

令和 5 年 6 月 10 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07238

研究課題名(和文) 脂質性二次伝達物質代謝・産生酵素の組織分布と細胞内局在に関する形態学的機能解析

研究課題名(英文) Morphological and functional analyses of the tissue distribution and subcellular localization of the metabolizing/producing enzymes for lipid second messengers.

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：脂質性二次伝達物質であるジアシルグリセロール(DG)を代謝するDGキナーゼ(DGK)およびホスファチジン酸(PA)を産生するホスホリパーゼD(PLD)について、新規に確立した特異抗体を用いてタンパクレベルで組織分布と細胞内局在を検討した。その結果、DGKアイソザイムのうちDGKとDGKが、PLDアイソザイムのうちPLD1とPLD2が中枢神経系に豊富に存在することが明らかとなった。また各酵素はタンパクレベルで細胞内小器官で異なる局在を示していた。この結果は、脂質性二次伝達物質とその代謝・産生酵素が中枢神経系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であるジアシルグリセロールの代謝酵素であるジアシルグリセロールキナーゼと、同じく脂質性二次伝達物質であるホスファチジン酸の産生酵素であるホスホリパーゼDが中枢神経で豊富に発現することが明らかとなった。DGKは小脳において協調運動に関与し、PLD1とPLD2は小胞輸送に関与してがんやアルツハイマー病との関連が報告されている。また本研究により各酵素のタンパクレベルでの細胞内局在が明らかとなり、各酵素の細胞内小器官における役割が見出された。当研究成果は中枢神経疾患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)：We investigated the tissue distribution and subcellular localization about DG kinase (DGK), which metabolizes diacylglycerol (DG) and phospholipase D (PLD), which produces phosphatidic acid (PA) at the protein level using newly established specific antibodies. As a result, it was revealed that DGK, DGK, PLD1, and PLD2 are abundant in the central nervous system. In addition, each enzyme showed different localization in intracellular organelles at the protein level. This result suggests that lipid secondary messengers and their metabolizing/producing enzymes may have important functions in the central nervous system.

研究分野：組織学

キーワード：ホスホリパーゼD ジアシルグリセロールキナーゼ 特異抗体 免疫組織化学染色 免疫細胞化学染色
中枢神経 スプライスバリエント 細胞膜

子と関連して機能しているかを検討する。

- (5) 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 ・DGK ι および PLD1・PLD2 抗体による形態学的解析から、細胞内シグナル伝達におけるジアシルグリセロールの代謝と産生メカニズムの解明が進む。
 - ②PLD1 と PLD2 のタンパクレベルでの発現および局在解析は、中枢神経系とその他の臓器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。
 - ③PLD1 と PLD2 はがんやアルツハイマー病との関連が報告されている(Nelson et al. J Lipid Res. 2015;56:2229-2237)。PLD1 と PLD2 の各臓器や細胞における詳細な発現局在解析が、疾患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。

3. 研究の方法

(概要)

本研究では DG の代謝を行う DGK および DG・PA の産生を担う PLD の組織分布と細胞内局在を、新規に確立した特異抗体を用いて免疫組織化学染色法により明らかにした。

- (1) DGK アイソザイム (DGK γ ・DGK ι) および PLD アイソザイム (PLD1・PLD2) の中枢神経系における組織発現と細胞内局在解析【令和2年度～3年度】(八月朔日, 吉川)

- ①蛍光多重染色法による解析 (共焦点レーザー顕微鏡): 八月朔日, 吉川

DGK アイソザイムはラット脳について、PLD アイソザイムはマウス脳の各領域について蛍光多重染色を行う。各種マーカー、比較対象分子は以下の通りとする。

シナプス前終末: VGlut1, VGlut2, VGAT パーグマングリア: GLAST

シナプス後終末: PSD-95, Homer1 細胞内小器官: IP $_3$ R (小胞体)

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 receptor, dopamine D2 receptor

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

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: 小脳-DGK γ , DGK ι , DGK ϵ 大脳皮質・海馬-DGK γ ・DGK ι , 線条体-DGK ι ・DGK β

- ②免疫電子顕微鏡法による解析: 八月朔日

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 γ ・DGK ι および PLD1・PLD2 の神経細胞内微細局在の解析を行う。

- (2) PLD1・PLD2 の脳内発現および局在変化を生じる分子や刺激の探索【令和3年度】

カイニン酸注入や虚血刺激による PLD2 のマウス脳内発現量や神経細胞内局在の変化を特異抗体で確認する。さらに、PLD1 と PLD2 の発現や局在変化を生じる新規分子や刺激の探索を行う。(八月朔日, 吉川)

- (3) PLD1・PLD2 の末梢臓器における組織発現と細胞内局在解析【令和3年度～4年度】

ウェスタンブロット法によりマウス各臓器における PLD1・PLD2 のタンパクレベルでの発現を解析する。それを元に PLD1 と PLD2 抗体で免疫組織化学染色を行い、各種顕微鏡により各臓器における発現細胞や細胞内局在を解析する。(八月朔日, 吉川)

- (4) DGK および PLD のシグナル伝達複合体の解明【令和4年度】

脳タンパクを抽出し、DGK γ ・DGK ι および PLD1・PLD2 の特異抗体で免疫沈降法を行う。得られた免疫複合体にイノシトールリン脂質代謝関連分子が含まれるか、ウェスタンブロット法で解析する。(八月朔日)

4. 研究成果

- (1) 中枢神経系における DGK γ の発現局在解析

- ① 生化学的局在解析

ラット脳タンパク質の遠心分画法で生化学的に DGK γ の細胞膜/細胞内膜系小器官への発現が明らかとなった(図3)。

- ② 形態解析

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4)。

ラット脳の大脳皮質と海馬において、DGK γ は MAP2 陽性および陰性ニューロンの両者に発現していた。もっとも強く DGK γ が発現する小脳について、共焦点レーザー顕微鏡を用いた多重蛍光染色法と免疫電子顕微鏡法にて組織分布および発現細胞同定、細胞内における局在を観察した。その結果、DGK γ 免疫反応は小脳プルキンエ細胞および分子層に分布する介在ニューロンに検出された。またプルキンエ細胞軸索に DGK γ の発現を認めなかった(図5)。

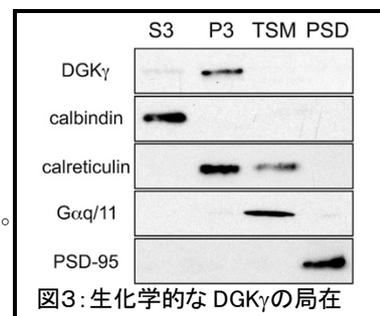
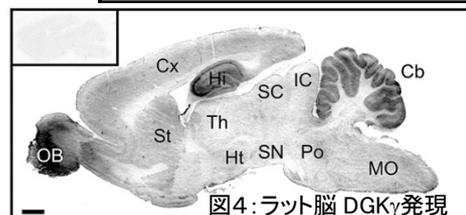


図3: 生化学的な DGK γ の局在



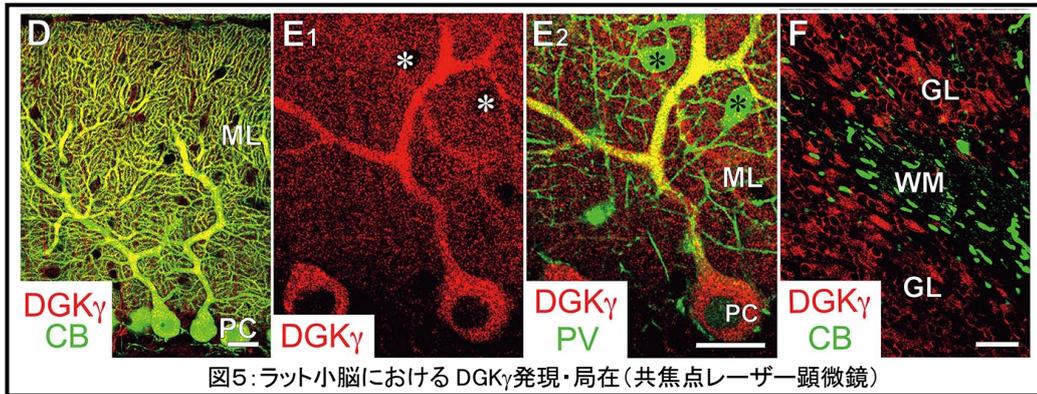


図5: ラット小脳における DGK γ 発現・局在 (共焦点レーザー顕微鏡)

免疫電子顕微鏡法により、DGK γ がプルキンエ細胞の滑面小胞体に局在することが明らかとなった (図6)。

形態学的解析から、DGK γ が生体脳において興味深い局在を示すこと、また他の DGK アイソザイムと異なる発現パターンを示すことが示された。

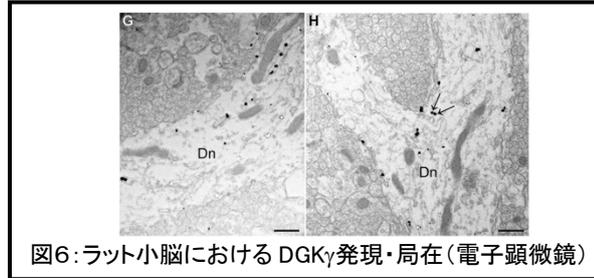


図6: ラット小脳における DGK γ 発現・局在 (電子顕微鏡)

(2) 中枢神経系における DGK ι の発現局在解析

① 生化学的局在解析

ラット脳タンパク質の遠心分画法で生化学的に DGK ι の細胞膜/細胞内膜系小器官への発現が明らかとなった。

② 形態解析

DGK ι の免疫反応は DGK γ -mRNA 発現パターンと類似して認められた (図7)。高倍率像では DGK ι 免疫反応はニューロンの細胞質にびまん性に検出された。



図7: ラット脳 DGK ι 発現

(3) PLD1 と PLD2 の組織分布および細胞内発現局在解析

① 生化学的局在解析

RT-PCR 法にてマウス由来の NIH3T3 細胞および 3T3-L1 細胞に PLD1 と PLD2 の発現が確認された。新規に確立した PLD1 と PLD2 抗体を用い、siRNA 法にて抗体の特異性を確認した (図8)。PLD1 と PLD2 抗体はコントロールで各推定分子量付近にバンドを検出した。siRNA 導入細胞では、各バンドの減弱を示し、確立した両抗体の特異性が確認された。

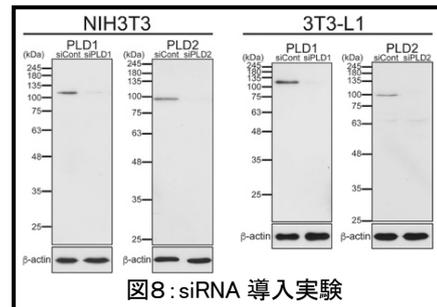


図8: siRNA 導入実験

RT-PCR 法により、マウス由来培養細胞である NIH3T3 細胞と 3T3-L1 細胞およびマウス臓器における PLD1 と PLD2 スプライズバリエントの発現を解析した (図9)。その結果、マウス由来培養細胞では PLD1 は PLD1b が優位に発現し、PLD2 は PLD2b の発現を認めたものの、PLD2a の発現は検出限界以下であった。一方、マウス各臓器における発現はほぼマウス由来培養細胞と同様であったが、心臓では PLD1a が優位に発現し、培養細胞と異なる結果であった。心臓における PLD1a の特異的な機能が推察された。

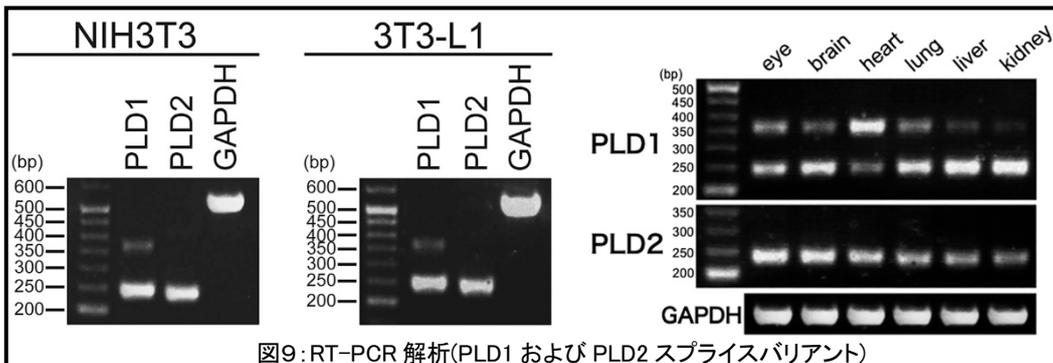


図9: RT-PCR 解析 (PLD1 および PLD2 スプライズバリエント)

生体内におけるタンパク質発現を、PLD1 と PLD2 が豊富に発現すると考えられたマウス脳および肺でウェスタンブロット解析を用いて検討した (図10)。PLD1、PLD2 ともにマウス脳と肺に豊富な発現が検出された。

② 形態解析

GFP 融合タンパク質発現実験を、各 PLD アイソザイムおよびスプライスバリエントについて NIH3T3 細胞を用いて行った(図 1 1)。各 GFP 融合 PLD タンパク質は細胞内で顆粒状・点状に検出され、一部は細胞膜への局在が認められたが、詳細な細胞内局在は不明であった。

次に、内在性タンパク質の細胞内局在を検討するため、新規に確立した PLD1 および PLD2 特異抗体を用い、mRNA 発現が確認された NIH3T3 細胞と 3T3-L1 細胞で免疫細胞化学染色を行なった(図 1 2)。その結果、PLD1 免疫反応は細胞膜に点状に認められた。一方、PLD2 は点状に細胞内に検出された。PLD2 の免疫反応は細胞内小器官における PLD2 の局在を推察させた。

マウス海馬における PLD1 および PLD2 の発現局在解析を行なった(図 1 3)。PLD1 および PLD2 の CA3 領域錐体細胞における発現が検出され、樹状突起において PLD1 はびまん性あるいは点状に、PLD2 はやや粗大な顆粒状に検出された(図 1 3 ▶)。

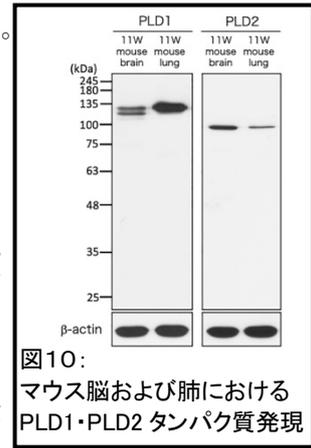


図10:
マウス脳および肺における
PLD1・PLD2 タンパク質発現

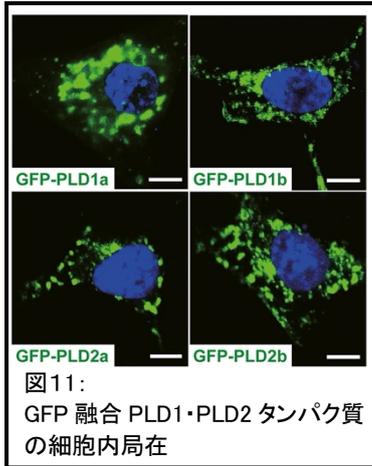


図11:
GFP 融合 PLD1・PLD2 タンパク質
の細胞内局在

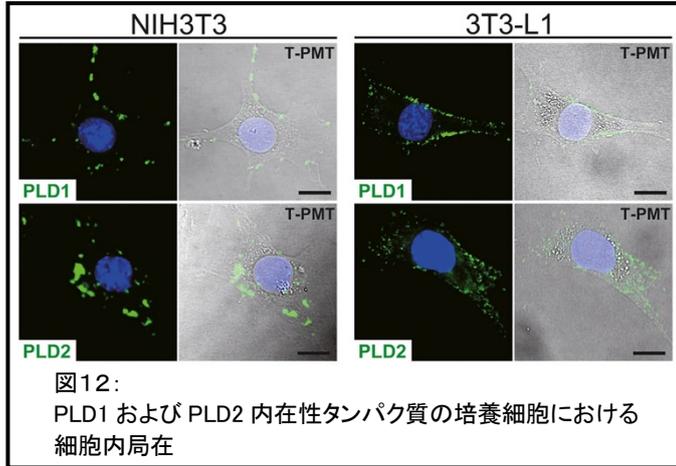


図12:
PLD1 および PLD2 内在性タンパク質の培養細胞における
細胞内局在

本研究における DGK γ ・DGK ι および PLD1・PLD2 抗体による形態学的解析は、細胞内シグナル伝達における DG および PA の産生と代謝バランス制御の解明に寄与すると考えられる。また、PLD1 と PLD2 のタンパクレベルでの発現および局在解析により、PLD1 が細胞膜に局在することが明らかとなった。PLD は癌細胞の増殖、浸潤、転移、また神経系においては神経伝達物質分泌に関与すると報告されており、本研究の結果はそのメカニズムにおける PLD の重要性を解明する一助になると期待される。

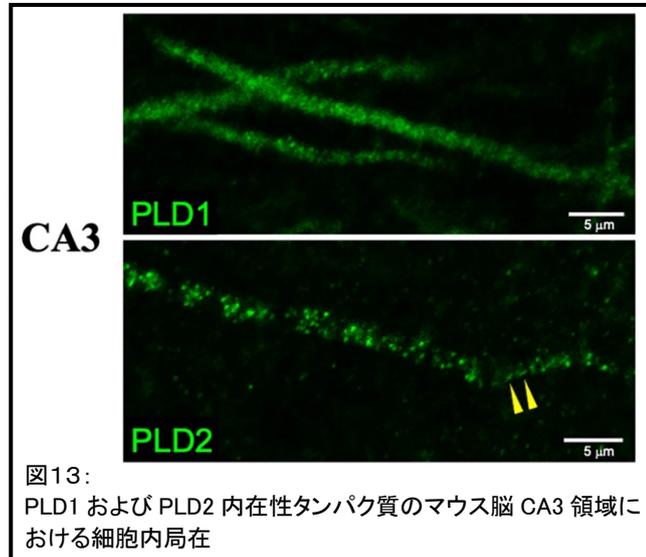


図13:
PLD1 および PLD2 内在性タンパク質のマウス脳 CA3 領域に
おける細胞内局在

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 1件）

1. 著者名 Hozumi Yasukazu, Yamazaki Masakazu, Nakano Tomoyuki	4. 巻 625
2. 論文標題 Immunocytochemistry of phospholipase D1 and D2 in cultured cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 161 ~ 166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.07.118	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 HOZUMI Yasukazu, NAKANO Tomoyuki, GOTO Kaoru	4. 巻 42
2. 論文標題 Cellular expression and subcellular localization of diacylglycerol kinase in rat brain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedical Research	6. 最初と最後の頁 33 ~ 42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2220/biomedres.42.33	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tanaka Toshiaki, Nakano Tomoyuki, Hozumi Yasukazu, Martelli Alberto M., Goto Kaoru	4. 巻 1868
2. 論文標題 Regulation of p53 and NF- κ B transactivation activities by DGK in catalytic activity-dependent and -independent manners	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research	6. 最初と最後の頁 118953 ~ 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 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 Akimoto Ryo, Tanaka Toshiaki, Nakano Tomoyuki, Hozumi Yasukazu, Kawamae Kaneyuki, Goto Kaoru	4. 巻 71
2. 論文標題 DGK depletion attenuates HIF-1 α induction and SIRT1 expression, but enhances TAK1-mediated AMPK phosphorylation under hypoxia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cellular Signalling	6. 最初と最後の頁 109618 ~ 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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 八月朔日 泰和
2. 発表標題 ホスホリパーゼD1およびD2の細胞内局在解析
3. 学会等名 第128回日本解剖学会 総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 八月朔日 泰和
2. 発表標題 Cellular expression and subcellular localization of diacylglycerol kinase in rat brain
3. 学会等名 第126回日本解剖学会 総会・全国学術集会・第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021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	吉川 究 (Yoshikawa Kiwamu) (90400481)	秋田大学・医学系研究科・助教 (11401)	

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
---------	---------