

# 論文内容要旨

## 論文題目

細胞内二次伝達物質代謝酵素 Diacylglycerol kinase  $\zeta$ による低酸素応答メカニズムの制御

責任講座： 解剖学第二講座

氏名：秋元 亮

## 【内容要旨】(1,200字以内)

ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) ファミリーは生体膜リン脂質から産生される二次伝達物質ジアシルグリセロール (DG) の代謝を介して細胞内情報伝達を制御する。ゼータ型 DGK (DGK $\zeta$ ) は核内に局在するアイソザイムであるが、虚血や低酸素等のストレス応答において細胞質に移行しその後、分解され減少する。細胞は、低酸素や細胞内 ATP 枯渇状態に陥ると、Hypoxia-inducible factor-1 (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。本研究では、これら代謝ホメオスタシスに関連する HIF-1 $\alpha$ 、AMPK $\alpha$ 、SIRT1 の制御メカニズムにおける DGK $\zeta$  の役割を解析した。

DGK $\zeta$ ノックアウト (DGK $\zeta$ -KO) マウス由来のマウス胎児線維芽細胞 (MEF) および DGK $\zeta$ ノックダウン HeLa 細胞を低酸素濃度 (1%) 条件下に培養を行い、HIF-1 $\alpha$ 、SIRT1、AMPK $\alpha$ 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。

実験の結果、24 時間の低酸素負荷による HIF-1 $\alpha$ の発現誘導は、DGK $\zeta$ ノックダウン細胞において、コントロール細胞と比べて低く抑えられていることが示された。また SIRT1 発現は、野生型 MEF では僅かな減少であったが、DGK $\zeta$ -KO MEF では著しい減少が認められた。一方、ATP の減少に応答して活性化される AMPK $\alpha$ のリン酸化は、DGK $\zeta$ -KO MEF において増加しており、DGK $\zeta$ の発現減少によって、AMPK $\alpha$ の活性化が亢進することが明らかとなった。AMPK $\alpha$ の活性化は主として、Liver kinase B 1 (LKB1) により制御されることが報告されているので、このリン酸化酵素の解析を行ったところ、LKB1 の活性はむしろ DGK $\zeta$ -KO MEF において減少していることが判明した。LKB1 は細胞内エネルギー減少を感知する経路を介して活性化を受け AMPK $\alpha$ をリン酸化することが報告されているので、次に細胞内 ATP 量の測定を行った。その結果、通常酸素圧および低酸素曝露の両条件下において、DGK $\zeta$ -KO MEF における ATP 量は野生型 MEF の約 1.5 倍と高値を示すことが判明した。

以上の結果より、DGK $\zeta$ 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 HIF-1 $\alpha$ および SIRT1 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 $\zeta$ 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 $\zeta$ 発現減少による細胞内 ATP 量の増加に対応したものである可能性がある。一方、AMPK $\alpha$ 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推測されるが、AMPK $\alpha$ 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 $\zeta$ 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、DGK $\zeta$ 発現減少に伴う細胞内 ATP 増加のメカニズムおよび AMPK $\alpha$ 活性化メカニズムを解析することにより、DGK $\zeta$ による代謝ホメオスタシスの制御メカニズムを追求していきたい。

平成 29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：秋元 亮

論文題目：細胞内二次伝達物質代謝酵素 Diacylglycerol kinase $\zeta$ による低酸素応答メカニズムの制御

審査委員：主審査委員

本郷 誠治 (本郷)

副審査委員

加藤 丈夫 (加藤)

副審査委員

石井 邦明 (石井)

審査終了日：平成 29年 1月 17日

### 【 論文審査結果要旨 】

ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) ファミリーは生体膜リン脂質から産生される二次伝達物質ジアシルグリセロール (DG) の代謝を介して細胞内情報伝達を制御する。ゼータ型 DGK (DGK $\zeta$ ) は虚血や低酸素等の低エネルギー状態の応答メカニズムに関与すると推測されるが、その詳細な機序は不明である。本研究では、細胞内の代謝ホメオスタシスを司る主要な3つのエネルギーセンサータンパク質である Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)、Sirtuin 1 (SIRT1)、AMP-activated kinase (AMPK) の制御メカニズムにおける DGK $\zeta$ の役割を細胞の低酸素曝露モデルを用いて解析した。

DGK $\zeta$ ノックアウト (DGK $\zeta$ -KO) マウス由来のマウス胎児線維芽細胞および DGK $\zeta$ ノックダウン HeLa 細胞を低酸素濃度 (1%) 条件下に培養を行い、HIF-1 $\alpha$ 、SIRT1、AMPK $\alpha$ 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。

24時間の低酸素負荷により HIF-1 $\alpha$ の発現が誘導されたが、DGK $\zeta$ ノックダウン細胞で見られた誘導の程度はコントロール細胞より低かった。また低酸素負荷により SIRT1 発現が低下したが、その程度は野生型細胞より DGK $\zeta$ -KO 細胞の方が大きかった。この SIRT1 発現の低下は転写レベルで起きていた。細胞内の ATP 減少に反応して活性化される AMPK $\alpha$ のリン酸化は、DGK $\zeta$ -KO 細胞で増加しており、DGK $\zeta$ の発現減少によって、AMPK $\alpha$ の活性化 (リン酸化) が亢進することが明らかになった。AMPK $\alpha$ は主として Liver kinase B 1 (LKB1) により活性化されると報告されているので、このリン酸化酵素の解析を行ったところ、低酸素負荷による LKB1 の活性化 (リン酸化) の程度は DGK $\zeta$ -KO で低かった。LKB1 は細胞内エネルギー減少を感知する経路を介して活性化を受けると報告されているので、細胞内 ATP 量を測定すると、通常酸素圧および低酸素曝露の両条件下において、DGK $\zeta$ -KO 細胞の ATP 量は野生型細胞の約 1.5 倍と高かった。

以上の結果より、DGK $\zeta$ が低酸素曝露による HIF-1 $\alpha$ および SIRT1 の発現誘導に関与することが明らかになった。また、低酸素曝露条件下において、DGK $\zeta$ 発現減少細胞では ATP 量が増加するにもかかわらず AMPK $\alpha$ のリン酸化 (活性化) レベルは高い状態にあるという解明すべき課題が明らかになった。

本研究により細胞レベルでの低酸素応答における DGK $\zeta$ の関与が明らかになったという知見に加え、本学位論文が論理的に構成されていること、さらに本審査会での質疑に的確に回答し、本研究で生じた課題を解明する研究方針も述べることであったことから、博士 (医学) の授与に値するものと判断した。

(1, 200字以内)