

脂質性二次伝達物質ジアシルグリセロール (DG) と 代謝酵素 DG キナーゼ*

八月朔日 泰和

秋田大学大学院医学系研究科 細胞生物学講座

(平成 29 年 4 月 27 日掲載決定)

Lipid second messenger, Diacylglycerol, and its Metabolizing enzyme, Diacylglycerol kinase

Yasukazu Hozumi

Department of Cell Biology and Morphology, Akita University Graduate School of Medicine

Key words : phosphoinositide lipids, specific antibody, immunoelectron microscopy, knock-out mice, behavioral test

はじめに

神経伝達物質や成長因子、ホルモンなどの 1 次メッセンジャーは細胞内シグナルへとつながり、カルシウム、cAMP、cGMP、inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) そしてジアシルグリセロール (DG) といった二次メッセンジャーへとその情報が伝えられる。そのような二次メッセンジャーは protein kinase A (PKA), Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK), protein kinase C (PKC) といったプロテインキナーゼを活性化する。また、いくつかのシグナルは受容体型チロシンキナーゼを介して MAP キナーゼを活性化する。これらは、細胞内シグナル伝達の多くがタンパク質のリン酸化につながることを示している (図 1)。細胞膜でイノシトールリン脂質代謝系により産生される DG は PKC を活性化する二次メッセンジャーとして知られている¹⁾。この DG をリン酸化してホスファチジン

酸 (PA) に変換する酵素が DG キナーゼ, DGK である。PA も二次メッセンジャーとして近年注目されている (図 2)。細胞膜のイノシトールリン脂質代謝系において、PLC により PIP₂ からイノシトールという大きなリングが外れた後には、DG がある領域に集中して一種のマイクロドメインとして存在し、PKC などの活性化を行う場となると考えられる。そして DGK が DG をリン酸化して PA に変換することにより、今度はこの領域が PA による活性化を引き起こす場となる。つまり、DGK は単に DG をリン酸化する酵素ではなく、DG と PA という 2 つの二次メッセンジャーを量的に、空間的に制御することによって細胞内シグナル伝達に関与していると考えられる (図 2)。

筆者は DGK という酵素に注目し、DGK の発現細胞や細胞内の局在を解析して、その機能について疾患の関連を含めて研究を進めている。以前筆者が所属していた教室は、ラット脳 cDNA ライブラリーから 5 種の DGK アイソザイム、DGK α , β , γ , ζ , η をクローニングしてきた (図 3)²⁻⁶⁾。筆者が大学院生として研究を始めた際は、各 DGK アイソザイムの脳での発現は mRNA レベルで明らかにされており、その脳での発現の多様性が示されていた (図 4 左)^{7,8)}。しかし、タンパクレベルで発現局在が明らかにされていたのは、特異抗体が確立されていた DGK α のみで、その他の DGK アイソザイムに対する特異抗体はその当時

Corresponding author : Yasukazu Hozumi
Department of Cell Biology and Morphology, Akita University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Hondo, Akita 010-8543, Japan
TEL : 81-18-884-6056
FAX : 81-18-834-7808
E-mail : yahodumi@med.akita-u.ac.jp

*平成 29 年 2 月 9 日秋田医学会教授就任特別講演

(2)

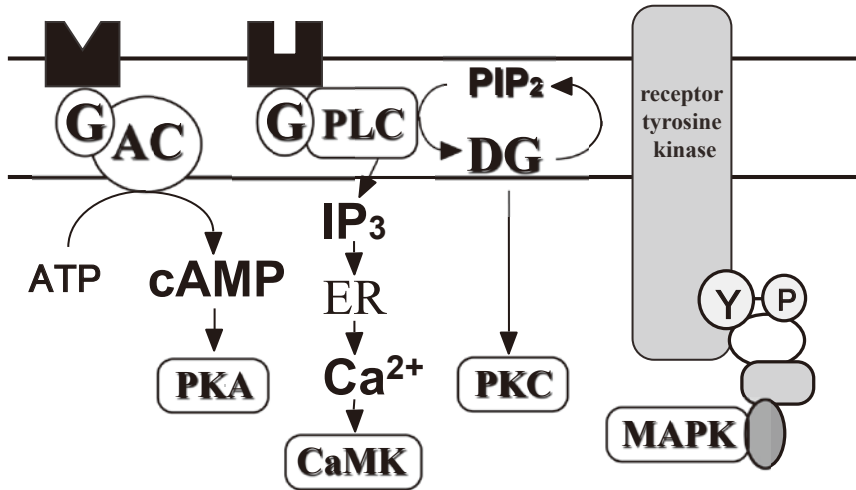
DGK β and DGK ϵ in the central nervous system

図1. リン酸化につながる細胞内シグナル伝達系

AC: adenylate cyclase, ER: endoplasmic reticulum, G: G protein, IP₃: 1,4,5-trisphosphate, MAPK: mitogen-activated protein kinase, P: phosphate, PLC: phospholipase C, Y: tyrosine

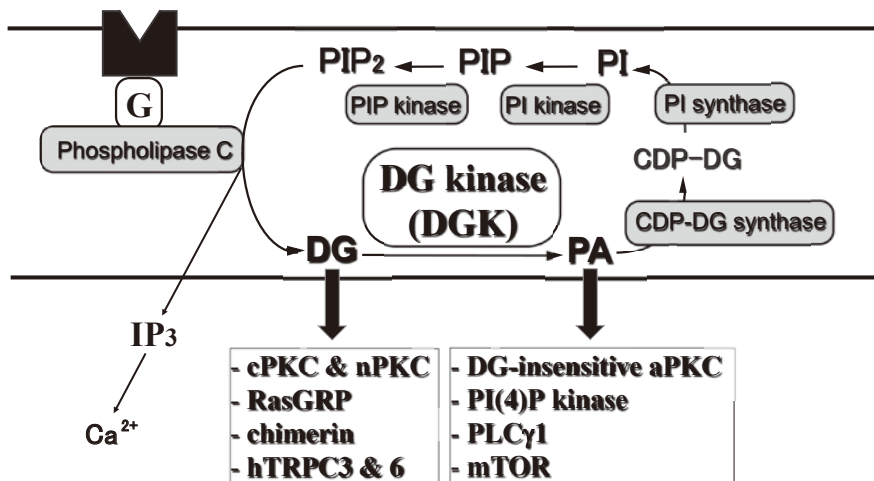


図2. イノシトールリン脂質代謝回転と細胞内シグナル伝達系

DG: diacylglycerol, PA: phosphatidic acid, PI: phosphatidylinositol, PIP: phosphatidylinositol phosphate, PIP₂: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

確立されたものがなかった。筆者は中枢神経系での DGK の重要性に興味を持ち、タンパクレベルでの DGK の細胞内発現と局在をさらに明らかにしたいと考え、大学院での研究課題として DGK に対する特異抗体の作製に取り組んだ。そして現在までに 5 種の DGK アイソザイム、DGK β , γ , ϵ , ζ , ι に対する特異

抗体を確立し、脳における DGK 発現の多様性をタンパクレベルで明らかにしてきた (図 4 右)。また、DGK は中枢神経系のみならず様々な器官で発現しており、網膜、下垂体、副腎、脾臓における DGK の発現局在解析を行い、その細胞内発現や局在の多様性を明らかにした⁹⁻¹²⁾。これらの特異抗体は他の研究者に

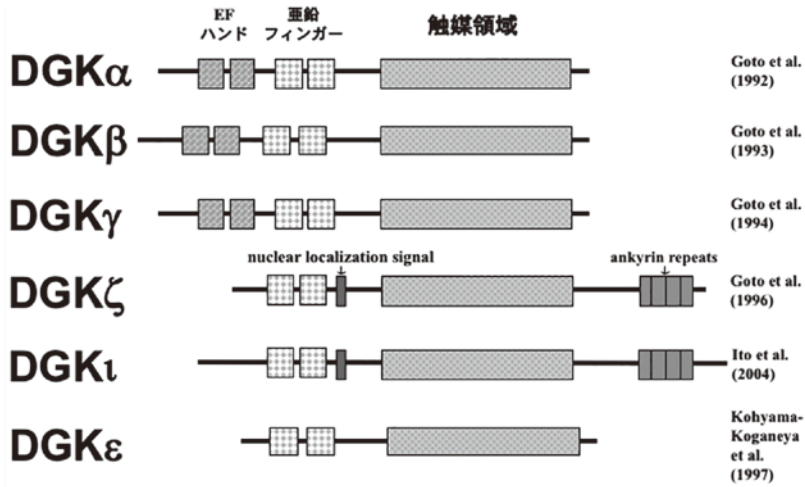


図3. ラットジアシルグリセロール (DGK) アイソザイムの構造 (模式図)

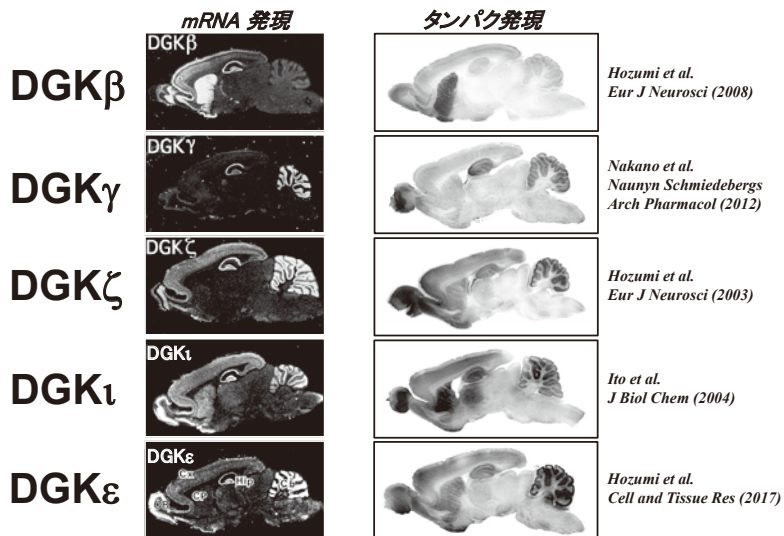


図4. ラット DGK アイソザイムの脳内発現

Cb: cerebellum 小脳, CP: caudate-putamen 線条体, Cx: cerebral cortex 大脳皮質, Hip: hippocampus 海馬, OB: olfactory bulb 嗅球

供与され、様々な器官での DGK ファミリーの発現局在および細胞内における機能解析が進められてきた¹³⁻¹⁶⁾。

本稿ではこのうち、線条体に強い発現がみられる DGKβ および基質特異性を持つ DGKε について、形態学的解析からみえてきた各 DGK アイソザイムの細胞内機能について概説する。

β (ベータ) 型ジアシルグリセロールキナーゼ (DGKβ)

DGKβ mRNA 発現は、線条体に強く認められるという特徴がある (図4)。特異抗体を用いて免疫組織化学染色を行うと、mRNA の発現パターンと同様に、DGKβ タンパクは線条体と海馬に強い発現が認められ

(4)

DGK β and DGK ϵ in the central nervous system

た。DGK β の神経細胞内での局在を詳細に検討するために、包埋前金コロイド銀増感免疫電子顕微鏡法を行った。その結果、DGK β の局在を示す黒い反応構造物は、線条体投射ニューロンの樹状突起と棘突起の細胞膜上や膜直下に認められた(図5上)。さらに反応構造物の中心と細胞膜までの距離をそれぞれ測り、統計学的な解析を行った。抗体として使用されるIgGの長さは約35 nmとされ、40 nmを指標にしてそれ以内であれば細胞膜にあると判定することが出来る。その結果、dendrite(樹状突起)およびspine(棘突起)の各領域では、細胞膜と反応構造物中心の距離が40 nmである割合が高く、統計学的にもDGK β が細胞膜上に局在あるいは非常に近接して局在することが明らかとなった(図5下)。次に棘突起、特にシナプス後膜肥厚における分子の局在を解析する方法である包埋後金コロイド免疫電子顕微鏡法を施行した。細胞膜上の金コロイド中心とシナプス後膜肥厚の端までの距離を測定したところ、DGK β がシナプス後膜肥厚内部にはほとんど存在せず、シナプス外のシナプス後膜肥厚近傍、いわゆるペリシナプスに高い割合で局在していた

(図6)。以上の研究から、電子顕微鏡レベルでDGK β が線条体投射ニューロンの細胞膜、特に棘突起ではペリシナプスの細胞膜に局在することが明らかとなった¹⁷⁾。

次に、DGK β ノックアウトマウスを用いて、孤立性にニューロンが描出されるGolgi鍍銀法を使って線条体投射ニューロンの形態解析を行った(図7)。一見すると違いがないように見えるが、樹状突起に注目すると、棘突起の数がDGK β ノックアウト(KO)マウスで減少していた。形態計測で、樹状突起の分岐ごとの区域に分けて棘突起の数を統計的に解析したところ、細胞体に近い近位部の樹状突起の棘突起の数に差は見られなかったが、入力により棘突起の数が変化する遠位部の樹状突起において、DGK β -KOマウスで棘突起の数が減少していた。この結果はDGK β が可塑性に富む遠位部の樹状突起で、棘突起の形成に重要であることを示唆するものである¹⁸⁾。また、遺伝子工学的な手法により、野生型DGK β と酵素活性を欠失するDGK β の変異体ベクターを作製して海馬初代培養細胞に遺伝子導入して解析したところ、点状に樹状突

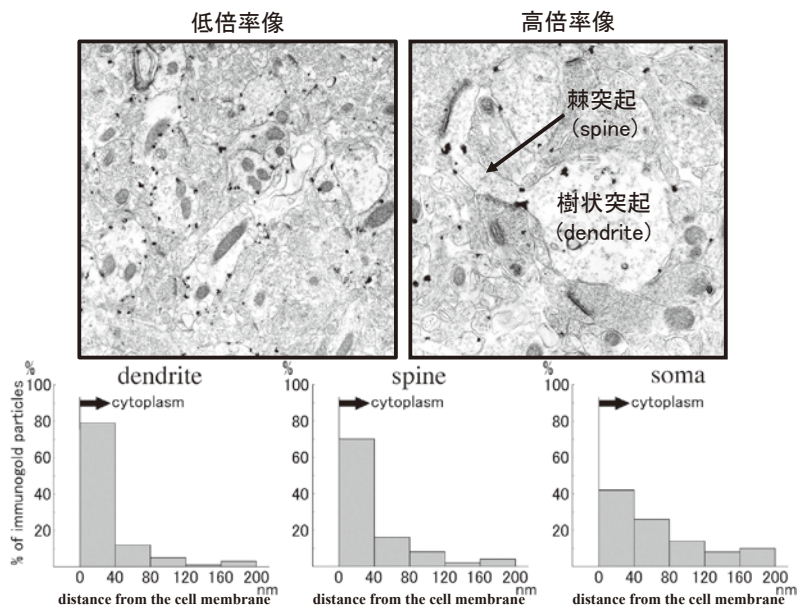


図5. 線条体投射ニューロンにおけるDGK β の微細局在(包埋前金コロイド銀増感免疫電子顕微鏡法)(文献17)

DGK β の局在を示す黒い反応構造物は、線条体投射ニューロンの樹状突起と棘突起の細胞膜上や膜直下に認められる(上の画像)。統計学的にもDGK β が細胞膜上に局在あるいは非常に近接して局在することが明らかとなった(下のグラフ)。

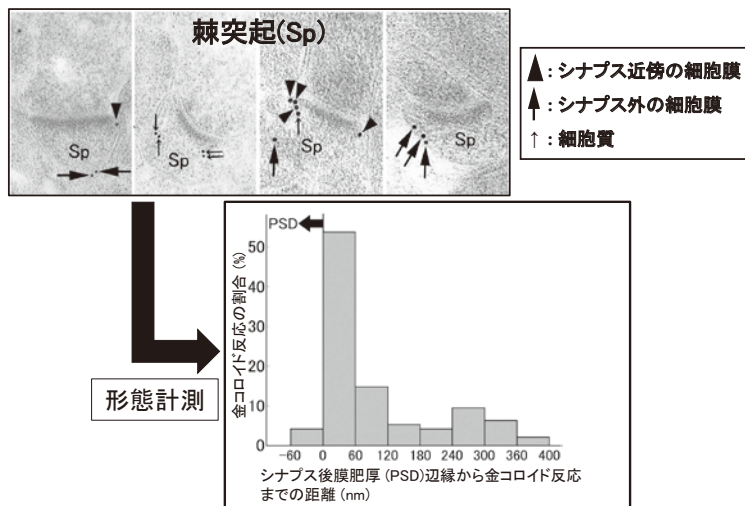


図6. 線条体投射ニューロンにおける DGK β の微細局在 (包埋後金コロイド免疫電子顕微鏡法) (文献 17) DGK β はシナプス後膜肥厚内部にはほとんど存在せず, ペリシナプスの細胞膜に高い割合で局在する. PSD: postsynaptic density, Sp: spine

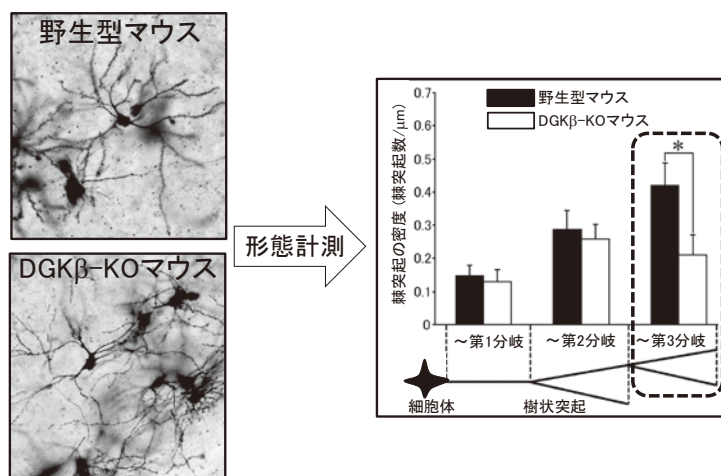


図7. Golgi 鍍銀法による DGK β ノックアウト (KO) マウス線条体解析 (文献 18) 遠位部の樹状突起において, DGK β -KO マウスで棘突起の数が減少する.

起の細胞膜上に認められた野生型 DGK β と異なり, 酵素活性欠失型 DGK β は樹状突起の細胞質にびまん性に局在し, 野生型とは局在が全く異なっていた. このことから, DGK β の酵素活性の変化により, 細胞内情報伝達系に異常が起こる可能性が示されている¹⁹⁾.

ϵ (イプシロン) 型ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK ϵ)

DGK ϵ はグリセロール骨格の *sn*-2 の位置にアラキドン酸を含むジアシルグリセロールを特異的にリン酸化する基質特異性を持っており, アラキドノイル DGK とも呼ばれる. この基質特異性は, 他の DGK ファ

(6)

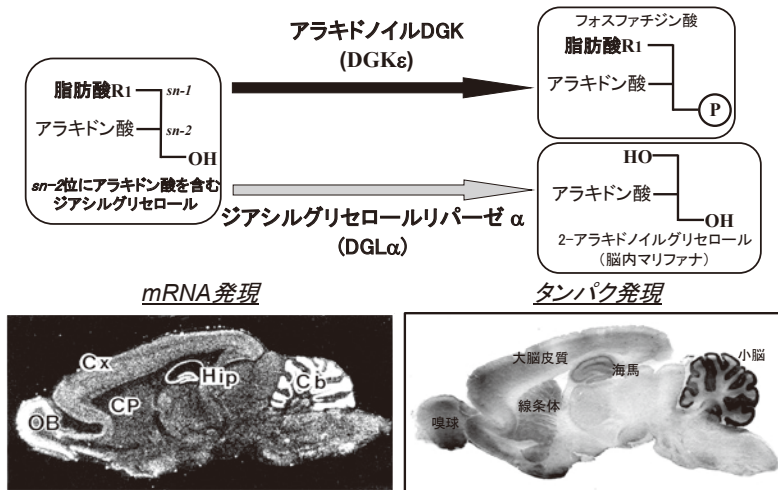
DGK β and DGK ϵ in the central nervous system

図8. アラキドノイル DGK (DGK ϵ) の脳内発現
Cb: cerebellum 小脳, CP: caudate-putamen 線条体, Cx: cerebral cortex 大脳皮質, Hip: hippocampus 海馬, OB: olfactory bulb 嗅球

ミリーにはない特徴である。一方、同じこの DG を代謝する酵素として、DG リパーゼ α (DGL α) が挙げられる。この分子は脳内マリファナとして働く 2-アラキドノイルグリセロールを産生する主要な酵素とされている。この両者は基質を共有することから、DGK ϵ は 2-アラキドノイルグリセロールの量的な制御にも関与する可能性が示唆されている (図8)。特異抗体で脳内での DGK ϵ タンパクの発現をみると、mRNA 発現パターンとはほぼ一致して嗅球、大脳皮質、線条体、海馬と、脳全体に広く認められ、特に小脳に強く認められた (図8)。この小脳に注目すると、DGK ϵ の反応はプルキンエ細胞層と分子層に認められ、多くはプルキンエ細胞の樹状突起の表層部に、粗大な顆粒状に認められた (図9 矢印)。細胞内小器官への DGK ϵ の局在を検討する目的で包埋前金コロイド銀増感免疫電子顕微鏡法を行なった結果、DGK ϵ の反応はプルキンエ細胞の樹状突起で、細胞膜直下の滑面小胞体である表面下槽 (subsurface cistern) の内部に認められた (図10 矢印)。表面下槽は細胞外から流入したカルシウムにより、カルシウムを細胞内に放出する役割を持っている。表面下槽への DGK ϵ の局在は、DGK ϵ がカルシウムの細胞内への放出に関係している可能性を示す²⁰⁾。また、基質を共有する DGK ϵ と DGL α の局在を共焦点レーザー顕微鏡で解析したところ、DGL α はプルキンエ細胞の樹状突起の表層部に数

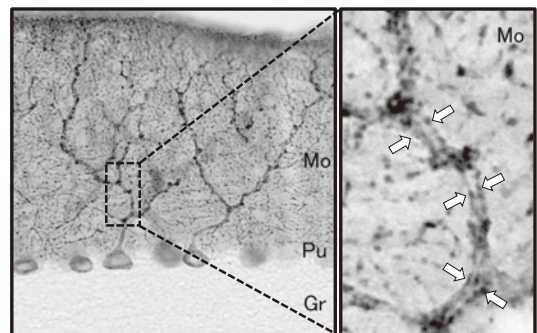


図9. 小脳における DGK ϵ の発現および局在 (文献20)

DAB 染色による免疫組織化学染色。DGK ϵ 免疫反応は小脳プルキンエ細胞の樹状突起の表層部に、粗大な顆粒状に認められる (矢印)。Gr: granular layer, Mo: molecular layer, Pu: Purkinje cell layer

珠状構造として認められた。一方、DGK ϵ の反応は DGL α の反応と隣接し、その深層部に認められた²⁰⁾。DGL α は棘突起の根本である頸部の細胞膜に局在すると報告されており²¹⁾、両者が細胞膜近傍で隣接して機能する可能性が示された。

DGK ϵ 喪失の個体への影響を検討するため、DGK ϵ -KO マウスを用いて行動解析の1つであるロータロッド試験を行った。ロータロッド試験は回転棒にマウス

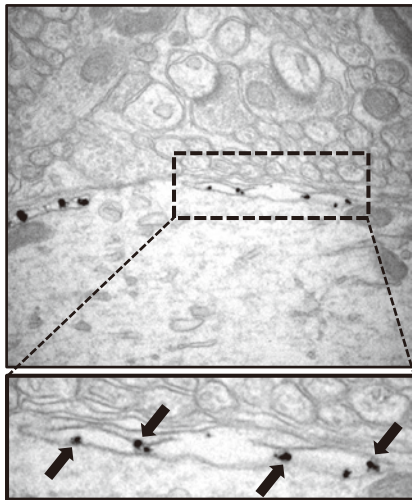


図 10. 小脳プルキンエ細胞における DGKε の微細局在 (包埋前金コロイド銀増感免疫電子顕微鏡法) (文献 20)

DGKε はプルキンエ細胞の樹状突起で、細胞膜直下の滑面小胞体である表面下槽 (subsurface cistern) の内部に認められる (矢印)。

をのせ、棒の回転速度を徐々に上げていって、マウスが落下するまでの時間を測定する。これを 1 日 1 回、連続 5 日間行った。野生型マウスは回を重ねるごとに回転棒に乗っている時間が長くなっていて学習効果が認められたが、DGKε-KO マウスは回を重ねても回転棒に乗っている時間が短いままで、DGKε-KO マウスは協調運動の学習能力が低下していた (図 11)²⁰。形態学的な解析と合わせて、DGKε は小脳のプルキンエ細胞の表面下槽で DGLα と隣接して協調運動に関係して機能する可能性があり、現在 KO マウスを用いた形態解析を進めている (図 12)。

DGK とヒト疾患

ヒト DGKβ の解析により、双極性障害患者の前頭葉に特異的に DGKβ の C 端側に欠失するスプライス変異体が発現していることが報告されている²²⁾。また、DGKε を抑制すると、ハンチントン舞踏病の病因となるタンパクを作るカスパーゼ 3 の活性が抑制されることが報告され、DGKε の抑制がハンチントン舞踏病の治療に有効である可能性が示唆されている²³⁾。このように DGK は、アイズザイムごとに疾患と関連する可能性が明らかになりつつあり、今後は DGK をはじめ

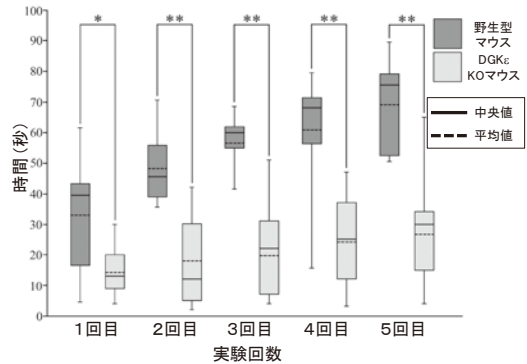


図 11. DGKε-KO マウスを用いたロータロッド試験 (文献 20)

DGKε-KO マウスは協調運動の学習能力が低下する。

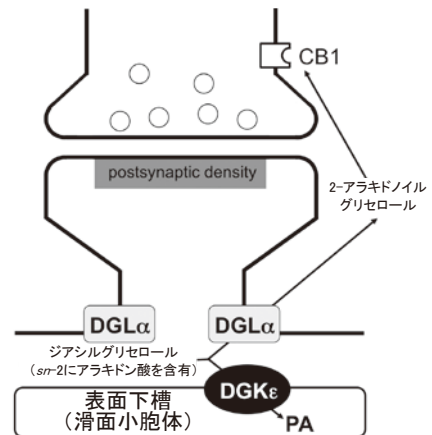


図 12. DGKε と DGLα の局在と機能 (文献 20 の図を改変)

CB1 : cannabinoid receptor type 1

としたイノシトールリン脂質代謝関連分子とヒト疾患の関連を常に念頭に置き、研究を進めたいと考えている。

おわりに

これまでの研究をふまえ、分子の発現の多様性や細胞内局在を知ることがその分子の機能解明につながると考え、広く特異抗体を用いた免疫組織化学染色を行い、各種顕微鏡を駆使して形態学による研究を推進していきたい。

文 献

- 1) Nishizuka, Y. (1992) Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*, **258**, 607-614.
- 2) Goto, K., Watanabe, M., Kondo, H., Yuasa, H., Sakane, F. and Kanoh, H. (1992) Gene cloning, sequence, expression and in situ localization of 80 kDa diacylglycerol kinase specific to oligodendrocyte of rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **16**, 75-87.
- 3) Goto, K. and Kondo, H. (1993) Molecular cloning and expression of a 90-kDa diacylglycerol kinase that predominantly localizes in neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **90**, 7598-602.
- 4) Goto, K., Funayama, M. and Kondo, H. (1994) Cloning and expression of a cytoskeleton-associated diacylglycerol kinase that is dominantly expressed in cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **91**, 13042-13046.
- 5) Goto, K. and Kondo, H. (1996) A 104-kDa diacylglycerol kinase containing ankyrin-like repeats localizes in the cell nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **93**, 11196-11201.
- 6) Ito, T., Hozumi, Y., Sakane, F., Saino-Saito, S., Kanoh, H., Aoyagi, M., Kondo, H. and Goto, K. (2004) Cloning and characterization of diacylglycerol kinase iota splice variants in rat brain. *J. Biol. Chem.*, **279**, 23317-23326.
- 7) Goto, K. and Kondo, H. (2004) Functional implications of the diacylglycerol kinase family. *Adv. Enzyme Regul.*, **44**, 187-199.
- 8) Goto, K., Nakano, T. and Hozumi, Y. (2006) Diacylglycerol kinase and animal models: the pathophysiological roles in the brain and heart. *Adv. Enzyme Regul.*, **46**, 192-202.
- 9) Hozumi, Y., Watanabe, M. and Goto, K. (2010) Signaling cascade of diacylglycerol kinase β in the pituitary intermediate lobe: dopamine D2 receptor/phospholipase C β 4/diacylglycerol kinase β /protein kinase C α . *J. Histochem. Cytochem.*, **58**, 119-129.
- 10) Hozumi, Y., Matsui, H., Sakane, F., Watanabe, M. and Goto, K. (2013) Distinct expression and localization of diacylglycerol kinase isozymes in rat retina. *J. Histochem. Cytochem.*, **61**, 462-476.
- 11) Hozumi, Y., Akimoto, R., Suzuki, A., Otani, K., Watanabe, M. and Goto, K. (2015) Expression and localization of the diacylglycerol kinase family and of phosphoinositide signaling molecules in adrenal gland. *Cell Tissue Res.*, **362**, 295-305.
- 12) Hozumi, Y., Nakano, T., Tanaka, T. and Goto, K. (2016) Localization of diacylglycerol kinase ζ in rat pancreatic islet cells under normal and streptozotocin-induced stress conditions. *Arch. Histol. Cytol.*, **76**, 23-33.
- 13) Nakano, T., Hozumi, Y., Goto, K. and Wakabayashi, I. (2012) Involvement of diacylglycerol kinase γ in modulation of iNOS synthesis in Golgi apparatus of vascular endothelial cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **385**, 787-795.
- 14) Tanaka, T., Okada, M., Hozumi, Y., Tachibana, K., Kitahara, C., Hamamoto, Y., Martelli, A.M., Topham, M.K., Iino, M. and Goto, K. (2013) Cytoplasmic localization of DGK ζ exerts a protective effect against p53-mediated cytotoxicity. *J. Cell Sci.*, **126**, 2785-2797.
- 15) Matsui, H., Hozumi, Y., Tanaka, T., Okada, M., Nakano, T., Suzuki, Y., Iseki, K., Kakehata, S., Topham, M.K. and Goto, K. (2014) Role of the N-terminal hydrophobic residues of DGK ϵ in targeting the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta*, **1842**, 1440-1450.
- 16) Tsuchiya, R., Tanaka, T., Hozumi, Y., Nakano, T., Okada, M., Topham, M.K., Iino, M. and Goto, K. (2015) Downregulation of diacylglycerol kinase ζ enhances activation of cytokine-induced NF- κ B signaling pathway. *Biochim. Biophys. Acta*, **1853**, 361-369.
- 17) Hozumi, Y., Fukaya, M., Adachi, N., Saito, N., Otani, K., Kondo, H., Watanabe, M. and Goto, K. (2008) Diacylglycerol kinase β accumulates on the perisynaptic site of medium spiny neurons in the striatum. *Eur. J. Neurosci.*, **28**, 2409-2422.
- 18) Hozumi, Y., Kakefuda, K., Yamasaki, M., Watanabe, M., Hara, H. and Goto, K. (2015) Involvement of diacylglycerol kinase β in the spine formation at distal dendrites of striatal medium spiny neurons. *Brain Res.*, **1594**, 36-45.
- 19) Hozumi, Y., Watanabe, M., Otani, K. and Goto, K. (2009) Diacylglycerol kinase β promotes dendritic outgrowth and spine maturation in developing hippocampal neurons. *BMC Neurosci.*, **10**, 99.
- 20) Hozumi, Y., Fujiwara, H., Kaneko, K., Fujii, S.,

- Topham, M.K., Watanabe, M. and Goto, K. (2017) Diacylglycerol kinase ϵ localizes to subsurface cisterns of cerebellar Purkinje cells. *Cell Tissue Res.*, **368**, 441-458.
- 21) Yoshida, T., Fukaya, M., Uchigashima, M., Miura, E., Kamiya, H., Kano, M. and Watanabe, M. (2006) Localization of diacylglycerol lipase- α around post-synaptic spine suggests close proximity between production site of an endocannabinoid, 2-arachidonoyl-glycerol, and presynaptic cannabinoid CB1 receptor. *J. Neurosci.*, **26**, 4740-4751.
- 22) Caricasole, A., Bettini, E., Sala, C., Roncarati, R., Kobayashi, N., Caldara, F., Goto, K. and Terstappen, G.C. (2002) Molecular cloning and characterization of the human diacylglycerol kinase β (DGK β) gene : alternative splicing generates DGK β isoforms with different properties. *J. Biol. Chem.*, **277**, 4790-4796.
- 23) Zhang, N., Li, B., Al-Ramahi, I., Cong, X., Held, J.M., Kim, E., Botas, J., Gibson, B.W. and Ellerby, L.M. (2012) Inhibition of lipid signaling enzyme diacylglycerol kinase ϵ attenuates mutant huntingtin toxicity. *J. Biol. Chem.*, **287**, 21204-21213.