

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08507

研究課題名(和文) 脂質性二次伝達物質リン酸化酵素の神経細胞および膵臓・副腎における形態学的機能解析

研究課題名(英文) Morphological and functional analyses of phosphatases of the lipid second messenger in the neurons, pancreas and adrenal gland

研究代表者

八月朔日 泰和 (Hozumi, Yasukazu)

秋田大学・医学系研究科・教授

研究者番号：00372334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：DGKepsilon (DGKe)の中樞神経における発現局在を解析した結果、DGKeは海馬・大脳皮質・線条体の投射ニューロンに発現するが、介在ニューロンには発現しないことが明らかとなった。また、DGKzeta(DGKz)の蝸牛外有毛細胞の核への局在、および音響暴露刺激により核から細胞質に移行する現象を新規に報告した。副腎皮質球状帯細胞においてはDGKgamma(DGKg)がゴルジ体に、DGKeが小胞体に局在することが明らかになった。中枢神経のみならず末梢器官でのDGKアイソザイムの豊富な発現や刺激による局在変化は、この酵素が細胞機能において重要な機能を有する可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂質性二次伝達物質ジアシルグリセロールのリン酸化酵素であるジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)ファミリーのうち、イプシロン型DGK(DGKe)の神経細胞と内分泌器官である副腎における発現および細胞内微細局在が明らかになった。また、DGKeが小脳においてイノシトール三リン酸受容体と免疫複合体を形成することを形態学的に明らかにした。DGKeの抑制がハンチントン舞蹈病の治療に有効である可能性が報告されており、当研究成果がハンチントン舞蹈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。

研究成果の概要(英文)：Analysis of the localization of DGKepsilon (DGKe) in the central nervous system revealed that DGKe was expressed in hippocampus, cerebral cortex and striatal projection neurons, but not in interneurons. We also newly reported that DGKzeta (DGKz) localizes to the nuclei of outer hair cells in the cochlea and translocates from the nucleus to the cytoplasm by acoustic stimulation. It was revealed that DGKgamma (DGKg) is localized in the Golgi apparatus and DGKe is expressed in the endoplasmic reticulum in zona glomerulosa cells of the adrenal gland. The abundant expression of DGK isozymes in the peripheral organs as well as central nervous system and the localization changes upon external stimulation suggest that this enzyme may have an important role in cell function.

研究分野：組織学

キーワード：ジアシルグリセロールキナーゼ 免疫組織化学染色 特異抗体 結合タンパク質 イノシトール三リン酸受容体 ゴルジ体 小胞体 虚血ストレス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) イノシトールリン脂質(PI)代謝系で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)であり、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)の遺伝子クローニングを報告してきた。
- (2) 申請者はイプシロン型DGK(DGK ϵ)に対する特異抗体作製に成功した。DAB発色による光学顕微鏡を用いた検討により、小脳でDGK ϵ はプルキンエ細胞樹状突起に発現すること、さらに免疫電子顕微鏡法による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である表面下槽内に局在することを明らかにした。
- (3) 申請者はDGK ϵ に対する特異抗体以外にも、DGK β , DGK γ , DGK ζ , DGK ι に対する特異抗体を自ら確立し、中枢神経系や他の末梢器官におけるDGKの発現・局在を明らかにし、学内外の研究者に特異抗体の供与を行ってきた。また、申請者はDGK以外の分子に対する特異抗体の作製にも成功し、各分子の細胞内局在や機能の解明に寄与してきた。
- (4) 申請者はDGKアイソザイムの膵臓・副腎における発現局在について報告した。
 - ① 膵臓にはDGK ζ が発現し、虚血ストレス刺激に反応して核から細胞質に移行する。
 - ② 副腎皮質および副腎髄質にはDGK ϵ およびDGK ζ の発現が認められる。

2. 研究の目的

上述したデータより、DGKファミリーは中枢神経系ならびに内分泌細胞において各々の局在領域で機能する可能性が高いが、詳細な細胞内局在や機能的役割は未だ不明である。本研究ではこの点に関し、細胞内での普遍的および内分泌細胞に特異的な機能におけるDGKの生理学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) 神経細胞と内分泌細胞におけるDGKアイソザイムの詳細な局在の比較検討

① DGKアイソザイムの脳および膵臓・副腎における細胞内微細局在解析

脳：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リパーゼ α (DGL α)と基質を共有する可能性を示唆する。小脳プルキンエ細胞および海馬錐体細胞にはDGL α が豊富に発現しており、同じ発現を示すDGK ϵ とDGL α の相互関係について解析する。

膵臓：DGK ζ のランゲルハンス島構成細胞の核内における微細局在解析を行う。

副腎：皮質と髄質に発現するDGKアイソザイムの細胞内微細局在解析を行う。

② 虚血ストレス条件下でのDGKの膵臓および副腎における発現局在変化の解析

膵臓・副腎について、虚血ストレス条件下におけるDGKアイソザイムや他のPI代謝関連分子の局在変化を検討する。

2) DGK ϵ およびDGK ζ -KOマウスの神経細胞および膵臓・副腎の形態学的解析

連携研究者が有するDGK ϵ およびDGK ζ -KOマウスの供与を受け、神経細胞および膵臓・副腎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。

3) DGK ϵ およびDGK ζ の細胞内シグナル伝達系における役割の解析

DGK ϵ およびDGK ζ について、特異抗体を用いた免疫沈降法による質量分析・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) 本研究計画の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義は以下の点である。

- ① 自ら確立したDGK γ , - ϵ , - ζ , - ι 抗体による形態学的解析から、神経細胞・膵臓・副腎での細胞内シグナル伝達における詳細な作用点の解明が進むと予想される。
- ② 共通起源を持つとされる中枢神経系と副腎髄質が、共有あるいは各々独自に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。
- ③ DGK ϵ 抑制がハンチントン舞踏病の治療に有効である可能性が報告され、DGK ϵ の詳細な発現局在解析がハンチントン舞踏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>

- ① DGK ϵ の神経細胞における発現・細胞内微細局在解析
- ② DGKアイソザイムの膵臓・副腎における発現・細胞内微細局在解析
- ③ DGKアイソザイムの膵臓・副腎における虚血ストレス条件下での局在変化の解析
- ④ DGK ϵ およびDGK ζ -KOマウスの神経細胞・膵臓・副腎の形態学的解析
- ⑤ 特異抗体を用いたDGK ϵ およびDGK ζ のシグナル伝達複合体の解明

<平成 29 年度>

① ラット・野生型マウスにおける DGK ϵ の神経細胞内発現および細胞内微細局在解析

DGK ϵ の発現細胞同定と神経細胞内微細局在解析を行う。

1) 蛍光多重染色法による解析

DGK ϵ が豊富に発現する小脳を中心に、海馬、大脳皮質および線条体について共焦点レーザー顕微鏡で蛍光多重染色法を行う。各種マーカーは以下の通りとする。

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

投射ニューロン (海馬・大脳皮質錐体細胞)：MAP2

投射ニューロン (線条体)：dopamine D1, D2 receptor

抑制性介在ニューロン：GAD, nNOS, CHT1, calretinin, parvalbumin

バグマングリア：GLAST 細胞内小器官：IP3R (小胞体)

イノシトールリン脂質代謝関連分子：mGluR1, mGluR5, G α q/11, PLC β 1, PLC β 3, PLC β 4

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) 免疫電子顕微鏡法による解析

包埋前 (DAB・銀増感) および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 30 年度>

① DGK アイソザイムの膵臓・副腎における発現および微細局在解析と、虚血ストレス条件下における発現および局在変化の解析 (ラット・野生型マウス)

1) DGK アイソザイムの膵臓・副腎における細胞内微細局在解析

膵臓：内分泌部であるランゲルハンス島において、DGK ζ が構成細胞の核内に発現する。

副腎：DGK アイソザイムおよび PI 代謝関連分子は、副腎皮質球状帯細胞と副腎髄質クロム親和性細胞に豊富に発現し、DGK ϵ は細胞膜、DGK ζ は核内に局在する。

包埋前 DAB・銀増感および包埋後免疫電子顕微鏡法により、DGK アイソザイムの膵臓・副腎における発現細胞内小器官微細局在の解析を行う。

2) 虚血ストレス条件下における DGK アイソザイム発現および局在変化の解析

申請者の免疫組織化学的解析から、PI 代謝系シグナル伝達は哺乳動物の膵臓および副腎で駆動すると考えられる。申請者は DGK ζ が神経細胞では虚血により、膵臓 β 細胞ではストレプトゾトシンによる DNA 損傷ストレスにより、核から細胞質に移行することを報告している。膵臓および副腎について、虚血ストレス条件下における DGK や他の PI 代謝関連分子の局在変化を検討する。

<平成 31 年度>

① DGK ϵ および DGK ζ -KO マウスの神経細胞および膵臓・副腎の形態比較解析

1) 神経細胞の解析 (DGK ϵ -KO マウス)

① ゴルジ渡銀法による解析

DGK ϵ -KO マウス脳にゴルジ渡銀法を施行し、小脳プルキンエ細胞の棘突起数や形態変化を解析する。

② 電子顕微鏡による解析

電子顕微鏡を用いて、DGK ϵ -KO マウスの細胞および細胞内小器官の形態変化を野生型マウスと比較検討する。

2) 膵臓および副腎の形態比較解析 (DGK ϵ および DGK ζ -KO マウス)

電子顕微鏡を用いて、DGK ϵ および DGK ζ -KO の膵臓ランゲルハンス島構成細胞、副腎皮質球状帯細胞および副腎髄質クロム親和性細胞の細胞・細胞内小器官の形態変化を、野生型マウスと各々比較検討する。

② 特異抗体を用いた DGK ϵ および DGK ζ のシグナル伝達複合体の解明

1) DGK ϵ ：結合タンパクの同定 (マウス小脳)

DGK ϵ 特異抗体にて免疫沈降法を行い、得られた免疫複合体に質量分析を行う。

2) DGK ζ ：結合タンパクの同定 (マウス膵臓・副腎)

申請者は培養細胞レベルで DGK ζ が p53, NAP1L, NAP1L4 と結合することを見出している。膵臓と副腎より構成細胞の核分画を抽出し、DGK ζ 特異抗体にて免疫沈降法を行い、得られた免疫複合体に質量分析を行う。

4. 研究成果

1) 中枢神経系における DGK ϵ の発現局在解析

① 形態解析

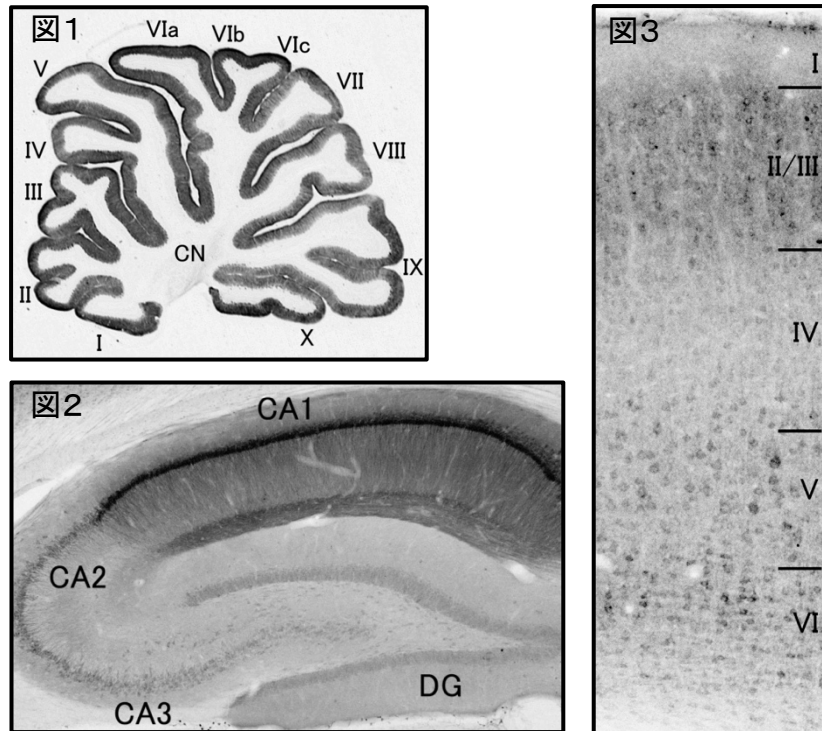
DGK ϵ は小脳プルキンエ細胞に豊富に発現することから、小脳以外でDGK ϵ が豊富に発現する海馬、大脳皮質に注目した。

低倍率像における解析

小脳：小脳小葉における DGK ϵ の発現差は認めなかった(図1)。

海馬：DGK ϵ 免疫反応はCA1領域に強く検出された(図2)。

大脳皮質：DGK ϵ はII/III層およびV、VI層に発現が認められた(図3)。



高倍率像における解析

海馬：海馬CA1領域において、DGK ϵ 免疫反応は投射ニューロン細胞体および樹状突起に点状に検出された。GAD陽性介在ニューロンにおけるDGK ϵ 免疫反応は検出限界以下だった。

大脳皮質：DGK ϵ 免疫反応は投射ニューロンの細胞体および樹状突起領域に粗大な顆粒状に認められた。GAD陽性介在ニューロンにおけるDGK ϵ 免疫反応は検出限界以下だった。

線条体：線条体投射ニューロン(medium spiny neurons)において、DGK ϵ 免疫反応はドーパミンD1およびD2受容体陽性細胞の両者に発現していた。

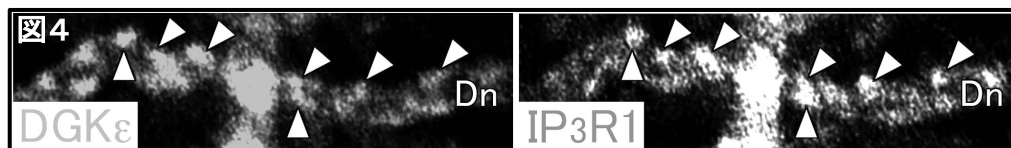
以上よりDGK ϵ が脳全体に広く発現することが明らかとなった。このことはDGK ϵ が小脳以外の領域でも重要な機能を有する可能性を示唆する。

② DGK ϵ -KOマウス, DGK ζ -KOマウス神経細胞の形態比較解析

電子顕微鏡を用いた解析ではDGK ϵ およびDGK ζ 欠失による細胞および細胞内小器官の形態変化は認められなかった。

③ シグナル伝達系

マウス小脳におけるイノシトール三リン酸受容体との結合が明らかとなった。形態的にもDGK ϵ はイノシトール三リン酸受容体と小脳プルキンエ細胞樹状突起において近接して局在することが明らかとなった(図4)。



2) 中枢神経系における DGK γ の発現局在解析

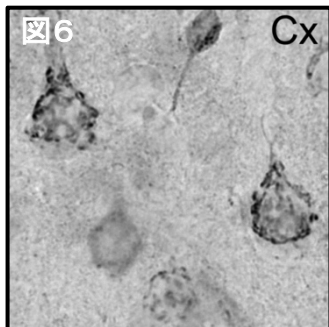
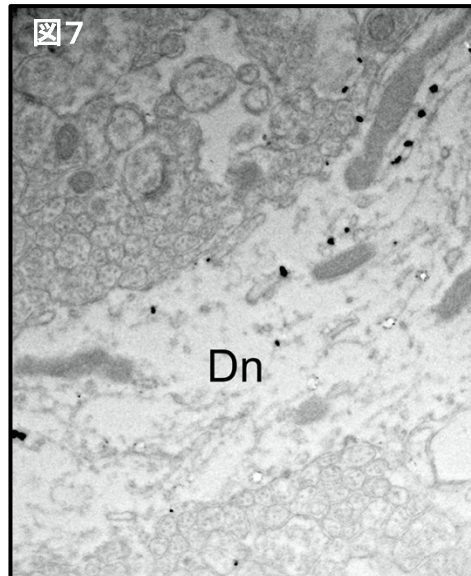
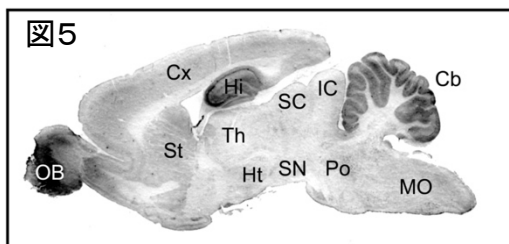
DGK γ に対する特異抗体を確立していたが、中枢神経系における発現および細胞内局在は不明であった。本研究にてDGK γ の神経細胞における発現局在解析を開始した。

DGK γ の免疫反応はDGK γ -mRNA発現パターンと類似して、海馬と小脳に強く認められた(図5)。

高倍率で観察すると、大脳皮質第V層の大錐体細胞細胞質において粗大な網状・顆粒状構造として検出された(図6)。

包埋前金コロイド銀増感免疫電子顕微鏡法にてDGK γ の小脳プルキンエ細胞樹状突起内微細

局在を解析したところ、DGK γ は滑面小胞体内に局在することが明らかとなった(図7)。これは滑面小胞体の中でも表面下槽に限局して局在する DGK ϵ とは異なる局在パターンであった。



- 3) DGK アイソザイムの膵臓・副腎における発現および微細局在解析
 - ① DGK アイソザイムの膵臓・副腎における細胞内微細局在解析
副腎皮質球状帯細胞において DGK γ がゴルジ体に、DGK ϵ が小胞体に局在することを明らかにした。膵臓では RT-PCR にて DGK α -および DGK ϵ -mRNA 発現もわずかに認められたため特異抗体でタンパクの検出を試みたが、検出限界以下であった。
 - ② 虚血ストレス条件下における DGK アイソザイム発現および局在変化の解析
ラット副腎褐色細胞腫由来の培養細胞である PC-12 に対して虚血ストレスを与え、DGK アイソザイムの発現量変化および局在変化の解析を行った。RT-PCR にて PC-12 には DGK α , DGK ϵ , DGK ζ および DGK ι の発現が認められ、タンパクレベルでの解析のために特異抗体を用いて虚血ストレス実験を行ったが、発現量の変化や局在変化を認めなかった。
 - ③ DGK ϵ -KO マウス, DGK ζ -KO マウス膵臓・副腎の形態比較解析
電子顕微鏡を用いた DGK ϵ -KO マウスおよび DGK ζ -KO マウスの膵臓ランゲルハンス島構成細胞、副腎皮質球状帯細胞および副腎髄質クロム親和性細胞の細胞・細胞内小器官の形態変化は認められなかった。虚血ストレスによる細胞の形態変化は認められなかった。
 - ④ シグナル伝達系
新規結合タンパク質は検出されなかった。
- 4) 内耳における DGK ζ の発現・局在解析および音響暴露による局在変化の解析
本研究において、確立した DGK ζ 特異抗体がモルモット DGK ζ にも特異性を示すことが確認された。DGK ζ 特異抗体を使用してモルモット内耳での DGK ζ 発現を解析したところ、DGK ζ は内毛細胞と外毛細胞の核に局在することが明らかとなった。音響暴露による DGK ζ の局在変化を観察したところ、音響暴露に感受性の高い外毛細胞において DGK ζ が核から細胞質に移行した(図8)。虚血ストレスによる DGK ζ の核外移行の現象は報告されていたが、本研究により音響暴露によっても核外移行が生じることを初めて報告した。

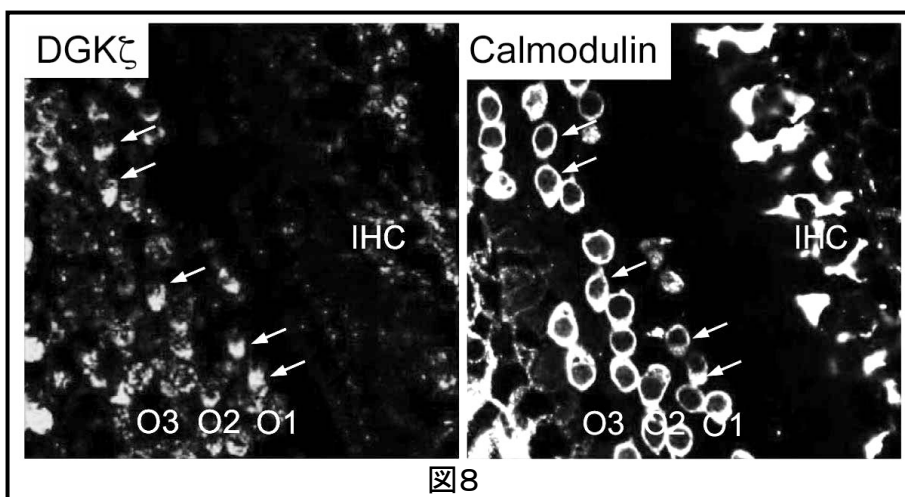


図8

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

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 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research	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 Nakano T, Ogasawara S, Tanaka T, Hozumi Y, Sano M, Sayama Y, Yamada S, Kaneko MK, Kato Y, Goto K.	4. 巻 38
2. 論文標題 DzMab-1: Anti-Human Diacylglycerol Kinase Monoclonal Antibody for Immunocytochemistry.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 179-182
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/mab.2019.0024.	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 Shinkawa C, Ito T, Hozumi Y, Chiba M, Matsui H, Goto K, Kakehata S.	4. 巻 151
2. 論文標題 Expression and localization of diacylglycerol kinase in guinea pig cochlea and its functional implication under noise-exposure stress conditions.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 461-474
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00418-019-01781-9.	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, Ogasawara S, Tanaka T, Hozumi Y, Yamaki A, Sakane F, Shirai Y, Nakamura T, Yanaka M, Yamada S, Kaneko MK, Kato Y, Goto K.	4. 巻 37
2. 論文標題 DgMab-6: Antihuman DGKgamma Monoclonal Antibody for Immunocytochemistry.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 229-232
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/mab.2018.0026.	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Chikako Shinkawa, Tsukasa Ito, Makoto Chiba, Yasukazu Hozumi, Kaoru Goto, Seiji Kakehata
2. 発表標題 The Expression and Localization of DGK in Normal and Noise Exposed Guinea Pig Cochlea
3. 学会等名 54th Workshop on Inner EAR Biology (国際学会)
4. 発表年 2017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
研究協力者	後藤 薫 (Goto Kaoru) (30234975)		
研究協力者	渡辺 雅彦 (Watanabe Masahiko) (70210945)		