

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590229

研究課題名(和文) 脂質二次伝達物質リン酸化酵素の神経細胞および内分泌細胞における発現局在の比較解析

研究課題名(英文) Comparative analysis for localization and expression of diacylglycerol kinase isozymes in neurons and endocrine cells

研究代表者

八月朔日 泰和 (Hozumi, Yasukazu)

山形大学・医学部・准教授

研究者番号：00372334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：野生型に比してDGK 欠失マウスの線条体投射ニューロンの棘突起数が減少していることが明らかとなった。また、DGK とAMPA型グルタミン酸受容体のサブユニットであるGluR2の結合が見出された。DGK についてはDGK が小脳プルキンエ細胞樹状突起に発現すること、またsubsurface cisterns内に局在することが明らかとなった。内分泌細胞については、ラット副腎にはmRNAレベルでDGK およびDGK の発現が認められたが、DGK は蛋白レベルでは副腎には発現していないと考えられた。一方DGK は、副腎皮質球状帯細胞の形質膜に局在する可能性が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Results show that stratal medium spiny neurons of DGKb-KO mice exhibit reduced dendritic spine density at the distal dendrites compared with wild-type mice. We also sought protein targets that interact with DGKb and identified the GluR2 AMPA receptor subunit as a novel DGKb binding partner. DGKe immunoreactivity was widely distributed in the cerebellum. At higher magnifications, DGKe was detected as granular structure in Purkinje cells (PCs) dendrites and perikarya. Ultrastructural localization of DGKe was examined in PCs by pre-embedding immunoelectron microscopy, showing that DGKe-immunoreactivities were distributed in flattened or tubular smooth endoplasmic reticulum just under the cell membrane, which were presumed subsurface cisterns. In rat adrenal gland, RT-PCR analysis showed that the expression signals for DGKb and DGKe are intensely detected. At protein level, DGKb was not expressed in the adrenal gland, but DGKe was detected on the plasma membrane in the zone glomerulosa.

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：棘突起 GluR2 プルキンエ細胞 subsurface cistern 副腎 小脳 線条体 免疫電子顕微鏡法

1. 研究開始当初の背景

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、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。ラット脳における DGK アイソザイムのうち DGK β mRNA シグナルは線条体、海馬に強く検出されるが、下垂体にも発現する。申請者は自らが確立した抗 DGK β 抗体を用いて、ラット脳線条体、海馬および下垂体における形態学的解析、更に海馬初代培養細胞への遺伝子導入実験の結果を報告してきた。

<脳(線条体および海馬)>

DGK β は線条体においてドーパミン D1/D2 受容体 (D1R/D2R) を有する投射ニューロン (medium spiny neurons, MSNs) に発現し、介在ニューロンには認められない。一方、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。

DGK β は線条体 MSNs 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。

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>

DGK β は、下垂体中間葉細胞の細胞膜に局在する。

下垂体中間葉細胞では、イノシトールリン脂質代謝関連情報伝達系として D2R、フォスホリパーゼ C β 4 (PLC β 4) およびプロテインキナーゼ C α (PKC α) のカスケードが作動すると考えられる。

さらに申請者は DGK ϵ に対する特異抗体作製にも成功していた。DGK ϵ は生体に幅広く分布しており、特に小脳に強い発現が認められる。申請者は近年、DGK ϵ が下垂体前葉の一部の細胞に発現していることを報告した。

2. 研究の目的

以上の背景を考慮すると、DGK β および DGK ϵ は両者とも、神経細胞ならびに内分泌細胞の両種の細胞で機能する可能性が高いが、詳細な細胞内局在ならびに機能的役割は未だ不明である。本研究ではこの点を追求し、神経内分泌機能における DGK の生理的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) ニューロンと内分泌細胞における DGK β と DGK ϵ の詳細な局在の比較検討

DGK ϵ の神経細胞内微細局在および内分泌細胞における発現局在解析

小脳および下垂体における DGK ϵ の神経細胞内微細局在解析および発現細胞の同定を行う。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 α (DGL α) と基質を共有

する可能性を示唆する。小脳における DGK ϵ と DGL α の相互関係も解析する。

DGK β の副腎における発現局在解析および下垂体中間葉ドーパミン刺激実験

DGK β タンパクの副腎における発現局在解析を行う。下垂体のドーパミン刺激実験を行い、D2R を介した DGK β 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内分泌細胞の形態学的解析

DGK β および DGK ϵ -KO マウスを用いて、神経細胞および内分泌細胞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 はマウス線条体、DGK ϵ はマウス小脳について、特異抗体を用いた免疫沈降法による質量分析および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) 本研究の学術的な特色・独創的な点および予想される結果と意義は、以下である。

DGK β 抗体および DGK ϵ 抗体を用いた形態学的解析により、神経細胞および内分泌細胞での細胞内シグナル伝達における各 DGK アイソザイムの詳細な作用点の解明が進むと予想される。

共通起源を持つとされる神経細胞と内分泌細胞が共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。

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>

DGK ϵ の神経細胞および内分泌細胞における発現・微細局在解析

DGK β の副腎における発現局在と下垂体ドーパミン刺激実験における局在解析

DGK β -KO と DGK ϵ -KO マウスの神経細胞および内分泌細胞における形態比較解析

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 23 年度>

DGK ϵ の神経細胞および下垂体前葉における発現・微細局在解析

1) 野生型マウスを用いた蛍光多重染色法による解析

共焦点レーザー顕微鏡で蛍光多重染色法を行う。

小脳

各種マーカーを用いる。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 バーグマングリア: GLAST 細胞内小

器官：calreticulin, IP3R (小胞体)
DGK ϵ 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 DGL α と基質を共有すると考えられるので DGK ϵ と DGL α の神経細胞内局在を比較検討する。

2)野生型マウスを用いた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、DGK ϵ の神経細胞内微細局在の解析を行う。

<平成 24 年度>

1)DGK β の副腎における発現局在と下垂体ドーパミン刺激実験における局在解析

DGK β の副腎における発現局在解析

DGK β の副腎におけるタンパクレベルでの発現および局在をウェスタンブロット法、DAB染色法、共焦点レーザー顕微鏡を用いた多重染色法にて解析する。

ドーパミン投与による局在変化の解析

ドーパミンを野生型および DGK β -KO マウスに投与し、下垂体中間葉において共局在化など DGK β および他の関連分子の局在に変化がないか検討する。

2)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

免疫沈降法 質量分析による解析

DGK β と DGK ϵ 特異抗体を用い免疫沈降法を行い、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として用い、特異的に結合するタンパクを特定する。

免疫沈降法 ウェスタンブロット法による解析

I 型代謝型グルタミン酸受容体、AMPA 型グルタミン酸受容体、シナプス後部の足場タンパク、イノシトールリン脂質代謝関連酵素等に対する抗体で、結合タンパク検出を試みる。

<平成 25 年度>

DGK β -KO, DGK ϵ -KO マウスの神経細胞および内分泌細胞の形態比較解析

1)神経細胞の解析

ゴルジ渡銀法による解析

DGK β -, DGK ϵ -KO マウス脳にゴルジ渡銀法を施行し、線条体 MSNs および小脳プルキンエ細胞の棘突起の数や形態変化について解析する。棘突起の形態評価は棘突起を参考論文 (Spires et al., Eur J Neurosci. 2004; 19: 2799-2807) のように分類して行う。

初代培養細胞による解析

樹状突起と棘突起の描出のため、各 KO マウスと EGFP-Tg マウスを掛け合わせ、DGK β -KO/EGFP(+) および DGK ϵ -KO/EGFP(+) マウスを作製する。DGK β -KO/EGFP(+)線条体より MSNs を、DGK ϵ -KO/EGFP(+)小脳よりプルキンエ細胞を培養し、DGK β , DGK ϵ や他の関連分子の局在変化、樹状突起の長さ、棘突起の数および形態変化について解析する。

電子顕微鏡による解析

電子顕微鏡にて DGK β および DGK ϵ -KO マウス棘突起の形態変化を、また包埋後免疫電子顕微鏡を用いて、棘突起における関連分子の局在

を解析する。

2)内分泌細胞の解析

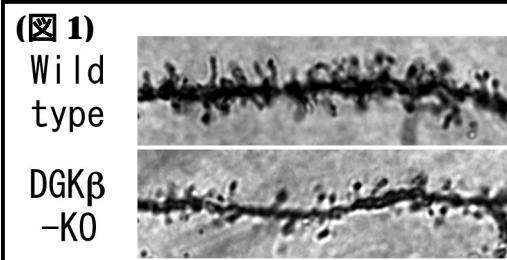
D2R-KO マウスでは中間葉細胞が増殖し、POMC 発現量の増加および α -MSH の分泌促進が報告されているので (Yamaguchi et al., Genes Cells 1996; 1: 253-268)、DGK β および DGK ϵ -KO マウスの下垂体や副腎を構成する細胞の形態変化の解析を行う。

4. 研究成果

1)中枢神経系における DGK β の機能解析

形態解析

DGK β -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 DGK β -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明らかにした (図 1)。一方、棘突起の性状については、野生型マウスとの変化を認めなかった。

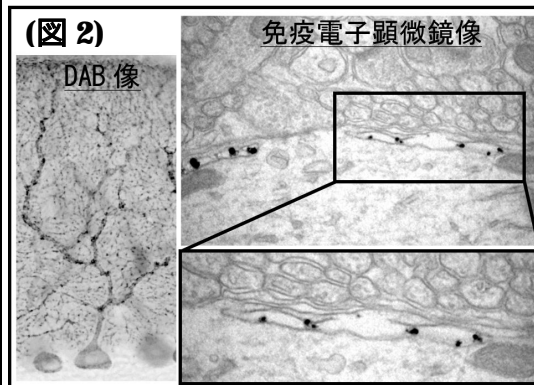


シグナル伝達系

免疫沈降法により、DGK β 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 GluR2 の結合を見出した。

2)中枢神経系における DGK ϵ の機能解析

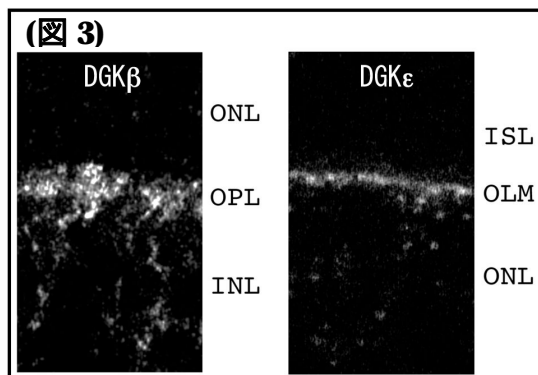
DAB 発色による光学顕微鏡的検討により、小脳において DGK ϵ はプルキンエ細胞樹状突起に発現すること (図 2 左) さらに免疫電子顕微鏡法による詳細な細胞内微細局在の観察により、DGK ϵ が細胞内カルシウム動態に重要である細胞膜直下の滑面小胞体 subsurface cisterns 内に局在することを明らかにした (図 2 右)。



3)網膜における DGK β および DGK ϵ の発現局在解析

DGK アイソザイムの網膜における発現局在について報告し (図 3)。このうち、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していた。一方、DGK ϵ は外境界膜 (OLM) に発現し、さらに DGK ϵ が

DGK アイソザイムのうち唯一、光受容細胞に発現する DGK であることを明らかにした。



4) 副腎における DGK アイソザイムの発現
ラット副腎には、RT-PCR 法を施行した結果、mRNA レベルで DGK α , β , γ , ϵ , ζ , ι の発現が認められた (図 4)。



mRNA レベルでは DGK β 発現が認められたが、生化学的および免疫組織化学的解析から、DGK β はタンパクレベルでは副腎には発現していないと考えられた。一方 DGK ϵ は副腎皮質球状帯細胞の形質膜に局在する可能性が明らかになった。
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と考えられた。

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 5 件)

Hozumi Y, Matsui H, Sakane F, Watanabe M, Goto K. Distinct expression and localization of diacylglycerol kinase isozymes in rat retina. *J Histochem Cytochem.* (2013); 61: 462-476. (査読有)

Tanaka T, Okada M, Hozumi Y, Tachibana K, Kitanaka C, Hamamoto Y, Martelli AM, Topham MK, Iino M, Goto K. Cytoplasmic localization of DGK ζ exerts a protective effect against p53-mediated cytotoxicity. *J Cell Sci.* (2013); 126: 2785-2797, 2013. (査読有)

Hozumi Y, Goto K. Diacylglycerol kinase β in neurons: functional implications at the synapse and in disease. *Adv Biol Regul.* (2012); 52: 315-325. (査読有)

Sato S, Hozumi Y, Saino-Saito S, Yamashita H, Goto K. Enzymatic activity and gene expression of diacylglycerol kinase isozymes

in developing retina of rats.

Biomed Res. (2011); 32: 329-336. (査読有)
Iwanaga T, Hozumi Y, Takahashi-Iwanaga H. Immunohistochemical demonstration of dopamine receptor D2R in the primary cilia of the mouse pituitary gland. *Biomed Res.* (2011); 32: 225-235. (査読有)

[学会発表] (計 9 件)
(国内)

第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (2014 年 3 月 28 日 下野市・自治医科大学)

イプシロン型ジアシルグリセロールキナーゼの形態学的機能解析 (ポスター)

八月朔日 泰和、藤原 浩樹、藤井 聡
後藤 薫

第 59 回東北・北海道連合支部学術集会 (2013 年 9 月 15 日 札幌市・北海道大学)

小脳プルキンエ細胞におけるイプシロン型ジアシルグリセロールキナーゼの発現局在および行動解析 (口演)

八月朔日 泰和、藤原 浩樹、金子 健也、藤井 聡、後藤 薫

第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (2013 年 3 月 30 日 高松市・サンポートホール高松)

網膜におけるジアシルグリセロールキナーゼの発現局在解析 (ポスター)

八月朔日 泰和、後藤 薫

第 44 回 東北生理談話会 (2012 年 10 月 27 日 山形市・山形大学)

小脳におけるイプシロン型ジアシルグリセロールキナーゼの発現局在と行動解析 (口演)

八月朔日 泰和、藤原 浩樹、藤井 聡、後藤 薫

第 58 回東北・北海道連合支部学術集会 (2012 年 9 月 23 日 山形市・山形大学)

網膜におけるジアシルグリセロールキナーゼの発現局在解析 (口演)

八月朔日 泰和、後藤 薫

第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (2012 年 3 月 27 日 甲府市・山梨大学)

イプシロン型ジアシルグリセロールキナーゼの小脳における発現局在解析 (ポスター)

八月朔日 泰和、後藤 薫

第 57 回東北・北海道連合支部学術集会 (2011 年 9 月 10 日 盛岡市・岩手大学)

網膜におけるジアシルグリセロールキナーゼの発現局在解析 (口演)

八月朔日 泰和、後藤 薫

(国外)

Diacylglycerol kinase family in the brain: expression, localization and functional implications. (口演)

SRC Mini-symposium
Phospholipid-mediated Signaling in Brain,
Ulsan National Institute of Science and
Technology, Ulsan, Korea, November 15th,
2013.

Yasukazu Hozumi, Kaoru Goto

Expression and localization of diacylglycerol
kinase in rat retina. (ポスター)

Society for neuroscience 42nd annual
meeting, Ernest N. Morial Convention Center,
New Orleans, October 16th, 2012.

Yasukazu Hozumi, Kaoru Goto

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・准教授

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