

ジアシルグリセロールキナーゼと様々な生理機能と病態との関連

—がん, がん免疫, 2 型糖尿病, 精神疾患等との関連—

千葉大学特任教授・名誉教授 坂根 郁夫 (25 期 1982 年卒)

はじめに

私は、1987 年に北海道大学大学院薬学研究科博士課程修了し、薬学博士の学位取得後、学術振興会特別研究員 PD(博士課程在学中に特別研究員 DC 採用)として 1 年間北大・薬で研究に従事した。その後、1988 年 4 月に札幌医科大学医学部 生化学教室(加納英雄教授)の助手になり、講師、助教授、准教授として勤めた。その間、1998 年から 2 年半、ユタ大学ハンツマン癌研究所(Stephen M. Prescott 教授)で訪問研究員として研究を行った。そして、2009 年 4 月千葉大学大学院理学研究科化学コース(現在は理学研究院化学研究部門に改称)に教授として赴任した。15 年間勤め、2024 年 3 月に退官したが、大型研究費に採択されたので特任教授(Research professor)として現在も研究を続けている。札幌医科大学に赴任してから、一貫してジアシルグリセロール(DG)キナーゼ(DGK)に関する研究を行ってきた。幸い、論文も数多く発表することができ、研究費も研究を遂行するための充分量を獲得でき、楽しく研究を進めることができた。本稿では、私のライフワークである DGK について紹介したいと思う。

DGK は DG(グリセロールの 1 位と 2 位に脂肪酸がエステル結合)をリン酸化してホスファチジン酸(PA)に変換する酵素である(図1)。哺乳類の DGK は、10 種の独立した遺伝子によってコードされるアイソザイム($\alpha \sim \kappa$)から成る分子ファミリーを形成しており、各 DGK アイソザイムは C1 ドメイン(zinc finger structure, 2~3 個)と触媒ドメインの共通領域に加えて、それぞれに特徴的な機能ドメインを持ち、その構造的特徴から I 型(α, β, γ)、II 型(δ, η, κ)、III 型(ϵ)、IV 型(ζ, ι)、V 型(θ)に分類される¹⁾(図 2)。I 型は分子内に 2 個の EF ハンド(Ca^{2+} 結合能をもつ)を、II 型はプレクストリンホモロジー(PH)ドメインと sterile α motif(SAM)ドメインを、IV 型はアンキ

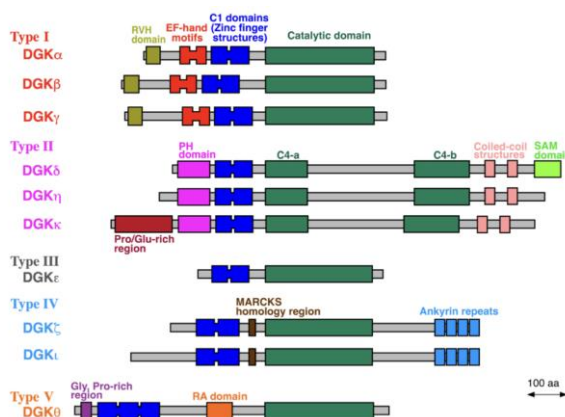


図2. DGKアイソザイムの構造

リンリピート(4 個)と MARCKS (myristoylated, alanine-rich C-kinase substrate)のリン酸化部位類似配列を、V 型は3個の C1 ドメインと Gly/Pro に富む領域を持っている。ε アイソザイムは C1 ドメイン以外に特徴的な機能ドメインをもたない。

DG は最も単純なグリセロ脂質であるので、それをリン酸化する酵素が重要な生理機能を制御するとは考えられてこなかったが、興味深いことに、ここ 20 年ほどで、各 DGK アイソザイムが想像以上に多彩な生理機能や病態に関与することが我々の研究を含めて明らかになってきた。DG の 2 本の脂肪酸は多様性(炭素数と不飽和結合の数(場所))があるが、DGK の基質の DG はホスファチジルイノシトール(PI)代謝回転由来のアラキドン酸(20:4(X:Y=脂肪酸の炭素の数:脂肪酸の不飽和結合の数))含有 DG であると長年信じられてきた。しかし、最近、各 DGK アイソザイムは、それぞれ異なる DG 分子種をリン酸化して(PA 分子種を産生して)おり、DGK がこれまで想定されていなかった PI 代謝回転とは異なる新規の情報伝達経路を形成することが分かってきた。我々の知見を中心に各 DGK アイソザイムの生理機能や病態との関連、更には、それらが産生する PA 分子種について概説する。

1. DGK α (I 型)

DGK α は T 細胞(T リンパ球)で強く発現している。

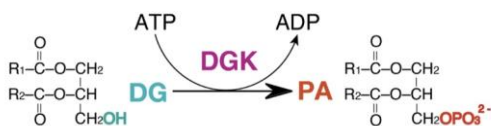


図1. DGKの反応

表 1. DGK アイソザイムの生理機能と疾患における役割

DGK アイソザイム	方法論	生理機能及び疾患における潜在的役割	標的	産生 PA 分子種	文献
α (I 型)	KO マウス, RNA 干渉	T 細胞 anergy の亢進	RasGRP1	16:0/16:1-, 16:0/18:1-PA	2,3
	RNA 干渉, 阻害剤	メラノーマ細胞死の抑制	NF- κ B	16:0/16:0-, 16:0/18:0-PA	4,6,7
	RNA 干渉	肝細胞がん細胞増殖の亢進	MEK/ERK		5
β (I 型)	KO マウス	双極性障害抑制, スパイン伸長亢進	?		8
γ (I 型)	RNA 干渉	インスリン分泌の亢進	?		9
	RNA 干渉	Rac1 活性の抑制	β 2-Chimaerin		10
	KO マウス	小脳の運動調整機能, LTD の亢進	PKC γ		11
δ (II 型)	KO マウス	EGF 受容体活性の亢進	PKC		12
	KO マウス, RNA 干渉	2 型糖尿病増悪化の抑制	PKC	14:0/16:0-, 16:0/16:0-PA	13,14
	欠損患者	てんかん, 自傷傾向の抑制	?		20
	脳特異的 KO マウス	強迫性障害の抑制	Praja-1/SERT	18:0/22:6-PA	21,22,23,24
η (II 型)	RNA 干渉	EGF 受容体活性の亢進	C-Raf		25
	GWAS	双極性障害	?		26
	KO マウス	双極性障害 (躁) 様表現型の抑制	PKC β /DAT	18:1/20:2-, 18:1/22:2-PA	27,28,29
κ (II 型)	CLIP	脆弱 X 症候群の抑制	PKC α , mTOR	18:0/18:1-, 18:1/20:1-PA	30
ε (III 型)	KO マウス	海馬 LTP の亢進	PI 代謝回転	18:0/20:4-PA	31
	RNA 干渉	ハンチントン病の増悪化	PI 代謝回転	18:0/20:4-PA	32
ζ (IV 型)	KO マウス	T 細胞機能の抑制	RasGRP1		2,33
	RNA 干渉	神経突起スパイン密度の維持	?	16:0/16:0-PA	34
	KO マウス	神経細胞分化の亢進	?		35
ι (IV 型)	KO マウス	がん細胞増殖の亢進	RasGRP3		36
	KO マウス	mGluR-LTD の亢進	PKC		37
θ (V 型)	GWAS, <i>in vitro</i>	パーキンソン病の増悪化	α -シヌクレイン?	18:1/18:1-PA	28, 29

DGK アイソザイムの主な生理機能と疾患における役割 (潜在的なものも含む) をリストアップした。略号は本文参照のこと。産生 PA 分子種は代表的なものを挙げた。

T 細胞抗原受容体や G 蛋白質共役型受容体の刺激時に、DGK α は DG を消費することによる RasGRP (C1 ドメインに DG が結合して活性化) の活性抑制を通じて受容体刺激の伝達を減弱させ anergy 状態 (不活性・非増殖状態) に誘導する ²⁾ (表1)。DGK α は、これらの刺激によって細胞膜へ移行し、DG を消費して RasGRP を細胞膜から解離させて不活化する。DGK α を阻害すると、T 細胞の anergy 状態から回復することから、がん免疫亢進の標的として多くの製薬企業から注目されている。DGK α が T 細胞 (非増殖状態) 中で産生する PA 分子種は主に 16:0/16:1-と

16:0/18:1-PA であるという結果が得られた ³⁾。

一方、DGK α はがん化により発現誘導される ^{4, 5)}。DGK α はメラノーマ細胞の腫瘍壊死因子- α 依存性のアポトーシスを NF- κ B の活性化を介して強く抑制する ⁴⁾ (表1)。また、DGK α は肝細胞がんにおいても MEK/ERK 系の活性化を介して細胞増殖を促進していることが明らかになった ⁵⁾ (表1)。従って、DGK α の阻害剤はがんの細胞死を誘導することができると考えられる。

我々は、DGK α を特異的に阻害する化合物を同定した ^{6, 7)}。本化合物は、T 細胞 (Jurkat 細胞) を活性

化(インターロイキン-2 産生亢進)した。同時に、メラノーマ細胞等のがん細胞の細胞死を誘導した。従って、DGK α 特異的阻害化合物は、がん細胞の細胞死を直接誘導し、且つ、がん免疫によって間接的に細胞死を誘導するという二重の効果が期待されることが分かった。また、DGK α がメラノーマ細胞中で産生する PA 分子種は主に 16:0/16:0-と 16:0/18:0-PA であるという結果が得られた⁷⁾。

2. DGK β (I 型)

DGK β のノックアウト(KO)マウスは恐怖心の欠如や過活動等の双極性障害の躁状態様の表現型を示し、その表現型は、双極性障害(躁状態)の治療薬であるリチウムによって抑制された⁸⁾(表1)。更に、DGK β -KO マウスの神経は分岐が減少し、DGK β は神経突起スパイン伸長に関与することが示された(表1)。

3. DGK γ (I 型)

DGK γ は DGK α と共に膵臓 β 細胞におけるインスリン分泌を制御することが報告された⁹⁾(表1)。また、DGK γ は、Rac1 及び Rac GTPase-activating protein の一つである β 2-chimaerin(PA により活性化される)と複合体を形成して Rac1 活性を抑制する¹⁰⁾(表1)。

DGK γ の KO マウスは、プロテインキナーゼ C (PKC) γ (C1 ドメインに DG が結合して活性化する)の活性化を介して小脳の運動調整機能、長期抑制(LTD)、およびプルキンエ細胞の樹状突起の発達に障害を示すことが報告された¹¹⁾。

4. DGK δ (II型)

我々は、DGK δ の KO マウスが、誕生時にまぶたが無く、更に、肺や皮膚の形態に顕著な異常が見られる等、上皮系の細胞の分化や増殖に不全があることを明らかにした¹²⁾。本マウスは、肺が機能しないことで生後 24 時間以内に死亡した。更に生化学的解析を行った結果、DGK δ は上皮増殖因子(EGF)受容体下流の PKC と相互作用し、その活性を抑制することで本受容体の活性・発現を維持・活性化していることが明らかになった(表1)。

2型糖尿病患者の骨格筋中では DGK δ の蛋白質量が約半分に減少していることが見出された¹³⁾。更に、DGK δ の KO マウス(ホモ体は生後 24 時間以内に致死なのでヘテロ体)は、インスリン抵抗性惹起や肥満等の2型糖尿病様の表現型を示す等、DGK δ が本症発症・増悪化の新たなキーンゼイムであること

が示された¹³⁾(表1)。DGK δ の発現量が低下することによって蓄積した DG が PKC δ を活性化し、PKC によるインスリン受容体基質 1 の Ser307 のリン酸化がその発現・活性を低下させ、インスリン抵抗性を増大させると考えられる。C2C12 マウス筋芽細胞において、高濃度グルコース刺激時に、DGK δ 依存的に主に 14:0/16:0-, 16:0/16:0-, 16:0/18:0-PA が産生された¹⁴⁾。これらの分子種は、PI 代謝開演由来のもの(20:4 含有 PA)とは異なり、予想外の結果であった。そして、その基質の DG の供給は、ホスファチジルコリン特異的ホスホリパーゼ C によるものであることが示唆された¹⁴⁾。更に、その上流の DG 供給酵素の候補として、スフィンゴミエリン合成酵素関連蛋白質を同定した^{15, 16)}。

2型糖尿病患者の骨格筋中では DGK δ の蛋白質量が半減している¹³⁾、その量を上げる(回復させる)ことが出来れば、本症の予防・治療に繋がるのではと考え、DGK δ の蛋白質量を上昇させる物質を探索したところ、ミリスチン酸(14:0, 遊離型)が細胞レベル(C2C12 細胞)で特異的に DGK δ 蛋白質量を増加(倍増)させ、更に、インスリン依存性の糖の取り込みを亢進することが明らかになった¹⁷⁾。一方、ラウリル酸(12:0)やパルミチン酸(16:0)、ステアリン酸(18:0)、更には不飽和結合を持つ脂肪酸では効果がなかった。更に、ミリスチン酸は個体レベル(2 型糖尿病モデル(Nagoya-Shibata-Yasuda)マウス)で DGK δ 蛋白質量(骨格筋)を増加させ、糖負荷試験での血糖値を顕著に低下させた¹⁸⁾。また、ミリスチン酸は DGK δ 蛋白質の安定性を上昇させ、その効果は脂肪酸(ミリスチン酸)、蛋白質(DGK δ)、細胞(C2C12 筋芽細胞)に特異的であり、極めて限定されたものであることが分かった¹⁹⁾。

脳機能に関しては、DGK δ の部分欠損患者は、てんかんや自傷傾向等が認められた²⁰⁾(表1)。また、軽度の肥満も観察され(表1)、糖尿病との関連も興味深い。

我々は、DGK δ の脳特異的 KO マウスを作成して、その表現型を解析した。本マウスは強迫性障害様の表現型を示し、その表現型は強迫性障害の治療薬であるフルオキセチン(セロトニントランスポーター(SERT)阻害薬)によって抑制された²¹⁾(表1)。更に、DGK δ は SERT と相互作用して、その安定性を低下させることも明らかになった²²⁾(表1)。また、DGK δ -KO マウスの脳内ではセロトニン量が減少していた。興味深いことに、melanoma-associated antigen D1 (アダプター蛋白質)と Praja-1 (ユビキチン E3 リガーゼ)

が δ DGK δ と相互作用して、SERT のユビキチン化を促進することが明らかになった²³⁾(表1)。また、DGK δ -KOマウスの脳では18:0/22:6-PAが減少しており、DGK δ は脳内では18:0/22:6-DGを基質と考えられた²⁴⁾(表1)。

5. DGK η (II型)

我々は、DGK η (胃がんをはじめとするがん細胞において発現が亢進している)はEGF刺激に応答してC-Raf/B-Rafと相互作用してC-Rafを活性化し、その下流のMEK/ERKの活性を増大させ、HeLa細胞の増殖を亢進していることを報告した²⁵⁾(表1)。

DGK η は脳にも強く発現している。Baumらは全ゲノム関連解析(GWAS)によってDGK η 遺伝子と双極性障害との間に相関がある可能性を示している²⁶⁾(表1)。実際、DGK η のKOマウスを作成して表現型を解析したところ、リチウム感受性の躁状態様(双極性障害様)の表現型を示した²⁷⁾。また、DGK η -KOマウスの脳では18:1/20:2-, 18:1/22:2-PAが減少しており、DGK η は脳内ではこれらのPA分子種を産生すると考えられた²⁸⁾(表1)。更に、DGK η -KOマウスの脳内ではドーパミンとリン酸化されたドーパミントランスポーター(DAT, リン酸化されるとシナプス間隙のドーパミンを取り込むのではなく、逆にプレシナプスからシナプス間隙へドーパミンを放出する)の量が増え、また、DATをリン酸化するPKC β のリン酸化(活性化)も亢進することを明らかにした²⁹⁾。

6. DGK κ (II型)

脆弱X症候群は発達遅滞・知的障害を特徴とする疾患で、RNA結合蛋白質であるfragile X mental retardation protein(FMRP)の消失によって引き起こされる。最近、cross-linking immunoprecipitation法(CLIP)により、FMRPの標的がDGK κ mRNAであることが突き止められた³⁰⁾(表1)。そして、FMRPの消失によりDGK κ 蛋白質量が減り、そのことによって蓄積したDGがPKC α を活性化し、減少したPAがmTORの活性抑制をもたらすことで、脆弱X症候群が発症すると考えられた(表1)。DGK κ が脳中で産生するPA分子種は主に18:0/18:1-, 18:1/20:1-PAであった。

7. DGK ε (III型)

DGK ε はPI代謝回転由来の18:0/20:4-DGを選択的にリン酸化する唯一のアイソザイムである。DGK ε は脳で強く発現し、そのKOマウスは短期強直性発

作を伴う電気けいれんショックに対するより高い抵抗性を示し、海馬穿通枝路歯状顆粒細胞シナプスにおける長期増強(LTP)が減弱していた³¹⁾(表1)。本KOマウス大脳皮質中のアラキドン酸含有DGとアラキドン酸の量が低下しており、PI4,5-ニリン酸シグナル伝達経路(PI代謝回転、主に18:0/20:4-PAを産生)が強く影響を受けていた。以上から、DGK ε がPI代謝回転の制御を通じて、神経可塑性やてんかん誘起機構に関連した神経伝達経路の調節に関与していることが示された。また、DGK ε のノックダウンはhuntingtin変異体の毒性をブロックすることが報告された³²⁾。従って、DGK ε がハンチントン病の病状悪化因子の一つである可能性がある(表1)。

8. DGK ζ (IV型)

DGK ζ はDGK α と同様にRasGRPの活性抑制を通じてT細胞の機能を低下させる²⁾(表1)。従って、DGK ζ も、その阻害化合物がT細胞の活性・機能を亢進すると考えられるので、がん免疫の標的として注目されている。実際、DGK α と ζ の活性・量を同時に低下させると、それぞれ単独よりも免疫活性を強く増強し、且つ、がん細胞の細胞死も強く誘導した³³⁾。

DGK ζ は脳中で興奮性シナプスに局在し、PSD-95と相互作用している。DGK ζ のKOマウスの脳では神経突起スパイン密度が減少し、興奮性シナプス伝達が低下していた³⁴⁾(表1)。従って、DGK ζ はスパイン密度の維持において重要な役割を果たすと考えられる。

神経芽腫細胞(Neuro-2a細胞)のレチノイン酸や血清飢餓による分化刺激時に16:0/16:0-PAが顕著に増加し、その産生にはDGK ζ が主に寄与していることが明らかになった³⁵⁾。

9. DGK ι (IV型)

DGK ι のKOマウスを用いた実験により、DGK ι はDGを消費することによって、RasGRP3の活性(RasGRP3はC1ドメインにDGが結合することにより活性化する)を抑制してRap1の活性を低下させることを示した³⁶⁾(表1)。Rap1はRas活性を抑制するので、DGK ι はRasを間接的に活性化する(細胞増殖等を亢進する)。実際、DGK ι -KOマウスではホルボールエステル塗布によるRas依存性の皮膚がんの発症が抑制されていた。

DGK ι -KOマウスの脳の解析により、DGK ι は代謝型グルタミン酸受容体依存性LTD(mGluR-LTD)におけるシナプス前部からの伝達物質放出の制御制

御に関与することが明らかになった³⁷⁾(表1)。mGluR-LTDにおいては、PKCの活性制御が寄与していた。

10. DGK θ (V型)

GWASにより、DGK θ が家族性パーキンソン病の原因遺伝子の一つである可能性が示された³⁸⁾(表1)。DGK θ はin vitroで18:1/18:1-PAを産生する。興味あることに、我々は、様々なリン脂質の分子種の中で18:1/18:1-PAが最も強く α -シヌクレインと結合し、その凝集(パーキンソン病発症の原因の一つとされる)を促進することを示した³⁹⁾。

おわりに

以上の様に、DGKは予想以上に広範で多彩な生理機能・病態形成制御に関与しており、各DGKアイソザイムは、それぞれに特異的な機能を担っていることが明らかになって来ている。更に、産生されるPA分子種及び消費されるDG分子種がアイソザイムによって、また、細胞や刺激、生理機能・病態によって異なる可能性があるというデータが蓄積されてきている。各DGKアイソザイムがPI代謝回転とは独立した新規の情報伝達経路を形成している可能性が高い。近い将来、この興味ある現象や経路の全貌が明らかになることを期待したい。

上述の様に、DGKアイソザイムは様々な疾患の病態形成において重要な役割を担うことが明らかになり、DGKアイソザイムは魅力的な創薬ターゲット・健康食品ターゲットとして認識されつつある。例えば、DGK α や γ の阻害化合物は、抗がん剤及びがん免疫増強剤(そしてデュアル効果のある薬剤)として有望であると考えられる。また、ミリスチン酸も2型糖尿病や肥満を予防する健康食品として有望と考えられる。今後、各DGKアイソザイムを特異的に活性制御する化合物等が同定・開発されれば、各DGKアイソザイムが決定的に制御する(もしくは潜在的に関与する可能性のある)上述の疾病の治療薬やがん免疫増強剤の開発も視野に入るものと考えられる(表1)。

参考文献

- 1) Sakane F. et al. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 6794 (2020).
- 2) Olenchock B. A. et al. *Nat. Immunol.* 7, 1174–1181 (2006).
- 3) Murakami Y. et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 525, 1054–1060 (2020).
- 4) Yanagisawa K. et al. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Biol. Lipids* 1771, 462–474 (2007).
- 5) Takeishi K. et al. *J. Hepatol.* 57, 77–83 (2012).
- 6) Liu, K. et al. *J. Lipid Res.* 57, 368–379 (2016).
- 7) Yamaki, A. et al. *J. Cell. Biochem.* 120, 10043–10056 (2019).
- 8) Kakefuda K. et al. *PLoS One* 5, e13447 (2010).
- 9) Kurohane Kaneko Y. et al. *Endocrinology* 154, 4089–4098 (2013).
- 10) Yasuda S. et al. *FEBS Lett.* 581, 551–557 (2007).
- 11) Tsumagari R. et al. *eNeuro* 7, 0319–19 (2020).
- 12) Crotty T. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 103, 15485–15490 (2006).
- 13) Chibalin A. V. et al. *Cell*, 132, 375–386 (2008).
- 14) Sakai H. et al. *J. Biol. Chem.* 289, 26607–26617 (2014).
- 15) Murakami, C. et al. *J. Biol. Chem.* 295, 2932–2947 (2020).
- 16) Murakami, C. et al. *J. Biol. Chem.* 296, 100454 (2021).
- 17) Wada Y. et al. *Lipids* 51, 897–903 (2016).
- 18) Takato T. et al. *Diabetologia*, 60, 2076–2083 (2017).
- 19) Iwata, K., et al. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Biol. Lipids* 1864, 1031–1038 (2019).
- 20) Leach N. T. et al. *Am. J. Hum. Genet.* 80, 792–799 (2007).
- 21) Usuki T. et al. *Brain Res.* 1648, 193–201 (2016).
- 22) Lu Q. et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 497, 1031–1037 (2018).
- 23) Lu Q. et al. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Biol. Lipids* 1865, 158608 (2020).
- 24) Lu Q. et al. *FEBS Lett.* 594, 1787–1796 (2020).
- 25) Yasuda S. et al. *J. Biol. Chem.* 284, 29559–29570 (2009).
- 26) Baum A. E. et al. *Mol. Psychiatry* 13, 197–207 (2008).
- 27) Isozaki T. et al. *J. Neurochem.* 138, 448–456 (2008).
- 28) Komenoi S. et al. *Biochem. Biophys. Rep.* 19, 100660 (2019).
- 29) Asami M. et al. *FEBS Lett.* 595, 1313–1321 (2021).
- 30) Tabet R. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E3619–3628 (2016).
- 31) Rodriguez De Turco E. B. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 4740–4745 (2001).
- 32) Zhang N. et al. *J. Biol. Chem.* 287, 21204–21213 (2012).

- 33) Takao S., et al. *J. Cell. Biochem.* 122, 494–506 (2021).
- 34) Kim K. et al. *EMBO J.* 28, 1170-1179 (2009).
- 35) Misuno S. et al. *Biochem. Biophys. Rep.* 8, 352-359 (2016).
- 36) Regier D. S. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 7595-7600 (2005).
- 37) Yang J. et al. *EMBO J.* 30, 165-180 (2011).
- 38) Pankratz N. et al. *Hum. Genet.* 124, 593-605 (2009).
- 39) Misuno S. et al. *FEBS Lett.* 591, 784-791 (2017).

同窓会 HP: 2024 年 5 月 28 日公開