

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 27 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20178

研究課題名(和文)内耳におけるリン脂質代謝酵素と小胞体ストレス応答の解明

研究課題名(英文)The study of the phospholipid metabolizing enzymes and endoplasmic reticulum in the inner ear.

研究代表者

松井 祐興(Matsui, Hirooki)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：60594322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：正常モルモット蝸牛におけるDGKアイソザイムのRT-PCRを施行したところDGK<sub>1</sub>、DGK<sub>2</sub>、DGK<sub>3</sub>が強く発現していた。正常モルモット蝸牛において、DGK<sub>1</sub>は内毛細胞と支持細胞の核内に強く検出されるのに対し、外毛細胞の核内では弱いシグナルであった。FLAGタグつきDGK<sub>1</sub>プラスミドを作成し、免疫沈降を行い、銀染色を行い、検出したタンパク質を質量分析に提出したが、小胞体に存在するDGK<sub>1</sub>の結合タンパクの同定には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：The results of RT-PCR of DGK isozymes revealed that DGK<sub>1</sub>, DGK<sub>2</sub> and DGK<sub>3</sub> were strongly expressed in the cochlea of normal guinea pigs. DGK<sub>1</sub> was strongly detected in the nucleus of inner hair cells and supporting cells, but only weakly found in nuclei of outer hair cells. DGK<sub>1</sub> plasmids with FLAG tag were prepared, immunoprecipitated, silver stained, and the detected proteins were submitted to mass spectrometry. However, DGK<sub>1</sub> was not found to bind to protein in the endoplasmic reticulum in this study.

研究分野：耳科学

キーワード：内耳 リン脂質代謝酵素 ジアシルグリセロールキナーゼ 小胞体

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 進行性感音難聴の原因として小胞体ストレスとの関連が示唆されている。

(2) 細胞内情報伝達機構において、細胞内セカンドメッセンジャーであるジアシルグリセロール(DG)のリン酸化酵素 DG キナーゼ(DGK)は分子多様性ならびに生体臓器における遺伝子発現の多様性を示し、様々な病態に関与すると考えられるがいまだ不明な点が多い。

(3) 本研究では、細胞のストレス応答(タンパク合成障害やDNA損傷など)において、脂質代謝酵素であるジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)の役割を解析し、小胞体ストレス因子とアポトーシスの制御機構を解明する。さらに内耳における局在を解析し進行性感音難聴との関連について解析する。

### 2. 研究の目的

(1) 正常モルモット蝸牛における DGK の発現の有無を確認する。

(2) 正常モルモット蝸牛における DGK の局在を同定する。

(3) DGK は、その酵素自体のキナーゼ活性よりもむしろ他のタンパク質と結合し、他のタンパク質の働きを調節している報告がある。申請者は DGK が小胞体に局在しその機能を報告した(Matsui et al. BBA- Molecular and Cell Biology of Lipids, 2014)。そこで、DGK の結合タンパクを見つけるため免疫沈降を行った。

### 3. 研究の方法

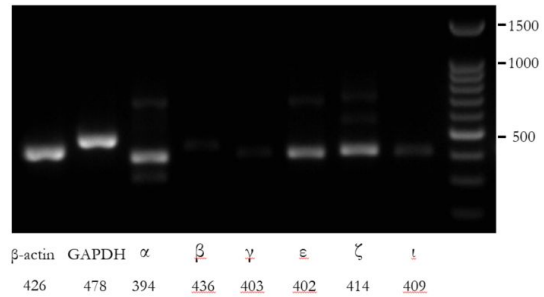
(1) 正常モルモット蝸牛における DGK アイソザイムの RT-PCR を施行した。

(2) 正常モルモット蝸牛を縦断切片である Cryosection 法で観察した。正常コルチ器における DGK などの発現を免疫染色して、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(3) DGK の結合タンパクを見つけるため FLAG タグをつけた DGK を作成した。免疫沈降を行い、銀染色を行い、検出したタンパク質を質量分析に提出した。

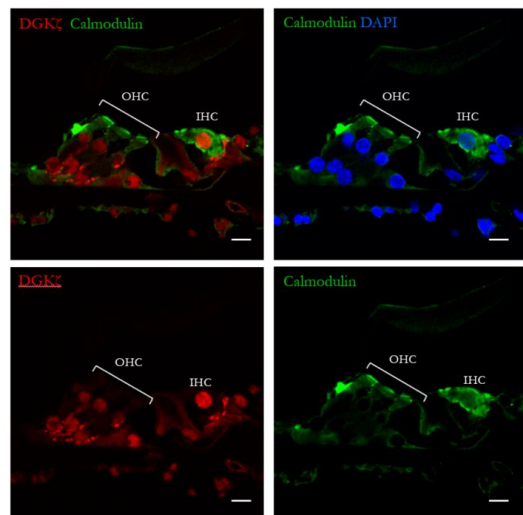
### 4. 研究成果

(1) 正常モルモット蝸牛における DGK (アイソザイムの RT-PCR を施行したところ DGK $\alpha$ 、DGK $\beta$ 、DGK $\gamma$  が強く発現していることが明らかとなった。DGK $\delta$  でも弱い発現は見られたが、DGK $\epsilon$ 、DGK $\zeta$  は検出感度以下であった。



図の説明：蝸牛における DGK アイソザイム mRNA の発現 正常モルモット蝸牛から採取した mRNA を RT-PCR にて解析したところ、DGK $\alpha$ 、DGK $\beta$ 、DGK $\gamma$  の強い発現が認められた。また DGK $\delta$  も弱く発現していたが、DGK $\epsilon$  と DGK $\zeta$  は検出感度以下であった。

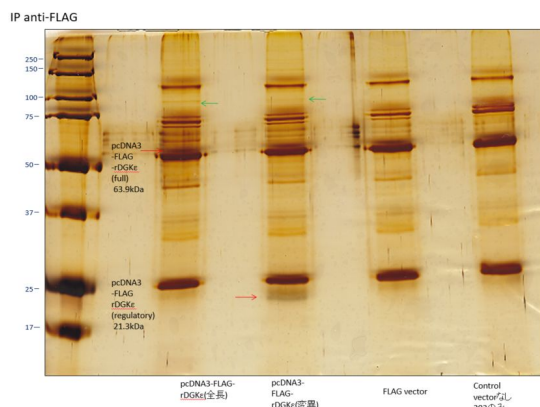
(2) 正常モルモット蝸牛を縦断切片である Cryosection 法で観察すると、1列の内有毛細胞と3列の外有毛細胞、そしてそれらを下支えする支持細胞の配列が見られた。有毛細胞マーカーの抗カルモジュリン抗体を用いて、内有毛細胞の細胞質、外有毛細胞の不動毛、クチクラ板における発現を確認した。正常コルチ器における DGK $\alpha$  免疫反応は内有毛細胞、支持細胞の核内に強く検出された。また DGK $\beta$  免疫陽性反応は外有毛細胞の核内にも認められたが、内有毛細胞、支持細胞に比べると、その反応は弱いものであった。コルチ器全体を Whole mount 法で解析すると DGK $\alpha$  免疫反応は内有毛細胞の核内に強く検出されるのに対し、外有毛細胞の核内では弱いシグナルであった。さらに支持細胞マーカーである Sox2 と多重染色を行うと、有毛細胞の深層に位置する Sox2 陽性の支持細胞の核は DGK $\alpha$  免疫陽性反応を示しており、DGK $\alpha$  は支持細胞の核内にも局在することが明らかとなった。



図の説明：正常コルチ器における DGK $\alpha$  の局在 Calmodulin：有毛細胞マーカー OHC:

outer hair cell, IHC: inner hair cell

(3) pcDNA3-FLAG-rDGK (全長プラスミド) および pcDNA3-FLAG-rDGK (制御部位の Zinc fingers ドメインのみの変異プラスミド) を作成した。内耳のタンパク質は免疫沈降を行う量として、不十分であった。そこで、マウスおよびラットの脳神経細胞を可溶化し、それを基質として免疫沈降を行った。また、HEK293 細胞を用いて、DGK を遺伝子導入し過剰発現系でも免疫沈降を行った。いずれも電気泳動を行い、銀染色を行った。いずれも、コントロールと比べて、異なる複数のバンドがいずれも認められた。しかし、バンドを切り出し、質量分析を行ったが、新規結合タンパクは見つけれなかった。今後、モルモット内耳細胞を取り出し、タンパク量を増やしての免疫沈降を行う予定である。また、耳細胞における DGK の働きについて、小胞体ストレス試薬などの刺激負荷によって、小胞体ストレス応答シグナルやアポトーシスの因子の変化について検討する予定である。



図の説明 免疫沈降し、電気泳動を行い、銀染色を行った。いずれもコントロールと比べて異なる複数のバンドを認められた。

## 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 8 件)

- (1) 松井祐興, 鈴木豊, 岡崎雅, 新川智佳子: 頸部リンパ節と胸椎生検した Rosai-Dorfman 症例. 耳鼻臨床. 2018; 111(2): 133-138 (査読有)
- (2) 松井祐興, 鈴木豊, 岡崎雅, 荒木直人: 嚥下障害が主訴であった食道カンジダ症例. 嚥下医学. 2018; 7(1): 91-97 (査読有)
- (3) 松井祐興, 鈴木豊, 岡崎雅, 荒木直人: 診断に苦慮した浸潤型後部副鼻腔アスペルギルス症例. 頭頸部外科. 2017; 27(3): 345-349 (査読有)
- (4) 松井祐興, 小池修治, 那須隆, 石田晃弘, 欠畑誠治: 頬脂肪体を用いて再建

を行った口腔癌の 2 症例. 頭頸部外科 27(1) 37-43, 2017 (査読有)

- (5) 松井祐興, 野田大介: 咽頭から頸部皮下まで刺入した歯ブラシによる深達性穿通性損傷の小児例. 口咽科 30(1) 143-147, 2017 (査読有)
- (6) 松井祐興, 那須隆, 岡崎慎一, 野田大介, 岡崎雅, 千田邦明, 小池修治, 欠畑誠治: 初診時に脳神経症状を呈した上咽頭癌症例の検討. 口咽科 30(1) 111-116, 2017 (査読有)
- (7) Nakano T, Matsui H, Tanaka T, Hozumi Y, Iseki K, Kawamae K, Goto K: Arachidonoyl-Specific Diacylglycerol Kinase and the Endoplasmic Reticulum. Front Cell Dev Biol.4, 132 2016. (査読有)
- (8) Hozumi Y, Tanaka T, Matsui H, Nasu T, Koike S, Kakehata S, Ito T, Goto K: Orotate phosphoribosyltransferase localizes to the Golgi complex and its expression levels affect the sensitivity to anti-cancer drug 5-fluorouracil Biomedical Research Vol.36, No.6, 403-409, 2015 (査読有)

[学会発表](計 12 件)

- (1) 松井祐興, 鈴木豊, 岡崎雅, 新川智佳子: 縦隔気管孔造設を行った頸部気管腺様嚢胞癌の 1 例. 第 28 回日本頭頸部外科学会, 宇都宮; 2018 年 1 月
- (2) Hirooki Matsui, Tsukasa Ito, Toshinori Kubota, Takatoshi Furukawa, Kazunori Futai, Chikako Shinkawa, Seiji Kakehata Let 's get started Transcanal Endoscopic Ear Surgery with careful preparation 14th Taiwan-Japan Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Dec. 1-2, 2017, Kaohsiung, Taiwan
- (3) 松井祐興, 鈴木豊, 岡崎雅, 新川智佳子: 頸部リンパ節腫脹を認め脊椎骨生検で診断がついた Rosai-Dorfman 病の一例. 第 79 回耳鼻咽喉科臨床学会, 下関; 2017 年 7 月
- (4) 松井祐興, 鈴木豊, 岡崎雅, 新川智佳子: 外来対応以外を要した口腔咽頭頸部食道異物の検討. 第 65 回日本耳鼻咽喉科学会地方部会連合学会, 秋田; 2017 年 7 月
- (5) 松井祐興, 鈴木豊, 岡崎雅, 新川智佳子: 頸部リンパ節腫脹を認め脊椎骨生検で診断がついた Rosai-Dorfman 病の一例. 第 79 回耳鼻咽喉科臨床学会, 下関; 2017 年 7 月
- (6) 松井祐興, 鈴木豊, 岡崎雅, 荒木直人: 口腔咽頭頸部食道異物の症例検討. 第 118 回日本耳鼻咽喉科学会, 広島; 2017 年 5 月
- (7) 松井祐興, 鈴木豊, 岡崎雅, 荒木直人:

嚥下障害を主訴に受診した食道カンジダ症の2例. 第40回日本嚥下医学会, 東京; 2017年2月

- (8) 松井祐興, 鈴木豊, 岡崎雅, 荒木直人: 術後経過観察中に頭蓋内膿瘍形成を認めた副鼻腔アスペルギルス症例の2例. 第27回頭頸部外科学会, 東京; 2017年2月
- (9) 松井祐興, 鈴木豊, 岡崎雅, 荒木直人: 嚥下障害を主訴に受診した食道カンジダ症の2例. 第150回日耳鼻山形県地方部例会, 山形; 2016年9月
- (10) 松井祐興, 野田大介, 岡崎雅: 咽頭から頸部皮下まで刺入した歯ブラシ外傷の1例. 第29回日本口腔咽頭科学会, 松江; 2016年9月
- (11) 松井祐興, 鈴木豊, 岡崎雅, 荒木直人: 嚥下障害を主訴に受診した食道カンジダ症の2例. 第150回日耳鼻山形県地方部例会, 山形; 2016年9月
- (12) 松井祐興, 渡辺知緒, 伊藤史, 窪田俊憲, 古川孝俊, 欠畑誠治 経外耳道的内視鏡耳科手術にて鼓室形成術を始めるにあたっての工夫 第25回日本耳科学会総会・学術講演会、長崎; 2015年10月

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

松井 祐興 (MATSUI HIROOKI)

山形大学・医学部・教授

助教

研究者番号: 60594322

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし

### (4)研究協力者

欠畑誠治 (KAKEHATA SEIJI)

研究者番号: 60594322

山形大学・医学部・教授

後藤薫 (GOTO KAORU)

山形大学・医学部・教授

研究者番号: 30234975