

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20700312
 研究課題名 (和文) 脂質性二次伝達物質ジアシルグリセロールリン酸化酵素の神経細胞内微細局在・機能解析
 研究課題名 (英文) Morphological study of the diacylglycerol kinase family

研究代表者
 八月朔日 泰和 (YASUKAZU HOZUMI)
 山形大学・医学部・講師
 研究者番号：00372334

研究成果の概要 (和文)：ラット脳における DGK β mRNA シグナルは線条体、側座核、嗅結節、嗅球、海馬、大脳皮質に強く、また下垂体中間葉にも認められることが特徴である。報告者は確立した抗 DGK β 抗体を用い、DGK β の海馬錐体細胞および下垂体中間葉における発現局在を明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：DGK β is expressed not only in projection neurons but also in interneurons and is concentrated at perisynaptic sites of asymmetrical synapses. Overexpression of wild-type DGK β promotes dendrite outgrowth at 7 d *in vitro* (DIV) and spine maturation at 14 DIV in transfected hippocampal neurons, although its kinase-dead mutant has no effect. In addition, we show that DGK β and dopamine D2 receptor are co-expressed in the intermediate lobe and localize to plasma membrane side by side. These findings will substantiate and further extend our understanding of the molecular-anatomical pathway of the phosphoinositide signaling and functional roles of DGK in the pituitary intermediate lobe.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：(1)ジアシルグリセロールキナーゼ (2)免疫組織化学染色 (3)特異抗体
 (4)共焦点レーザー顕微鏡 (5)蛍光多重染色法 (6)ポストシナプス
 (7)免疫電子顕微鏡法 (8)細胞膜

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(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)である。我々の教室では、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、DGKアイソザイムのうちDGKに対する特異抗体を作

製し、免疫組織化学的に DGK ζ が神経細胞核に局在することを明らかにした(Hozumi Y et al. Eur.J.Neuosci.2003;18:1448-57)。さらに DGK ι に対する特異抗体を作製し、神経細胞内の局在を報告した(Ito T et al. J.Biol.Chem.2004;279:23317-26, Nakano T et al. Eur.J.Neuosci.2006;23:1427-35)。

申請者は新たに DGK β に対する特異抗体を作製し、共焦点レーザー顕微鏡による観察および免疫電子顕微鏡法により、その神経細胞内局在を詳細に解析していた。ラット脳における DGK β mRNA シグナルは側座核・嗅結節・嗅球・海馬・大脳皮質に強く、特に線条体において非常に強く認められることが特徴である(Goto K and Kondo H PNAS 1993;90:40-46)。この時点で以下のことが明らかとなっていた：

- ・ DGK β 抗体を用いた免疫組織化学染色の結果は、DGK β mRNA 発現パターンとほぼ一致する。
- ・ DGK β はドーパミン D1・D2 受容体を有する投射ニューロン (medium spiny neuron) に発現し、介在ニューロンには局在しない。
- ・ DGK β は medium spiny neuron の細胞体、樹状突起および棘突起の細胞膜に局在する。
- ・ 棘突起の細胞膜に局在する DGK β の 54% が、シナプス後膜肥厚に非常に近接した領域に局在する。

以上より DGK β が線条体 medium spiny neuron の細胞膜に局在し、棘突起においてはシナプス後膜肥厚に非常に近接した細胞膜領域に局在し、機能している可能性が示された。

2. 研究の目的

研究開始時点では線条体とともに DGK β の主たる発現部位である海馬および下垂体中間葉における DGK β 局在については未検討であった。またヒトにおいて 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いるが、DGK β の棘突起シナプス領域におけるシグナル伝達への関与や機能は不明であった。そこで、以下の目的で、研究を開始した。

1) DGK β の神経細胞内微細局在の検討

本研究においては海馬および下垂体中間葉に焦点を絞り、共焦点レーザー顕微鏡下に蛍光多重染色法を用いて、DGK β の神経細胞内局在および発現細胞の同定を行なう。さらに DGK β のシナプスへの局在について検討するため、免疫電子顕微鏡法を施行する。

2) DGK β の神経細胞における機能の検討

野生型およびリン酸化能を欠失する変異型 DGK β 発現ベクターを初代培養神経細胞に遺伝子導入し、樹状突起や棘突起の変化に注目する。さらにその結果から、DGK β の神経細胞における機能を明らかにする。

3. 研究の方法

1) 共焦点レーザー顕微鏡による解析

線条体および海馬 CA1 領域のラット脳組織切片において、分子マーカーを用いた蛍光多重染色法により、DGK β の神経細胞内局在および発現細胞の同定を行なう。

<海馬>

海馬錐体細胞層を構成する神経細胞を分類し、DGK β 発現の有無判定する。更に下記分子マーカーとの関係について DGK β の局在を検討する。

樹状突起：

MAP2(microtubule associated proteins 2 ; 神経細胞樹状突起マーカー)

プレシナプス：

シナプトフィジン(プレシナプス全般を表すマーカー)

VGluT1(小胞膜グルタミン酸トランスポーター-1 ; グルタミン酸作動性終末マーカー)

VGAT(小胞膜 アミノ酪酸トランスポーター ; アミノ酪酸作動性終末マーカー)

ポストシナプス： PSD-95(postsynaptic density-95 ; ポストシナプスの足場タンパク)

<下垂体>

下垂体中間葉に注目し、DGK β 発現局在解析を行う。更にフォスホリパーゼ C、プロテインキナーゼ C の発現局在解析も行う。

2) 免疫電子顕微鏡法による解析

海馬において DGK β の興奮性のシナプス後部に局在するのか解析する。更にシナプス後膜肥厚辺縁における DGK β の局在について、包埋後金コロイド銀増感免疫電子顕微鏡法を用いて検討する。

3) 初代培養神経細胞を用いた解析

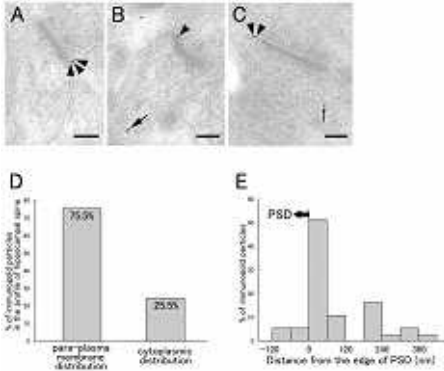
DGK β の主作用はジアシルグリセロールをリン酸化することである。この重要な機能を阻害した場合生じる事象について形態学的に解析する。野生型およびリン酸化能を欠失する変異型 DGK β 発現 DNA ベクターを海馬初代培養神経細胞に遺伝子導入する。研究開始時点での研究により DGK β は酵素活性の有無により細胞内局在が変化すること、またアクチン重合に DGK β が関与する可能性が示唆されていた。アクチンが関与する樹状突起伸展や棘突起形成の変化を、初代培養細胞の

発達段階を追って検討するとともに、酵素活性の有無による DGK β の細胞内局在変化についても観察を行なう。

4. 研究成果

< 脳 (海馬) >

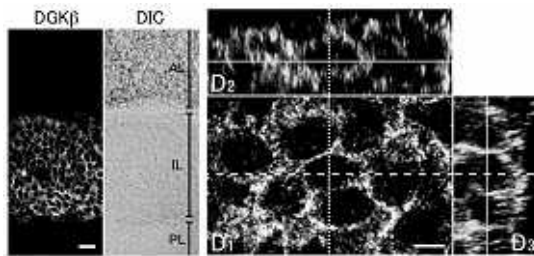
- 1) DGK β は海馬では投射ニューロンと介在ニューロンの両方に発現する。
- 2) DGK β は海馬ニューロンにおいて、興奮性シナプスを構成する棘突起のシナプス後膜肥厚に非常に近接した形質膜領域に局在する。



- 3) DGK β はニューロンの発達において、樹状突起の伸長と棘突起の成熟を促進する。

< 下垂体 >

- 1) DGK β は、下垂体中間葉メラニン細胞刺激ホルモン産生細胞の形質膜に局在する。



- 2) 下垂体中間葉メラニン細胞刺激ホルモン産生細胞に発現するイノシトールリン脂質代謝関連酵素はドーパミン D2 受容体、フォスホリパーゼ C β 4 およびプロテインキナーゼ C α であり、DGK β がこれら分子とともに細胞内シグナル伝達を担う可能性がある。

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3件)

- (1) Hozumi Y., Watanabe M, Goto K. Signaling cascade of diacylglycerol kinase in the pituitary intermediate lobe: dopamine D2 receptor/phospholipase C β 4/diacylglycerol

kinase beta / protein kinase Calpha. J Histochem Cytochem. (2010); 58: 119-129. 査読有

- (2) 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
- (3) Hozumi Y., Fukaya M, Adachi N, Saito N, Otani K, Kondo H, Watanabe M, Goto K. Diacylglycerol kinase beta accumulates on the perisynaptic site of medium spiny neurons in the striatum. Eur J Neurosci. (2008); 28 : 2409-22. 査読有

[学会発表](計1件)

- (1) Hozumi Y.; Diacylglycerol kinase β promotes dendritic outgrowth and spine maturation in developing hippocampal neurons. Neuroscience 2009, Chicago
発表の日: 2009年10月20日

6. 研究組織

(1)研究代表者

八月朔日 泰和 (HOZUMI YASUKAZU)

山形大学・医学部・講師

研究者番号: 00372334