

## 論文内容要旨

### 論文題目

細胞周期におけるジアシルグリセロールキナーゼの局在の変化と機能について

責任講座： 運動機能再建・回復学分野（整形外科学） 講座

氏名： 長谷川 浩士

### 【内容要旨】

ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) は、細胞内情報伝達系において細胞内脂質メッセンジャーであるジアシルグリセロール (DG) の量的調節によりプロテインキナーゼ C (PKC) の活性制御に関与すると考えられている。これまでラット脳から数種類の DGK アイソザイムがクローニングされ、脳内における特徴的な遺伝子発現様式が報告されている。これらのアイソザイムのうち DGK $\alpha$  は核移行シグナルを有し、神経細胞を含めた様々な細胞において核内に局在することが明らかになっている。近年、核内にも形質膜とは独立したホスファチジルイノシトールリン脂質代謝系の存在が報告され、核内 DG や PKC が細胞周期に関与することが示唆されているが核内 DGK の機能的役割は未だ不明である。本研究では培養細胞を用いて細胞周期における DGK $\alpha$  の細胞内局在と機能的役割について検討した。

細胞周期を同期化した HeLa 細胞において、DGK $\alpha$  及び他のアイソザイム mRNA 発現は細胞周期を通して大きな変動は認められなかった。内在性に DGK $\alpha$  mRNA を発現する NIH3T3 細胞のウェスタンブロット解析において DGK $\alpha$  は核画分に検出され、DNA を除去した核マトリックス画分にも認められた。また各細胞周期における DGK $\alpha$  の細胞内局在を免疫細胞化学的に解析すると、DGK $\alpha$  免疫反応は G<sub>1</sub> 期から S 期においては核内に粗な顆粒状構造物として観察され、核小体には認められなかった。G<sub>2</sub> 期から分裂前期にかけて核膜が消失すると DGK $\alpha$  の反応は凝集する染色分体の周囲にリング状に認められ、分裂中期から終期において染色分体の凝集が進むと反応は顆粒状に細胞質に広がり、染色分体の領域には認められなかった。また、分裂終期後の核膜形成と共に再び核内に検出されるようになった。次に、機能的役割を追求するために遺伝子導入 HEK293 細胞における DGK $\alpha$  免疫沈降物の質量分析解析を行い、DGK $\alpha$  結合蛋白質として human nucleosome assembly protein 1 (hNAP-1) を同定した。COS7 細胞への共発現実験により、DGK $\alpha$  は核において hNAP-1 と共局在を示し、アンキリンリピートを含むカルボキシル基領域を介して hNAP-1 と結合することが判明した。

以上の結果より、DGK $\alpha$  は分裂細胞において細胞周期を通して発現が確認され、間期の細胞では非分裂細胞である神経細胞と同様に核内に局在し、分裂期においては特徴的な変化を示すことが明らかとなった。また、DGK $\alpha$  はヒストン H2A、H2B のシャペロンタンパク質である NAP-1 との相互作用により、ヌクレオソームのリモデリングにおける NAP-1 の機能に関与する可能性が示唆された。

平成 18 年 1 月 31 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：長谷川浩士

論文題目：細胞周期におけるジアシルグリセロールキナーゼ $\zeta$ の局在の変化と機能について

審査委員：主審査委員

若林 一良

副審査委員

北中 千史

副審査委員

細 天 貴 亮

審査終了日：平成 18 年 1 月 25 日

### 【 論文審査結果要旨 】

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 (DG) のリン酸化を介してプロテインキナーゼC (PKC) 活性を調節し細胞機能を制御していると考えられている。これまでにラット脳から数種類のDGKアイソザイムがクローニングされ、脳内のDGK遺伝子発現パターンが報告されている。この中でDGK $\zeta$ は核移行シグナルを有し、神経細胞を含む様々な細胞の核内に局在する。一方、形質膜とは独立したホスファチジルイノシトールリン脂質代謝系の存在が核内にも報告され、核内DGやPKCが細胞周期に関与することが示唆されている。そこで申請者は核内DGKの細胞周期と関連した機能的役割を解明する目的で、各細胞周期におけるDGK $\zeta$ の細胞内局在と機能的役割を検討した。

細胞周期を同期化したHeLa細胞では、DGK $\zeta$ を含む各DGKアイソザイムmRNA発現は細胞周期を通して明らかな変動を示さなかった。内在性にDGK $\zeta$ mRNAを発現するNIH3T3細胞では、DGK $\zeta$ は核画分に検出され、さらにDNAを除去した核マトリックス画分にも認められた。またDGK $\zeta$ 免疫反応はG<sub>1</sub>期からS期においては核内に粗な顆粒状構造物として観察され、核小体には認められなかった。一方、G<sub>2</sub>期から分裂前期にかけて核膜が消失するとDGK $\zeta$ 免疫反応は凝集する染色分体の周囲にリング状に認められ、分裂中期から終期において染色分体の凝集が進むと反応は顆粒状に細胞質に広がり、染色分体の領域には認められなかった。そして、分裂終期後の核膜形成と共に再び核内に検出されるようになった。さらに遺伝子導入HEK293細胞におけるDGK $\zeta$ 免疫沈降物の質量分析解析を行った結果、DGK $\zeta$ 結合蛋白質としてhuman nucleosome assembly protein 1 (hNAP-1) が同定された。COS7細胞への共発現実験により、DGK $\zeta$ は核においてhNAP-1と共局在を示し、アンキリンリピートを含むカルボキシル基領域を介してDGK $\zeta$ はhNAP-1と結合することが判明した。

以上の結果より、DGK $\zeta$ 遺伝子発現量は細胞周期と関連して変化しないものの、その発現パターンには特徴がみられ、非分裂細胞である神経細胞と同様に間期には核内に局在し、分裂期においては核と細胞質との間で局在が変化することが明らかとなった。さらに、DGK $\zeta$ はヌクレオソームのリモデリングにおけるNAP-1機能に関与する可能性が示唆された。このように申請者はDGK $\zeta$ の局在と機能的役割に関する意義のある新しい知見を得た。よって学位論文審査委員会は本論文が博士 (医学) を授与するに値するものと判定した。