

論文内容要旨

論文題目

Diacylglycerol kinase と 結合蛋白 nucleosome assembly protein の脳内発現局在について

責任講座：小児科学 講座

氏 名：高橋 信也

【内容要旨】

【背景】

ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) は脂質性二次伝達物質であるジアシルグリセロール (DG) の代謝を介して、細胞内情報伝達機構に重要な役割を果たす。DGKとは主としてニューロンの核内に局在するアイソザイムであるが、その機能解析を目的として HEK293 細胞における免疫沈降ならびに質量分析を行ったところ、DGKと新規結合蛋白として nucleosome assembly protein (NAP) 1 like 1 と NAP1L4 が同定されている。しかし、これまで NAP1L1 および NAP1L4 の脳における発現や局在に関する報告はない。本研究では、脳における NAP1L1 と NAP1L4 の発現と局在を明らかにすると共に、DGKと NAP1L1 および NAP1L4 の結合がストレス負荷により変化するかどうかを検討することを目的とした。

【方法】

大腸菌発現タンパクをウサギおよびモルモットに免疫し、抗 NAP1L1、抗 NAP1L4、抗 DGK とポリクローナル抗体を作製した。これらの抗体を用いて、大脳皮質と海馬および小脳における局在を免疫組織化学的に解析した。またストレス負荷実験においては、成体雄マウスを酸素濃度 4.5~5.0% で 6 分 40 秒間の低酸素ストレスに暴露した。負荷後に脳切片の免疫組織化学を施行し、TUNEL 染色による神経細胞の障害度を評価した。さらに免疫沈降法により低酸素負荷の有無による DGKと NAP1L1 および NAP1L4 の結合の変化を検討した。

【結果と考察】

NAP1L1 および NAP1L4 免疫反応は、大脳皮質において、ほぼ全ての神経細胞の細胞体にびまん性に検出された。また海馬において、NAP1L1 は錐体ニューロンと介在ニューロンに検出されるが、NAP1L4 は介在ニューロンでの発現が優位であった。一方、小脳における両者の局在は大きく異なっており、NAP1L1 はバグマングリアの細胞体に、NAP1L4 はプルキンエ細胞の細胞体と樹状突起に局在が認められた。これらの結果より、DGKとは主としてニューロンの核に局在するが、DGKと結合蛋白として同定された NAP1L1 と NAP1L4 はともに種々のニューロンの細胞質に局在することが明らかとなった。

また、低酸素負荷マウスの海馬錐体層では、負荷 72 時間後に多数の TUNEL 陽性細胞が認められ、細胞死が誘導されると考えられた。この時、負荷 24 時間以降になると、海馬における DGKとの免疫反応は、一過性虚血負荷後と同様、ニューロンの核内から細胞質優位に変化することが明らかとなった。また、低酸素負荷の有無によって DGKと NAP1L1 および NAP1L4 の蛋白発現量に変化は認められなかったが、NAP1L1 および NAP1L4 の免疫沈降産物における DGKとの結合量は低酸素負荷後に増加傾向にあった。以上より NAP1L1 および NAP1L4 は低酸素ストレス負荷を受けたニューロンにおいて DGKとの細胞質移行のメカニズムに関与している可能性が示唆された。

平成 23 年 / 月 29 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 : 高橋信也

論文題目 : Diacylglycerol kinase (結合蛋白 nucleosome assembly protein) の
脳内発現局在について

審査委員 : 主審査委員

大谷 浩一



副審査委員

藤井 聡



副審査委員

鈴木 匡子



審査終了日 : 平成 23 年 1 月 21 日

【 論文審査結果要旨 】

ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) のアイソザイムの一つである DGK ζ は主としてニューロンの核内に局在し、脂質性二次伝達物質であるジアシルグリセロールの代謝を介して、細胞内情報伝達に重要な役割を果たす。申請者らの研究グループはこれまでに DGK ζ の新規結合蛋白として nucleosome assembly protein (NAP) 1 like 1 と NAP1L4 を同定している。本研究で申請者は NAP1L1 と NAP1L4 の脳内発現とその局在を免疫組織化学的に解析した。また、これらの結合蛋白の脳内局在と DGK ζ との結合に与える低酸素ストレス負荷の影響も検討した。

方法としては、NAP1L1、NAP1L4、DGK ζ のポリクローナル抗体を作製して、これらの抗体を用いて大脳皮質、海馬、小脳における局在を免疫組織化学的に解析した。低酸素ストレスとして酸素濃度 4.5~5.0% に 6 分 40 秒間暴露した。

結果として、まず、NAP1L1 と NAP1L4 はともに種々のニューロンの細胞質に局在しており、主としてニューロンの核に局在する DGK ζ とは大きく異なっていた。次に、低酸素ストレス負荷の影響については、NAP1L1 と NAP1L4 の局在は変化しないが、DGK ζ の局在がニューロンの核内から細胞質優位に変化すること、NAP1L1、NAP1L4、DGK ζ の発現量は変化しないことが明らかになった。さらに、低酸素ストレスによりこれらの結合蛋白と DGK ζ との結合が増加する可能性が示唆された。

本研究は申請者らのグループのこれまでの研究を進展させて、NAP1L1、NAP1L4、DGK ζ について、いくつかの重要な新知見を得たものである。審査会では本研究が厳密な手法で行われ、得られた結果は明確であり、またそれに基づく考察も妥当であることが評価された。従って、本審査委員会は本研究が医学博士号取得に十分値するものと判断した。