

平成 22 年 5 月 21 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20890025

研究課題名(和文) 脂質代謝酵素群の虚血性脳神経細胞障害および細胞死における機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of phospholipid metabolizing enzymes during cell death after ischemia

研究代表者

岡田 雅司 (MASASHI OKADA)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：70512614

研究成果の概要(和文): 脳梗塞モデルラットにおいて脂質代謝酵素群の1つである DGK ζ が核から細胞質へ局在変化するが起ることを明らかにしてきたが、興奮性神経細胞死の過程においてこの局在変化と共にユビキチン化によるタンパク質の低下が引き起こされることを *in vivo* および *in vitro* において明らかにした。また、この発現量の低下は神経細胞においてサイクリンの発現を惹起しストレス応答性細胞死を引き起こすこと、DGK ζ のノックアウトマウスでは虚血性神経細胞死が増大することを明らかとした。

研究成果の概要(英文): In previous study, we demonstrated that diacylglycerol kinase (DGK) ζ which is distributed at nucleus in normal hippocampal neuron *in vivo*, is translocated to cytoplasm from nucleus by middle cerebral artery infarction in rat. But it is unclear that the mechanisms of ischemia induced translocation of DGK ζ and the physiological functions after localization in cytoplasm of DGK ζ . In this study, we demonstrated that DGK ζ nuclear export is regulated that calcium influx signaling after ischemia. Moreover, cytoplasmic DGK ζ is poly-ubiquitinated and degraded in hippocampal neuron *in vitro* and *in vivo*. This downregulation causes ER stress induced cell death following expression of cyclin D and cyclin E in neurons after ischemia using DGK ζ deficient mice and siRNA knockdown study *in vivo* and *in vitro*. These data suggest that DGK ζ is a downregulator of ischemic calcium signaling by inhibiting cyclin expression and cell cycle re-entry of neurons.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：虚血、低酸素、ユビキチン、DGK、リン脂質、タンパク質分解、細胞死

1. 研究開始当初の背景

(1) 虚血性脳神経細胞障害はグルタミン酸受容体を介するシグナル伝達系の関与が示唆されている。グルタミン酸受容体にリガンドであるグルタミン酸が結合することでカルシウムイオンの流入が起き、細胞内カルシウム濃度上昇が引き起こされ、種々の PLC などのリパーゼやプロテアーゼ、カインースやフォスファターズが活性化すること、またグルタミン酸受容体の幾つかは G 蛋白質を介してリン脂質代謝酵素の一つであるホスホリパーゼ C (PLC) を作動させることから、PLC により産生されるジアシルグリセロール (DG) とイノシトール 3 リン酸 (IP3) を起点とするシグナル伝達系が虚血障害時に何らかの役割を果たすと考えられている。

(2) DG の代謝酵素の一つであるジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) ζ は脳では主に神経細胞に発現し、核内に多く局在している。中大脳動脈閉塞術を用いた脳梗塞モデルを用いたラット海馬において、DGKζ は速やかに核から細胞質への局在変化が観察されたのち、その局在は細胞質に点状に認められることを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

本研究では、脳梗塞に起因する虚血性神経細胞死において、グルタミン酸受容体の下流で働くリン脂質代謝酵素群のシグナル伝達の分子機構を解明し、さらに発症後の神経細胞死を軽減する方策を検討する。

3. 研究の方法

(1) 脳梗塞モデル・てんかん発症モデル・DGKζ ノックアウトマウスを用いた免疫染色、ウエスタンブロットティングを中心としたタンパク質の解析、および個体の性状解析を行う。

(2) ラットおよびノックアウトマウス海馬スライス培養を用いた低酸素・低グルコース処理を用いた系での様々なリン脂質代謝酵素分子の局在解析を行う。

(3) 野生型および DGKζ ノックアウトマウス由来初代培養を用いた虚血ストレスおよび ER ストレスによる細胞死をウエスタンブ

ロットティングおよび免疫染色を用いた解析にて検討する。

(4) 培養細胞および初代細胞を用いた DGKζ の低酸素負荷における発現減少機構およびタンパク質分解機構を遺伝子導入系を活用したタンパク質レベルで行う。

4. 研究成果

(1) 中大脳動脈閉塞術を用いた脳梗塞モデルラットおよびカイニン酸腹腔内投与によるてんかん発症モデルマウスを用いた解析で、海馬において DGKζ は処理後、海馬ニューロンの細胞核から細胞質に移行するだけではなく、その後 DGKζ のタンパク質発現量が特異的に低下することを明らかにした。

(2) 初代海馬ニューロンにおいて虚血刺激に準ずるグルタミン酸負荷を行うと DGKζ は核から細胞質へ局在変化を起こすことを見出した。これにより *in vitro* でも同様の現象が存在することを見出した。生体を用いた虚血負荷において観察された DGKζ のタンパク質量低下は初代海馬ニューロンにグルタミン酸負荷および神経芽細胞腫の一つである SHSY-5Y 細胞やその他の培養細胞株 (HeLa 細胞、HEK293 細胞) を 5% 以下の酸素濃度である低酸素に曝露させた時も同様に観察された。このとき DGKζ の mRNA 量の減少は観察されなかったこと、低酸素負荷によるタンパク質の減少はプロテアソームインヒビターである MG132 処理で阻害されることから虚血負荷時の DGKζ 量の低下はタンパク質分解系、特にユビキチンを介したプロテアソーム分解系であることが示唆された。

(3) HEK293 細胞および SHSY-5Y 細胞に DGKζ とユビキチン (Ub) を共発現させたのち MG132 で細胞を処理し DGKζ を免疫沈降してウエスタンブロットティングを行うと、poly-ubiquitination が引き起こされていることが明らかとなった。また初代海馬ニューロンにおいても、MG132 処理により内在性 DGKζ が poly-ubiquitination されることを明らかにした。この神経細胞における DGKζ の poly-ubiquitination はグルタミン酸処理により増加することが明らかとなった。

さらに HEK293 細胞を用いて DGKζ の様々な変異体を発現させ、その poly-ubiquitination を比較すると、核内輸送シグナル配列を欠失した変異体が特に強く poly-ubiquitination さ

れることがわかった。また、核外輸送を阻害する抗生物質であるレプトマイシンBで野生型 DGK ζ を発現させた細胞を処理することで DGK ζ の核—細胞質間輸送を阻害し核内に留めると、この poly-ubiquitination が減少することが明らかとなった。

これらの事から DGK ζ は核—細胞質間をシャトリングし、核外に移行することで(細胞質で) poly-ubiquitination を受けることが培養細胞株を用いた発現系、初代海馬ニューロンを用いた系で明らかとなった。

(4) 虚血負荷およびカイニン酸を用いたてんかんモデルにより DGK ζ の発現が減少したマウス海馬ニューロンでは、Rb のリン酸化が増加し、それに伴いサイクリン D1、サイクリン E の発現量の増加が見られた。ノックアウトマウスを用いた実験において、野生型に比べ負荷無しでの定常状態からリン酸化 Rb およびサイクリン D1 の量が上昇しており、虚血負荷によりサイクリン E 量の上昇が野生型に比べ顕著であることから、虚血負荷後の神経細胞の細胞周期再回転が引き起こされていることが示唆された。

また、siRNA を用いた DGK ζ ノックダウンを初代海馬神経細胞に施し DGK ζ の発現量を低下させた後、グルタミン酸処理もしくはカルシウム依存性の ER ストレスを引き起こすタプシガルギンで処理すると、カスパーズの活性化およびその結果から引き起こされる種々の基質の限定分解、およびその結果としての細胞死がコントロールであるスクランブル DGK ζ ノックダウンに比べより顕著に引き起こされることが明らかとなった。また、野生型および DGK ζ ノックアウトマウス由来の mouse embryonic fibroblast (MEF)細胞を用いた実験でも、ER ストレス応答性細胞死は DGK ζ ノックアウト MEF 細胞がより顕著に誘引されることから、カルシウム濃度依存性細胞死において DGK ζ は重要な働きをしていることが示唆された。

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7件)

Okada M, Taguchi K, Maekawa S, Fukami K, Yagisawa H; Calcium fluxes cause nuclear shrinkage and the translocation of phospholipase C-delta1 into the nucleus. *Neurosci Lett.* 472, 188-93. 2010 (査読有り)

Uekama N, Aoki T, Maruoka T, Kurisu S, Hatakeyama A, Yamaguchi S, Okada M, Yagisawa H, Nishimura K, Tuzi S: Influence

of membrane curvature on the structure of the membrane-associated pleckstrin homology domain of phospholipase C-delta1. *Biochim Biophys Acta.* 12, 2575-83, 2009 (査読有り)

Okada M, Wang Y, Jang SW, Tang X, Neri LM, Ye K; Akt phosphorylation of merlin enhances its binding to phosphatidylinositols and inhibits the tumor-suppressive activities of Merlin. *Cancer Res.* 69, 4043-51. 2009 (査読有り)

Okada M and Ye K: Nuclear phosphoinositide signaling regulates messenger RNA export. *RNA Biol.* 6, 12-6. 2009 (査読有り)

Oh SM, Liu Z, Okada M, Jang SW, Liu X, Chan CB, Luo H, Ye K: Ebp1 sumoylation, regulated by TLS/FUS E3 ligase, is required for its anti-proliferative activity. *Oncogene.* 29, 1017-30. 2009 (査読有り)

Liu Z, Oh SM, Okada M, Liu X, Cheng D, Peng J, Brat DJ, Sun SY, Zhou W, Gu W, Ye K. Human BRE1 is an E3 ubiquitin ligase for Ebp1 tumor suppressor. *Mol Biol Cell.* 20, 757-68. 2009 (査読有り)

Yagisawa, H, and Okada, M: Ca²⁺-dependent nuclear accumulation of phospholipase C-d1. *Neurosci. Res.* 61: S39 2008 (査読無し)

[学会発表](計2件)

岡田 雅司、後藤 薫; Nuclear assembly protein は DGK ζ の細胞内局在を制御する、日本解剖学会全国学術集会、2010/03/28-30 (盛岡)

岡田 雅司、後藤 薫; DGK ζ 結合タンパクの探索とその性状解析、日本解剖学会東北北海道支部地方会、2009/09/26-27 (仙台)

[その他]
ホームページ等

<http://www.id.yamagata-u.ac.jp/AnatomyII/anall.htm>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

岡田 雅司 (MASASHI OKADA)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：70512614