

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24日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570145

研究課題名（和文） 2型ジアシルグリセロールキナーゼの生理機能におけるRACK1の役割の検討

研究課題名（英文） The study of roles of RACK1 in physiological functions of diacylglycerol kinase (type II)

研究代表者

今井 伸一 (IMAI SHIN-ICHI)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：20213209

研究成果の概要(和文): HeLa 細胞においてジアシルグリセロールキナーゼ η (DGK η)を siRNA によりノックダウンしたところ、細胞増殖が阻害された。さらに、DGK η は上皮増殖因子(EGF)刺激の際の Ras/B-Raf/C-Raf/MEK/ERK シグナル経路を活性化した。EGF 刺激した HeLa 細胞では DGK η は B-Raf や C-Raf の細胞質から膜への移行及び B-Raf と C-Raf のヘテロ二量体の形成を調節していた。また、DGK η は EGF 依存的な C-Raf キナーゼ活性のみを活性化した。これらの結果は、DGK η が ERK シグナル経路の新規の調節因子であることを示唆している。また、DGK α が AKI メラノーマ細胞において、プロテインキナーゼ C ζ (PKC ζ)による nuclear factor- κ B (NF- κ B)の p65 サブユニットのリン酸化(Ser311)による活性化を介して、腫瘍壊死因子 α (TNF α)によるアポトーシスを抑制することが示唆された。

研究成果の概要(英文): Knockdown of diacylglycerol kinase η (DGK η) using siRNA inhibited cell proliferation of the HeLa cells. Moreover, DGK η activated the Ras/B-Raf/C-Raf/MEK/ERK signaling pathway induced by epidermal growth factor (EGF). DGK η regulated recruitment of B-Raf and C-Raf from cytosol to membranes and their heterodimerization in EGF-stimulated HeLa cells. DGK η also activated C-Raf but not B-Raf in an EGF-dependent manner. These results suggest that DGK η acts as a novel critical regulatory component of the ERK signaling pathway. On the other hand, it is suggested that DGK α positively regulates tumor necrosis factor α -dependent nuclear factor- κ B activation via the protein kinase C ζ -mediated Ser311 phosphorylation of p65 subunit in AKI melanoma cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：シグナル伝達、脂質、酵素

1. 研究開始当初の背景

DGK は生理活性脂質であるジアシルグリセロールとホスファチジン酸の細胞内濃度

を調節することにより細胞の生理機能を制御していると考えられている。哺乳類の DGK は現在まで 10 種類のアイズイムの

cDNA がクローニングされており、これらのアイソザイムはすべてのアイソザイムに共通の触媒ドメインと亜鉛フィンガー以外のドメイン構造の違いから5つのサブグループ(1~5型)に分類されている。

DGK η はN末端にpleckstrin homologyドメインを持ち、触媒ドメインが2つに分かれている2型DGKに属するアイソザイムであり、C末端の配列が異なる2種類のスプライシング産物が存在する。DGK η は酸化ストレスや浸透圧ストレスでエンドソームに移行することが報告されているが、その生理機能に関してはほとんど判っていない。

また、DGK α はEFハンドモチーフを持つ1型DGKに属するアイソザイムである。最近、我々はヒトメラノーマ細胞においてDGK α が過剰に発現しているためにNF- κ Bが活性化され、TNF α によるアポトーシスが抑制されていることを報告した。

2. 研究の目的

DGKアイソザイムの生理機能を解明するために、本研究では1) DGK η によるERKの活性制御機構の解明、2) DGK α によるNF- κ Bの活性制御機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

RNAi-HeLa細胞に10 nM siRNAをトランスフェクトし、72時間後に各種実験を行なった。AKI細胞には10 nM siRNAをトランスフェクトし、48時間後に各種実験に用いた。

免疫沈降-細胞可溶化物を各種抗体とプロテインGビーズとインキュベートし、ビーズを洗浄した。免疫沈降物を各種実験に用いた。

In vitro Rafキナーゼアッセイ-HeLa細胞可溶化物からC-Rafを免疫沈降し、沈降物中にリコンビナントMEK1とATPを加えてインキュベートした後、ウェスタンブロッティングでphospho-MEK1を検出した。

NF- κ B活性-pNF- κ B-LucベクターをトランスフェクトしたAKI細胞を刺激した後、細胞を可溶化し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

4. 研究成果

1) DGK η によるERKの活性制御機構

EGFなどの増殖因子やサイトカインが細胞膜受容体に結合するとRasが活性化した後、Raf、MEK1/2、ERK1/2が順次活性化し、最終的に核にシグナルが伝わり、細胞増殖などが制御される。DGK η により細胞増殖が制御されていると考えられることから、DGK η によるEGFのシグナル伝達の制御機構の解析を行なった。

DGK η 特異的siRNAをトランスフェクトすることによりDGK η の発現を抑制したHeLa細胞は細胞増殖が阻害された。さらに、この細胞では、EGF刺激依存性のERK1/2のリン

酸化だけでなく、上流のMEK1/2のリン酸化も阻害された。このことから、DGK η はEGFによって活性化されるERK経路に対して促進的に働くことが示された。しかしながら、EGF刺激によるRasの活性化には影響がなかったことから、DGK η がRafキナーゼを制御していると考えられた。In vitroでのRafキナーゼの活性を測定したところ、DGK η はEGF依存的にC-Rafキナーゼ活性を促進的に制御していたが、B-Rafキナーゼ活性は制御していなかった。さらに、DGK η 発現抑制細胞で免疫沈降実験を行なったところ、C-Rafと共沈してくるB-Rafの量が著しく減少した。このことから、DGK η がEGF刺激依存性のB-RafとC-Rafのヘテロ二量体形成の制御をしていることも示された。ただし、DGK η とB-RafあるいはC-RafはEGF刺激非依存性に相互作用していた。活性化RasからのシグナルはB-RafとC-Rafを膜へと移行させるが、この際、DGK η はB-Rafと相互作用した状態でC-Rafと活性化型Rasが局在する細胞膜へと、そして(あるいは)、C-Rafと相互作用した状態でB-Rafと活性化型Rasが局在する細胞膜へと移行する可能性が示された。

以上のことから、DGK η はB-Raf及びC-Rafと結合し、Rasの活性化により細胞膜に移行し、B-RafとC-Rafのヘテロ二量体形成を促進することにより、MEK1/2-ERK1/2へのシグナルを増強し、細胞増殖を促進することが推測された。

2) DGK α によるNF- κ Bの活性制御機構

DGK α 特異的siRNAをトランスフェクトすることによりDGK α の発現を抑制したAKI細胞(ヒトメラノーマ細胞株)ではTNF α 投与時のNF- κ Bの活性を強く抑制した。また、様々なPKC阻害剤の影響を検討したところ、nPKC(PKC ζ , ι/λ)がDGK α によるNF- κ Bの活性制御に関与していることが示された。そして、PKC ζ によりリン酸化することが知られているNF- κ Bのp65サブユニットのSer311のリン酸化がDGK α の発現を抑制することにより大きく減少した。一方、PKC ζ の発現抑制あるいは過剰発現はNF- κ Bの活性を抑制あるいは亢進した。

以上のことから、TNF α -PKC ζ -NF- κ B経路においてDGK α が重要な制御因子であ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5件)

- ① Oki G, Wada T, Iba K, Aiki H, Sasaki K, Imai S, Sohma H, Matsumoto K, Yamaguchi M, Fujimiya M, Yamashita T and Kokai Y.

Metallothionein deficiency in the injured peripheral nerves of complex regional pain syndrome as revealed by proteomics. *Pain* **153** (2012) 532–539, 査読有.

- ② Yamamoto M, Ota A, Hori T, Imai S, Sohma H, Suzuki N, Hatakeyama N, Inazawa N, Ito YM, Kimura H, Tsutsumi H and Kokai Y. Early expression of plasma CCL8 closely correlates with survival rate of acute graft-vs.-host disease in mice. *Exp. Hematol.* **39** (2011) 1101–1112, 査読有
- ③ Yamaguchi M, Kokai Y, Imai S, Utsumi K, Matsumoto K, Honda H, Mizue Y, Momma M, Maeda T, Toyomasu S, Ito YM, Kobayashi S, Hashimoto E, Saito T and Sohma H. Investigation of annexin A5 as a biomarker for Alzheimer's disease using neuronal cell culture and mouse model. *J. Neurosci. Res.* **88** (2010) 2682–2692, 査読有.
- ④ Yasuda S, Kai M, Imai S, Takeishi K, Taketomi A, Toyota M, Kanoh H and Sakane F. Diacylglycerol kinase η augments C-Raf activity and B-Raf/C-Raf heterodimerization. *J. Biol. Chem.* **284** (2009) 29559–29570, 査読有.
- ⑤ Kai M, Yasuda S, Imai S, Toyota M, Kanoh H and Sakane F. Diacylglycerol kinase α enhances protein kinase C ζ -dependent phosphorylation at Ser311 of p65/RelA subunit of nuclear factor- κ B. *FEBS Lett.* **583** (2009) 3265–3268, 査読有.

[学会発表] (計 14 件)

- ① 大木豪介「メタロチオネインはCRPS患者の末梢神経で欠損している」第26回日本整形外科基礎学術集会, 2011年10月21日, 前橋.
- ② 大木豪介「メタロチオネインはラットPSLモデルにおいて異痛症と痛覚過敏を改善する」第26回日本整形外科基礎学術集会, 2011年10月21日, 前橋.
- ③ 竹林庸雄「脳脊髄液中における疼痛関連タンパク質のプロテオミクス解析」第26回日本整形外科基礎学術集会, 2011年10月20日, 前橋.
- ④ 太田明伸「CCL8濃度とCCL8陽性細胞の増加はマウス肺のGVHD病態と密接に関与する」第70回日本癌学会学術総会, 2011年10月4日, 名古屋.
- ⑤ 相馬仁「アルツハイマー病分子マーカーの解析」第84回日本生化学会大会, 2011年9月23日, 京都.
- ⑥ Sohma H. "Investigation of novel biomarkers for Alzheimer's disease using lipid-coated nanoparticles" 2nd World Congress on Biomarkers and Clinical

Research, 13 Sep 2011, Baltimore, U.S.A.

- ⑦ 今井伸一「プロテオミクス解析によるCRPS関連タンパク質の探索」第44回北海道病理談話会, 2011年9月10日, 旭川.
- ⑧ 大木豪介「メタロチオネインはCRPS患者の末梢神経で欠損している」第121回北海道整形災害外科学術集会, 2011年6月11日, 旭川.
- ⑨ 大木豪介「メタロチオネインはラットPSLモデルにおいて異痛症と痛覚過敏を改善する」第121回北海道整形災害外科学術集会, 2011年6月11日, 旭川.
- ⑩ Sohma H. "Investigation of novel biomarkers for Alzheimer's disease" 10th World Congress of Biological Psychiatry, 30 May 2011, Prague, Czech Republic.
- ⑪ 相馬仁「アネキシンA5はアルツハイマー病のバイオマーカーとなりうる」第33回日本神経科学大会・第53回日本神経化学会大会・第20回日本神経回路学会大会合同大会, 2010年9月2日, 神戸.
- ⑫ Yamamoto M. "CCL8 as a biomarker intimately associated with murine graft-versus-host disease (GVHD)" 36th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation, 22 March 2010, Vienna, Austria.
- ⑬ 甲斐正広「PKC ζ によるp65のリン酸化がメラノーマ細胞におけるジアシルグリセロールキナーゼ α からNF- κ Bへのシグナル伝達を仲介する」第68回日本癌学会学術総会, 2009年10月3日, 横浜.
- ⑭ 安田智「ジアシルグリセロールキナーゼ η は上皮増殖因子に依存したRafシグナル経路を制御する」第68回日本癌学会学術総会, 2009年10月2日, 横浜.

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

- ① 名称: 疼痛を治療、改善、または予防するための組成物
発明者: 小海康夫、大木豪介、松本圭代、今井伸一、和田卓郎
権利者: 札幌医科大学
種類: 特許
番号: 特願 2011-036855
出願年月日: 2011年2月23日
国内外の別: 国内
- ② 名称: アミロイド β 神経障害バイオマーカー
発明者: 小海康夫、相馬仁、今井伸一、松本圭代、木村成寿
権利者: 札幌医科大学
種類: 特許
番号: 特願 2010-280331

出願年月日：2010年12月16日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 伸一 (IMAI SHIN-ICHI)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号：20213209