

論文内容要旨

論文題目

ϵ 型ジアシルグリセロールキナーゼの細胞内局在化機構および小胞体ストレスにおける機能的解析

責任講座：耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 講座

氏名： 松井 祐興

【内容要旨】(1,200字以内)

背景：細胞内情報伝達機構においてイノシトールリン脂質代謝回転は、ジアシルグリセロール (DG) とイノシトール 3 リン酸 (IP3) を産生する。ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) はプロテインキナーゼ C (PKC) の生理的活性化因子である DG をリン酸化し、ホスファチジン酸 (PA) に変換する。 ϵ 型 DGK (DGK ϵ) は全てのアイソザイムに共通する亜鉛フィンガーと触媒領域を有する分子量 64kDa の小さなアイソザイムである。これまでの研究により、DGK ϵ 活性は小胞体画分に認められ、その局在は培養細胞への遺伝子導入実験において小胞体マーカーと一致することが報告されているが、その局在化メカニズムおよび機能は不明である。本研究では、DGK ϵ の細胞内局在化機構のおよび小胞体ストレス下における機能的役割を解析した。

方法：種々の DGK ϵ 変異型を GFP 発現ベクターにサブクローニングし、共焦点レーザー顕微鏡を用いて遺伝子導入細胞における細胞内局在解析を行った。また、DGK ϵ をノックダウンした NIH3T3 細胞および DGK ϵ -KO マウス由来の mouse embryonic fibroblasts (MEF) を用いて、Thapsigargin および Tunicamycin 誘導小胞体ストレス下における細胞生存率の測定、アポトーシスや小胞体ストレス関連タンパク質の発現を検討した。

結果：遺伝子導入 HeLa 細胞において、野生型 DGK ϵ は小胞体マーカーの局在と一致した。また、種々の欠失型 DGK ϵ の導入実験により、N端側 DGK ϵ (aa.1-55) も小胞体に局在することが判明した。さらに、DGK ϵ (aa.1-55) に含まれる疎水性の高い 21 残基の領域 DGK ϵ (aa.20-40) のみで小胞体に局在することから、いくつかの疎水性アミノ酸の置換実験を行った。その結果、最小疎水性アミノ酸 Ala に置換した変異体 DGK ϵ (aa.20-40/L22A,L25A,L29A) は小胞体に局在するが、親水性アミノ酸 Gln に置換した変異体 DGK ϵ (aa.20-40/L22Q,L25Q,L29Q) は細胞質および核内にび慢性に認められた。よって、DGK ϵ の小胞体局在化には、aa.20-40 の疎水性領域が重要な役割を果たすことが明らかとなった。小胞体ストレス実験において、DGK ϵ ノックダウン細胞および DGK ϵ -KO MEF ではコントロールと比較し細胞生存率の低下が認められた。また、DGK ϵ -KO MEF において小胞体品質管理機構分子の発現パターンが野生型 MEF と異なっており、アポトーシスの早期進行が観察された。

考察：DGK ϵ の小胞体局在化には、疎水性アミノ酸に富む 20-40 アミノ酸領域が重要な役割を果たす。DGK ϵ ノックダウンおよび DGK ϵ -KO 細胞は小胞体ストレスに対して脆弱性を示すことから、DGK ϵ は小胞体ストレスの制御機構に関与すると考えられる。

平成 25 年 1 月 22 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： 松井 祐興

論文題目： ϵ 型ジアシルグリセロールキナーゼの細胞内局在化機構
および小胞体ストレスにおける機能解析

審査委員：主審査委員 中島 修 

副審査委員 後藤 薫 

副審査委員 欠畑 誠治 

審査終了日：平成 25 年 1 月 10 日

【 論文審査結果要旨 】

松井祐興氏は、本研究において、ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) アイソザイムの一つである DGK ϵ の細胞内局在化機構を明らかにする目的で、種々のラット DGK ϵ 変異体との GFP 融合タンパク質の発現ベクターを作製し、これらベクターを用いて、共焦点レーザー顕微鏡による GFP 蛍光観察により、融合タンパク質の培養細胞内での細胞内局在を解析した。加えて、小胞体に局在する DGK ϵ の、小胞体ストレス応答における機能を明らかにすることを目的として、DGK ϵ 遺伝子破壊マウスよりマウス胎児繊維芽細胞 (MEF) を作製した DGK ϵ -KO MEF および、siRNA による DGK ϵ ノックダウンした細胞に対して、小胞体ストレス誘導試薬を処理し、細胞生存率や種々の小胞体ストレス応答・アポトーシス関連因子の発現解析を行い、以下の点を明らかにした。

1. DGK ϵ の小胞体局在化には、ジアシルグリセロールキナーゼ活性 (酵素活性) は必要なく、疎水性アミノ酸が豊富な、ラット DGK ϵ N 末端から 20~40 番目のアミノ酸領域が必要にして十分である。
2. DGK ϵ 小胞体局在化シグナルであるラット DGK ϵ (aa. 20-40) 内に存在する疎水性アミノ酸であるロイシン (L22, L25, L29) を親水性アミノ酸であるグルタミンへ変換すると、小胞体局在化能を失うことから、DGK ϵ (aa. 20-40) の疎水性が、小胞体局在には重要である。
3. 小胞体ストレス試薬処理により、DGK ϵ ノックダウン細胞および DGK ϵ -KO MEF では、コントロール群と比較して、有意に細胞生存率の低下が観察され、また、小胞体ストレス試薬を処理した DGK ϵ -KO MEF では、野生型 MEF と比較して、アポトーシスマーカーである PARP の断片化が早期に観察されることから、DGK ϵ 欠損細胞では小胞体ストレス感受性が亢進する。
4. 小胞体ストレス試薬を処理した DGK ϵ -KO MEF では、野生型 MEF と比較して、種々の小胞体ストレスマーカーの発現に変化が認められ、DGK ϵ 欠損細胞では小胞体ストレスシグナルが修飾される。

以上の解析結果から、本研究により、DGK ϵ が小胞体に局在するのに必要十分なアミノ酸領域が明らかにされ、さらに、その領域内のアミノ酸の疎水性が、小胞体局在化に重要であることが示された。加えて、DGK ϵ が小胞体ストレス応答に関与し、細胞の小胞体ストレス抵抗性に寄与している可能性が示された。DGK ϵ の小胞体局在化シグナルを明らかにした研究は、これまでに報告が無く、本研究が最初であり、また、DGK ϵ の生理機能として、小胞体ストレス応答への関与を明らかにしたことは、大変意義深いと考えられる。

以上から、主・副審査委員は、本研究は学位授与に値するものと判断した。

(1, 200字以内)