

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月30日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20390050

研究課題名（和文）細胞周期およびストレス応答における脂質性情報伝達物質代謝酵素の役割

研究課題名（英文）Functional role of lipid second messenger metabolizing enzyme in cell cycle and stress response

研究代表者

後藤 薫 (GOTO KAORU)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：30234975

研究成果の概要（和文）：

ジアシルグリセロールキナーゼ（DGK）はプロテインキナーゼ C の生理的活性調節因子と考えられ近年、その機能的役割として癌や細胞死のシグナル伝達への関与が注目されている。これまで我々は、DGK アイソザイムのうちζ型 DGK（DGKζ）が核移行シグナルを有し核内に局在すること、そしてラット脳虚血実験にて海馬錐体ニューロンの核内から細胞質へ移行しアポトーシスの初期過程に関わる可能性があることを明らかにしてきた。本研究では、ストレス応答における DGKζ の役割および細胞周期との関連を検討した。その結果、DGKζ は癌抑制因子としてよく知られ DNA 損傷に応答してアポトーシスを誘導する転写因子 p53 と結合することを見出した。また細胞質に移行した DGKζ は p53 タンパク発現を強力に抑制し、アポトーシスを減少させることが明らかとなった。一方神経細胞において、ストレス応答による核内 DGKζ の減少は、細胞周期関連蛋白の発現増加によってアポトーシスを誘導することが分かった。以上の結果から、DGKζ は細胞質および核内の両コンパートメントにおいて、p53 の制御に関わっている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Diacylglycerol kinase (DGK), an enzyme that phosphorylates diacylglycerol to phosphatidic acid, is involved in many pathophysiological cellular responses, such as cancer and apoptosis. Our previous studies show that DGKζ, which contains a nuclear localization signal, is localized in the nucleus of hippocampal neurons but rapidly translocates from the nucleus to the cytoplasm and disappears in the early phase of ischemia, suggesting its implication in an apoptotic process. In this study we investigated the functional link between DGKζ cytoplasmic translocation and p53 that acts as the hub of various stress pathways. We found that cytoplasmic DGKζ induces cytoplasmic localization of p53 after DNA damage and suppresses p53 induction. In neurons, down-regulation of nuclear DGKζ after excitotoxic stress leads to aberrant cell cycle reentry, which results in cell death. These findings suggest that DGKζ cytoplasmic translocation exerts distinct effects on signal transduction both in the cytoplasm and the nucleus.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2009年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2010年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2011年度	3,100,000	930,000	4,030,000
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般

キーワード：細胞周期、ストレス応答、脂質代謝酵素

1. 研究開始当初の背景

(1) 生体膜は、種々の蛋白分子を含有する脂質二重層から構成されており、細胞内外あるいは細胞内の各コンパートメントを境するバリアーとして働くのみならず、情報の変換部位としても重要な役割を果している。

(2) 近年、細胞膜脂質の主要構成成分であるリン脂質が、情報伝達系に深く関与していることが明らかになってきた。

(3) 申請者は、この生体膜の微量成分であるイノシトールリン脂質の分解産物である脂質性二次伝達物質 DG のリン酸化酵素 DGK に注目し研究を行っている。これまで、ラット脳から5種の DGK アイソザイム (α , $-\beta$, $-\gamma$, $-\zeta$, $-\iota$) を単離し、その分子多様性と遺伝子発現の多様性を明らかにしてきた。

(4) しかし、これら DGK アイソザイムの機能的役割については未だ不明な点が多い。申請者は、生体ストレスの誘因として日常、最も頻繁かつ重要と考えられる虚血・低酸素による生体応答について、脂質性二次伝達物質代謝酵素である DGK を指標として解析を行うことにより、脂質代謝を介するストレス応答について探りたいと考えている。

2. 研究の目的

(1) これまでの研究により、ラット脳一過性虚血実験において DGK ζ が海馬錐体ニューロンの核内から細胞質へ移行する現象を見出した。

(2) 本研究では、この DGK ζ の核-細胞質移行の現象とストレス応答、また細胞周期との関連を検討した。

3. 研究の方法

(1) DGK ζ の核-細胞質移行の分子メカニズム解析を目的として、DGK ζ の遺伝子導入細胞を用いた免疫沈降法および質量分析法により、DGK ζ 結合蛋白を探索した。

(2) DGK ζ のニューロンにおける核-細胞質移行の現象を精査するために、海馬スライスを用いた解析を行った。

(3) 細胞のストレス応答に重要な役割を果たす p53 の制御機構に DGK ζ の核-細胞質移行の現象がどのような関わりを持つか検討した。

(4) ニューロンにおける DGK ζ の機能的役割

を解析するために、siRNA を用いた DGK ζ のノックダウン法および DGK ζ ノックアウトマウスを用いて、ストレス応答を解析した。

4. 研究成果

(1) HEK293 細胞にタンデムアフィニティータグを融合した DGK ζ を発現させ結合タンパク質群を精製し TOF-MS 解析を行った結果、Nucleosome assembly protein 1-like1 (NAP1L1) および-like4 (NAP1L4) を同定した。DGK ζ の変異体を用いた解析により、NAP1L1 は DGK ζ の N 末端側を中心とした全体的な構造を認識して結合し、NAP1L4 は DGK ζ の N 末側のみに結合することが明らかとなった。DGK ζ は主として核局在を示すが、一方、NAP は主に細胞質に局在することが報告されている。各々の遺伝子を HEK293 細胞に共発現させると DGK ζ は細胞質局在を示すようになった。また、最小結合領域である DGK ζ の N 末端領域も同様に NAP1L1 および NAP1L4 との共発現により細胞質に観察されるようになった。以上より、NAP1L1 および NAP1L4 は DGK ζ を細胞質にアンカリングし、その働きを空間的に制御する可能性が示唆された。

次に、NAP1L1 および NAP1L4 に対する特異抗体を作製し、ラット脳（大脳皮質、小脳、海馬）における局在を免疫組織化学的に検討した。大脳皮質における NAP1L1 および NAP1L4 免疫反応は、ほぼ全ての神経細胞の細胞体にびまん性に検出された。一方、小脳においては両者の局在は大きく異なっており、NAP1L1 はバークマングリアの細胞体に、NAP1L4 はプルキンエ細胞の細胞体と樹状突起に優位な局在が認められた。また海馬において、NAP1L1 は投射ニューロンと介在ニューロンに検出されたが、NAP1L4 は介在ニューロンでの発現が優位であった。

(2) 脳虚血負荷実験をシミュレートするためにラット海馬スライスに酸素グルコース欠乏負荷 (oxygen-glucose deprivation: OGD) を与え、DGK ζ の細胞内局在の経時的変化を詳細に検討した。DGK ζ は動物モデル実験と同様、OGD 負荷 20 分後から徐々に核外に移行し、その後、酸素グルコースを含む通常培養条件下に戻しても再び核内に戻ることはなかった。一方、OGD 負荷 10 分後では DGK ζ の核外移行は認められないが、その後、通常培養条件下に戻すと 60 分後には ζ 型 DGK が完全に核外へ移行することが明らかとなった。以上より、10 分間の OGD 負荷により細胞死カスケードが作動し、DGK ζ の核外移行が誘導された可能性が示唆された。

さらにグルタミン酸毒性との関連性を追求するために、通常培養条件下において NMDA を添加すると DGK ζ の核外移行が誘導され、一方 OGD 負荷時に NMDA 受容体を阻害すると DGK ζ の核外移行は認められなくなった。また、細胞外 Ca²⁺ をキレートし OGD 負荷を行うと DGK ζ の核外移行は起こらなかった。以上より DGK ζ の核外移行には、NMDA 受容体刺激による細胞外 Ca²⁺ の細胞内流入が重要であると考えられた。

(3) 癌抑制因子としてよく知られ DNA 損傷に応答してアポトーシスを誘導する転写因子 p53 との関連を検討したところ、DGK ζ は p53 と結合することが明らかとなった。また、HeLa 細胞を DNA 損傷因子である Doxorubicin で処理すると p53 タンパクが核内に増加し細胞死が誘導されるが、細胞質型 DGK ζ を遺伝子導入すると p53 タンパク発現誘導が強力に抑制されることが明らかとなった。このタンパク発現誘導の抑制は、プロテアソーム阻害剤 MG132 の添加により認められなくなることから、p53 の発現抑制はユビキチン-プロテアソーム系を介するタンパク分解系の促進によることが示唆された。さらにこの時、細胞質局在型 DGK ζ を過剰発現させると、細胞死が抑制されることも判明した。以上の結果から、細胞質型 DGK ζ は p53 の核移行阻害ならびにユビキチン-プロテアソーム系による分解系を調節することにより、p53 を介して細胞の生死をコントロールすることが示唆された。

さらに新規 DGK ζ 結合タンパクとして同定した NAP1L1 および NAP1L4 が DGK ζ を核から細胞質へ移行させる際、HeLa 細胞の DNA 損傷モデルにおいて、p53 の発現制御を介して細胞死を抑制することが明らかになった。また、DGK ζ をノックダウンすると NAP1L1/NAP1L4 の過剰発現による p53 の発現制御は生じないことがわかった。以上の結果から、NAP は DGK ζ の細胞質移行を介して p53 の発現を抑制し、細胞の生死をコントロールすることが示唆された。

(4) 虚血ストレスはニューロンに対して興奮毒性をもたらすと考えられているので、培養ニューロンを用いて興奮性伝達物質であるグルタミン酸の添加実験を行った。高濃度グルタミン酸 (1 mM) を 30 分添加後に通常メディアに置換すると、24 時間後にニューロンはアポトーシスを呈した。この実験系において DGK ζ の細胞内局在を観察すると、一過性虚血ストレスと同様に、DGK ζ は核から細胞質へ移行することが明らかとなった。さらに細胞質に移行した DGK ζ はユビキチン・プロテアソーム系により分解を受け、その後アポトーシスマーカーの上昇が認められた。

また siRNA により DGK ζ をノックダウンしたニューロンでは、コントロールと比較して、より早期にアポトーシスを呈した。個体レベルの実験では、カイニン酸誘導痙攣モデルにおいて、DGK ζ ノックアウトマウスの海馬ニューロンでは野生型と比較し、アポトーシスの進行が早期に認められた。この時、非分裂細胞であるニューロンにおいて細胞周期マーカーの増加が認められることから、DGK ζ の核-細胞質移行とその後の消失は、ニューロンの細胞周期と密接に関連してアポトーシスの制御に関与することが示唆された。

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 17 件)

(1) Nakano T, Hozumi Y, Iwazaki K, Okumoto K, Iseki K, Saito T, Kawata S, Wakabayashi I, Goto K. Altered expression of diacylglycerol kinase isozymes in regenerating liver. *J Histochem Cytochem.* 2012, 60:130-8. (査読有)

doi: 10.1369/0022155411429154.

(2) Suzuki Y, Yamazaki Y, Hozumi Y, Okada M, Tanaka T, Iseki K, Ohta N, Aoyagi M, Fujii S, Goto K. NMDA receptor-mediated Ca²⁺ influx triggers nucleocytoplasmic translocation of diacylglycerol kinase ζ under oxygen-glucose deprivation conditions, an in vitro model of ischemia, in rat hippocampal slices. *Histochem Cell Biol.* 2012, 137:499-511. (査読有)

doi: 10.1007/s00418-011-0907-y.

(3) Okada M, Hozumi Y, Iwazaki K, Misaki K, Yanagida M, Araki Y, Watanabe T, Yagisawa H, Topham MK, Kaibuchi K, Goto K. DGK ζ is involved in LPS-activated phagocytosis through IQGAP1/Rac1 pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012, 420:479-84. (査読有)

doi: 10.1016/j.bbrc.2012.03.057.

(4) Hozumi Y, Goto K. Diacylglycerol kinase β in neurons: functional implications at the synapse and in disease. *Adv Biol Regul.* 2012, 52:315-25. (査読有)

doi: 10.1016/j.jbior.2012.03.003.

(5) Okada M, Hozumi Y, Tanaka T, Suzuki Y, Yanagida M, Araki Y, Evangelisti C, Yagisawa H, Topham MK, Martelli AM, Goto K. DGK ζ is degraded through the cytoplasmic ubiquitin-proteasome system under excitotoxic conditions, which causes neuronal apoptosis because of aberrant cell cycle reentry. *Cell Signal.*

2012, 24:1573-82. (査読有)
doi: 10.1016/j.cellsig.2012.03.021.
(6) Nakano T, Hozumi Y, Goto K, Wakabayashi I. Involvement of diacylglycerol kinase γ in modulation of iNOS synthesis in Golgi apparatus of vascular endothelial cells. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2012, 385:787-95. (査読有)
doi: 10.1007/s00210-012-0760-0.
(7) Martelli AM, Tabellini G, Bressanin D, Ognibene A, Goto K, Cocco L, Evangelisti C. The emerging multiple roles of nuclear Akt. *Biochim Biophys Acta.* 2012, 1823:2168-78. (査読有)
doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.08.017.
(8) Marumo M, Nakano T, Takeda Y, Goto K, Wakabayashi I. Inhibition of thrombin-induced Ca^{2+} influx in platelets by R59949, an inhibitor of diacylglycerol kinase. *J Pharm Pharmacol.* 2012, 64:855-861. (査読有)
doi: 10.1111/j.2042-7158.2012.01485.x.
(9) Saino-Saito S, Hozumi Y, Goto K. Excitotoxicity by kainate-induced seizure causes diacylglycerol kinase ζ to shuttle from the nucleus to the cytoplasm in hippocampal neurons. *Neurosci Lett.* 2011, 494:185-9. (査読有)
doi: 10.1016/j.neulet.2011.02.062.
(10) Akiyama H, Hozumi Y, Nakano T, Kubota I, Goto K. Nuclear relocation of DGK ζ in cardiomyocytes under conditions of ischemia/reperfusion. *Histol Histopathol.* 2011, 26:1383-1390. (査読有)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21938675>
(11) Martelli AM, Ognibene A, Buontempo F, Fini M, Bressanin D, Goto K, McCubrey JA, Cocco L, Evangelisti C. Nuclear phosphoinositides and their roles in cell biology and disease. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.* 2011, 46:436-57. (査読有)
doi: 10.3109/10409238.2011.609530.
(12) Okada M, Hozumi Y, Ichimura T, Tanaka T, Hasegawa H, Yamamoto M, Takahashi N, Iseki K, Yagisawa H, Shinkawa T, Isobe T, Goto K. NAP Interaction of nucleosome assembly proteins abolishes nuclear localization of DGK ζ by attenuating its association with importins. *Exp Cell Res.* 2011, 317:2853-63. (査読有)
doi: 10.1016/j.yexcr.2011.09.014.
(13) Hozumi Y, Watanabe M, Goto K. Signaling Cascade of Diacylglycerol Kinase beta in the Pituitary Intermediate Lobe: Dopamine D2 Receptor/ Phospholipase

C-beta4/ Diacylglycerol Kinase-beta/ Protein Kinase C-alpha. *J Histochem Cytochem.* 2010, 58:119-129. (査読有)
doi: 10.1369/jhc.2009.954347.
(14) Evangelisti C, Gaboardi GC, Billi AM, Ognibene A, Goto K, Tazzari PL, McCubrey JA, Martelli AM. Identification of a functional nuclear export sequence in diacylglycerol kinase-zeta. *Cell Cycle.* 2010, 9:1-6. (査読有)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20023381>
(15) Evangelisti C, Astolfi A, Gaboardi GC, Tazzari P, Pession A, Goto K, Martelli AM. TIS21/BTG2/PC3 and cyclin D1 are key determinants of nuclear diacylglycerol kinase-zeta-dependent cell cycle arrest. *Cellular Signaling* 2009, 21:801-9. (査読有)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19263516>
(16) Nakano T, Iseki K, Hozumi Y, Kawamae K, Wakabayashi I, Goto K. Brain trauma induces expression of diacylglycerol kinase zeta in microglia. *Neurosci Lett.* 2009, 461:110-5. (査読有)
doi: 10.1016/j.neulet.2009.06.001.
(17) Hozumi Y, Watanabe M, Otani K, Goto K. Diacylglycerol kinase beta promotes dendritic outgrowth and spine maturation in developing hippocampal neurons. *BMC Neurosci.* 2009, 10:99. (査読有)
doi: 10.1186/1471-2202-10-99.

[学会発表] (計 10 件)

- (1) Tanaka T, Goto K: Cytoplasmic localization of diacylglycerol kinase zeta suppresses p53 induction after DNA damage. 42th Annual Meeting of Neuroscience, Convention Center, New Orleans, USA; October 13-17, 2012.
- (2) Matsui H, Hozumi Y, Iseki K, Goto K: Subcellular localization of Diacylglycerol kinase ϵ in transfected neurons. 42th Annual Meeting of Neuroscience, Convention Center, New Orleans, USA; October 13-17, 2012.
- (3) Hozumi Y, Goto K: Expression and localization of diacylglycerol kinase in rat retina. 42th Annual Meeting of Neuroscience, Convention Center, New Orleans, USA; October 13-17, 2012.
- (4) Goto K: Functional significance of diacylglycerol kinase in stress response. The 116th Annual Meeting of The Japanese Association of Anatomists

- and the 88th Annual Meeting of The Physiological Society of Japan, Yokohama, Japan; March 28-30, 2011.
- (5) Tanaka T, Goto K: Cytoplasmic diacylglycerol kinase ζ suppresses p53 stability and apoptosis. Gordon Conference, Ventura, CA, USA; February 27-March 4, 2011.
- (6) 岡田雅司、後藤薫 : Nuclear assembly proteinはDGK ζ の細胞内局在を制御する. 第115回日本解剖学会総会、岩手医科大学、盛岡； 2010年3月28-30日
- (7) 高橋信也、後藤薫 : DGK ζ 結合蛋白 NAP1とNAP2の脳内局在解析. 第115回日本解剖学会総会、岩手医科大学、盛岡； 2010年3月28-30日
- (8) Yusuke Suzuki, Yoshihiko Yamazaki, Kenya Kaneko, Satoshi Fujii, Ken Iseki, Kaoru Goto. Nucleocytoplasmic translocation of diacylglycerol kinase zeta under oxygen and glucose deprivation in rat hippocampal slices. 39th Annual Meeting of Neuroscience, Convention Center, Chicago, USA; October 17-21, 2009.
- (9) Toshiaki Tanaka, Masashi Okada, Kaoru Goto. Cytoplasmic lipid kinase suppresses p53 stability. 39th Annual Meeting of Neuroscience, Convention Center, Chicago, USA; October 17-21, 2009.
- (10) Yasukazu Hozumi, Kaoru Goto. Diacylglycerol kinase beta promotes dendritic outgrowth and spine maturation in developing hippocampal neurons. 39th Annual Meeting of Neuroscience, Convention Center, Chicago, USA; October 17-21, 2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

伊関 憲 (ISEKI KEN)
山形大学・医学部・准教授
研究者番号 : 70332921
八月朔日 泰和 (HOZUMI YASUKAZU)
山形大学・医学部・准教授
研究者番号 : 00372334
岡田 雅司 (OKADA MASASHI)
山形大学・医学部・講師
研究者番号 : 70512614
田中 俊昭 (TANAKA TOSHIAKI)
山形大学・医学部・助教