

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：11501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2017

課題番号：26670782

研究課題名(和文) 低体温療法における細胞内情報伝達系の応答

研究課題名(英文) Intracellular signal transduction in response to hypothermia

研究代表者

後藤 薫 (Goto, Kaoru)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：30234975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：組織損傷後、低体温環境が低酸素誘導因子(HIF)を誘導することにより代謝エネルギー消費を抑制し、組織細胞損傷を軽減する可能性が考えられる。本研究では、細胞内二次伝達物質代謝酵素ジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)によるHIF制御およびエネルギー代謝機構を解析した。その結果、ゼータ型DGKを欠失させると、24時間の1%低酸素負荷によって、1)HIF1 $\alpha$  蛋白の発現が約50%減少すること、2)エネルギーセンサーAMPKの活性化が亢進すること、3)細胞内ATP量が増加することを明らかにした。以上の結果より、ゼータ型DGKはHIFを介するエネルギー代謝機構に重要な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Upon tissue damage, hypothermia induces Hypoxia inducible factor (HIF), which suppresses energy expenditure and exerts a beneficial effect to damaged cells. In this study we examined the regulatory mechanism of the diacylglycerol kinase (DGK) family on HIF expression and energy metabolism. We found that after 24 h of 1% hypoxic conditions DGKzeta deficiency reduces HIF1 $\alpha$  expression by 50%, activates energy sensor AMPK, and increases intracellular ATP levels. These results suggest that DGKzeta plays an important role in energy metabolism under hypoxic conditions.

研究分野：解剖学、組織学、細胞生物学

キーワード：エネルギー代謝 脂質代謝酵素 低酸素 エネルギーセンサー ATP 熱ショックタンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 心肺蘇生で自己心拍が再開した患者も、その後生じる様々な臓器障害によって予後を悪化させることが 2008 年に心肺蘇生後症候群として報告された。心肺蘇生後の脳機能障害は、循環・呼吸停止による低酸素ストレスと心拍再開後の脳浮腫によって惹起されると考えられている。

(2) 近年、心拍再開直後の低体温療法により、神経予後の改善が報告されているが、その明確な脳保護作用は明らかではない。

(3) Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) は低酸素状態での遺伝子発現の制御を行っており、エリスロポエチン、血管内皮増殖因子(VEGF)、アドレノモジュリン、エンドセリン、一酸化窒素合成酵素 2(NOS2)などの制御を介して、低酸素に対する応答を制御する。この時、HIF は消費エネルギーを抑制し、ストレス状態に対する耐性も増加させる可能性が考えられる。

(4) DGK は二次伝達物質ジアシルグリセロール (DG) をリン酸化してホスファチジン酸 (PA) に変換する酵素でありファミリーを形成するが、その中でゼータ型 DGK (DGK $\zeta$ ) が HIF の機能発現制御に関与することが報告されている。

(5) 申請者らの研究により、DGK は海馬ニューロンにおいて、通常酸素下では核内に局在するが、一過性の低酸素・低グルコース負荷 (OGD) を受けると、その後通常酸素下に戻しても、しだいに細胞質に移行し発現が減少することが明らかとなった。

(6) これらの結果は、DGK の核から細胞質への移行、そしてその後の発現減少が神経細胞死と関連する可能性が指摘されている。しかし DGK による HIF の制御機構は未だ解析がなされていない。

## 2. 研究の目的

(1) 細胞は、低酸素や細胞内 ATP 枯渇状態に陥ると、HIF-1 や、AMP-activated kinase (AMPK) 等のセンサーが作動し、低エネルギー環境への適応を開始する。また Sirtuin 1 (SIRT1) は NAD<sup>+</sup>依存性の脱アセチル化酵素であり、リボソーム RNA 合成を抑制することにより、ATP の消費を抑えることが報告されている。

(2) 低体温療法では、HIF 発現誘導を介して、エネルギー代謝を変化させることにより、細胞保護効果を発揮すると考えられる。したがって本研究では、これら代謝ホメオスタシスに関連する HIF-1、AMPK、SIRT1 の制御メカニズムにおける DGK の機能的役割を解析した。

(3) また、ストレス環境下で機能する DGK 結合蛋白を同定し、低体温療法における役割の解析を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) DGK ノックアウト (DGK<sup>-KO</sup>) マウス由来のマウス胎児線維芽細胞 (MEF) および DGK ノックダウン HeLa 細胞を低酸素濃度 (1%) 条件下に培養を行った。HeLa 細胞は 10% ウシ胎児血清 (FBS)、MEF は 20% FBS 含有ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) で培養した。インキュベーター内を 37<sup>o</sup>C、20% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub> としたものを通常酸素条件とし、37<sup>o</sup>C、1% O<sub>2</sub>、94% N<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub> に管理したものを低酸素条件とした。

(2) HIF-1、AMPK、SIRT1 および関連タンパク質の発現をウェスタンブロット法および RT-PCR により解析した。またホタル・ルシフェラーゼ発光法を用いて、細胞内 ATP を測定した。

(3) 種々のストレス蛋白のうち、熱ショックタンパク質 (HSP) ファミリーに焦点を絞り、免疫沈降法を用いて、DGK と相互作用を示す蛋白の同定を行った。

## 4. 研究成果

(1) 低酸素負荷条件下における HIF-1 の発現誘導

最初の実験として、低酸素負荷による HIF-1 蛋白の発現誘導レベルの解析を施行した。HeLa 細胞に control siRNA または DGK siRNA を遺伝子導入後、DGK タンパク発現がノックダウンされているのを確認後、正常酸素または 1% 低酸素負荷条件下で 24 時間培養を行った。

ウェスタンブロット解析の結果、正常酸素条件下の培養では、コントロール細胞および DGK ノックダウン細胞の両者ともに、HIF-1 蛋白はほとんど検出限界以下であったが、低酸素負荷により HIF-1 蛋白発現の増加が認められた。しかしながら、HIF-1 蛋白発現誘導は、DGK ノックダウン細胞において有意に減少しており、コントロールと比較して約 50% 程度であった。

(2) 低酸素負荷条件下における SIRT1 の発現解析

次の実験として、カロリー制限等により誘導される脱アセチル化酵素 SIRT1 の発現を解析した。SIRT1 は、NAD<sup>+</sup>依存性に活性化されるエネルギーセンサーとして働き、代謝を抑えることにより ATP の消費を抑制し低エネルギー状態への適応を促すことが報告されている。野生型および DGK<sup>-KO</sup> 由来の MEF を正常酸素ないし低酸素環境下で 24 時間培養を行い、SIRT1 の蛋白発現および mRNA をウェスタンブロットと RT-PCR にて解析をした。

正常酸素条件下では、DGK<sup>-</sup>KO MEF の SIRT1 蛋白発現は野生型に比べて約 50%に低下していた。低酸素負荷によって、野生型および DGK<sup>-</sup>KO MEF の両者ともに、SIRT1 の蛋白発現は減少するが、DGK<sup>-</sup>KO MEF における減少の程度が顕著であった。

RT-PCR による mRNA の発現を検討すると、DGK<sup>-</sup>KO MEF における SIRT1 mRNA は、正常酸素下ではコントロール MEF の約 80%に、低酸素負荷条件下では、約 50%に減少することが判明した。この結果より、DGK<sup>-</sup>KO MEF における SIRT1 発現は、転写レベルにおいて抑制されており、さらに低酸素曝露によって顕著に低下すると考えられた。

### (3) 低酸素負荷環境下における AMPK の発現解析

AMPK は細胞内の“エネルギーセンサー”としての役割を担っており、細胞内 ATP の消費により増加した ADP および AMP に応答して活性化される。活性化を受けた AMPK は、ATP 産生に働く異化作用を促進させると同時に、エネルギーを消費する蛋白合成等の同化作用を抑制することにより、低エネルギー環境に適応する。

実験では、野生型および DGK<sup>-</sup>KO MEF を、低酸素環境下で 0、6、24 時間培養を行い、AMPK 抗体およびその活性化型を認識する AMPK<sup>-</sup>Thr172 リン酸化抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。また、PCR 法を用いて AMPK mRNA の発現を検討した。

タンパクレベルにおいて AMPK の発現は、野生型においては低酸素負荷により時間依存的に増加した。一方 DGK<sup>-</sup>KO MEF における AMPK 蛋白は、正常酸素圧で既に高い発現レベルを示していたが、逆に低酸素負荷により次第に減少することが判明した。AMPK mRNA 発現は、正常酸素圧においては、野生型および DGK<sup>-</sup>KO MEF には著しい差は認められなかった。しかし低酸素環境下においては、野生型と DGK<sup>-</sup>KO MEF の両者とも減少するが、DGK<sup>-</sup>KO MEF での減少が顕著であることが判明した。

次の実験として、リン酸化抗体を用いて活性化型 AMPK の発現を解析すると、野生型および DGK<sup>-</sup>KO MEF 共に低酸素負荷により次第に活性化型蛋白も増加するが、DGK<sup>-</sup>KO MEF においては、コントロールと比較してより高い活性化が生じていることが判明した。

### (4) AMPK 活性化機構の解析

Thr172 のリン酸化による AMPK の活性化は、細胞内エネルギー枯渇に応答して活性化される LKB1 により制御される。したがって、LKB1 の活性化を検討する目的で、野生型および DGK<sup>-</sup>KO MEF を正常酸素および低酸素負荷条件下で 24 時間培養し、LKB1 の発現とリン酸化をウェスタンブロット法により解析した。

タンパクレベルにおいて LKB1 の発現は、

正常酸素下において野生型および DGK<sup>-</sup>KO MEF との間に差が認められず、また低酸素負荷条件下において両者共にわずかに減少するものの、同程度のレベルであった。

また、LKB1 のリン酸化は、低酸素負荷により野生型 MEF では著しく亢進するが、DGK<sup>-</sup>KO MEF では野生型の約 40%と顕著に低下していた。以上より、DGK<sup>-</sup>KO MEF においては、低酸素負荷における LKB1 活性化が抑制されていると考えられた。

### (5) 細胞内 ATP の測定

上に述べた AMPK および LKB1 活性化の解析結果において、DGK<sup>-</sup>KO MEF では、低酸素負荷により AMPK 自身の活性化が亢進するにも関わらず、LKB1 の活性が抑制されるという、相反する知見が得られた。LKB1 は細胞内 ATP の減少に応答して活性化されるので、次に野生型および DGK<sup>-</sup>KO MEF を正常酸素および低酸素負荷条件下で 24 時間培養した後に、ホタル・ルシフェラーゼ発光法を用いて細胞内 ATP 測定を行った。

正常酸素圧において、DGK<sup>-</sup>KO MEF の細胞内 ATP は、野生型の約 1.5 倍と著しい高値を示すことが判明した。低酸素負荷条件下での細胞内 ATP は両者とも正常酸素圧の約 50%程度に減少した。この時、正常酸素圧の場合と同様に、DGK<sup>-</sup>KO MEF の細胞内 ATP は野生型の約 1.5 倍と高値を示した。

### (6) 熱ショックタンパク質 (HSP) との結合

温度変化における細胞応答の変化は、HSP ファミリーによって制御を受ける可能性があることを考慮し、DGK と HSP ファミリー間のタンパク結合実験を行った。A549 細胞を回収した後、DGK 抗体を用いて免疫沈降を行い、HSP90、HSP70、HSP40、HSP27 抗体でウェスタンブロット法を施行した。

その結果、DGK は HSP ファミリーの中で、HSP27 と強く結合することが明らかとなった。今後、低温、低酸素、低エネルギー環境下における結合の変化、ならびに DGK の機能的役割の変化を解析する予定である。

### (7) まとめ

以上の結果をまとめると、DGK のノックアウトあるいはノックダウン細胞において、低酸素曝露により SIRT1 および HIF-1 の発現誘導の減少が起こることが明らかとなった。すなわち、DGK の発現減少により、これら 2 つのエネルギーセンサーを介する応答性が低下する可能性が示唆される。これらの低エネルギー応答経路の反応性低下は、DGK 発現減少により細胞内 ATP 量が増加する現象と関連する可能性がある。一方、AMPK を介する低エネルギー応答経路に関しては、ATP 量増加を反映して上流の LKB1 の活性化 (リン酸化) レベルがコントロール細胞よりも低値を示していると考えられるが、AMPK 自身の活性化レベルはより高い状態にあるという、

相反する知見が得られた。このデータは、DGK 発現減少細胞においては、細胞内 ATP 量が増加しているにもかかわらず、AMPK センサーを介するシグナルが増強している可能性を示唆する。今後、このようなエネルギー代謝調節における HSP27 の役割も追求する予定である。

#### 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 18 件)

- (1) Nakano T, Ogasawara S, Tanaka T, Hozumi Y, Mizuno S, Satoh E, Sakane F, Okada N, Taketomi A, Honma R, Nakamura T, Saidoh N, Yanaka M, Itai S, Handa S, Chang YW, Yamada S, Kaneko MK, Kato Y, Goto K. DaMab-2: Anti-Human DGK Monoclonal Antibody for Immunocytochemistry. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*. 2017;36:181-184. (査読有) doi: 10.1089/mab.2017.0023.
- (2) Hozumi Y, Fujiwara H, Kaneko K, Fujii S, Topham MK, Watanabe M, Goto K. Diacylglycerol kinase localizes to subsurface cisterns of cerebellar Purkinje cells. *Cell Tissue Res*. 2017;368:441-458. (査読有) doi: 10.1007/s00441-017-2579-y.
- (3) Suzuki A, Matsumoto Y, Shirata T, Goto K, Enokido M, Otani K. C3435T polymorphism of the MDR1 gene is not associated with blood levels of hypothalamus-pituitary-adrenal axis hormones in healthy male subjects. *Genet Mol Res*. 2017;16. (査読有) doi: 10.4238/gmr16019447.
- (4) Shimomura T, Nakano T, Goto K, Wakabayashi I. R59949, a diacylglycerol kinase inhibitor, inhibits inducible nitric oxide production through decreasing transplasmalemmal L-arginine uptake in vascular smooth muscle cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2017;390:207-214. (査読有) doi: 10.1007/s00210-016-1316-5.
- (5) Tanaka T, Goto K, Iino M. Sec8 modulates TGF- $\beta$  induced EMT by controlling N-cadherin via regulation of Smad3/4. *Cell Signal*. 2017;29:115-126. (査読有) doi: 10.1016/j.cellsig.2016.10.007.
- (6) Tanaka T, Goto K, Iino M. Diverse Functions and Signal Transduction of the Exocyst Complex in Tumor Cells. *J Cell Physiol*. 2017;232:939-957. (査読有) doi: 10.1002/jcp.25619.
- (7) Nakano T, Matsui H, Tanaka T, Hozumi Y, Iseki K, Kawamae K, Goto K. Arachidonoyl-Specific Diacylglycerol Kinase and the Endoplasmic Reticulum. *Front Cell Dev Biol*. 2016;4:132. (査読有) eCollection 2016.
- (8) Iseki K, Ozawa A, Seino K, Okubo R, Yamazaki K, Goto K, Tase C. An Overview of Hydrogen Sulfide Suicides Based on Police Data in Yamagata Prefecture, Japan. *ASIA PACIFIC JOURNAL of MEDICAL TOXICOLOGY*. 2016;5:79-82. (査読有) DOI: 10.22038/apjmt.2016.7672.
- (9) Mizuno S, Kado S, Goto K, Takahashi D, Sakane F. Diacylglycerol Kinase Zeta Generates Dipalmitoyl-phosphatidic Acid Species during Neuroblastoma Cell Differentiation. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 2016;8:352-359. (査読有) doi.org/10.1016/j.bbrep.2016.10.004
- (10) Otsuki N, Homma T, Fujiwara H, Kaneko K, Hozumi Y, Shichiri M, Takashima M, Ito J, Konno T, Kurahashi T, Yoshida Y, Goto K, Fujii S, Fujii J. Trichloroethylene exposure aggravates behavioral abnormalities in mice that are deficient in superoxide dismutase. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2016;79:83-90. (査読有) doi: 10.1016/j.yrtph.2016.05.007.
- (11) Tanaka T, Tsuchiya R, Hozumi Y, Nakano T, Okada M, Goto K. Reciprocal regulation of p53 and NF- $\kappa$ B by diacylglycerol kinase. *Adv. Biol. Regul*. 2016, 60:15-21. (査読有) doi: 10.1016/j.jbior.2015.09.009.
- (12) Hozumi Y, Akimoto R, Suzuki A, Otani K, Watanabe M, Goto K. Expression and localization of the diacylglycerol kinase family and of phosphoinositide signaling molecules in adrenal gland. *Cell Tissue Res*. 2015, 362:295-305. (査読有) doi: 10.1007/s00441-015-2199-3.
- (13) Hipkayo W, Chomphoo S, Pakkarato S, Sakaew W, Sawatpanich T, Hozumi Y, Polsan Y, Hipkayo D, Goto K, Kondo H. Selective localization of diacylglycerol kinase (DGK) in the terminal tubule cells in the submandibular glands of early postnatal mice. *Histochem Cell Biol*. 2015, 144:185-93. (査読有) doi: 10.1007/s00418-015-1328-0.
- (14) Hozumi Y, Kakefuda K, Yamasaki M, Watanabe M, Hara H, Goto K. Involvement of diacylglycerol kinase in the spine formation at distal dendrites of striatal medium spiny neurons. *Brain*

- Res. 2015, 1594:36-45. (査読有) doi: 10.1016/j.brainres.2014.11.012.
- (15) Tsuchiya R, Tanaka T, Hozumi Y, Nakano T, Okada M, Topham MK, Iino M, Goto K. Downregulation of diacylglycerol kinase enhances activation of cytokine-induced NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Biochim Biophys Acta Mol. Cell Res.* 2015, 1853: 361-9. (査読有) doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.11.011.
- (16) Matsui H, Hozumi Y, Tanaka T, Okada M, Nakano T, Suzuki Y, Iseki K, Kakehata S, Topham MK, Goto K. Role of the N-terminal hydrophobic residues of DGK in targeting the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2014, 1842:1440-50. (査読有) doi: 10.1016/j.bbalip.2014.07.007.
- (17) Takahashi N, Hozumi Y, Tanaka T, Okada M, Iseki K, Hayasaka K, Goto K. Cellular expression and localization of DGK-interacting NAP1-like proteins in the brain and functional implications under hypoxic stress. *Histochem Cell Biol.* 2014, 142:461-71. (査読有) doi: 10.1007/s00418-014-1226-x.
- (18) Goto K, Tanaka T, Nakano T, Okada M, Hozumi Y, Topham MK, Martelli AM. DGK under stress conditions: To be nuclear or cytoplasmic, that is the question. *Adv. Biol. Regul.* 2014, 54:242-53. (査読有) doi: 10.1016/j.jbior.2013.08.007.

[学会発表](計 13 件)

- (1) 田中俊昭、後藤薫: DGKzeta 結合蛋白 NAP1-like proteins による p53 アセチル化制御を介した細胞周期およびアポトーシス制御機構の解析. 第 123 回日本解剖学会総会、東京; 2018 年 3 月
- (2) 東海林悠、田中俊昭、欠畑誠治、後藤薫: グルコース欠乏負荷条件下における型ジアシルグリセロールキナーゼの機能解析. 第 123 回日本解剖学会総会、東京; 2018 年 3 月 28-30 日
- (3) 八月朔日泰和、後藤薫: 下垂体中間葉細胞におけるベータ型ジアシルグリセロールキナーゼの情報伝達系. 第 123 回日本解剖学会総会、東京; 2018 年 3 月 28-30 日
- (4) 中野知之、後藤薫: DGK 欠損による白色脂肪組織の褐色化メカニズムの解析. 第 122 回日本解剖学会総会、長崎; 2017 年 3 月 28-30 日
- (5) 八月朔日泰和、後藤薫: ラット糖尿病モデルの膵臓ランゲルハンス島における DGK の局在変化. 第 122 回日本解剖学会総会、長崎; 2017 年 3 月 28-30 日
- (6) 清野慶子、中野知之、伊関憲、後藤薫:

- 肝星細胞活性化における型ジアシルグリセロールキナーゼの機能的役割の解析. 第 122 回日本解剖学会総会、長崎; 2017 年 3 月 28-30 日
- (7) 秋元亮、田中俊昭、八月朔日泰和、川前金幸、後藤薫: ゼータ型 DGK によるエネルギーセンサー AMPK の制御. 第 121 回日本解剖学会総会、ビッグパレットふくしま(福島県郡山市); 2016 年 3 月 28-30 日
- (8) 中野知之、後藤薫: 中性脂質代謝機構における DGK ノックアウトの効果 ~ 長期高脂肪食負荷による脂肪沈着メカニズムの解析 ~. 第 121 回日本解剖学会総会、ビッグパレットふくしま(福島県郡山市); 2016 年 3 月 28-30 日
- (9) 後藤薫: Cellular processes mediated by a lipid-metabolizing enzyme diacylglycerol kinase (DGK) family. 第 120 回日本解剖学会総会、神戸国際会議場(兵庫県神戸市); 2015 年 3 月 21-23 日
- (10) 八月朔日泰和、後藤薫: Involvement of diacylglycerol kinase  $\zeta$  in the spine formation at distal dendrites of striatal medium spiny neurons. 第 120 回日本解剖学会総会、神戸国際会議場(兵庫県神戸市); 2015 年 3 月 21-23 日
- (11) 中野知之、後藤薫: DGK deletion induces lipid metabolism impairment and adipose tissue insulin insensitivity. 第 120 回日本解剖学会総会、神戸国際会議場(兵庫県神戸市); 2015 年 3 月 21-23 日
- (12) 田中俊昭、後藤薫: DGK-interacting NAP1-like proteins regulate cell cycle and apoptosis by controlling p53 acetylation. 第 120 回日本解剖学会総会、神戸国際会議場(兵庫県神戸市); 2015 年 3 月 21-23 日
- (13) Goto K, Tanaka T: Cytoplasmic translocation of DGK exerts a protective effect against p53-mediated cytotoxicity. ASCB Annual Meeting, Pennsylvania Convention Center, Philadelphia, USA; December 6-10, 2014.

6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
後藤 薫 (GOTO KAORU)  
 山形大学・医学部・教授  
 研究者番号: 30234975
- (2) 研究分担者  
 秋元 亮 (AKIMOTO Ryo)  
 山形大学・医学部・助教  
 研究者番号: 40594677