

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790559  
 研究課題名 (和文) 血管におけるジアシルグリセロールキナーゼの TRP チャネル分子制御機構の解明  
 研究課題名 (英文) Regulatory mechanisms of TRP channel by diacylglycerol kinase in blood vessels.  
 研究代表者  
 中野 知之 (NAKANO TOMOYUKI)  
 兵庫医科大学・医学部・助教  
 研究者番号：00333948

研究成果の概要 (和文) : ラット大動脈構成細胞におけるジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) アイソザイムの発現を解析した。ラット大動脈平滑筋細胞 (RASMC) には  $\alpha$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  型 DGK の mRNA 発現が確認され、免疫細胞化学によって  $\alpha$  型は細胞全体に、 $\epsilon$  型は細胞骨格状に、 $\zeta$  型は核内にそれぞれ局在していることが明らかとなった。DGK $\epsilon$  はファロイジンとの二重染色によりストレスファイバーに発現し、セロトニンによる収縮刺激を与えると細胞質へと局在が変化するから、同アイソザイムが収縮制御に関わる可能性を示唆した。ラット大動脈血管内皮細胞 (RAEC) において、免疫細胞化学により DGK $\gamma$  がゴルジ体に発現すること、さらに IL-1 $\beta$  で刺激すると DGK $\gamma$  mRNA 発現が亢進することを明らかにした。本研究ではさらに IL-1 $\beta$  により発現誘導される cyclooxygenase-2 (COX-2) のラット大動脈および RASMC における発現解析を行った。COX-2 は正常では主に外膜に発現が誘導されるが、内膜除去によって中膜にも発現することを明らかにした。これらの結果は DGK アイソザイムの血管構成細胞における機能解析をする上で重要な知見であり、DGK による TRP チャネル分子制御機構を解明するうえで意義がある。

研究成果の概要 (英文) : In the present study, diacylglycerol kinase (DGK) expression in rat aortic cells was investigated. In rat aortic smooth muscle cells (RASMC),  $\alpha$ ,  $\epsilon$  and  $\zeta$  types of DGK isozymes mRNA were detected. Immunocytochemical analysis revealed that DGK $\alpha$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  were localized in nucleus and cytoplasm, cytoskeleton and nucleus, respectively. Phalloidin staining demonstrated that DGK $\epsilon$  was localized to actin stress fibers. When RASMC were treated with serotonin, a contractile agonist, subcellular localization of DGK $\epsilon$  was altered to be diffusely in cytoplasm. These facts indicate that DGK $\epsilon$  functions in the regulatory mechanism of contraction in RASMC. In rat aortic endothelial cells (RAEC), immunocytochemical analysis revealed that DGK $\gamma$  was localized in Golgi complex. Present study demonstrated that up-regulated expression of DGK $\gamma$  mRNA by IL-1 $\beta$ . We also investigated the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) which was induced by IL-1 $\beta$ . In endothelial denuded aortae, COX-2 expression was induced in tunica media, in addition to adventitia, whereas no expression was detected in tunica media of intact aortae. These facts can be significant to study functional role of DGK isozymes, for example regulation of TRP channels, in vascular cells.

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	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：ジアシルグリセロールキナーゼ、血管平滑筋細胞、血管内皮細胞

## 1. 研究開始当初の背景

ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) はジアシルグリセロール (DG) をリン酸化してフォスファチジン酸 (PA) に変換する酵素である。DG はプロテインキナーゼ C や transient receptor potential (TRP) チャンネルを活性化し、PA は mammalian target of rapamycin や hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  などの2次メッセンジャーを活性化することから、DGK は細胞内情報伝達において重要な役割を果たすと考えられている。ラット大動脈壁を構成する平滑筋細胞や内皮細胞においては前述の2次メッセンジャーがその細胞機能に特に重要な役割を果たしているが、DGK アイソザイムの発現や機能に関する詳細な報告は本研究以前にはなかった。よって DGK による DG 作動性 TRP チャンネルの制御機構という観点の研究は報告されていない。

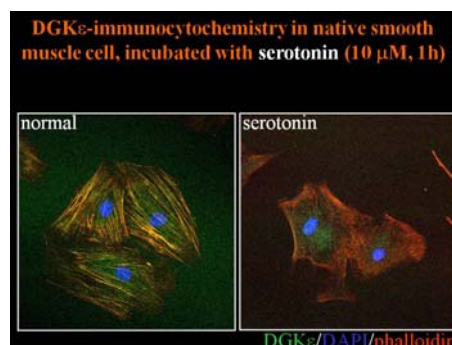
## 2. 研究の目的

ラット大動脈構成細胞（血管内皮細胞・平滑筋細胞）における DGK アイソザイムおよび関連分子の mRNA/タンパク発現、細胞内局在およびその機能的役割を明らかにして TRP チャンネル制御の分子機構解明への礎を作る。

## 3. 研究の方法

Wistar 系ラット大動脈および大動脈から単離した血管平滑筋細胞および内皮細胞を培養し、セロトニンや IL-1 $\beta$  などのアゴニストによって刺激する。その後、これらの組織・細胞における DGK アイソザイムおよび関連分子として cyclooxygenase-2 (COX-2) の発現・局在を以下の方法によって解析した。

- ① RT-PCR
- ② 免疫細胞化学
- ③ 免疫組織化学
- ④ イムノブロット
- ⑤ 細胞培養



## 4. 研究成果

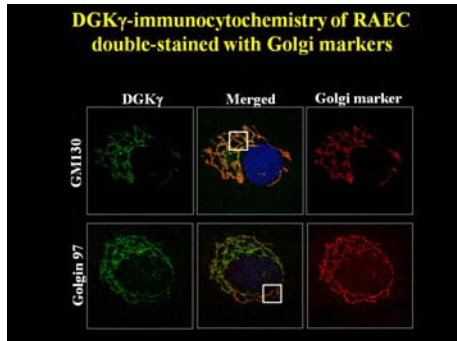
### (1) 血管平滑筋細胞における DGK 発現の解析

ラット大動脈平滑筋細胞 (RASMC) における DGK の発現解析を行った。RT-PCR 解析により、DGK $\alpha$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  の mRNA 発現が検出された。特異抗体による免疫細胞化学解析により、DGK $\alpha$  は核および細胞質にびまん性に、DGK $\epsilon$  は細胞長軸に沿った細胞骨格状に、DGK $\zeta$  は核内に顆粒状に免疫陽性反応が認められた。ファロイジンによる二重染色および Rho キナーゼインヒビターの投与実験から、DGK $\epsilon$  はアクチンストレスファイバーに発現することが明らかとなった。RASMC を収縮アゴニストであるセロトニンで刺激すると、細胞は収縮像を示し、DGK $\epsilon$  はストレスファイバーから細胞質にびまん性へと局在が変化した（上図参照）。さらにセロトニン刺激によって DGK $\epsilon$  のタンパクおよび mRNA 発現が亢進することをイムノブロット法ならび RT-PCR 法によって明らかにした。以上の結果から、RASMC において DGK $\epsilon$  はアクチンストレスファイバーに局在し、細胞の収縮制御機構に関与する可能性を示唆した。

### (2) 血管内皮細胞における DGK 発現の解析

ラット大動脈内皮細胞 (RAEC) における DGK の発現解析を行った。RT-PCR 解析により、DGK $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\zeta$  の mRNA 発現が主に検出され、免疫細胞化学解析により、アイソザイムはそれぞれ核および細胞質にびまん性、核

周部の細胞質に筒状・網状、核内に顆粒状に免疫陽性反応が検出された。DGK $\gamma$ の局在部位は GM130 や Golgin97 抗体などマーカー抗体との二重染色により、ゴルジ体であることが明らかとなった(次ページ図参照)。RAEC を IL-1 $\beta$ で刺激すると、DGK $\gamma$ の mRNA 発現



が亢進し、この亢進は p38MAP kinase インヒビター存在下では抑制されることを明らかにした。この結果から、IL-1 $\beta$ による DGK $\gamma$  mRNA 発現亢進は p38MAP kinase により調節されていると考えられる。

### (3) 血管平滑筋における COX-2 発現の解析

DGK $\gamma$ と同様に IL-1 $\beta$ によって発現が亢進する cyclooxygenase-2 (COX-2) の解析をラット大動脈組織および RASMIC を用いて行った。正常大動脈組織では IL-1 $\beta$ により COX-2 は外膜構成細胞(線維芽細胞と一部のマクロファージ)に発現が誘導される。我々は内皮細胞を機械的に除去すると外膜に加えて中膜平滑筋細胞にも COX-2 免疫陽性細胞が検出されることを見出した。この内皮細胞除去後に出現する COX-2 陽性平滑筋細胞は分裂細胞マーカーである抗 PCNA 抗体で描出されることから、細胞の形質が分裂型に変化している可能性を示唆した。さらに RASMIC を ERK インヒビター存在下で IL-1 $\beta$ 刺激を行うと COX-2 の発現が抑制されることから、RASMIC における COX-2 の発現は ERK 依存性であることを明らかにした。

本研究の結果、DGK は血管平滑筋細胞、内皮細胞ともに複数のアイソザイムが発現していることが明らかとなった。これらの細胞に発現している $\alpha$ および $\gamma$ 型は一次構造中にカルシウム結合部位である EF ハンドを有し、 $\epsilon$ 型の関与が考えられる細胞収縮にはカルシウムが重要な役割を果たす。よって、これらアイソザイムを中心とした DGK と TRP チ

ャネルの機能的結びつきを直接的に解析することが次の課題である。

## 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. T. Nakano and I. Wakabayashi (2010) Identification of cells expressing COX-2 in response to interleukin-1 $\beta$  in rat aortae. *J. Pharmacol. Sci.*, 113:84-88. 査読あり

2. I. Wakabayashi, T. Nakano and Y. Takahashi (2010) Enhancement of interleukin-1 $\beta$  -induced iNOS expression in cultured vascular smooth muscle cells of Goto-Kakizaki diabetes rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 629:1-6. 査読あり

3. T. Nakano, Y. Hozumi, K. Goto, and I. Wakabayashi, Localization of diacylglycerol kinase  $\epsilon$  on stress fibers in vascular smooth muscle cells. *Cell Tis. Res.*, 2009, 337:167-175. 査読あり

[学会発表] (計 6 件)

1. T. Nakano, K. Goto and I. Wakabayashi, IL-1 $\beta$ -induced expression of diacylglycerol kinase  $\gamma$  in Golgi complex in rat aortic endothelial cells, 49<sup>th</sup> annual meeting of American Society for Cell Biology, Dec. 5-9, 2009, San Diego CA, USA

2. 中野知之、若林一郎、後藤 薫、血管内皮細胞におけるジアシルグリセロールキナーゼの発現解析 第 114 回日本解剖学会総会、2009 年 3 月 29~31 日 岡山理科大学

3. 中野知之、後藤 薫、若林一郎、血管内皮細胞におけるジアシルグリセロールキ

ナーゼ発現の解析-iNOS発現制御の可能性  
第 38 回日本心脈管作動物質学会、  
2009 年 2 月 6 日 岡山大学

4. T. Nakano, K. Goto and I. Wakabayashi, Expression and subcellular localization of diacylglycerol kinase isozyme in rat aortic endothelial cells, 48<sup>th</sup> Annual meeting of American Society for Cell Biology, Dec. 13-17, 2008, San Francisco, CA, USA
5. 中野知之、若林一郎、後藤 薫、血管平滑筋細胞におけるジアシルグリセロールキナーゼの発現・機能解析 第 113 回日本解剖学会総会、2008 年 3 月 27～29 日、大分
6. 中野知之、後藤 薫、若林一郎、ジアシルグリセロールキナーゼによる血管平滑筋機能制御の可能性 第 37 回日本心脈管作動物質学会、2008 年 2 月 2 日、仙台

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中野 知之 (NAKANO TOMOYUKI)  
兵庫医科大学・助教  
研究者番号：00333948