

脳におけるジアシルグリセロールキナーゼの機能

白井 康仁

1. はじめに

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) をリン酸化し、ホスファチジン酸 (PA) に変換する脂質キナーゼである。周知のように、DG はプロテインキナーゼ C (PKC) をはじめとするさまざまな酵素の活性化因子であり、生体内では主にホルモンや成長因子、神経伝達物質などの刺激に応じて、ホスホリパーゼ C によるホスファチジルイノシトール二リン酸 (PIP₂) の加水分解を介して、イノシトール三リン酸とともに産生される。一方、PA も脂質メッセンジャーであり、Raf-1 キナーゼ、aPKC、mTOR などを活性化する¹⁻³⁾。すなわち、DGK は DG 量を減少させることで PKC などの酵素を間接的に抑制すると同時に、PA 産生を介して mTOR などの酵素を活性化することで、生体内で重要な働きをしていると考えられている。実際、いくつかの DGK サブタイプのノックアウト (KO) マウスがⅡ型糖尿病や免疫寛容障害を起こすなど、重要な機能が明らかになりつつある⁴⁻⁶⁾。

これまでに哺乳類の DGK には少なくとも 10 種類のサブタイプが報告され、ドメイン構造を基に五つに大別されている (図 1)。また、スプライスバリエーションも数多く報告されている¹⁾。すべてのサブタイプが C 末端側に保存された触媒領域を持ち、N 末端側の調節領域に PKC の脂質結合ドメインによく似たシステインリッチドメイン (C1 ドメイン) を持っている。Type I (α , β , γ) は、二つの C1 ドメイン (C1A, C1B ドメイン) のほかに、N 末端に recoverin homology (RVH) ドメインと、Ca²⁺ が結合する EF-hand モチーフを持つ。この RVH ドメインと EF-hand モチーフは、Ca²⁺ 依存的な酵素活性と構造変化に関与し、自己制御ドメインとして機能すると考えられている。Type

II (δ , η , κ) は、二つの C1 ドメインと pleckstrin homology (PH) ドメインを持ち、触媒領域は二つに分かれている。さらに、C 末端には sterile α motif (SAM) ドメインが存在し、タンパク質間相互作用などに関与していると考えられている¹⁾。Type III に属する DGK ϵ は最も単純な構造をしており、制御領域は二つの C1 ドメインのみである。Type IV (ζ , ι) は、C 末端に PDZ 結合モチーフとアンキリンリピートを四つ持ち、N 末端に myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS) リン酸化部位を持つ。DGK θ は Type V に属し、三つの C1 ドメインと Ras-associating (RA) ドメインを持ち、RA ドメインと重なる形で PH ドメイン様構造を持つ。また、N 末端には glycine, proline-rich region も存在する。

これら 10 種のサブタイプは組織発現も異なっているものの、ほとんどのサブタイプが脳に多く存在しており、その神経系における重要な機能が示唆されている³⁾。そこで、本稿では、我々が明らかにしてきた DGK β の神経系における機能を中心に、最近明らかになりつつある脳における DGK の機能について概説する。

2. DGK β

DGK β は 1993 年に後藤および近藤らによってラット脳 cDNA ライブラリーからクローニングされたサブタイプで、脳、特に線条体、側坐核、嗅結節および海馬に発現している。また、ヒト双極性障害および統合失調症患者から得られた cDNA ライブラリーから DGK β のスプライスバリエーションがクローニングされ、神経疾患との関連も示唆されている⁷⁾。しかし、DGK β の神経系における機能や脳高次機能における役割などは長い間不明であった。そこで、我々は DGK β の KO マウスを作製し、その神経突起伸長における機能や、記憶や感情などの脳高次機能における重要性を検討した。

1) DGK β KO マウスの表現型

まず、DGK β が海馬に多く発現していることから、作製した KO マウスを用いて記憶に関する行動試験を行った。短期記憶を調べる Y 迷路テストの結果、DGK β KO マウスは、野生型マウスに比べて、異なるアームに入る割合が低

神戸大学大学院農学研究科生命機能科学専攻応用生命化学講座動物資源利用化学分野 (〒657-8501 兵庫県神戸市灘区六甲台町 1-1)

Function of diacylglycerol kinase in the brain

Yasuhito Shirai (Chemistry & Utilization of Animal Production Resources, Applied Chemistry in Bioscience, Agrobioscience, Graduate School of Agricultural Science, Kobe University, 1-1 Rokkodai-cho, Nada-ku, Kobe, Hyogo 657-8501, Japan)

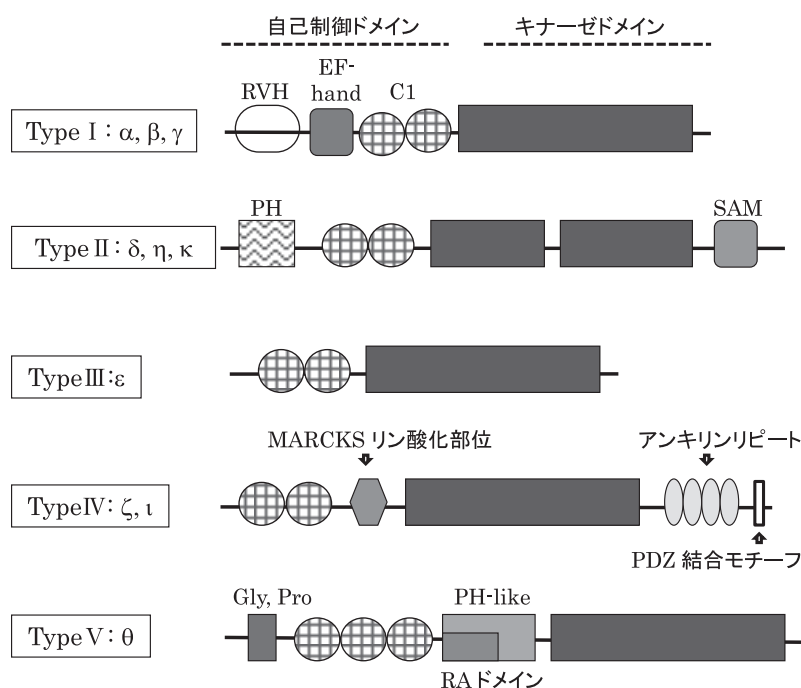


図1 哺乳類の DGK サブタイプとドメイン構造

C1 : conserved region1, RVH : recoverin homology, PH : pleckstrin homology,
SAM : sterile α motif, MARCKS : myristoylated alanine-rich C-kinase substrate,
RA : Ras associating, Gly, Pro : glycine & proline rich domain.

く、有意に同じアームに戻る傾向を示し、自発的交替行動の低下、すなわち短期記憶が低下していることが明らかになった⁸⁾。次いで、長期空間記憶を調べる Morris 水迷路テストを行った。その結果、野生型 (WT) マウスはターゲットのあった領域を泳ぐ傾向を示したのに対し、DGK β KO マウスは、四つのエリアをほぼ同等に泳いだ。また、Morris 水迷路テストにおいてプラットホームからの距離を比較すると、DGK β KO マウスは、WT に比べて、有意にプラットホームから離れたところを泳ぐ傾向を示した。すなわち、長期空間記憶にも障害が生じていることが明らかになった。そこで、海馬 CA1 領域における長期増強 (LTP) を調べたところ、LTP の維持に障害があることが明らかになった。一方、入出力関係 (input-output relationship) には差がなかったことから、基礎的なシナプス機能には変化がないことも明らかになった。以上のことから、DGK β は LTP を制御することで、記憶といった脳高次機能において重要であることがわかった⁸⁾。

次いで、DGK β は大脳皮質および線条体に存在することや、そのスプライスバリエントの存在が双極性障害患者で確認 (ただし mRNA レベルで) されていることから、DGK β KO マウスの情緒および社会性行動などについて調べた。オープンフィールドテストを行ったところ、WT に比べ DGK β KO マウスは、明らかにオープンフィールドの中央部を横切り、総移動距離も有意に長くなった。高架式

十字迷路テストにおいても、DGK β KO マウスは、有意にオープンアームを歩行した。一方、プレパルスインヒビションテスト (pre-pulse inhibition test : PPI) や社会性行動測定テスト (social interaction test) においては、差が認められなかった。以上のことから、DGK β KO マウスは正常な社会性は示すものの、躁病や多動性障害様の表現型を示すことが明らかになった⁹⁾。

2) DGK β KO マウスにおける記憶障害および感情障害機序

DGK β KO マウスの記憶障害や感情障害機序を解明するため、得られた DGK β KO マウスから大脳皮質および海馬初代培養細胞を調製し、その形態を WT マウスと比較した^{8,9)}。その結果、KO マウスから調製した初代培養細胞における 1 突起あたりの分岐数は、WT のものに比べて有意に少なかった。さらに、培養 10 日目海馬初代培養細胞におけるスパイン様構造の数を比較したところ、KO マウスでは一つの突起あたりのスパインの数 (スパイン密度) も WT に比べて有意に減少していた。逆に、マウス海馬初代培養細胞に緑色蛍光タンパク質 GFP を融合した DGK β (GFP-DGK β) を過剰発現させると複数の突起を持った細胞数が有意に増加した。この突起は複数の分岐およびスパイン様構造を有していた。以上の結果より、DGK β は一つの突起あたりの分岐の数やスパイン形成といった神経細胞

の形態を変化あるいは維持させることにより、記憶や感情などの脳高次機能に重要な働きをしていることが示唆された。

3) DGK β による特徴的な神経突起伸長機構

興味深いことに、双極性障害患者にその存在が報告されている DGK β のスプライスバリエーションは、C 末端の約 30 アミノ酸が欠損しており、WT と異なり細胞質膜ではなく細胞質に局在する。そこで我々も、C 末端が欠損している DGK β 変異体 (C-cut) を作製し、ヒト神経芽細胞腫由来の SH-SY5Y 細胞に過剰発現させたところ、変異タンパク質は予想どおり細胞質に発現し、WT DGK β でみられる複数の分枝を持った突起数が有意に抑制された。しかし、欠損させた C 末端部分のみを発現させても特徴的な突起伸長は認められなかった。そこで、DGK β による特徴的な突起伸長機構を解明するために、C 末端から N 末端側にさまざまな領域を延長させた DGK β 変異体を用い、酵素活性、細胞内局在、神経突起伸長能について評価した。その結果、キナーゼドメインまで延長させると、酵素活性はあるものの膜局在を示さず、突起伸長能を示さなかった。しかし、さらに C1 ドメインを付加したところ (CA)、酵素活性が約 3 倍に上昇し、顕著な膜局在および突起伸長能を示した。一方、このコンストラクト (CA) から C 末端約 30 アミノ酸を欠損させた CA-C-cut は、活性、膜局在、突起伸長能がすべて消失した。以上のことから、DGK β の突起伸長能には、C1 ドメインと C 末端を介した細胞膜局在が重要であることが明らかになった。また、活性には C 末端領域も重要であることが明らかになった。次いで、C1A または C1B ドメインの構造維持に重要なシステイン残基、および C 末端に存在する塩基性アミノ酸に変異を導入したところ、細胞膜局在と突起伸長能がともに消失した。これらより、DGK β の神経突起伸長および膜局在には、C 末端に存在する塩基性アミノ酸のクラスターと C1 ドメイン全体の立体構造が重要であることが明らかになった¹⁰⁾。

3. DGK ζ と DGK ι

小脳、海馬、嗅球に多く存在している DGK ζ は、スパイラの維持機能を有していることが最近報告された¹¹⁾。この機能には、DGK ζ のキナーゼ活性と、PZD 結合モチーフを介した PSD95 ファミリータンパク質との結合が重要であることが明らかになっている。一方、海馬、視神経に多く発現しており、DGK ζ と同じ Type IV に属する DGK ι にはスパイラ維持機能は見いだされていない。代わりに、DGK ι は神経伝達物質の分泌を調節する機能を有しているようである¹²⁾。しかし、DGK ζ や DGK ι KO マウスの表現

型に関する報告は今のところない。

4. DGK η , DGK ϵ , DGK δ

海馬や歯状回に多く発現している DGK η も、DGK β 同様、大規模なゲノム解析により双極性障害との関係が示唆されている¹³⁾。しかし、その後相反する結果も報告されており、今後の研究が待たれるところである。

DGK ϵ は脳全体に広く分布しており、その KO マウスは、てんかんを引き起こす電氣的刺激に抵抗性を示すだけでなく、野生型より早く回復する¹⁴⁾。また、脳にはあまり発現していない DGK δ もてんかんと関係が示唆されている¹⁵⁾。

5. その他の DGK

DGK γ は小脳プルキンエ細胞や海馬に、DGK θ は小脳や海馬に多く発現しているが、その神経系における機能については今のところ不明である。また、DGK α は神経系ではなく、オリゴデンドロサイトに発現しているが、その機能もいまだ解明されていない。一方、DGK κ については脳内の局在は今のところ報告されていない。

6. おわりに

上述の各 DGK サブタイプと脳における局在と機能を表 1 にまとめた。このように DGK は脳、特に神経系において重要な働きをしているといえる。総じて、DGK は神経細胞特有の形態変化や神経分泌を調節することで、記憶や感情障害といった脳高次機能において重要な働きをしており、その破綻は神経疾患と深く関わっているようである。しかし、機能発現のための詳細な分子メカニズムは依然不明な点が多い。特に、DGK による膜脂質代謝がどのように神経系における DGK の機能と結びついているのか、今後の研究課題である。さらに、上述のように神経系には多くのサブタイプが存在するにも関わらず、そのサブタイプ特異的機能の全貌は明らかになっていない。今後、それぞれの KO マウスの作製と解析を介して、さまざまな重要な機能が明らかになってくると期待している。

また、DGK は神経系のみならず、免疫系をはじめとするさまざまな細胞にも発現し、免疫疾患、糖尿病、がんなどと密接に関連している。これらの知見については割愛したので、他の優れた総説を参照していただきたい。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導下さった神戸大学バイオシグナル研究センター・齋藤尚亮教授、DGK の

表1 DGK の脳内における局在とその機能

	分子量($\times 10^3$)	脳における局在	酵素学的性質	KO マウスの表現型と脳における機能
α	80	オリゴデンドロサイト	Ca^{2+} 感受性, PS 依存的 R59022 感受性 PIP_3 , $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$ により活性化	不明
β	90	cp>hip, ctx, olf	Ca^{2+} 感受性, PS 依存的 $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ により活性化	記憶障害 感情障害 (躁様) てんかんの重症化
γ	88	ret, cb, hip	Ca^{2+} 感受性, PS 依存的 R59022 感受性	不明
δ	130	微量	Ca^{2+} , PS 非依存的	てんかん
η	130-140	hip, dg	Ca^{2+} 非感受性	双極性障害 (?)
κ	142	発現していない (?)	Ca^{2+} 非感受性	不明
ϵ	64	均一	Ca^{2+} 非感受性	てんかん
ζ	104	cb, hip, olf	Ca^{2+} 非感受性 Mg^{2+} , PS 依存的	スパインの維持
ι	130	ret>hip, cp, ctx, cb, dg	Ca^{2+} 非感受性	神経伝達物質放出
θ	110	cb, hip	Ca^{2+} 非感受性	不明

cb : 小脳, cp : 線条体, dg : 歯状回, hip : 海馬, olf : 嗅球, ret : 視神経系, ctx : 大脳皮質, PS : ホスファチジルセリン.

面白さを教えて下さった札幌医科大学・加納英雄名誉教授, 山形大学・後藤薫教授並びに千葉大学・坂根郁夫教授, $\text{DGK}\beta\text{KO}$ マウスを作製して下さった大阪大学・竹田順二教授と堀江准教授, 電気生理をご担当下さった東北大学・福永浩司教授と森口茂樹講師, 行動試験をして下さった岐阜薬科大学・原英彰教授並びに研究室の方々, そして一緒に研究して下さった学生達に深く感謝致します。

- 1) Sakane, F., Imai, S., Kai, M., Yasuda, S., & Kanoh, H. (2007) *Biochem. Biophys. Acta*, **793**, 793-806.
- 2) Shulga, Y.V., Topham, M.K., & Epand, R.M. (2011) *Chem. Rev.*, **111**, 6186-6208.
- 3) Shirai, Y. & Saito, N. (2014) *J. Biomed. Sci.*, **21**, 28-35.
- 4) Zha, Y., Marks, R., Ho, A.W., Peterson, A.C., Janardhan, S., Brown, I., Praveen, K., Stang, S., Stone, J.C., & Gajewski, T. F. (2006) *Nat. Immunol.*, **7**, 1166-1173.
- 5) Olenchok, B.A., Guo, R., Carpenter, J.H., Jordan, M., Topham, M.K., Koretzky, G.A., & Zhong, X.P. (2006) *Nat. Immunol.*, **7**, 1174-1181.
- 6) Chibalin, A.V., Leng, Y., Vieira, E., Krook, A., Björnholm, M., Long, Y.C., Kotova, O., Zhong, Z., Sakane, F., Steiler, T., Nylén, C., Wang, J., Laakso, M., Topham, M.K., Gilbert, M., Wallberg-Henriksson, H., & Zierath, J.R. (2008) *Cell*, **132**, 375-386.
- 7) Caricasole, A., Bettini, E., Sala, C., Roncarati, R., Kobayashi, N., Caldara, F., Goto, K., & Terstappen, G.C. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 4790-4796.
- 8) Shirai, Y., Kouzuki, T., Kakefuda, K., Moriguchi, S., Oyagi, A., Horie, K., Morita, S.Y., Shimazawa, M., Fukunaga, K.,

- Takeda, J., Saito, N., & Hara, H. (2010) *PLoS ONE*, **5**, e11602.
- 9) Kakefuda, K., Oyagi, A., Ishisaka, M., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Yokota, K., Shirai, Y., Horie, K., Saito, N., Takeda, J., & Hara, H. (2010) *PLoS ONE*, **5**, e13447.
- 10) Kano, T., Kouzuki, T., Mizuno, S., Ueda, S., Yamanoue, M., Sakane, F., Saito, N., & Shirai, Y. (2014) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **447**, 89-94.
- 11) Kim, K., Yang, J., Zhong, X.P., Kim, M.H., Kim, Y.S., Lee, H.W., Han, S., Choi, J., Han, K., Seo, J., Prescott, S.M., Topham, M.K., Bae, Y.C., Koretzky, G., Choi, S.Y., & Kim, E. (2009) *EMBO J.*, **28**, 1170-1179.
- 12) Yang, J., Seo, J., Nair, R., Han, S., Jang, S., Kim, K., Han, K., Paik, S.K., Choi, J., Lee, S., Bae, Y.C., Topham, M.K., Prescott, S.M., Rhee, J.S., Choi, S.Y., & Kim, E. (2011) *EMBO J.*, **30**, 165-180.
- 13) Baum, A.E., Akula, N., Cabanero, M., Cardona, I., Corona, W., Klemens, B., Schulze, T.G., Cichon, S., Rietschel, M., Nöthen, M.M., Georgi, A., Schumacher, J., Schwarz, M., Abou Jamra, R., Höfels, S., Propping, P., Satagopan, J., Detera-Wadleigh, S. D., Hardy, J., & McMahon, F.J. (2008) *Mol. Psychiatry*, **13**, 197-207.
- 14) Rodriguez de Turco, E.B., Tang, W., Topham, M.K., Sakane, F., Marcheselli, V.L., Chen, C., Taketomi, A., Prescott, S.M., & Bazan, N.G. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 4740-4745.
- 15) Leach, N.T., Sun, Y., Michaud, S., Zheng, Y., Ligon, K.L., Ligon, A.H., Sander, T., Korf, B.R., Lu, W., Harris, D.J., Gusella, J.F., Maas, R.L., Quade, B.J., Cole, A.J., Kelz, M.B., & Morton, C.C. (2007) *Am. J. Hum. Genet.*, **80**, 792-799.

著者寸描

●白井康仁（しらい やすひと）



神戸大学大学院農学研究科生命機能科学専攻応用生命化学講座教授。博士（医学），博士（農学）。

■略歴 1964年京都市に生る。94年神戸大学大学院自然科学研究科博士課程修了。同年より神戸大学大学院自然科学研究科助手，96年よりバイオシグナル研究セン

ター助手，2001年より同准教授を経て，09年より現職。この間，00～01年UCSDにて客員研究員。

■研究テーマと抱負 神経疾患，癌，糖尿病性合併症，アレルギーなどにおけるPKCとDGKの機能協関解析とその創薬及び分子標的機能性食品への応用。

■ウェブサイト <http://www2.kobe-u.ac.jp/~shirai/>

■趣味 旅行，映画鑑賞。