結合することを見出した (図 6)。また、DGKε-KO の行動解析において、DGKε を欠失すると協調運動の学習能力が低下していた (図 7)。



以上より、DGKε 欠失により細胞の形態に変化が生じることによって細胞内シグナル伝達に変化し、個体の運動機能に影響をおよぼす可能性が示唆された。

3) DGKβ および DGKε の網膜における局在解析
特異抗体を用いた免疫電子顕微鏡法により、DGKβ が双極細胞および水平細胞樹状突起におけるシナプス領域に局在する可能性が示唆された。電子顕微鏡を用いた DGKβ-KO および DGKε-KO マウスの神経細胞、網膜構成細胞における細胞内小器官の形態変化については、野生型マウスとの間に差は認められなかった。明暗条件の違いによる DGK アイソザイムの発現局在について解析したところ、試行した条件下では局在にに変化を認めなかった。

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 10 件)

- ① Hozumi Y, Fujiwara H, Kaneko K, Fujii S, Topham MK, Watanabe M, Goto K. Diacylglycerol kinase ε localizes to subsurface cisterns of cerebellar Purkinje cells. *Cell Tissue Res.* (2017); 368: 441-458. (査読有)
- ② Iwazaki K, Tanaka T, Hozumi Y, Okada M, Tsuchiya R, Iseki K, Topham MK, Kawamae K, Takagi M, Goto K. DGKζ downregulation enhances osteoclast differentiation and bone resorption activity under inflammatory

- conditions.
J Cell Physiol. (2017); 232: 617-624.
(査読有)
- ③ Hozumi Y, Tanaka T, Nakano T, Goto K. Localization of diacylglycerol kinase ζ in rat pancreatic islet cells under normal and streptozotocin-induced stress conditions. Arch Histol Cytol. (2016); 76: 23-33.
(査読有)
- ④ Hozumi Y, Tanaka T, Nakano T, Matsui H, Nasu T, Koike S, Kakehata S, Ito T, Goto K. Orotate phosphoribosyl transferase localizes to the Golgi complex and its expression levels affect the sensitivity to anti-cancer drug 5-fluorouracil. Biomed Res. (2015); 36: 403-409. (査読有)
- ⑤ Hozumi Y, Akimoto R, Suzuki A, Otani K, Watanabe M, Goto K. Expression and localization of the diacylglycerol kinase family and phosphoinositide signaling molecules in the adrenal gland. Cell Tissue Res. (2015); 362: 295-305.
(査読有)
- ⑥ Hozumi Y, Kakefuda K, Yamasaki M, Watanabe M, Hara H, Goto K. Involvement of diacylglycerol kinase β in the spine formation at distal dendrites of striatal medium spiny neurons. Brain Res. (2015); 1594: 36-45. (査読有)
- ⑦ Tsuchiya R, Tanaka T, Hozumi Y, Nakano T, Okada M, Topham MK, Iino M, Goto K. Downregulation of diacylglycerol kinase ζ enhances activation of cytokine-induced NF- κ B signaling pathway. Biochim Biophys Acta. (2014); 1853: 361-369. (査読有)
- ⑧ Matsui H, Hozumi Y, Tanaka T, Okada M, Nakano T, Suzuki Y, Iseki K, Kakehata S, Topham MK, Goto K. Role of the N-terminal hydrophobic residues of DGK ϵ in targeting the endoplasmic reticulum. Biochim Biophys Acta. (2014); 1842: 1440-1450. (査読有)
- ⑨ Takahashi N, Hozumi Y, Tanaka T, Okada M, Iseki K, Hayasaka K, Goto K. Cellular expression and localization of DGK ζ -interacting NAPI-like proteins in the brain and functional implications under hypoxic stress. Histochem Cell Biol. (2014); 142: 461-471.
(査読有)
- ⑩ Yamamoto M, Tanaka T, Hozumi Y, Saino-Saito S, Nakano T, Tajima K, Kato T, Goto K. Expression of mRNAs for the diacylglycerol kinase family in immune cells during an inflammatory reaction. Biomed Res. (2014); 35: 61-68. (査読有)

[学会発表] (計 6 件)
(国内)

- ① 第 1 2 2 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (2017 年 3 月 30 日 長崎市・長崎大学)
ラット糖尿病モデルの膵臓ランゲルハンス島における DGK ζ の局在変化 (ポスター)
○八月朔日 泰和、後藤 薫
- ② 第 6 2 回東北・北海道連合支部学術集会 (2016 年 9 月 4 日 帯広市・帯広畜産大学)
ラット糖尿病モデルの膵臓ランゲルハン

ス島における DGK ζ の局在変化 (口演)

- 八月朔日 泰和、後藤 薫
- ③ 第 1 2 1 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (2016 年 3 月 30 日 福島市・福島県立医科大学)
副腎におけるイノシトールリン脂質代謝関連分子の発現局在解析 (ポスター)
○八月朔日 泰和、後藤 薫
- ④ 第 6 1 回東北・北海道連合支部学術集会 (2015 年 8 月 29 日 盛岡市・岩手医科大学)
副腎におけるイノシトールリン脂質代謝関連分子の発現局在解析 (口演)
○八月朔日 泰和、後藤 薫
- ⑤ 第 1 2 0 回日本解剖学会総会・全国学術集会/第 9 2 回日本生理学会大会 合同大会 (2015 年 3 月 21 日 神戸市・神戸国際会議場)
ベータ型ジアシルグリセロールキナーゼは線条体投射ニューロンの遠位樹状突起領域における棘突起形成に関与する (ポスター) ○八月朔日 泰和、後藤 薫
- ⑥ 第 6 0 回東北・北海道連合支部学術集会 (2014 年 9 月 7 日 福島市・福島県立医科大学)
ベータ型ジアシルグリセロールキナーゼは GluR2 を介して線条体投射ニューロンの棘突起形成に関与する (口演)
○八月朔日 泰和、後藤 薫

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八月朔日 泰和 (HOZUMI, Yasukazu)
秋田大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：00372334

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

後藤 薫 (GOTO, Kaoru)
山形大学・医学部・教授
研究者番号：30234975

渡辺 雅彦 (WATANABE, Masahiko)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：70210945