

機関番号 : 82601

研究種目 : 若手研究 (B)

研究期間 : 2009 年~2010 年

課題番号 : 21770147

研究課題名 (和文) ジアシルグリセロールキナーゼ η による細胞増殖制御機構の解明研究課題名 (英文) Elucidation of the mechanism by which diacylglycerol kinase η regulates cell proliferation

研究代表者

安田 智 (YASUDA SATOSHI)

国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子細胞医薬部・主任研究官

研究者番号 : 20381262

研究成果の概要 (和文) : Ras/B-Raf/C-Raf/MEK/ERK 経路 (ERK 経路) は、細胞増殖を含む細胞機能の制御に重要な役割を果たしている。HeLa 細胞に siRNA をトランスフェクトし、ジアシルグリセロールキナーゼ η (DGK η) の発現を抑制すると、上皮増殖因子 (EGF) 刺激によって誘導される ERK 経路の活性化の障害が認められた。また DGK η の発現は触媒活性非依存的に ERK 経路を活性化したことより、DGK η はアダプタータンパク質として機能していることが考えられた。B-Raf と C-Raf のキナーゼ活性を測定したところ、DGK η の発現抑制により C-Raf 活性のみが減少することが明らかになった。さらに DGK η の発現抑制によって、EGF 刺激によって誘導される B-Raf と C-Raf のヘテロ二量体形成も顕著に抑制された。また DGK η は B-Raf および C-Raf と相互作用し、EGF 刺激によって誘導される B-Raf および C-Raf の細胞膜への移行も制御した。以上の結果は、DGK η は ERK 経路を制御する新規の因子であることを示唆している。

研究成果の概要 (英文) : The Ras/B-Raf/C-Raf/MEK/ERK pathway (ERK pathway) is critical for the control of many cellular processes including proliferation. Here we showed that siRNA-dependent knockdown of diacylglycerol kinase η (DGK η) impairs the ERK pathway activated by epidermal growth factor (EGF) in HeLa cells. The overexpression of DGK η could activate the ERK pathway in a DGK activity-independent manner, suggesting that DGK η serves as an adaptor protein. We revealed that DGK η activates C-Raf but not B-Raf. Moreover, knockdown of DGK η inhibited EGF-induced heterodimerization of C-Raf with B-Raf. DGK η physically interacted with B-Raf and C-Raf and regulated EGF-induced recruitment of B-Raf and C-Raf from the cytosol to membranes. These results support that DGK η acts as a novel critical regulatory component of the ERK signaling cascade.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,700,000	0	1,700,000
総計	3,500,000	540,000	4,040,000

研究分野 : 生物学

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

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をリン酸化し、ホスファチジン酸に変換する酵素である。哺乳動物細胞において、DGK には 10 種類のアイズアイムが存在することが現在までに報告されている。DGK η は、N 末端側に PH ドメインを持ち、触媒部位が 2 つに分かれている II 型 DGK に属する。また DGK η には、分子量 128 kDa の DGK η 1 と分子量 135 kDa の DGK η 2 の 2 種類のスプライシング産物があり、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。しかしながら DGK η に関する論文は数少なく、DGK η が生体内や細胞内で何を行っているのか、ということに関してほとんど分かっていない。本研究では DGK η の生理的な機能および役割の解明を行う。

2. 研究の目的

ERK 経路は、細胞外からのシグナルを核に伝え、細胞増殖・分化・生存を制御することが広く知られている。増殖因子やサイトカインが細胞表面の受容体に結合し、低分子量 G タンパク質である Ras が活性化される。セリン/スレオニンキナーゼである Raf は、活性化した Ras からのシグナルを下流の MEK1/2 に伝え、その結果 ERK1/2 を活性化する。Raf の活性化メカニズムは複雑であり、活性化 Ras との結合の他に、リン酸化、B-Raf と C-Raf のヘテロ二量体形成などが関与する。

DGK η の細胞機能における役割を明らかにするため siRNA により DGK η の発現を抑制したところ、細胞増殖の阻害が観察された。本研究では、DGK η による細胞増殖制御に関連して、DGK η による ERK 活性制御機構の解析を行った。

3. 研究の方法

細胞培養とトランスフェクション-HeLa 細胞に 10 nM siRNA をトランスフェクトし、72 時間後に無血清培地で 5 時間インキュベートし、100 ng/ml EGF で刺激した。

免疫沈降とウェスタンブロット解析-細胞溶解液を調製し、抗 C-Raf 抗体と Protein G Sepharose とインキュベートし、ビーズの洗浄を行った。細胞溶解液もしくは免疫沈降物中の phosphoERK1/2、ERK1/2、phosphoMEK1/2、MEK1/2、DGK η 、B-Raf および C-Raf は、それ

らに対する特異的な抗体を用いてウェスタンブロット法で検出した。

In vitro Raf キナーゼアッセイ-細胞溶解液を調製し、抗 C-Raf 抗体を用いて免疫沈降を行った。免疫沈降物を 6xHis-MEK1-K97R と ATP を含む反応溶液中で 30°C、20 分間インキュベートし、生成した phosphoMEK1 をウェスタンブロット法により検出した。

細胞分画-細胞質画分と膜画分の分離は、ProteoExtract™ subcellular proteome extraction kit を用いて行った。

4. 研究成果

HeLa 細胞に DGK η 特異的 siRNA をトランスフェクトすることにより、DGK η の発現を低下させた。DGK η の発現を抑制した細胞では、EGF 刺激に依存的な ERK1/2 のリン酸化が低下していた。また ERK1/2 の上流のキナーゼである MEK1/2 の EGF に依存したリン酸化も、DGK η 発現抑制により阻害された (図 1)。これらことは、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を示している。

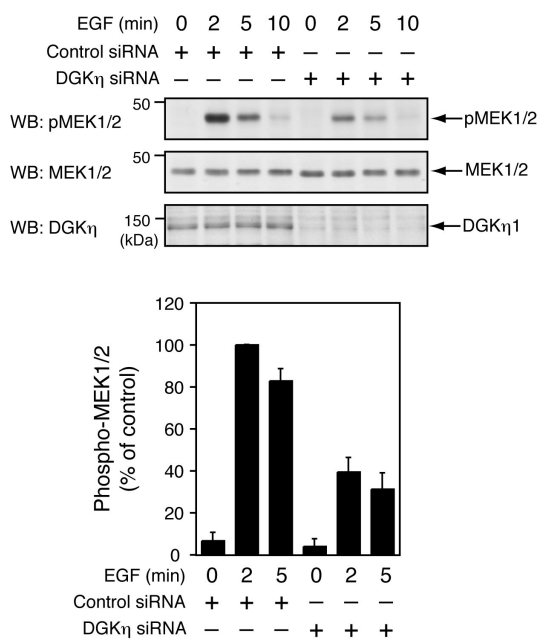


図 1 DGK η は EGF 刺激で誘導された MEK1/2 のリン酸化に必要である。

EGF 刺激によって増加する Ras-GTP 量は DGK η の影響を受けなかったため、DGK η による Raf キナーゼ活性の制御が考えられた。したがって次に DGK η の発現を抑制した HeLa 細胞

胞を EGF 刺激し、内在性の C-Raf を免疫沈降し、*in vitro* で Raf キナーゼ活性を測定した。C-Raf のキナーゼ活性は、EGF 刺激によって著しく上昇した (図 2)。興味深いことに、DGK η の発現抑制は EGF 依存的な C-Raf キナーゼ活性を顕著に阻害した。しかしながら、DGK η は B-Raf キナーゼ活性には影響を及ぼさなかった。これらのことは、DGK η が B-Raf キナーゼ活性ではなく C-Raf キナーゼ活性を制御していることを示している。

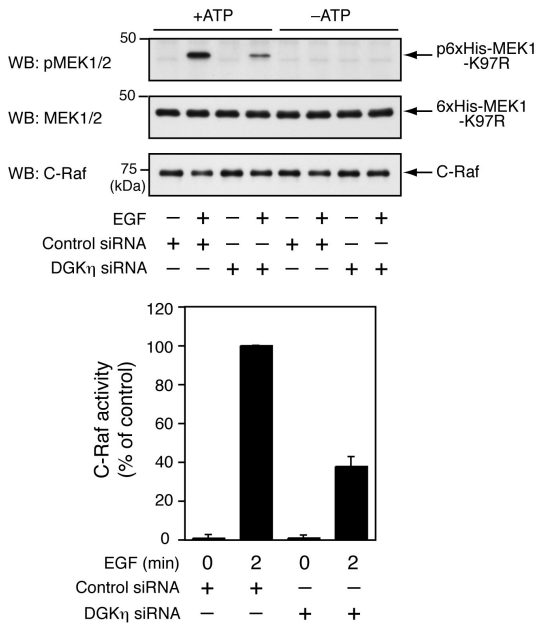


図 2 DGK η は EGF に応答した C-Raf キナーゼ活性化に必要である。

活性化型 Ras 依存的に C-Raf は B-Raf とヘテロ二量体を形成することが近年報告されている。また B-Raf は C-Raf の上流にあり、それらのヘテロ二量体は強い Raf キナーゼ活性を有することが知られている。DGK η の発現を抑制した HeLa 細胞を EGF 刺激し、内在性の C-Raf の免疫沈降を行い、B-Raf の共沈降を見た。細胞を EGF で刺激することにより、B-Raf の共沈降が著しく誘導された (図 3)。また DGK η の発現抑制により、EGF 刺激に依存した B-Raf の共沈降が顕著に阻害された。これらのことより、DGK η が EGF 依存的な B-Raf と C-Raf の相互作用の制御を行っていることが明らかになった。

次に DGK η と B-Raf および C-Raf との相互作用を検討した。HeLa 細胞に DGK η を発現させ免疫沈降を行ったところ、EGF 刺激有無に関わらず B-Raf および C-Raf の共沈降が観察された。これらのことは、DGK η は細胞外か

らのシグナルに依存すること無く、B-Raf および C-Raf と常時相互作用していることを示している。

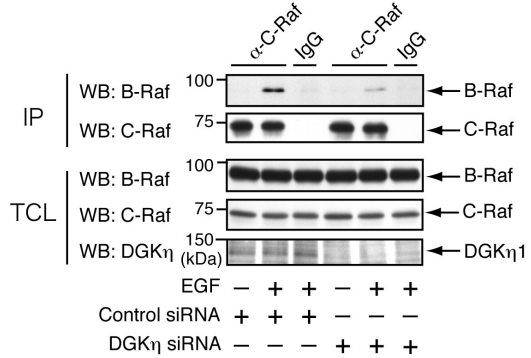


図 3 DGK η は EGF に応答した B-Raf と C-Raf の相互作用を制御する。

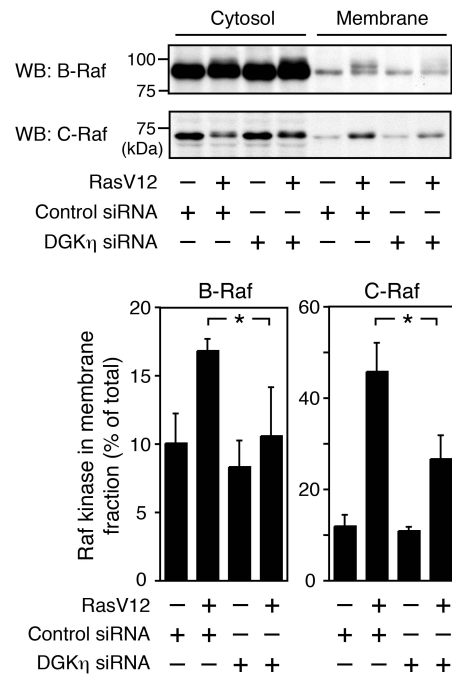


図 4 DGK η は RasV12 による B-Raf および C-Raf の膜移行に必要である。

B-Raf と C-Raf の膜への移行は、活性化 Ras からのシグナルを下流に伝達する上で重要である。EGF 刺激および活性化型 Ras (RasV12) は B-Raf と C-Raf の膜への移行を促進したが、DGK η の発現を抑制すると、B-Raf および C-Raf の膜への移行が阻害された (図 4)。しかしながら DGK η は、RasV12 と C-Raf の結合には影響を及ぼさなかった。これらの結果は、DGK η は自らと相互作用している C-Raf を活性化型 Ras と B-Raf の局在する細胞膜へ移行さ

せることを示唆している。同時に DGK η は、B-Raf を活性型 Ras と C-Raf の局在する膜へ移行させることが考えられた。

以上の結果より、DGK η は C-Raf と B-Raf に相互作用し、Ras の活性化により細胞膜に移行し、C-Raf と B-Raf の二量体形成を促進し、MEK-ERK へのシグナルを増強し、細胞増殖を促進することが考えられた (図 5)。

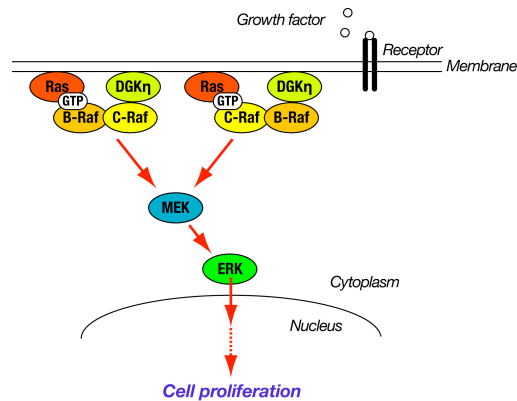


図 5 DGK η による ERK 経路活性制御機構のモデル図。

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 2 件)

- ① Yasuda S, Kai M, Imai S, Takeishi K, Taketomi A, Toyota M, Kanoh H, Sakane F. Diacylglycerol kinase η augments C-Raf activity and B-Raf/C-Raf heterodimerization. (2009) *J. Biol. Chem.* 284(43), 29559-70. 査読あり
- ② Kai M, Yasuda S, Imai S, Toyota M, Kanoh H, Sakane F. Diacylglycerol kinase α enhances protein kinase C ζ -dependent phosphorylation at Ser311 of p65/RelA subunit of nuclear factor- κ B. (2009) *FEBS Lett.* 583(19), 3265-8. 査読あり

[学会発表] (計 5 件)

- ① 安田 智、長谷川 哲也、細野 哲司、佐藤 光利、山口 照英、鈴木 和博、佐藤 陽治「マウス胚性癌細胞および胚性幹細胞における心筋分化能マーカーの検索」

第 10 回 日本再生医療学会(東京) 2011 年 3 月

- ② 安田 智、今井 伸一、甲斐 正広、鈴木 拓、今井 浩三、豊田 実、坂根 郁夫「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(横浜) 2009 年 10 月
- ③ 甲斐 正広、安田 智、今井 伸一、鈴木 拓、今井 浩三、豊田 実、坂根 郁夫「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(横浜) 2009 年 10 月
- ④ 安田 智、坂根 郁夫「ジアシルグリセロールキナーゼ η は、上皮増殖因子にตอบสนองして B-RAF と C-Raf の相互作用を促進し、MEK-ERK 経路を活性化する。」第 51 回 日本脂質生化学会(名古屋) 2009 年 7 月
- ⑤ Kai M, Yanagisawa K, Yasuda S, Sakane F. Diacylglycerol kinase α suppresses tumor necrosis factor- α -induced apoptosis of human melanoma cells through NF- κ B activation. 4th International Conference on Phospholipase A₂ and Lipid Mediators, Tokyo, May 2009.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安田 智 (YASUDA SATOSHI)

国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子細胞医薬部・主任研究官

研究者番号：20381262