

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 23 日現在

機関番号：14501
研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2009～2011
課題番号：21570139
研究課題名（和文） PKC との機能協関に着目した DG キナーゼの機能解析とその応用
研究課題名（英文） Analysis of DG kinase functions related to PKC and its application for future drug.
研究代表者
白井 康仁（SHIRAI YASUHITO）
神戸大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：60263399

研究成果の概要（和文）：

DGK \cdot の神経系における機能について調べたところ、DGK \cdot はスパインといった神経細胞特有の形態を維持することにより神経ネットワーク形成、しいては記憶や感情などの脳高次機能において重要な働きをしていると考えられた。ついで、DGK \cdot の腎臓における機能をノックアウト (KO) マウスを用いて調べたところ、糖尿病性腎症が早期化及び重篤化することが明らかになった。また、チロシンリン酸化と局在調節の関係も調べた結果、c-SrcはDGK \cdot の22番目及び334番目のチロシンをリン酸化することにより細胞質膜移行を誘導し、一方、c-Ablによる218番目のチロシンをリン酸化は核外移行に必須であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

To elucidate function of DGK β in neurons, we developed DGK β KO mice using the Sleeping Beauty transposon system, and found that DGK β regulates spine formation by regulation of lipids, contributing to the maintenance of neural networks in synaptic transmission of cognitive processes including memory and emotion. Using DGK α KO mice, we investigated physiological role of DGK α in Vitamin E-induced improvement of diabetic renal dysfunction, and found that renal dysfunction of DGK α KO mice was sever and occurred earlier than WT. Finally, we discovered c-Src phosphorylated Tyr22 and Tyr334, while c-Abl phosphorylated 218Tyr.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学

キーワード：細胞情報伝達機構、脂質

1. 研究開始当初の背景

DGKは、脂質シグナルであるDGをリン酸化しPAを産生する脂質キナーゼであり、これまでに10種のサブタイプが報告されている (Topman MK., J Cell Biochem., 2006)。換言すれば、DGKは間接的にPKCの活性を抑制できる酵素である。これまでに、我々は両酵素の機能協関を明らかにしてきた。例えば、DGK γ がPKC γ と直接相互作用し、お互いの活性及び細胞内局在を制御すること、PKC ϵ は胎生の早い時期から発現しており、その過剰発現は1本の長い神経突起伸長を誘導するが、DGK β は胎生期には認められず、神経ネットワークが形成される生後1~2週間後に発現が顕著に増大し、多数の分岐をもつ複数の神経突起を誘導すること、PKCの活性亢進は糖尿病腎症の増悪化に関与するが、ビタミンEによるDGK α の活性化は糖尿病性腎症の改善に寄与することなどを明らかにしている。

しかし、PKC ϵ とDGK β がどのようにして、異なった神経突起伸長を誘導するのか？DGK β の神経系における機能は何か？そしてDGK α はどこで、どのようなメカニズムで活性化され糖尿病血管合併症を予防しているのか？などは依然不明のままである。

一方DGKは、最近にわかに脚光を浴びつつあり、T細胞の免疫寛容の維持や、糖尿病合併症や細胞周期制御、心肥大に関する重要性などがあいついで報告されている。従って、今後DGKを作用点とする創薬開発が重要と思われるが、現在DGKを作用点とする創薬やサブタイプ特異的薬剤はほとんどない。

2. 研究の目的

本研究では神経ネットワーク形成及び糖尿病性腎症におけるPKCとDGKの機能協関解析を行い、神経系及び腎系球体機能維持におけるDGKの新規機能を明らかにする。その過程で作製される遺伝子改変動物は疾患モデルマウスとしても期待される。また、ライブイメージングを駆使してDGKを作用点とする新しい薬剤の開発を目指した。

3. 研究の方法

3-1. 海馬初代培養細胞の形態観察

胎生18-19日目のDGK β KO マウスから住友ベークライド社の神経細胞培養システムを用いて海馬初代培養細胞を調整した。尚、コントロールはlitter mateの野生型マウスを用いた。SUMILON 神経細胞用培養液で適時培養したのち、固定し、MAP-2抗体を用いて神経細胞を染色した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて、蛍光及び形態を観察した。突起数、分枝数、スパイン数などは神経細胞解析ソフトNeuroLucida Nuerolucida Explorerを用いて解析した。

3-2. 行動試験

Morris water maze testによる長期空間記憶と、elevated cross maze testによる感情障害試験は以下の共同研究者に依頼した。

3-3. 糖尿病モデルマウスの作製と尿中アルブミン及びクレアチニンの測定

KOマウスと、同条件で飼育した野生型マウス(control)に20 mMクエン酸緩衝液(pH 4.5)に溶解したSTZ (2 mg/ml)を150 mg/kgを1回、もしくは50 mg/kgになるよう5日間腹腔内に投与した。最終STZ投与48時間後に、グルテストセンサー(三和化学)を用いて血糖値を測定し、血糖値が200 mg/dl以上であったものを糖尿病(DM)と判定した。糖尿病になったことを確認してから2、4、6週間

目に、マウスの尿を採取した。即ち、各グループ毎にマウス用代謝ケージ群飼育用(テクニプラスト)に、8時から20時まで(12時間)マウスをセットした。その際、飼料はケージにセットせず、自動給水により自由に給水させた。その後尿を回収し、メスシリンダーを用いて尿量を測定し、15mlチューブに移し、-30°Cに保存した。絶食状態のマウスの血糖値は、採尿後すぐにグルテストセンサーを用いて測定し、記録した。また、尾より血液を1.5mlチューブに採取し、-30°Cに保存した。尿中クレアチニン及び尿中アルブミンの測定は株式会社エスアールエルに外注した。

3-4. GFP-DGK α 及び各変異体のNIH-3T3細胞における核内移行及び核外移行の観察

GFP融合DGK α 及び各変異体をトランスフェクションしたNIH3T3細胞は24時間後、無血清培地に交換して24時間後、血清を再添加して3時間後4%ホルマリン固定液にて固定した。GFPの蛍光は、共焦点レーザー顕微鏡を用い、488-nm argonレーザーで励起させ、515-nm-long pass barrier filterを使い観察した。それぞれ100細胞ずつ観察し、細胞質のみに発現しているもの、核内にも発現しているが細胞質よりは蛍光強度が低いもの、核内も細胞質と同様に発現しているもの、核内の蛍光強度が強いものに分けてカウントした。

4. 研究成果

4-1. DGK β KO マウスの行動異常と神経細胞の形態異常

Sleeping beauty 法によって作製されたDGK β KO マウス(6)の海馬初代培養細胞を調整し、その形態を野生型のものと比較した。その結果、DGK β KO マウスから調整した海馬初代培養細胞では、1突起あたりの枝分かれの数及びスパイン密度が有意に減少してい

た(図1A)。この形態異常は、DGK β -GFPを過剰発現させることで、レスキューされた(図1B)。一方、このDGK β KO マウスをY-maze及びwater maze test に供したところ、記憶障害を示した(図2A)。そこで、海馬のLTPを調べたところ、実際にLTPが低下しており、in vivoでもスパイン密度の減少が認められた(図1C)。

さらに、elevated cross maze test を行ったところ、このDGK β KO マウスは躁状態であることが判明した(図2B)。興味深いことに、この感情障害は10日間のリチウム処理によって改善した(図2C)。以上のことから、DGK β は神経突起やスパインといった神経特異的な形態変化を介して、記憶や感情といった脳高次機能に重要であることが明らかになった。

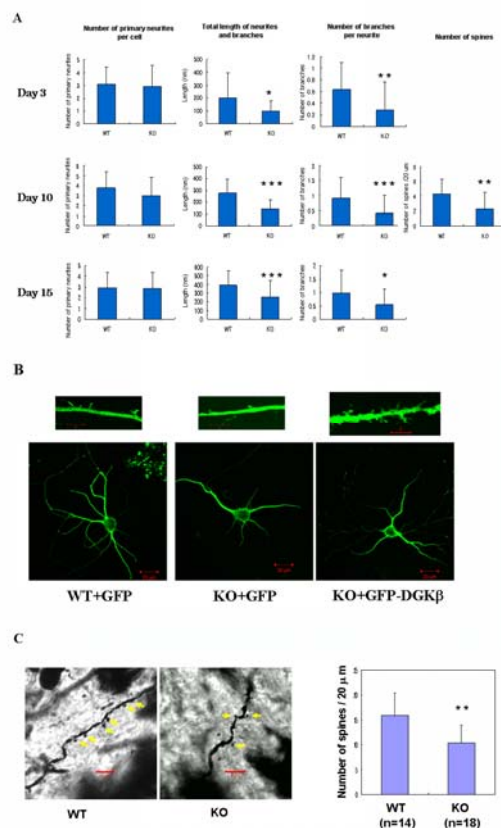


図1. DGK β KOマウスにみられる神経細胞の形態異常

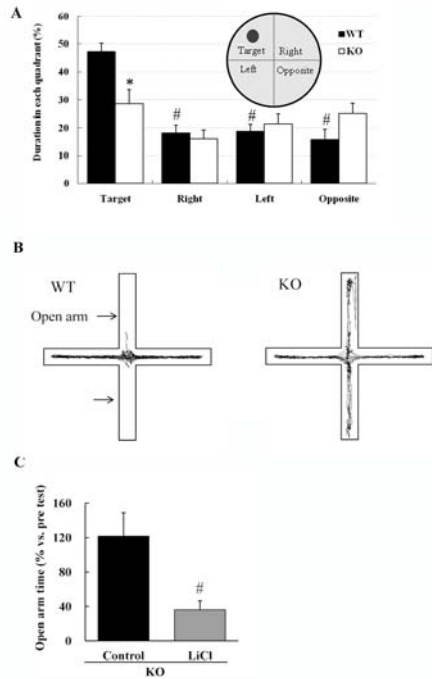


図2. DGK β KOマウスの行動異常

4-2. DGK α KOマウスにおける糖尿病性腎症の早期化と重篤化

DGK α の腎臓における機能を解析するため DGK α KOマウスを入手し、ホモ化した。この、DGK α KOマウスにSTZを投与し糖尿病を誘発させ、腎症の指標である尿量、クレアチニンクリアランスなどについて野生型と比較した。その結果、DGK α KOマウスは野生型より早く腎症が重篤化することが示唆された。また、腎糸球体において、DGK α はポドサイトに多く発現していることが示された。ポドサイトはスリット膜を形成し腎濾過機能において重要な働きをしていることから、DGK α はポドサイトの機能を調節することによって腎機能において重要な働きをしていることが示唆された。

4-3. DGK α のチロシンリン酸化による局在調節機構

まず、c-Abl、c-SrcによるDGK α のリン酸化部位を調べるために長さの異なるDGK α の制御領域(RD)を精製し、チロシンリン酸化部位の同定を行った。その結果、少なくと

も218、240番目のチロシンがリン酸化を受けている可能性が示された。そこで、この218番目と240番目のチロシンをフェニルアラニンに置換した変異体を作製し、*in vitro*リン酸化アッセイを行ったところ218番目のチロシンがv-Ablによってリン酸化を受けていることが明らかになった。一方、c-Srcでは少なくとも22番目あるいは50番目のチロシンがリン酸化を受けている可能性が示され、同様にフェニルアラニンに置換した変異体を用いて*in vitro*リン酸化アッセイを行ったところ22番目のチロシンが、c-Srcによってリン酸化を受けていると結論づけられた。

そこで、全長のDGK α においてそれぞれのチロシンをフェニルアラニンに置換した変異体(Y218F、Y22F)を作製し、DGK α の局在変化にこれらのチロシンが関与しているかどうかを調べた。その結果Y218Fは核外移行が阻害されたが、細胞質膜移行に変化はなかった。一方、Y22Fは細胞質膜移行が有意に阻害されたが、核-細胞質間シャトリングは正常であった。さらに、218番目と22番目のチロシン特異的リン酸化抗体を作製し、どこでこのリン酸化が起こっているかを検出したところ、リン酸化Y218は細胞質で認められ、リン酸化Y22は細胞質膜のみで認められた。

以上のことからDGK α は血清刺激により間接的に活性化されたc-Ablによって218番目のチロシンがリン酸化され、核外へと移行するのに対し、VtEによって活性化されたc-Srcによって22番目のチロシンがリン酸化され、膜へと移行する事が明らかとなった。

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5件) (総計12件)

1) Shirai, Y., Ikeda, M., Saito, N.,

- (2012) Regulation of diacylglycerol kinase by phosphorylation. *Adv. biological. Reg.* 52, 239-247.
- 2) Matsubara, M., Ikeda, M., Kiso, Y., Sakuma, M., Sakane, F., Merida, I., Saito, N. and Shirai, Y. (2012) c-Abl tyrosine kinase regulates serum-induced nuclear export of diacylglycerol kinase • by phosphorylation at Tyr218. *J. Biol. Chem.* 287:5507-5517.
- 3) Shirai, Y., Morioka, S., Sakuma, M., Yoshino, K., Otsuji, C., Sakai, N., Kashiwagi, K., Chida, K., Shirawaka, R., Horiuchi, H., Nishigori, C., Ueyama, T. and Saito, N. (2011) Direct binding of RalA to PKC • and its crucial role in morphological change during keratinocytes differentiation. *Mol. Biol. Cell* 22: 1340-1352.
- 4) Kakefuda K., Oyagi A., Ishisaka, M., Tsumura, K., Shimazawa M., Yokota, K., Shirai Y., Horie K., Saito N., Takeda J. and Hara H. (2010) Diacylglycerol kinase • • knockout mice exhibit lithium-sensitive behavioral abnormalities. *PLoS ONE* 5. e13447.
- 5) Shirai Y., Kouzuki T., Kakefuda K., Moriguchi S., Oyagi A., Horie K., Morita S., Shimazawa M., Fukunaga K., Takeda J., Saito N. and Hara H. (2010) Essential role of neuron-enriched diacylglycerol kinase (DGK), DGK • in neurite spine formation, contributing to cognitive function. *PLoS ONE* 5. e11602-
- 6) Takaoka K., Shirai Y. and Saito N. Inflammatory cytokine TNF- α enhances NGF production in human keratinocytes, HaCaT cells. (2009) *J. Pharmacol. Sci.* 111. 381-391.
- 7) Mori D., Yamada M., Mimori-Kiyosue Y., Shirai Y., Suzuki A., Ohno S., Saya H., Wynshaw-Boris A. and Hirotsune H. (2009) An essential role of the aPKC-aurora A-NDEL1 pathway on neurite elongation by modulation of microtubule dynamics. *Nature Cell Biol.* 11, 1057-1068.
- [学会発表] (計 13 件) (総計 26 件)
- 1) Y. Kiso, Y. Shirai, M. Sakuma, M. Ikeda, N. Saito. Physiological function of nuclear DGK α under serum depleted conditions. 第 85 回 日本薬理学会年会 (京都) 2012. 3. 14.
- 2) °白井康仁 (招待講演) Function of PKC and DGK in neurons. 2011 Taiwan-Japan Joint Symposium on Cell Signaling and Gene Regulation (台湾・台南) 2011. 11. 19.
- 3) °白井 康仁 (招待講演) Regulation of diacylglycerolkinase by phosphorylation. Fifty-Second International Symposium on “Regulation of Enzyme Activity and Synthesis in Normal and Neoplastic Tissues” (イタリア・ローニャ) 2011. 9. 26
- 4) °白井 康仁, 池田 もも, 佐久間 恵, 木曾 裕子, 齋藤 尚亮, 異なるチロシンリン酸化によるジアシルグリセロールキナーゼ α の局在調節機構, 第 119 回 薬理学会近畿支部大会 (名古屋) 2011. 7. 8.
- 5) °白井 康仁, 池田 もも, 木曾 裕子, 佐久間 恵, 齋藤 尚亮, ジアシルグリセロールキナーゼ • の核移行と細胞周期制御に関する研究 2 -c-Abl によるチ

- ロシンリン酸化サイトの同定一、第 53 回日本脂質生化学会 (東京) 2011. 5. 12
- 6) Y. Shirai, T Kouzuki, K Kakefuda, A Ohyagi, K Horie, S Moriguchi, S Morita, M Shimazawa, K Fukunaga, J Takeda, N Saito, H Hara. Impairment of cognitive function and lithium-sensitive behavior of knockout mice of neuron-enriched subtype of DG kinase, DGK γ . First annual meeting of International Society of Radiation Neurobiology. Maebashi, Japan, January 29, 2011.
- 7) Y. Shirai. Correlation between abnormal behavior and lipids contents of DGK γ KO mice. The 5th international mini-symposium on diacylglycerol kinase (DGK). 2010. 12. 11
- 8) Y. Shirai and N. Saito: Nuclear diacylglycerol signaling regulated by nuclear-cytoplasmic shuttling of diacylglycerol kinase γ and its correlation to cell cycle control. BMB2010 (as a symposist) (兼 第 83 回日本生化学会大会)、2010. 12. 8
- 9) Y. Shirai, T. Kouzuki, K. Kakefuda, S. Moriguchi, A. Oyagi, K. Horie, S. Morita, M. Shimazawa, K. Fukunaga, J. Takeda, N. Saito and H. Hara. Membrane lipids control by neuron-enriched diacylglycerol kinase γ is important for spine formation and cognitive function. Keystone symposia "Bioactive lipids: biochemistry and diseases. 2010. 6. 9
- 10) Y. Shirai, (Invited) Essential role of diacylglycerol kinase beta (DGK β in neurite spine formation,

cognitive function and memory. Japan-Taiwan Joint Symposium on Cell Signaling and Gene Regulation. 2009. 11. 12

- 11) Y. Shirai, Essential role of diacylglycerol kinase beta (DGK β) in neurite spine formation, cognitive function and memory. Neuroscience 2009, 200. 10. 22.

- 12) 白井 康仁、Important role of diacylglycerol kinase γ in spine formation and memory. 日本神経科学大会、2009年 9月 18日

- 13) 白井 康仁、ジアシルグリセロールキナーゼ γ ノックアウトマウスはスパイン形成異常と記憶障害を示すスパイン形成における脂質シグナリングの重要性一、脂質生化学会、2009年 7月 30日
[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1件)

名称: DGK γ をターゲットとする抗アレルギー剤のスクリーニング方法

発明者: 白井康仁、斎藤尚亮

権利者: 神戸大学

種類: 特許

番号: 2011-1415

出願年月日: 2011. 6. 27

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www2.kobe-u.ac.jp/~shirai/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白井 康仁 (SHIRAI YASUHITO)

神戸大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号: 60263399