

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04012

研究課題名(和文)脂質代謝酵素ファミリーが織りなす生命現象と疾病：細胞応答から個体レベルの解析

研究課題名(英文)Life and disease orchestrated by lipid metabolizing enzymes

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：脂質二重層を構成するリン脂質は、グリセロ脂質であるジアシルグリセロール(DG)のリン酸化を起点として合成される。我々はDGのリン酸化酵素DGキナーゼ(DGK)の機能解析に従事しているが、本研究ではDGKファミリーのうち、ゼータ型DGK(DGK ζ)とその結合蛋白によるがん抑制遺伝子産物p53と炎症応答制御因子NF- κ Bの2つの転写因子の制御機構を解析した。その結果、DGK ζ は酵素活性依存的に、p53転写活性を抑制する一方、NF- κ B転写活性を亢進させることが明らかとなった。これらの結果は、DGK ζ 酵素活性は核内転写調節機構に重要な役割を果たすことを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

三大栄養素の一つである脂質は、貯蔵エネルギーとしてのみならず、生命の基本単位である細胞の外壁(細胞膜)の構成要素としても機能する。細胞膜の脂質はさらに、その合成や分解の過程において、細胞機能を調節する情報伝達物質の役割も果たす。本研究では、代表的な脂質の一つであるジアシルグリセロールの代謝酵素が、その活性を利用して、細胞核内の遺伝子転写機構を調節することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Major constituents of lipid bilayer, phospholipids, are initially produced by phosphorylation of diacylglycerol (DG). We are working on the functional analysis of DG-phosphorylating enzyme, DG kinase (DGK). In this study, we investigated regulatory mechanisms of tumor suppressor p53 and master transcription factor of inflammation NF- κ B by DGK ζ and its binding partners. We found that DGK ζ enzymatic activity positively regulates p53 transcription activity whereas it negatively regulates NF- κ B transcription activity. In addition, DGK ζ binding partners modulate specificity and selectivity of these transcription factors. These results suggest that DGK ζ plays an important role in the regulation of transcription factors through the enzymatic activity.

研究分野：解剖学

キーワード：脂質代謝 ジアシルグリセロールキナーゼ 転写調節 酵素活性 p53 NF- κ B

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

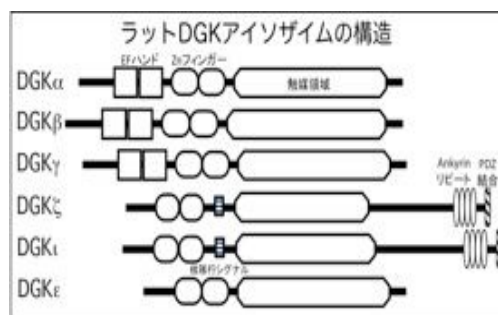
1. 研究開始当初の背景

(1) リン脂質は両親油性の性質を持ち、脂質二重層を構成する。この脂質二重層は、外界から隔離された「細胞」という微小空間を成立させることにより生命の誕生に重要な役割を果たしたと考えられ、その後さらに、細胞内オルガネラを区画し、様々な酵素反応の場を提供するようになる。リン脂質は、基本分子となるグリセロ脂質ジアシルグリセロール (DG) を起点として合成される。DG キナーゼ (DGK) は、この DG をリン酸化しフォスファチジン酸 (PA) に変換することにより、多様なリン脂質合成の第一段階を触媒する酵素である。

(2) DG は、リン脂質合成の起点となる他、生体エネルギーの貯蔵型トリグリセリド (TG) の前駆体でもあり、近年の研究では細胞内シグナル伝達に重要な役割を果たすプロテインキナーゼ C (PKC) 等の活性化因子となること明らかにされている。すなわち DG は、生体膜リン脂質合成、エネルギー代謝、そして情報伝達系と密接な関わりを持つことから、DG の代謝は細胞機能において重要な役割を果たすと考えられるが、その詳細は未だ不明な点が多い。



(3) これまでの研究により、原核細胞生物である大腸菌には2種類の DGK が、そして哺乳類では現在、10種類の DGK アイソザイムが同定されており、遺伝子重複によって増加した個々の DGK 遺伝子が、進化の過程において特有の変化を遂げ、機能分化を果たしてきたと推測される。DGK ファミリーの分子多様性の解明は、細胞機能のみならず生命進化の鍵を握ると考えられる。我々はこれまで、ラット DGK の遺伝子クローニング (DGK α 、 β 、 γ 、 ζ 、 ι) を介して、その分子多様性の解明と機能解析に従事してきた。我々はさらに、DGK ファミリーの脳内遺伝子発現の多様性をいち早く報告し、形態学的解析によって蛋白レベルの作用点を明らかにし、各アイソザイムが核やゴルジ体、小胞体などの細胞内オルガネラに配置されていることを見出した。



2. 研究の目的

(1) 上記発現局在の知見をもとに、本研究では、各アイソザイムの機能解析を進展させ、DGK という脂質代謝酵素ファミリーから観た生命現象について細胞応答から個体レベルの解析を行うことにより、生活習慣病、ストレス応答、炎症応答などの病態解明に向けた研究基盤を確立する。

(2) 「DGK と生活習慣病」 生体エネルギー代謝調節との関連を追求するために、種々の DGK-KO マウスを用いて短期間の高脂肪食負荷実験を行ったところ、DGK ζ -KO マウスは野生型および他の DGK-KO マウスと比較して、肥満傾向を示すことが明らかになった。

このテーマでは、DGK ζ -KO マウスの体重変化、耐糖能とシグナル伝達、および各臓器 (肝臓、脂肪組織、筋組織) におけるグリコーゲンおよび脂肪沈着の解析を行う。これらの研究成果は、DGK と生活習慣病の関連性を明らかにできる可能性がある。

(3) 「DGK と p53 ストレス応答」 これまで、細胞の核内に局在する DGK ζ が、種々のストレス刺激に応答して核から細胞質に移行し、ユビキチン・プロテアソーム系を介して癌抑制遺伝子 p53 の分解を促進することを報告した。また我々が発見した新規 DGK ζ 結合蛋白質 nucleosome assembly protein (NAP1L1 および NAP1L4) が p53 の転写制御に関わるデータを得ている。

このテーマでは、2つの NAP 蛋白による p53 転写制御機構を精査する。また DGK ζ の細胞質移行や酵素活性が、p53 転写活性制御にどのように関与するかを追求する。

(4) 「DGK と炎症応答」 これまでの研究により、DGK ζ ノックダウンによって、炎症応答の主要転写因子である NF- κ B 活性が増強することを報告した。また上記 DGK ζ 結合蛋白質 NAP が、選択的に NF- κ B 誘導遺伝子発現を制御するデータも得ている。これらに加え近年、さらに別の DGK ζ 結合蛋白質 Dead box protein 5 (DDX5) を同定したが、その機能は不明である。

このテーマでは、NAP 蛋白および DDX5 による NF- κ B 転写活性制御について、その核内移

行メカニズムの解明、ルシフェラーゼアッセイおよび ChIP アッセイ法を用いた実験を行う。また、DGK 酵素活性が NF- κ B 転写活性制御にどのように関与するかを追求する。

3. 研究の方法

(1) 「DGK と生活習慣病」

DGK⁻KO マウスの短期間(40日)及び長期間(90日)の高脂肪食負荷実験を行い、高脂肪食負荷マウスの体重変化を経時的にモニターしながら、血液サンプルを用いて、インスリンやレプチン、アディポネクチン等の糖および脂肪代謝関連ホルモンを ELISA 法を用いて測定する。また、グルコース負荷試験による耐糖能を検査する。インスリン標的臓器(肝臓、脂肪組織、筋組織)におけるグリコーゲン(PAS 染色)および脂肪沈着(Oil Red-O 染色)を組織化学的に解析する。

(2) 「DGK と p53 ストレス応答」

NAP1L1 と NAP1L4 ノックダウン細胞を用いて、DOX 刺激による p53 タンパクの誘導および転写活性、アポトーシスを定量する。2つの NAP 蛋白(NAP1L1 と NAP1L4)のノックダウン実験を施行し、DGK の細胞内局在制御、および ChIP アッセイ法を用いて p53 転写制御機構への関与を精査する。

(3) 「DGK と炎症応答」

NAP1L1 および NAP1L4、DDX5 のノックダウン細胞を用いて、炎症性メディエーターである TNF と IL1 の刺激時の NF- κ B の核内移行を形態学的に解析し、そしてその転写活性をルシフェラーゼアッセイにより測定する。NF- κ B 転写因子は、様々な遺伝子の中で、抗アポトーシス因子群 Bcl-2 ファミリーを誘導する。NAP1L1 および NAP1L4、DDX5 が、Bcl-2 ファミリー(Bcl-2、Bcl-xl、Mcl-1)の中で何れの遺伝子を標的にするか、ウエスタンブロットや ChIP アッセイを用いて解析する。

4. 研究成果

(1) DGK の遺伝子欠損(KO)マウスを解析する過程において 型 DGK-KO マウスを高脂肪食で 40 日間給餌すると、野生型に比して白色脂肪の沈着が増加することを見出したので、そのメカニズムを解析した。組織学的解析の結果、DGK^ε-KO マウスの精巢上体周囲白色脂肪細胞は、野生型の約 1.5 倍の大きさであった。ウエスタンブロット解析を行った結果、DGK^ε-KO マウスの白色脂肪細胞では、脂肪分解酵素である ATGL (Adipose TG lipase)および HSL (Hormone Sensitive Lipase)のタンパク発現が低下していた。これらの酵素はそれぞれ、TG を DG に、DG を MG (モノグリセリド)に分解する酵素であることから、DGK^ε の欠損は、高脂肪食飼育環境下において脂質分解系全般の機能低下を引き起こすことが示唆された。

さらに 90 日間の長期間給餌を行うと内臓脂肪組織中に褐色脂肪細胞が多数出現すること(褐色化)を見出した。この褐色脂肪細胞は熱産生に関与することから、寒冷刺激による褐色化を精査した。その結果、DGK^ε-KO マウスでは室温条件でも皮下白色脂肪組織に多胞性の褐色脂肪様細胞が多数観察され、寒冷暴露後も野生型マウスに比して褐色化が亢進していた。以上の結果、DGK^ε は寒冷暴露時の脂肪組織のリモデリングに関与する可能性が示唆された。

(2)新規 DGK 結合蛋白として同定した NAP1L1 および NAP1L4 による細胞周期およびアポトーシスの制御機構の解析を行った。その結果、NAP1L1 ノックダウン細胞では細胞増殖が促進し、一方 NAP1L4 をノックダウンすると細胞増殖が抑制されることを明らかにした。また DNA 損傷ストレスに対して、NAP1L1 ノックダウン細胞は脆弱性を示すのに対して、NAP1L4 ノックダウン細胞は抵抗性を示すことを見出した。

さらに、NAP1L1 および NAP1L4 が細胞周期および細胞死において相反する作用を及ぼすメカニズムに関して、p53 アセチル化現象を解析した。その結果、NAP1L1 ノックダウンでは 382 番目リジンのアセチル化が亢進するのに対して、NAP1L4 ノックダウンでは 320 番目リジンのアセチル化の亢進が認められた。

以上のことから、NAP1L1 および NAP1L4 はそれぞれ特有のリジン残基のアセチル化を介して p53 を制御し、細胞周期および細胞死を調節している可能性が示唆された。

(3)次に、細胞内の炎症応答の中心的な役割を担う NF- κ B カスケードに着目して、DGK および各種 DGK 結合タンパクが NF- κ B カスケードに対して、どのような制御を行っているのかを検討した。これまでの研究において DGK ノックダウンによって NF- κ B p65 が核内に留まることにより、NF- κ B の転写活性が増大することを明らかにした。一方で、DGK 結合蛋白として同定した NAP1L1 および NAP1L4 においては、NAP1L1 をノックダウンすると NF- κ B p65 は核内へ移行せずに細胞質に留まり NF- κ B の転写活性が減弱するのに対して、NAP1L4 をノックダウンすると NF- κ B p65 の核内移行に関しては影響を与えず、NF- κ B の転写活性に変化は認められなかった。

また、別の DGK 結合蛋白である DDX5 のノックダウンでは、NF-kB p65 の核内移行に影響は与えなかったものの NF-kB p65 の 311 番目セリンのリン酸化が抑制された結果、NF-kB の転写活性が減弱することが明らかとなった。

以上のことから、DGK および各種 DGK 結合タンパクは、NF-kB カスケードに対してそれぞれ異なる制御メカニズムを有しており、炎症応答における新たな調節因子としての可能性が示唆された。

(4) NF-kB は、抗アポトーシス機能を有する Bcl-2 ファミリー (Bcl-2、Bcl-xl、Mcl-1) の転写調節を介して、細胞の生存シグナルを制御する。そこで各 DGK 結合蛋白のノックダウンによって、NF-kB 制御下にある Bcl-2 ファミリーのいずれの因子が発現変化を示すか検討を行った。その結果、NAP1L1 ノックダウンにより NF-kB p65 の 310 番目リジンのアセチル化が低下し、Mcl-1 の発現が減少した。一方、DDX5 のノックダウンでは、NF-kB p65 の 311 番目セリンのリン酸化が抑制される結果、NF-kB の転写活性が減弱し、抗アポトーシス機能を有する Bcl-2 発現量の減少が認められた。

以上から、DGK を含むタンパク複合体は、NF-kB カスケードにおいて、Bcl-2 ファミリーの選択性に関与する可能性が示唆された。

(5) これまで、DGK および各種 DGK 結合タンパクのノックダウン実験により、p53 と NF-kB 転写活性の制御機構に及ぼす影響、ならびにこれら転写因子の発現誘導遺伝子の選択性に関して知見を得ることができた。しかし、DGK は本来、脂質代謝酵素であり、この酵素活性が p53 および NF-kB 転写活性にどのような影響を及ぼすかについては、未だ不明であった。

この点を解析するために、以下の 2 つの実験を施行した：

Hela 細胞の野生型 DGK をノックダウンし、酵素活性欠失型 DGK を遺伝子導入

DGK -KO 細胞に、酵素活性欠失型 DGK を遺伝子導入

この 2 つの実験により、DGK 酵素活性が p53 および NF-kB 転写活性に及ぼす影響を検討した。その結果、DGK は酵素活性依存的に p53 転写活性を正に調節し、一方 NF-kB 転写活性を負に制御することが明らかとなった。DGK は脂質性二次メッセンジャー-DG を PA に変換する酵素であることを考えると、この DG-PA 変換機構が核内転写機構に重要な役割を果たすことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tomoyuki Nakano, Keiko Seino, Ichiro Wakabayashi, Diana M Stafforini, Matthew K Topham, Kaoru Goto	4. 巻 32
2. 論文標題 Deletion of diacylglycerol kinase epsilon confers susceptibility to obesity via reduced lipolytic activity in murine adipocytes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 4121-4131
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.201701050R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Nakano T, Ogasawara S, Tanaka T, Hozumi Y, Mizuno S, Satoh E, Sakane F, Okada N, Taketomi A, Honma R, Nakamura T, Saidoh N, Yanaka M, Itai S, Handa S, Chang YW, Yamada S, Kaneko MK, Kato Y, Goto K.	4. 巻 36
2. 論文標題 DaMab-2: Anti-Human DGK Monoclonal Antibody for Immunocytochemistry.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Monoclon Antib Immunodiagn Immunother.	6. 最初と最後の頁 181-184
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/mab.2017.0023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakano T, Topham NK, Goto K.	4. 巻 75
2. 論文標題 Mice lacking DGKepsilon show increased beige adipogenesis in visceral white adipose tissue after long-term high fat diet in a COX-2-dependent manner.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Adv Biol Regul.	6. 最初と最後の頁 100659
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbior.2019.100659.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Tanaka T, Hozumi Y, Martelli AM, Iino M, Goto K.	4. 巻 1866
2. 論文標題 Nucleosome assembly proteins NAP1L1 and NAP1L4 modulate p53 acetylation to regulate cell fate.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.	6. 最初と最後の頁 118560
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbamcr.2019.118560.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tanaka K, Tanaka T, Nakano T, Hozumi Y, Yanagida M, Araki Y, Iwazaki K, Takagi M, Goto K.	4. 巻 65
2. 論文標題 Knockdown of DEAD-box RNA helicase DDX5 selectively attenuates serine 311 phosphorylation of NF- κ B p65 subunit and expression level of anti-apoptotic factor Bcl-2.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cellular Signalling.	6. 最初と最後の頁 109428
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cellsig.2019.109428.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka T, Nakano T, Hozumi Y, Martelli AM, Goto K.	4. 巻 1868
2. 論文標題 Regulation of p53 and NF- κ B transactivation activities by DGKzeta in catalytic activity-dependent and -independent manners.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.	6. 最初と最後の頁 118953
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamcr.2021.118953.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Akimoto R, Tanaka T, Nakano T, Hozumi Y, Kawamae K, Goto K.	4. 巻 71
2. 論文標題 DGKzeta depletion attenuates HIF-1 α induction and SIRT1 expression, but enhances TAK1-mediated AMPK α phosphorylation under hypoxia.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cellular Signalling.	6. 最初と最後の頁 109618
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cellsig.2020.109618.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 中野 知之、後藤 薫
2. 発表標題 型ジアシルグリセロールキナーゼ欠損による脂肪組織リモデリングの解析-寒冷暴露による変化-
3. 学会等名 第124回日本解剖学会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 田中 俊昭、後藤 薫
2. 発表標題 DGKゼータと結合タンパクによる多様なNF- κ B シグナル制御メカニズム
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 中野 知之、後藤 薫
2. 発表標題 ジアシルグリセロール代謝不全に起因する脂肪蓄積とインスリンシグナル異常
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会（招待講演）
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 中野 知之、後藤 薫
2. 発表標題 型ジアシルグリセロールキナーゼ欠損は皮下脂肪における褐色化を促進する
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 田中 俊昭、東海林 悠、後藤 薫
2. 発表標題 DGKzeta はSirt1発現調節を介してp53アセチル化を制御する
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Tomoyuki Nakano, Keiko Seino, Ken Iseki, Kaoru Goto
2. 発表標題 Diacylglycerol kinase alpha negatively regulates the activation of myofibroblasts in mouse liver.
3. 学会等名 ASCB Annual meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Toshiaki Tanaka, Kaoru Goto
2. 発表標題 NAP1L1 regulates NF-kB signaling pathway acting on anti-apoptotic Mcl-1 gene expression.
3. 学会等名 ASCB Annual meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中野 知之 (Nakano Tomoyuki) (00333948)	山形大学・医学部・准教授 (11501)	
研究分担者	田中 俊昭 (Tanaka Toshiaki) (70536987)	山形大学・医学部・助教 (11501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	ユタ大学			
イタリア	ボローニア大学			