

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 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22791745

研究課題名（和文） 急性脳障害における初期細胞応答メカニズムの解析と神経保護

研究課題名（英文） Functional analysis of phospholipid-metabolizing enzyme signal transduction during early phase of 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およびマウスに置いてリン脂質代謝酵素群の一つである DGKzeta が神経細胞の核から細胞質並行することを明らかにしてきたが、興奮毒性依存的細胞死において核から細胞質へ移行後 DGKzeta がポリユビキチン化により速やかに分解され、この分解が Rb のリン酸化の亢進を誘導し、細胞周期が S 期に移行することを明らかにした。この現象は DGKzeta ノックアウトにおいてさらに誘導されやすく、細胞死そのものも引き起こされやすいことが明らかとなった。DGKzeta の核-細胞質間の輸送は Qip1, NPI1 を基軸としたインポーチン依存的な輸送経路を利用し、その複合体形成に Nucleosome assembly protein (NAP)1-L1 及び-L4 と細胞質で結合することが必要である可能性を結合因子探索の結果から明らかにした。さらに独立して、Cdc42/Rac1 の GAP タンパクの一つである IQGAP1 を DGKzeta の新たな結合蛋白として同定しマクロファージにおいて細菌由来内毒素であるリポポリサッカライド (LPS) によってこの DGKzeta-IQGAP1 複合体形成が惹起されること、DGKzeta-IQGAP1 結合依存的に LPS による Rac1 の活性化が誘導され、特にファゴサイトーシスを制御していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

In previous study, we demonstrated that diacylglycerol kinase (DGK) zeta 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 DGKzeta and the physiological functions after localization in cytoplasm of DGKzeta. In this study, we demonstrated that transient exposure to excitotoxic concentration of glutamate led to cytoplasmic accumulation of DGK ζ followed by its down-regulation. Results showed that DGK ζ down-regulation was caused by proteolytic degradation through the ubiquitin-proteasome system (UPS) rather than transcriptional inhibition. DGK ζ -deficient hippocampus exhibited a significant increase in Ser807/811 phosphorylated retinoblastoma protein levels together with up-regulation of the expression of type D and E cyclins, indicative of cell cycle reentry. From a functional perspective, in vitro gene silencing of DGKzeta via specific siRNA enhanced DNA fragmentation in cultured neurons after glutamate exposure. At the organismal level, hippocampal neurons of DGKzeta-deficient mice showed vulnerability to kainate-induced seizures. In addition, nucleosome assembly protein (NAP) 1-like 1 (NAP1L1) and NAP1-like 4 (NAP1L4) are identified as novel DGKzeta binding partners. The molecular interaction of DGKzeta and NAP1Ls prohibits nuclear import of DGKzeta because binding of NAP1Ls to DGKzeta blocks import carrier proteins, Qip1 and NPI1, to interact with DGKzeta, leading to cytoplasmic tethering of DGKzeta. In addition, overexpression of NAP1Ls exerts a protective effect against doxorubicin-induced cytotoxicity. Additionally, we identified a small GTPase effector protein, IQGAP1, as a novel DGKzeta-associated complex protein. A bacterial endotoxin, lipopolysaccharide (LPS), facilitated the complex formation in macrophages. RNA interference-mediated knockdown of DGKzeta or IQGAP1 impaired LPS-induced Rac1 activation. Primary macrophages derived from DGKzeta $^{-/-}$ mice attenuated LPS-induced phagocytosis of bacteria. DGKzeta is involved in IQGAP1/Rac1-mediated phagocytosis upon LPS stimulation in macrophages.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,300,000

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：DGK, 虚血, イノシトールリン脂質, ユビキチン, 細胞周期

1. 研究開始当初の背景

(1) 虚血性神経細胞障害においてグルタミン酸受容体を介したカルシウムシグナル伝達系の関与が示唆されており、この下流に存在するフォスファチジルイノシトール(4,5)二リン酸およびそこから産生される二次伝達物質であるジアシルグリセロール (DG) の情報伝達が虚血障害時に何らかの役割を果たすと考えられる。

(2) イノシトールリン脂質代謝酵素の一つであるホスホリパーゼ C デルタ 1 が神経細胞障害時のカルシウム流入により局在変化を起こすこと、ホスホリパーゼにより産生されることで産生される DG を代謝するゼータ型ジアシルグリセロールキナーゼ (DGKzeta) が一過性脳虚血モデルの海馬神経細胞において核から細胞質に移行し、その後速やかに分解される現象を見いだしてきた。この現象はスライス培養、神経初代培養に置いても確認された。一過性脳虚血後の海馬ニューロンにおいて、DGKzeta の発現量とサイクリン D1 の発現量が相関することをノックアウトマウスを用いた免疫染色で見出した。

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、非常に早く顕著な局在変化を示す DGKzeta の核-細胞質間輸送機構の解明する。また、虚血性神経細胞死時に見られる現象として非分裂細胞である神経細胞において細胞周期が再回転することが知られているが DGKzeta によるサイクリンの発現量の制御を明らかにする。虚血処理後 DGKzeta は速やかにそのタンパク質が分解されるが、それらを引き起こす因子群を探索・同定を試みる。

3. 研究の方法

① 種々の importin および Crm1 との結合解析を生化学的に行い、DGKzeta の核-細胞質間輸送パートナーを同定する。

- ② 海馬スライス培養を用いて低酸素・グルコース処理を施し種々の阻害剤を用いて DGKzeta の局在変化に必要なシグナルを検索する
- ③ 野生型及びノックアウトマウスに一過性虚血処理後、細胞周期関連因子の脳内局在解析を行う。特に今までに関連があると報告してきた Rb およびリン酸化 Rb の脳内局在を共焦点顕微鏡を用いて、詳細に解析する。
- ④ 虚血処理後の初代神経細胞にて DGKzeta の細胞周期制御活性の有無を調べる。初代神経細胞に遺伝子導入、薬剤処理、種々の阻害剤処理を施し遅延性神経細胞死の前段階である細胞周期回転のメカニズムを解明する。
- ⑤ 虚血負荷の有無で各 DGK アイソザイムのタンパク質量および分解の有無を各特異抗体で検討する。
- ⑥ 虚血処理後の海馬もしくは HEK293 等のライン化された細胞にプロテアソーム阻害剤を処理しユビキチン化の状態を保たせたまま、ユビキチンリガーゼの同定を試みる。

4. 研究成果

- ① DGKzeta の核-細胞質間輸送パートナーを同定するため、輸送単体である種々の importin および Crm1 との結合解析を生化学的に行い、DGKzeta の核-細胞質間輸送パートナーが少なくとも Qip1, NPII により核内輸送され、Crm1 依存的に核外輸送されることが明らかとなった。
- ② 結合蛋白因子を探索した結果、細胞質にて Nucleosome assembly protein (NAP)1-L1 及び-L4 と細胞質で結合し、NAP 大量発現時には DGKzeta の核内輸

送担体との結合が阻害されることで細胞質に留まることを明らかにした。

- ③ さらに結合蛋白因子を探索した結果、新たに低分子量 G タンパク質である Rac1/Cdc42 の GAP タンパクの一つである IQGAP1 を同定した。様々な刺激実験を行った結果、マクロファージにおいて細菌由来内毒素であるリポポリサッカライド (LPS)によってこの DGKzeta-IQGAP1 複合体形成が惹起されること、DGKzeta-IQGAP1 結合依存的に LPS による Rac1 の活性化が誘導され、特にファゴサイトーシスを制御していることを明らかにした。
- ④ DGKzeta は虚血処理後海馬ニューロンにおいて速やかに核内から消失し、その後細胞質にてタンパク質の分解が起きることを明らかにしてきたが、DGKzeta の発現が減少した神経細胞ではその後サイクリン D の発現上昇が確認された。このタンパク質分解は HEK293 などを用いた発現系や初代ニューロンを用いた系、マウス癲癇モデルにおいてもでも認められ、グルタミン酸処理において引き起こされること、核外輸送阻害により減少することを明らかにした。
- ⑤ 上記の DGKzeta のタンパクレベルでの減少が HEK293 細胞を用いた再構成系の実験から、DGKzeta がポリユビキチン化されること、核内輸送シグナルを欠失した DGKzeta ではポリユビキチン化が顕著に起きることが示唆され、マウス海馬ニューロンにおいても内在性 DGKzeta がポリユビキチン化されることを明らかにした。
- ⑥ DGKzeta ノックアウトマウス由来神経細胞を用いて興奮毒性処理を行うと、野生型に比べ細胞死が誘導されやすくなることを見出した。個体においても、DGKzeta ノックアウトマウスはカイニン酸処理における癲癇誘導が引き起こされやすいことも明らかにした。
- ⑦ メカニズムの一端として、Rb 遺伝子産物のリン酸化 (Ser807/811)のリン酸化が亢進し、通常細胞周期が停止している海馬ニューロンが S 期に移行すること細胞周期停止機構が破綻し、細胞死開始が早まっていることを明らかにした。

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 4 件)

- ① **Okada M**, Hozumi Y, Tanaka T, Suzuki Y, Yanagida M, Araki Y, Evangelisti C, Yagisawa H, Topham MK, Martelli AM,

Goto K: DGK ζ is degraded through the cytoplasmic ubiquitin-proteasome system under excitotoxic conditions, which causes neuronal apoptosis because of aberrant cell cycle reentry. *Cellular Signalling*. 24, 1573-1582, 2012、査読有り、DOI: 10.1016/j.cellsig.2012.03.021.

- ② **Okada M***, Hozumi Y, Iwazaki K, Misaki K, Yanagida M, Araki Y, Watanabe T, Yagisawa H, Topham MK, Kaibuchi K, Goto K* (***Double corresponding**): DGK ζ is involved in LPS-activated phagocytosis through IQGAP1/Rac1 pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 420, 479-484. 2012、査読有り、DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.03.057.
- ③ Yusuke Suzuki, Yoshihiko Yamazaki, Yasukazu Hozumi, **Masashi Okada**, Toshiaki Tanaka, Ken Iseki, Nobuo Ohta, Masaru Aoyagi, Satoshi Fujii, Kaoru Goto: NMDA receptor-mediated Ca²⁺ influx triggers nucleocytoplasmic translocation of diacylglycerol kinase ζ under oxygen-glucose deprivation conditions, an in vitro model of ischemia, in rat hippocampal slices. *Histochem Cell Biol*. 137, 499-511. 2012、査読有り、DOI: 10.1007/s00418-011-0907-y.
- ④ **Okada M**, Hozumi Y, Ichimura T, Tanaka T, Hasegawa H, Yamamoto M, Takahashi N, Iseki K, Yagisawa H, Shinkawa T, Isobe T, Goto K.: Interaction of nucleosome assembly proteins abolishes nuclear localization of DGK ζ by attenuating its association with importins. *Exp Cell Res*. 317, 2853-63. 2011、査読有り、DOI: 10.1016/j.yexcr.2011.09.014.

〔学会発表〕（計 3件）

- ① Masashi Okada, Kaoru Goto ; DGK ζ is a suppressor of excitotoxic neuronal cell death ; 分子生物学会 年会 ; 2011年12月16日 （横浜、パシフィコ横浜）
- ② Masashi Okada, Kaoru Goto ; DGK ζ is a suppressor of excitotoxic neuronal cell death ; JBS バイオフロンティア国際シンポジウム 九州大学創立百周年記念 ; 2011年11月15日 （福岡、Hotel Luigans -Spa and Resort）
- ③ 岡田 雅司、後藤 薫 ; Nucleosome assembly protein は DGK ζ の核-細胞質間輸送を制御する ; 日本分子生物学会年会、日本生化学大会合同大会 ; 2010年12月9日 （神戸、神戸ポートアイランド）

〔図書〕（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.id.yamagata-u.ac.jp/AnatomyII/anaII.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