

論文内容要旨

論文題目

細胞内二次メッセンジャー代謝酵素ジアシルグリセロール
キナーゼ ζ による腫瘍抑制因子 p53 の制御

責任講座： 解剖学第二 講座

氏名： 田中俊昭

【内容要旨】(1,200字以内)

背景： 外的刺激に応答して膜イノシトールリン脂質代謝回転により2つの二次メッセンジャーであるジアシルグリセロール (DG) とイノシトール 3 リン酸 (IP3) が産生されるが、ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) はこの DG をリン酸化しホスファチジン酸に変換する酵素であり、いくつかのアイソザイムからなるファミリーを形成している。これまでの研究により、DGK アイソザイムのうち核移行シグナルを有する DGK ζ が虚血刺激の初期段階にある海馬ニューロンにおいて核から細胞質へ移行する現象が報告されており、DGK ζ が細胞のストレス応答や生死メカニズムにおいて何らかの役割を果たす可能性が示唆されている。一方、p53 は細胞ストレスの程度を感知し、軽度の場合は細胞周期の停止による DNA 修復を促進し、傷害が重度になるとアポトーシスを誘導するという2つの側面を持ち、ゲノムの守護神として細胞の生死に重要な役割を果たすことが知られている。本研究では、細胞のストレス応答において DGK ζ と p53 の機能的な相互作用について研究を行った。

方法： いくつかの DGK ζ 変異型を作製し、単独あるいは p53 との共遺伝子導入を各種培養細胞に行い、免疫沈降法によるタンパク結合アッセイ、また Doxorubicin による DNA 損傷モデルにおける mRNA およびタンパクレベルの量的変化、免疫細胞化学による細胞内局在の変化を検討した。また、カイニン酸誘導けいれんモデルマウスを作製し、海馬ニューロンにおける局在の変化を検討した。

結果： 共遺伝子発現および免疫沈降法により DGK ζ は p53 の DNA 結合領域を介してと結合することが明らかになった。野生型 DGK ζ と p53 は核内に局在するが、核移行シグナル (NLS) を欠失する細胞質型 DGK ζ Δ NLS を遺伝子導入すると p53 の局在は細胞質優位となり、Doxorubicin による DNA 損傷後の p53 タンパク発現の誘導が強力に抑制された。この時、プロテアソーム阻害剤 MG132 や核外輸送阻害剤 Leptomycin B の添加により p53 タンパク発現誘導が増加することから、細胞質型 DGK ζ Δ NLS は細胞質において p53 のユビキチン化ならびにプロテアソームによる分解を促進することにより p53 タンパク発現誘導を抑制している可能性が示唆された。またカイニン酸てんかんモデルマウスの海馬において、DGK ζ は核から細胞質に移行し、p53 は細胞質に認められることが明らかとなった。

考察： DNA 損傷後、細胞質型 DGK ζ は p53 の細胞質アンカーとして働き、ユビキチン-プロテアソーム系を介して p53 の分解を促進すると考えられた。p53 は細胞質においてミトコンドリアを介するアポトーシス経路を活性化することが報告されているので、DGK ζ は細胞質において p53 を介するアポトーシス経路を抑制する可能性が示唆される。

平成 22年 1月 28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 俊 昭

論文題目：細胞内二次メッセンジャー代謝酵素ジアシルグリセロール
キナーゼ ζ による腫瘍抑制因子 p53 の制御

審査委員：主審査委員

富 田 善 孝

副審査委員

北 中 千 史

副審査委員

加 藤 丈 夫

審査終了日：平成 22年 1月 28日

【 論 文 審 査 結 果 要 旨 】

外的刺激に応答して膜イノシトールリン脂質代謝の二次メッセンジャーであるジアシルグリセロール (DG) をリン酸化し、ホスファチジン酸に変換する酵素ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) は、いくつかのアイソザイムからなるファミリーを形成している。アイソザイムのうち核移行シグナルを有する DGK ζ が虚血刺激の初期段階にある海馬ニューロンにおいて核から細胞質へ移行する現象が報告されていることから、DGK ζ はストレス応答や生死メカニズムにおいて何らかの役割を果たす可能性が示唆されている。一方、p53 は細胞ストレスの程度を感知し、細胞周期の停止による DNA 修復を行うか、傷害が高度の場合にはアポトーシスを誘導する機能を持ち、アポトーシスの制御に重要な役割を果たすことが知られている。本研究では、DGK ζ と p53 分子の相互作用とアポトーシス誘導刺激を含む種々のストレスに対する DGK ζ と p53 の機能について研究を行った。

この結果、以下のことが明らかになった。1. 共遺伝子発現および免疫沈降法により DGK ζ は p53 の全体の構造を認識して結合すること。2. 野生型 DGK ζ と p53 は核内に局在するが、核移行シグナル (NLS) を欠失する細胞質型 DGK ζ Δ NLS を遺伝子導入すると p53 の局在は細胞質優位となること。3. カイニン酸てんかんモデルマウスの海馬において、DGK ζ は核から細胞質に移行し、p53 は細胞質に認められること。4. Doxorubicin による DNA 損傷後の p53 タンパク発現の誘導が強力に抑制され、プロテアソーム阻害剤 MG132 や核外輸送阻害剤 Leptomycin B の添加により p53 タンパク発現誘導が増加すること。

以上の結果からは、p53 と DGK ζ とのみの相互作用であるとは結論付けられないが、DNA 損傷刺激により、細胞質型 DGK ζ はユビキチン-プロテアソーム系を介して p53 の分解を促進する可能性が示唆され、結果的に p53 を介するアポトーシスを抑制することが考えられる。このことは、DGK ζ の機能についての新規の知見であり、学位授与に値するものと判定した。