

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07002

研究課題名(和文) 酵素の細胞内局在調節機構の包括的解明 - DGキナーゼを例として -

研究課題名(英文) Comprehensive investigation of molecular mechanism of intracellular localization of DG kinase as an example of general enzymes

研究代表者

白井 康仁 (Shirai, Yasuhito)

神戸大学・農学研究科・教授

研究者番号：60263399

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)：本研究では、ジアシルグリセロールキナーゼalpha(DGKa)の核-細胞質シャトリング機構を調べた。まず、218番目のチロシンがリン酸化されると、C1ドメインとRVH-EFは直接相互作用し、C1ドメインの核移行シグナルとしての機能が弱められ、DGKaが細胞質に局在するようになることが判った。さらに、核内DGKaの機能を調節していると考えられる結合タンパク質を調べたところ、DGKaは核内でcyclin dependent kinase 12と相互作用することにより、G1/S期で細胞周期を停止させていることが判明した。また、Rhebは、細胞質でDGKaと結合し、細胞増殖に関与していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, molecular mechanism of nuclear-cytoplasm shuttling of diacylglycerol kinase alpha (DGKa) was investigated. We found that RVH-EF region directly bound to C1 domain which functions as nuclear localization signal (NLS) interaction was enhanced by tyrosin phosphorylation at Y218, resulting weaken the function of C1 domain as NLS. We also identified cyclin dependent kinase 12 and Rheb as binding proteins of DGKa in the nucleus and the cytoplasm, respectively. The former seems to work to stop the cell cycle and the latter seems to contribute the proliferation.

研究分野：生化学

キーワード：脂質キナーゼ ジアシルグリセロール 可視化 結合タンパク質 細胞内局在変化 チロシンリン酸化
フォスファチジン酸

1. 研究開始当初の背景

ここ10数年GFPをはじめとする蛍光タンパク質の開発により、生細胞内での蛋白質動態を可視化することが可能となった。申請者も世界に先駆けて、プロテインキナーゼC (PKC) の細胞内動態を可視化し、PKCが様々な刺激に応じて異なる細胞内オルネラに移行し、異なる生理機能を発揮することを明らかにしている。この現象は、他の多くの機能蛋白質でも報告されており、とりわけ酵素の機能を調節するうえで普遍的で重要なメカニズムといえる。しかし、多くの酵素について、その細胞内局在調節機構の全貌は明らかになっていない。

本研究で取り扱うDGK α はPKCの活性化剤であるジアシルグリセロール (DG) をリン酸化しフォスファチジン酸 (PA) を産生する脂質キナーゼである。即ち、PKCの活性を間接的に抑制すると同時に、PAを介してmTORやRaf-1キナーゼなどを活性化する、脂質シグナリングにとってkeyとなる重要な酵素である。このDGK α も、PKCと同様、細胞内局在を変化させる。例えば、DGK α は通常細胞質に存在するが、血清の除去など飢餓状態にすると核内に移行し細胞分裂の停止に寄与する。血清を再添加すると、DGK α は核外移行に移行し、その後細胞は再び分裂するようになる。この血清再添加によるDGK α の核外移行には、c-Ablによる218番目のチロシン (Y218) リン酸化が重要であった。一方、ビタミンE刺激によりDGK α は細胞質膜に移行し、活性化され、糖尿病性腎症の改善に寄与する。この細胞質膜移行と活性化には、Srcによる334番目のチロシン (Y334) リン酸化が必須である。

これらの事実は、チロシンのリン酸化及び脱リン酸化による高次構造変化と、これに続く結合パートナー分子の置換がDGK α の局在調節や機能発現に重要であることを示唆しているが、その詳細なメカニズムは未だ明らかではない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、酵素局在調節機構解明の一環として、チロシンリン酸化とその結合蛋白質に着目し、DGK α の局在調節機構を明らかにすることを研究の目的とし、以下A~Cを明らかにすることとした。

A. チロシンリン酸化による分子内相互作用変化の解析

B. チロシンリン酸化による高次構造の解析

C. 局在及び機能を決定づける結合蛋白質の検索と同定

DGK α には、様々な分子内ドメインが存在し、相互作用していることが知られている。また、その相互作用はカルシウムなどに依存する。これらの事実は、分子内ドメインの相互作用が活性化・非活性化常態で大きく異なること、さらにはその変化がDGK α 全体の構造に大きく影響を与えることを示唆している。しかし、チロシンリン酸化が分子内相互作用や高次構造に及ぼす影響やDGK α の高次構造も未だ報告されていない。そこで、以下のA, Bを明らかにする。一方、局在の変化には部位特異的な結合蛋白質が存在していると予測される。即ち、DGK α の局在変化は、チロシンリン酸化により高次構造変化が起こり、結合するパートナー分子を変えることにより完結するとの仮説のもと、DGK α 結合タンパク質の網羅的解析 (C) を行う。

3. 研究の方法

A. チロシンリン酸化による分子内相互作用変化の解析

上述のように、DGK α は核移行するが、一般的な核移行シグナル (NLS) は見当たらない。しかし、C1ドメインのみを発現させると核に局在することや、C1ドメインの立体構造を壊すようなアミノ酸変異を1つ入れると、変異DGK α は核移行しないことから、DGK α においては、このC1ドメインが核移行に重要であると

考えている。一方、C1 ドメインにN 末領域 (RVH-EF hand 領域) を付加すると、細胞質に存在するようになる。このことから、RVH-EF hand 領域はC1 ドメインと相互作用することによりC1 ドメインのNLS としての機能を阻害していると考えられた。また、このC1 止めふるイン内には核移行に重要なY218 が存在する(上述)。これらの事実、RVH-EFhand 領域とC1 ドメインの相互作用がY218 のチロシンリン酸化によって調節されており、その相互作用の変化がDGK α の核 - 細胞質シャトリングを可能にしていることを示唆している。

そこで、大腸菌を用いてリコンビナント GST-RVH-EFhand とMBP-C1 ドメインやY218に 変異を導入したMBP-C1Y218F、MBP-C1Y218Eを を作製し、両ドメインの相互作用と、それに対するチロシンリン酸化の役割をプルダウン アッセイ法により検討した。

また、細胞内でのドメイン間の相互作用を 検討するため、GFP- C1とFLAG--RVH-EF hand をCHO-K1細胞に発現させ、GFP- C1の核局 在に対する影響を共焦点レーザー顕微鏡を用 いて検討した。さらに、GFP-C1Y218Fと GFP-C1Y218Eについても同様の検討を行った。

B . チロシンリン酸化による高次構造の解析

高次構造を解析するためMBP-RDY218Fを大 腸菌に発現させ、アミロースレジンを用いて 精製した。その後、Factor XaによりMBPを切 断したのち、疎水クロマトグラフィーにより 精製した。また、アミロースレジンを簡易精 製したMBP-RD、MBP-RDY218F 、MBP-RDY218E を陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾 過により精製した。得られたタンパク質 (MBP-RDY218Fのみ) を、結晶化キット (Crystal Screen HR2-110, Crystal Screen2 HR2-112, Crystal Screen Cryo HR2-122) に 供した。尚、ゲル濾過及び陰イオン交換クロ マトグラフィーにはAKTA systemを用いた。

また、得られた精製タンパク質を円二色性 分散計J720を用いて、CDスペクトルを測定 した。さらに、コンピューターシミュレーシ ョンも行った。

C . 局在及び機能を決定づける結合蛋白質の 検索と同定

DGK α と細胞質、核で結合し、それぞれ局在及 び機能調節に関与しているタンパク質を同定 するために、DDT1-MF2細胞にFLAG-DGK α をリポ フェクション法により発現させた。ついで、 無血清状態あるいは通常状態の細胞を、核と 細胞質画分に分画し、それぞれFLAG抗体ビー ズを用いて、免疫沈降した。得られたタンパ ク質を質量分析に供した。

4 . 研究成果

A . チロシンリン酸化による分子内相互作用 変化の解析

GST-RVH-EFhand とMBP-C1を混合し、グルタ チオン樹脂や、アミロースレジンを用いたプ ルダウンアッセイの結果、RVH-EFhand とC1 ドメインが直接結合していることが明らかと なった。また、この結合は、C1ドメイン内に 存在する218番目のチロシンを、リン酸化を模 倣したグルタミン酸に置換すると増強され、 フェニルアラニンに置換すると減弱した。

さらに、C1ドメインの核局在に対すRVH-EF handの共発現が及ぼす影響を調べたところ、 GFP-C1の核局在は、FLAG-RVH-EF hand の発現により、抑制された。また、この 抑制効果は、GFP-C1Y218Eに対して強く、 GFP-C1Y218Yに対しては弱かった。

以上のことから、C1ドメイン内の218番目の チロシンがリン酸化されるとC1ドメインは直 接相互作用し、C1ドメインの核移行シグナル としての機能が弱められるため、DGK α が細胞

質に局在するようになると考えられた。

B. チロシンリン酸化による高次構造の解析

DGK α 全長の精製は困難であったため、高次構造変化に重要であると考えられる218番目のチロシンを含む調節領域 (RD) の精製を試みた。また、リン酸化によって異なる高次構造をとる可能性があったため、Y218F変異体を用いて実験を行った。MBP-RDY218Fを作製し、factor XaでMBPを切断後、疎水クラマトグラフィーによりRDY218Fを得た。その後、限外ろ過膜を用いて濃縮したが、高濃度のRDY218Fを含む溶液を得ることができなかった。そこで、MBP-RDY218Fをアミロースレジンで精製したのち、Superdex200 (10/300)を用いたゲル濾過に供し、MBP-RDY218Fを精製した。これを、結晶化キットに供したが、結晶を得ることができなかった。

そこで、C1ドメインのリン酸化状態がDGKの構造変化に及ぼす影響について調べるため、MBP-RD、MBP-RDY218F、MBP-RDY218EをResource Qを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー、Superdex200を用いたゲル濾過により精製した。ついで、それぞれの溶液のCDスペクトルを測定した。その結果、変異体間で、2次構造レベルでは大きな違いは見られなかったが、3次構造レベルで違いが見られたことから、DGKのRDはC1ドメインのリン酸化状態によって高次構造を変化させることが確認された。

また、既に構造が報告されているhuman DGKのRVHドメインの構造や相同性の高いPKCのC1ドメインから推定したRDの構造モデルを作製した。その結果、RVH/EFは表面電荷が正に荷電している面と負に荷電している面が存在すること、同じくC1ドメイン部分も表面電荷が正に荷電している面と負に荷電している面が存在することが明らかになった。このことからC1ドメインとRVH/EFはこの表面電荷に

よって結合していると考えられた。また、野一方、Y218はC1ドメインの負に荷電している面に存在していた。従ってY218は、RVH/EFとの相互作用に直接関与するのではなく、リン酸化されることでC1ドメインにアロステリックな構造変化、つまりC1ドメインとRVH/EFとの相互作用をより強固にするような構造変化を引き起こしているのではないかと推測された。

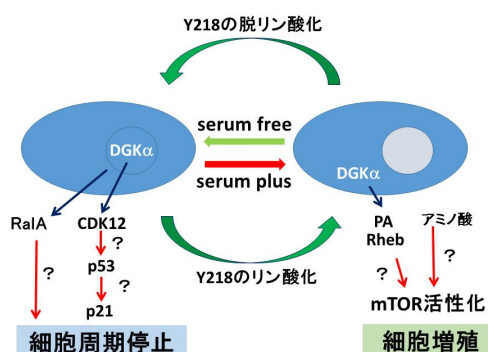
C. 局在及び機能を決定づける結合蛋白質の検索と同定

核-細胞質間シャトリングのメカニズム解明を行うため、核と細胞質それぞれにおけるDGK α 結合タンパク質を質量分析に供したところ、核ではcyclin-dependent kinase 12 (CDK12) やRa1A、細胞質ではheat shock protein 70 (Hsp70)、GTP-binding nuclear protein Ran (RAN)、myosin light chain (MLC) 1/3 及びRhebなどが検出された。

このうち、いくつかのタンパク質について抗体を用いた結合実験を行ったところ、無血清状態の核においてDGK α とCDK12との結合が確認された。さらに、Ra1Aとの有意な結合も確認された。即ち、GFP-DGK α とFLAG-Ra1Aをそれぞれ発現させたのち、FLAG抗体を用いたpull down assayを行ったところ有意な結合が認められた。一方、細胞質のDGK α の局在及び機能を調節している可能性のある結合タンパク質として、MLC1/3とRhebに着目した。しかし、MLC1/3については、有意な相互作用が確認できなかった。一方、GFP-DGK α とFLAG-Rhebをそれぞれ発現させたのち、pull down assayを行ったところ、結合する傾向は認められたが、有意ではなかった。

以上のことから、核内におけるCDK12やRa1Aとの結合はDGK α の細胞周期停止機能に重要であり、細胞質でのRhebとの結合はDGK α の細胞増殖機能に関与していることが示唆された

(下図)



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 4 件)

- 1) Hayashi D, Ueda S, Yamanoue M, Ashida H, Shirai Y. (2018) Amelioration of diabetic nephropathy by oral administration of d- α -tocopherol and its mechanisms. **Biosci Biotechnol Biochem.**, 82, 65-73.
- 2) Kakehi T, Yagi K, Saito N, Shirai Y (2017) Effects of vitamin E and its derivatives on diabetic nephropathy in Rats and identification of diacylglycerol kinase subtype involved in the improvement of diabetic nephropathy. **Functional Foods in Health and Disease**, 7, 816-832.
- 3) Hayashi D, Yagi K, Song C, Ueda S, Yamanoue M, Topham M, Suzaki T, Saito N, Emoto N, Shirai Y. (2017) Diacylglycerol Kinase alpha is Involved in the Vitamin E-Induced Amelioration of Diabetic Nephropathy in Mice. **Sci Rep.** 7, 2597-2604.
- 4) Lui K, Kunii N, Sakuma M, Yamaki A, Mizuno S, Sato M, Sakai H, Kado S, Kumagai K, Kojima H, Okabe T, Nagano T, Shirai Y. and Sakane F. (2016) A novel diacylglycerol kinase α -selective inhibitor,

CU-3, induces cancer cell apoptosis and enhances immune response. **J lipid res** 57,3,368-379.

[学会発表](計 10 件)

- 1) 脇阪昌明;岩下智秋;濱田大三;祇園景子;上田修司;山之上稔;鶴田宏樹;白井康仁, ジアシルグリセロールキナーゼ α の 218 番目のチロシンリン酸化はドメイン間相互作用と高次構造を変化させる, BMB2015, 2015.12.3, 神戸国際会議場
- 2) 脇阪昌明;岩下智秋;濱田大三;祇園景子;上田修司;山之上稔;鶴田宏樹;白井康仁, チロシンリン酸化がジアシルグリセロールキナーゼ α のドメイン間相互作用及び高次構造に与える影響, 農芸化学会関西支部例会 (492 回講演会), 2015.12.5, 神戸大学 農学部
- 3) 渡辺真以;木曾裕子;上田修司;山之上稔;齋藤尚亮;白井康仁, ジアシルグリセロールキナーゼ α の核 - 細胞質間シャトリングの生理的意義の解明, 農芸化学会関西支部例会 (493 回講演会), 2016.02.6, 京都大学
- 4) Yasuhito Shirai (invited), Function of diacylglycerol kinase, Lipid mediator in health and disease, 2016.05.20, San Diego (USA).
- 5) 白井康仁, カテキン類によるジアシルグリセロールキナーゼ α 活性化機構と、糖尿病性腎症の予防・改善の可能性について, 第 70 回日本栄養・食糧学会大会, 2016.05.15, 西宮
- 6) Yasuhito Shirai (invited), Possibility of epigallocatechin gallate and α -tocopherol as functional food for diabetic nephropathy and their molecular mechanism, 20th International conference of Functional Food in health disease, 2016.09.22,

Boston(USA)

- 7) Daiki Hayashi, Shuji Ueda, Minoru Yamanoue, Hitoshi Ashida, and Yasuhiro Shirai. Oral administration of epigallocatechin gallate (EGCg) improved diabetic nephropathy in mice. 20th International conference of Functional Food in health disease, 2016.09.23, Boston (USA).
- 8) 林大輝;上田修司;山之上稔;芦田均, 白井康仁、ジアシルグリセロールキナーゼ α 活性化剤としての緑茶カテキン EGCg の経口投与による糖尿病性腎症改善効果の検証、2018 年日本農芸化学大会、2017.03.18、京都
- 9) 林大輝;上田修司;山之上稔;芦田均, 白井康仁、緑茶カテキン EGCg のメチル化による糖尿病性腎症改善効果の増強、農芸化学会支部大会、2017.09.22、堺
- 10) 山口侑香;木曾裕子;山本麻央;渡辺真以;斎藤尚亮;上田修司;山之上稔;白井康仁、ジアシルグリセロールキナーゼ α の局在及び活性と慢性白血病細胞の増殖に関する研究、2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017.12.06、神戸

〔図書〕(計1件)

- 1) Hayashi D, Shirai Y. (2018) "Protective Role of Alpha-Tocopherol in Diabetic Nephropathy" In Nutritional and Therapeutic Interventions for Diabetes and Metabolic Syndrome. Ed. Debasis Bagchi, ELSEVIER.

〔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：

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
<http://www2.kobe-u.ac.jp/~shirai/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

白井 康仁 (SHIRAI YASUHITO)

神戸大学・農学研究科・教授

研究者番号：60263399

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

鶴田 宏樹 (TSURUTA HIROKI)

神戸大学・連携創造本部・准教授

研究者番号：20346282

(4)研究協力者

なし