

二国間交流事業 共同研究報告書

平成24年3月31日

独立行政法人日本学術振興会理事長 殿

共同研究代表者所属・部局 神戸大学・バイオシグナル研究センター

職・氏名 (ふりがな) 教授・齋藤 尚亮 さいとう なおあき

1. 事業名 相手国（スペイン）との共同研究 振興会対応機関（CSIC）
2. 研究課題名 DGKalpha のチロシンリン酸化とその免疫応答・悪性転換における機能の解明

3. 全採用期間

平成 22 年 4 月 1 日 ~ 平成 24 年 3 月 31 日 (2 年 ヶ月)

4. 経費総額

(1) 本事業により執行した研究経費総額 4,821,933 円

初年度経費 2,450,000 円、 2年度経費 2,371,933 円、 3年度経費 円

(2) 本事業経費以外の国内における研究経費総額 円

5. 研究組織

(1) 日本側参加者（代表者は除く）

氏名 <small>(ふりがな)</small>	所属・職名	研究協力テーマ
白井 康仁 <small>しらい やすひと</small>	神戸大学・農学研究科・教授	慢性白血病における機能解明及び研究の総括 免疫染色 遺伝子操作動物の作製
上田 修司 <small>うえだ しゅうじ</small>	神戸大学・農学研究科・助教	
上山 健彦 <small>うえやま たけひこ</small>	神戸大学・バイオシグナル研究センター・准教授	
佐久間 恵 <small>さくま めぐみ</small>	神戸大学・医学研究科・大学院生	糖尿病合併症における機能解明
木曾 裕子 <small>きそ ゆうこ</small>	神戸大学・理学研究科・大学院生	免疫系における機能解明
足立 直子 <small>あだち なおこ</small>	神戸大学・バイオシグナル研究センター・助教	遺伝子操作動物の作製
中井 寛子 <small>なかい ひろこ</small>	神戸大学・農学研究科・大学院生	PA の可視化プローブの作製
池田 もも <small>いけだ もも</small>	神戸大学・理学研究科・大学院生	チロシンリン酸化の同定

(2) 相手国側研究代表者

所属・職名・氏名

スペイン科学研究高等会議(CSIC; Consejo Superior de Investigaciones Científicas)・

研究室長・Isabel Merida

(3) 相手国参加者（代表者は除く）

氏名	所属・職名（国名）	研究協力テーマ
Juana Antonia Anila- Flores	CSIC・研究員	T細胞における DGK の働きに関する研究
Pedro Torres Ayuso	CSIC・大学院生	癌の増悪化における DGK の機能解析
Denise Soutar	CSIC・大学院生	抗体の作製

6. 研究実績概要（全期間を通じた研究の目的・研究計画の実施状況・成果等の概要を簡潔に記載してください。）

細胞質膜上のG蛋白質結合型受容体にホルモンなどのリガンドが結合すると、ホスホリパーゼCの活性化により、ジアシルグリセロール(DG)が産生され、PKCをはじめとする様々な酵素が活性化される。一方、産生されたDGはDGキナーゼ(DGK)によってリン酸化され、ホスファチジン酸(PA)に変換される。即ち、DGKはPKCを間接的に抑制するとともに、新たな脂質シグナルを産生する脂質キナーゼである。本研究に先だち、我々はDG-PKC経路と、DGK-PA経路について総合的に解析し、いくつかの重要な生理機能においてPKC/DGKがの機能相関していることを明らかにしてきた。本研究では、DGK α の1) 糖尿病性腎症に対する保護作用、2) 免疫系における機能、3) 悪性転換(細胞周期制御・慢性白血病)における機能、に着目し、その機能メカニズムを明らかにすることを目的の実験を行った。以下、その成果を述べる。については未だ不明な点が多い。一方、心臓や免疫系におけるDGKの重要性が最近報告されている。従って、DGKを作用点とする創薬の開発が望まれるが、現在DGKを作用点とする薬剤はない。そこで、本研究ではこれまでの研究に基づき、PKCとの機能協関を念頭におきながら神経系及び腎糸球体機能維持におけるDGKの役割を解明するとともに、将来的なDGKを作用点とするサブタイプ特異的薬剤の開発を目指している。本年度は、一方、DGK α の機能調節機構解明の一環として、チロシンリン酸化と局在調節の関係を調べた。その結果、c-SrcはDGK α の22番目及び334番目のチロシンをリン酸化することにより細胞質膜移行を誘導し(業績8)、一方、c-Ablによる218番目のチロシンをリン酸化は核外移行に必須であることが明らかとなった(業績7)。これらの事実は、DGK α は異なるチロシンリン酸化を介して、その構造や結合タンパク質などを変化させることにより、その局在、すなわち「いつどこで働くか」を決定していることを示唆していた。

1) 糖尿病性腎症に対する保護作用

(日本側)

1. ビタミンE刺激によりDGK α が活性化されることが、ビタミンEによる糖尿病性腎症改善に重要であることが示唆されている。このとき、Srcが活性化され、DGK α がチロシンリン酸化されることが必須であるが、そのリン酸化サイトは同定されていない。そこで、c-Srcによってリン酸化されるDGK α のチロシン残基の同定を試みた。その結果、22番目のチロシンがc-Srcによってリン酸化されることを明らかにした。実際に、22番目のチロシンをフィニルアラニンに置換した変位体では、活性化の指標であるビタミンEによる細胞質膜移行が阻害された。
2. DGK α KOマウスのホモ化に成功し、ストレプトゾトシンを投与し糖尿病を誘発させ、腎症の指標である尿量、クレアチンクリアランスなどについて野生型と比較した。その結果、DGK α KOマウスは野生型より早く腎症が重篤化することが示唆された。また、腎糸球体において、DGK α はポドサイトに多く発現していることが示された。ポドサイトはスリット膜を形成し腎濾過機能において重要な働きをしている

ことから、DGK α はポドサイトの機能を調節することによって腎機能において重要な働きをしていることが示唆された。

(スペイン側)

1. DGK α KOマウスのホモ化及び免疫染色に必要な、DGK α 特異抗体を作製し、日本側に供与した。

2) 免疫系における機能

(日本側)

1. ヒスタミン分泌における PKC の役割を解析し、PKC β が正に、PKC α が負に制御していることを明らかにした。この PKC α によるヒスタミン分泌の抑制は cofilin のリン酸化を介していた。さらに、ヒスタミン分泌における DGK の機能を解析したところ、DGK γ がカルシウム流入を制御することにより、ヒスタミン分泌に必須であることをつきとめた。一方、DGK α はヒスタミン分泌には関与していなかった。

(スペイン側)

1. T 細胞の分化には、DGK α の一時的な消失と、その後の DGK α の増加、さらにはチロシンリン酸化が重要であることを明らかにした。

3) 悪性転換（細胞周期制御・慢性白血病）における機能

(日本側)

1. DGK α による細胞周期の制御と慢性骨髄性白血病との関連を調べるため、c-Abl によるリン酸化部位の同定を試みた。その結果、DGK α の C1 ドメイン内に存在する 218 番目のチロシンが c-Abl によりリン酸化されることが明らかになった。そこで、リン酸化チロシンを特異的に認識する抗体を作製し、リン酸化された DGK α の細胞内局在を調べたところ、主に細胞質に認められた。また、218 番目のチロシンのチロシンをフェニルアラニンに置換した変位体では、血清添加による核外移行が優位に抑制された。これらのことから、血清添加により活性化された c-Abl により、218 番目のチロシンがリン酸化されることで DGK α の核外移行が制御されていることが示された。

(スペイン側)

2. 様々な肺癌細胞を用いて、その悪性度と DGK α およびチロシンリン酸化の程度との相関を検討した。その結果、肺癌細胞の悪性度と DGK α 発現量とチロシンリン酸化（活性化？）に相関が認められた。日本側が作製したチロシンリン酸化抗体を用いて、その局在を調べたところ、細胞質に認められ、我々の結果と一致した。