

論文内容要旨

論文題目

肝再生過程におけるジアシルグリセロールキナーゼの機能解析について

責任分野： 組織細胞生物学分野

氏名： 中野 知之

【内容要旨】 (1,200 字以内)

ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) は脂質性二次メッセンジャーであるジアシルグリセロール (DG) の代謝を介してプロテインキナーゼ C (PKC) の活性を制御すると考えられている。肝臓は高い組織再生能を有する臓器であり、これまで肝再生過程において核内のイノシトールリン脂質代謝系の関与が報告されている。

本研究ではラット 70%肝部分切除モデルを用いて肝再生過程における DGK アイソザイムの発現解析を行った。正常肝においては主として、DGK ζ と DGK α の遺伝子発現が検出された。正常肝における DGK ζ 免疫陽性反応は全体の約 3%の肝細胞の核内に認められた。免疫反応は核内において、粗大な顆粒状構造物として検出され、核小体は陰性であった。肝部分切除 1 日および 10 日後の再生過程では、DGK ζ 免疫陽性反応を示す肝細胞が大幅に増加し、ほぼ全ての肝細胞に認められるようになった。DGK ζ の発現亢進と DNA 合成期の関連を明らかにするために、肝再生過程において BrdU (DNA 合成期マーカー) との二重染色を行った結果、正常肝では BrdU 陽性反応はほとんど認められなかったが、切除 1 日後において多くの BrdU 陽性細胞が検出された。しかしながら増加した DGK ζ 免疫陽性肝細胞の中で BrdU 反応と一致するものは全体の約 30%に過ぎなかった。ヒト肝癌細胞由来の HepG2 細胞においても同様の結果であったことから DGK ζ の発現亢進が肝再生過程の細胞分裂誘導に直接的に関与する可能性は低いと考えられた。またウェスタンブロット法により、DGK ζ のタンパク発現は肝再生過程において顕著な亢進を示したが、RT-PCR 解析の結果、DGK ζ の mRNA 発現は正常肝および肝再生過程においてほぼ一定であることが明らかとなり、DGK ζ の発現はタンパクレベルで調節されている可能性が示唆された。

一方、DGK α 免疫陽性反応は正常肝において、肝細胞の細胞質に検出され、再生過程での局在変化は認められなかった。しかしながらウェスタンブロット解析の結果、正常および肝切除 1 日後においては野生型 80kDa の DGK α に加えてやや小さい 70kDa のタンパク発現が検出されるが、肝切除 10 日後では野生型のみが発現が検出されることが明らかとなり、肝再生過程において DGK α のスプライシング/プロセッシングに変化が生じる可能性が示唆された。

本研究では、肝再生過程において、核内に局在する DGK ζ のタンパク発現が増加すること、また細胞質に局在する DGK α のスプライシング/プロセッシングに変化が生じる可能性を明らかにした。これらの所見は肝再生過程において、核内および細胞質における DG の代謝が大きく変化する可能性を示唆する。

平成 19 年 1 月 25 日

山形大学大学院医学系研究科長 殿

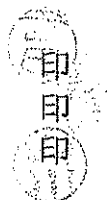
学位論文審査結果報告書

申請者氏名：中野 知之

論文題目：肝再生過程におけるジアシルグリセロールキナーゼの機能解析について

審査委員：主審査委員
副審査委員
副審査委員

吉田 匡
荻野 利孝
山川 光徳



審査終了日：平成 19 年 1 月 15 日

論文審査結果要旨

ジアシルグリセロール (DG) はプロテインキナーゼ C を活性化することによって、細胞の分裂や分化などの多彩な生理機能の発現に関与する。DG はジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) によって代謝されるため、DGK 活性が細胞内の DG 濃度を調節し結果的に細胞機能を調節することになる。そこで、中野君は DGK 活性が細胞分裂とどのような関わりを持つかに注目し、ラットの再生肝等を用いて検討した。

正常肝では六種のアイソザイムのうち α と γ の二つが著明に発現されていたため、本研究ではこの二種に注目しその変動を追跡した。免疫組織像では DGK γ は約 3% の正常肝細胞核内にしか認められなかったが、70% 肝切除 1 日後の肝臓では免疫陽性細胞が大幅に増加し、10 日後にはほぼ全てが陽性細胞であった。次に、DGK γ タンパク質のこのような発現増大が、その mRNA 量の増加によって惹起されているかどうかを RT-PCR 法で検討した所、興味深いことに mRNA 発現量は正常及び再生過程の肝細胞でもほぼ一定であった。因って、DGK γ タンパク質の発現は転写段階で制御されているのではなく、翻訳段階で調節されている可能性が高い事が示された。

次に、DGK γ の発現が肝再生に関与しているかを検討するため、DNA 合成期マーカーである BrdU を用いて DGK γ との二重染色を行った。肝切除後 1 日目では BrdU 陽性細胞は増加したが、DGK γ 陽性細胞と一致する細胞は約 30% に過ぎなかった。同様の結果はヒト肝癌細胞由来の HepG2 細胞でも観察された。また、分裂増殖しない初代培養肝細胞では培養 3-5 日後には全ての細胞で、正常細胞では殆ど認められなかった DGK γ 陽性顆粒の出現が観察された。以上の結果を総合すると DGK γ の発現と細胞分裂との相関は低いと思われる。

DGK α については、免疫組織像にも mRNA 量にも肝再生過程において大きな変動は認められなかった。然し、SDS-PAGE 後のウエスタンブロットでは正常や切除 1 日目の肝細胞では本来の 80 kDa のバンドの他にやや小さい 70 kDa のバンドも検出された。然し、この 70 kDa バンドは切除後 10 日目には消え、80 kDa のバンドしか検出されなかった。mRNA の成熟過程に何らかの変化が起こった事を示唆している。

以上のように中野君は肝再生過程において、DGK γ と α によって DG 代謝が大きく変動する事を発見した。更には、 γ 種の翻訳時での調節、 α 種の mRNA 生成でのプロセッシングの変化の可能性など今後解明に値する新知見を得ている。審査会は本研究を高く評価し、本研究は博士 (医学) の学位を授与するに値するものと判定した。