

論文内容要旨

論文題目

グルコース欠乏負荷条件下における ζ 型ジアシルグリセロールキナーゼの機能解析

責任講座：耳鼻咽喉・頭頸部外科学講座

氏名：東海林 悠

【内容要旨】(1,200字以内)

〔背景・目的〕

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における二次伝達物質ジアシルグリセロールの代謝を介して細胞内情報伝達を調節する。これまで、DGKアイソザイムの1つであるゼータ型DGK(DGK ζ)は、虚血や低酸素、DNAダメージ等のストレス応答に関与することが報告されている。本研究では、グルコース除去培地によるエネルギーストレス負荷条件下におけるDGK ζ の機能的役割を解析した。

〔方法〕

DGK ζ ノックアウト(DGK ζ -KO)マウス由来のマウス胎児線維芽細胞(MEF)をグルコース不含培地で培養し、実験を行った。アポトーシス関連タンパクであるカスパーゼとapoptosis inducing factor(AIF)の発現をウエスタンブロット法および免疫細胞化学法を用いて解析した。またATP量およびミトコンドリアにおけるATP産生の指標となるNAD⁺/NADHの測定を行った。

〔結果〕

実験の結果、野生型MEFをグルコース不含培地に置換すると10時間以内にほとんどの細胞が培養上清中に浮遊しているのが観察された。一方、DGK ζ -KO細胞はグルコース欠乏条件下でも10時間後に約90%の細胞が接着し生存していた。アポトーシス関連タンパクの発現をウエスタンブロット法により解析したところ、グルコース欠乏負荷によって野生型およびDGK ζ -KO細胞のいずれにおいても、活性型cleaved caspase3とcleaved caspase7の発現は認められなかった。免疫細胞化学法を用いてAIFの発現を解析すると、野生型MEFではDGK ζ -KO MEFよりも強いAIF免疫反応が観察された。AIFは通常ミトコンドリア膜間腔内に存在するが、ストレスに応答し細胞質に放出され、核に移行した後DNAを断片化そして凝集させアポトーシスを誘導することが知られている。グルコース欠乏条件下においてAIF発現が亢進している野生型MEFでは、核の縮小化と凝縮像が見られた。DGK ζ -KO細胞ではATP量が野生型細胞に比較して約1.2倍に増加していることから、AIFの局在するミトコンドリア電子伝達系でのNAD⁺およびNADHを測定したところ、DGK ζ -KO細胞においては還元型NADHが顕著に増加することが判明した。

〔考察〕

これまでの研究により、DGK ζ -KO細胞はDNAダメージによるアポトーシス刺激に脆弱性を示すことが報告されているが、今回の研究により、グルコース単独欠乏によるエネルギーストレスに対しては耐性を示すことが明らかになった。このメカニズムとして、DGK ζ -KO細胞では、グルコース欠乏負荷に応答するAIF発現が抑制されていること、ATP量が増大しているため短期間のエネルギー欠乏に耐性を持つこと、AIFはNADH増加によって二量体を形成し、ミトコンドリア膜間腔からの放出が阻害されること等により、AIFを介するアポトーシスに抵抗性を示すと考えられた。

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：東海林 悠

論文題目：グルコース欠乏負荷条件下における ζ 型ジアシルグリセロールキナーゼの機能解析

審査委員：主審査委員 藤井 順逸

副審査委員 大谷 浩一

副審査委員 後藤 薫



審査終了日：平成 31年 1月 17日

【 論 文 審 査 結 果 要 旨 】

ホスファチジルイノシトールのリン酸化に伴って生成するシグナル分子は、細胞の様々な生理機能の調節を担っている。イノシトール部位の4位と5位がリン酸化された後にホスホリパーゼCによる切断を受けるとイノシトール1,4,5トリスリン酸(IP_3)とジアシルグリセロールが生成する。ジアシルグリセロールは、 IP_3 の作用で小胞体から細胞質に放出されたカルシウムイオンとともにプロテインキナーゼCを活性化して、細胞増殖などの様々な機能制御にかかわる。ジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)は、ジアシルグリセロールをリン酸化してリン脂質合成材料となるホスファチジン酸を生成するが、一方でジアシルグリセロールを変換してプロテインキナーゼCの過剰な活性化を防ぐ作用もある。DGKファミリーのひとつであるDGK ζ は主に脳細胞の核に発現しており、虚血や低酸素といったストレス応答に関与する。本研究では、ストレス下におけるDGK ζ の役割を明らかにするために、DGK ζ 遺伝子欠損細胞と野生型細胞のグルコース単独欠乏に対する応答を培養条件下で比較検討した。

実験には、野生型とDGK ζ ノックアウト(KO)マウスに由来する胎児線維芽細胞(MEF)を不死化した株細胞を用いた。細胞をグルコース不含培地で培養すると、野生型MEFの多くが10時間以内に浮遊したのに対して、DGK ζ -KO細胞では生存が延長した。細胞死について評価したところ、野生型MEFではグルコース欠乏培地に移すとapoptosis inducing factor(AIF)の発現が亢進したが、DGK ζ -KO細胞ではその程度は弱かった。AIFはカスパーゼ非依存性のアポトーシスを起こすことが知られており、実際にカスパーゼ3と7の活性化を認めなかった。グルコース欠乏に伴うエネルギー産生についての検討では、ATP含有量はDGK ζ -KO細胞の方が野生型細胞よりも高かった。還元型電子受容体であるNADHの含有量は、DGK ζ -KO細胞の方が顕著に高く、ATP合成能が高いことに一致していた。以上のように、予想に反してDGK ζ -KO細胞の方が野生型細胞よりもグルコース単独欠乏に対して高い抵抗性を示したが、NADHが高いレベルに維持され、それがATP合成能を高めたことが直接の原因と考えられた。この結果は、DGK ζ が虚血などのストレスから脳を保護するとした従来の報告とは相反するが、MEFを用いたことが関係する可能性があるため、神経細胞を用いた検討が期待される。

本研究では、グルコース単独欠乏状態ではDGK ζ の欠損により細胞のエネルギー産生能が高まりアポトーシスに至るのが遅れるといった予期せぬ結果が得られたが、細胞内におけるDGK ζ の新たな機能の解明につながる可能性を示唆しており、博士(医科学)の学位に値すると判断した。