

論文内容要旨

論文題目

新規 DGK ゼータ結合蛋白 DEAD-box protein 5 (DDX5) による NF- κ B 制御機構の解析

責任講座： 整形外科学 講座
氏名： 田中 賢

【内容要旨】

ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) は、イノシトールリン脂質代謝系で産生されるジアシルグリセロールの代謝を介して細胞内情報伝達機構の制御に関与する。近年、ゼータ型 DGK (DGK ζ) の機能解析を目的に質量分析法を用いて結合蛋白の検索が行われているが、本研究では、新規 DGK ζ 結合蛋白として DEAD-box protein 5 (DDX5) を同定した。DDX5 は当初、RNA ヘリカーゼ活性を持つ分子として単離され、種々の転写因子に対する調節因子としての役割が報告されているが、未だ不明な点が多い。また最近の研究により DGK ζ は、炎症応答に主要な役割を果たす NF- κ B 経路を抑制的に制御することが明らかにされたことを踏まえ、本研究では DDX5 による NF- κ B 制御機構について解析を行った。実験では、HeLa 細胞および HEK293 細胞における DDX5 の細胞内局在や DDX5 ノックダウン細胞における NF- κ B p65 サブユニットの細胞内動態を形態学的に解析した。また I κ B と p65 サブユニットの発現およびリン酸化をウェスタンブロット法を用いて、そして NF- κ B 転写活性をルシフェラーゼアッセイ法を用いて検討した。

HeLa 細胞において、内在性 DDX5 は DGK ζ とともに主として核内に認められたが、その他細胞質にも検出された。TNF- α 刺激による p65 サブユニットの経時的な細胞内動態は、DDX5 ノックダウン細胞とコントロール細胞において、大きな変化を示さなかった。TNF- α 刺激による I κ B の発現にも、大きな変化は認められなかった。これらの結果から、DDX5 の発現減少は I κ B および p65 サブユニットの細胞内発現局在動態に影響を及ぼさないと考えられた。次に DDX5 ノックダウン細胞における p65 サブユニットのリン酸化レベルを解析すると、Ser 311 において大きく減少することが明らかとなった。DDX5 ノックダウン細胞の NF- κ B 転写活性は、コントロール細胞に比べて約 50%減少した。この結果、DDX5 の発現低下によって、p65 サブユニットのリン酸化を介する転写活性が抑制されることが示唆された。また TNF- α 刺激下での蛋白間結合を解析すると、p65 サブユニット、DGK ζ 、DDX5 の間に顕著な変化は認められなかった。

これまでの報告により、TNF- α 刺激による NF- κ B 活性化機構において DGK ζ ノックダウンは、p65 サブユニットの核内移行とリン酸化を促進することにより、NF- κ B 転写活性を亢進させることが示されている。本研究では、DDX5 ノックダウンが p65 サブユニットのリン酸化を抑制することにより、NF- κ B 転写活性を低下させることが明らかになった。すなわち、DGK ζ と DDX5 は NF- κ B 経路に対して相反する作用を及ぼす可能性が示唆される。

平成 27 年 1 月 19 日

山形大学大学院医学系研究科長 殿

学位論文審査結果報告書

申請者氏名： 田中 賢

論文題目： 新規 DGK ゼータ結合蛋白 DEAD-box protein 5 (DDX5)による NF- κ B 制御機構の解析

審査委員：主審査委員

永瀬 智



副審査委員

高木 理彰



副審査委員

内藤 輝



審査終了日：平成 27 年 1 月 15 日

【 論 文 審 査 結 果 要 旨 】

ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) は、イノシトールリン脂質代謝系を介する細胞内情報伝達機構において、ジアシルグリセロール (DG) をファスファチジン酸に変換する酵素である。DGK には 10 種類のアイソザイムがあり、その 1 つであるゼータ型 DGK (DGK ζ) は核移行シグナルや核外輸送シグナルを有し転写を調節すると考えられているが、その詳細な機能は十分には解明されていない。

田中氏は、DGK ζ の機能解析を行うため、新規 DGK ζ 結合蛋白の同定を行った。DGK ζ の免疫沈降物を質量分析法で解析し得られた候補結合蛋白のなかから、DEAD-box protein 5 (DDX5) に着目した。DDX5 は RNA の二次構造を解くヘリカーゼとして知られており、Estrogen receptor α 、Androgen receptor、p53 などの転写調節因子としての役割を有する。HEK293 細胞に GFP タグ DDX5 プラスミドを遺伝子導入し免疫沈降法を行ったところ、沈降物に内在性 DGK ζ を検出した。また、FLAG タグ DGK ζ プラスミドを HEK293 細胞に遺伝子導入した免疫沈降物に内在性 DDX5 を検出し、以上から DDX5 は DGK ζ の結合蛋白であることを明らかにした。

DGK ζ が転写因子 Nuclear factor- κ B (NF- κ B) の調節にも関与することが報告されており、NF- κ B 経路における DDX5 の役割について HeLa 細胞を用いて解析を行った。DDX5 ノックダウン細胞を TNF- α で刺激し、刺激前後の NF- κ B p65 サブユニットの細胞内動態と inhibitor of κ B (I κ B) の発現量を検討したが、コントロール細胞と比較し NF- κ B p65 サブユニットの細胞内動態や I κ B 発現量に有意な差は認めなかった。次に、DDX5 ノックダウン細胞における p65 サブユニットのリン酸化を解析した。TNF- α 刺激による p65 サブユニットの Ser311、Ser468、Ser536 の 3 か所のリン酸化を検討したところ、Ser311 におけるリン酸化が DDX5 ノックダウン細胞において著明に抑制されていることを見出した。さらに、NF- κ B の転写活性に与える影響をルシフェラーゼアッセイ法で検討したところ、DDX5 ノックダウンにより NF- κ B の転写活性が 50% に減少していることを確認した。

本研究は、DDX5 が DGK ζ の新規結合蛋白であることを見出し、そのノックダウンにより NF- κ B p65 サブユニットの Ser311 リン酸化を抑制し、NF- κ B の転写活性を抑制することを明らかにした。実験方法の記載や figure legend の修正など学位論文の体裁を整える必要があること、Ser311 のリン酸化部位についての文献的考察を加える必要があることが指摘されたが、審査委員会は、本研究論文を博士 (医学) の授与に値すると判定した。