

(千葉大学審査学位論文)

モデルマウスを用いた  
ジアシルグリセロールキナーゼ $\delta$ の  
脳における機能解析

2016年2月

千葉大学大学院理学研究科  
基盤理学専攻化学コース

臼木 貴子

## 【目次】

- 目次 1~2
  
- 略号 3
  
- 要約 4
  
- 序章 5~10
  
- 第1章 DGK $\delta$ の発現部位の解析
  - 1-1 緒言 12
  - 1-2 試薬と実験手法 13~15
  - 1-3 結果 16~37
    - 1-3-1 マウス脳における DGK $\delta$ 蛋白質の発現
    - 1-3-2 マウス脳における週齢依存的 DGK $\delta$ 蛋白質・mRNA の発現
    - 1-3-3 マウス脳における DGK $\eta$ 蛋白質の発現
    - 1-3-4 マウス脳における週齢依存的 DGK $\eta$ 蛋白質・mRNA の発現
    - 1-3-5 DGK $\delta$ ,  $\eta$  mRNA のマウス胎仔における発現
    - 1-3-6 DGK $\delta$  mRNA のマウス生殖器における発現
  - 1-4 考察 38~41
  
- 第2章 脳特異的 DGK $\delta$ 欠損マウスの行動解析
  - 2-1 緒言 43
  - 2-2 実験手法 44~56
  - 2-3 結果 57~70
    - 2-3-1 脳特異的 DGK $\delta$ 欠損マウスの作製
    - 2-3-2 一般的所見
    - 2-3-3 高架十字試験
    - 2-3-4 オープンフィールド試験
    - 2-3-5 社会性試験
    - 2-3-6 八方十字迷路試験
    - 2-3-7 バーンズ迷路試験
    - 2-3-8 Cotton bud biting 試験
    - 2-3-9 尾懸垂試験
    - 2-3-10 新規物体探索試験
    - 2-3-11 ビー玉埋め試験

2-4 考察	71~74
● 第3章	脳特異的 DGK $\delta$ 欠損マウスの脳組織の形態観察
3-1 緒言	76
3-2 試薬と実験手法	77
3-3 結果	78~80
3-3-1	ヘマトキシリン・エオシン染色による脳の形態観察
3-3-2	Golgi-Cox 染色による脳の形態観察
3-4 考察	81
● 第4章	DGK $\delta$ 欠損細胞の形態解析
4-1 緒言	83
4-2 試薬と実験手法	84~85
4-3 結果	86~89
4-3-1	脳特異的 DGK $\delta$ 欠損マウスの神経初代培養細胞の形態変化
4-3-2	DGK $\delta$ ノックダウン Neuro-2a 細胞の形態変化
4-4 考察	90
● 第5章	DGK $\delta$ 欠損によって引き起こされる分子レベルでの変化
5-1 緒言	92
5-2 試薬と実験手法	93~94
5-3 結果	95~105
5-3-1	DGK $\delta$ 欠損脳における脂質量の解析
5-3-2	DGK $\delta$ 欠損脳における PA 分子種の解析
5-3-3	DGK $\delta$ 欠損脳における各種シグナル分子の変化
5-3-4	DGK $\delta$ ノックダウン Neuro-2a 細胞における PA 分子種量の変化
5-3-5	DGK $\delta$ ノックダウン Neuro-2a 細胞における 各種シグナル分子の変化
5-4 考察	106~107
● 参考文献	108~112
● 謝辞	113

## 【略号】

APP : amyloid precursor protein

Bcl-X<sub>L</sub> : B-cell lymphoma-extra large

BSA : bovine serum albumin

CaMKII  $\alpha$  : calcium/calmodulin-dependent protein kinase II  $\alpha$

Cre マウス : cre +/- loxP -/-の遺伝子を持つ DGK $\delta$  +/-マウス

DG : diacylglycerol

DGK : diacylglycerol kinase

DI 水 : deionized water

DIG : digoxigenin

EGFR : epidermal growth factor receptor

GSK : glycogen synthase kinase

HE : ヘマトキシリン・エオシン

KO : knockout

KO マウス : cre +/- loxP +/-の遺伝子を持つ脳特異的 DGK $\delta$  -/-マウス

LoxP マウス : cre -/- loxP +/-の遺伝子を持つ DGK $\delta$  +/-マウス

MBP : myelin basic protein

mRNA : messenger RNA

Object F : familiar object

Object N : novel object

PA : phosphatidic acid

PBS : phosphate-buffered saline

PBS-T : 0.1% Tween 含有 PBS

PFA : paraformaldehyde

PKC : protein kinase C

siRNA : small interfering RNA

SNAP : soluble NSF attachment protein

TACE : tumor necrosis factor (TNF)  $\alpha$  converting enzyme

TBS : tris-buffered saline

TBS-T : 0.1% Tween 含有 TBS

TLC : thin layer chromatography

TNF : tumor necrosis factor

WT マウス : cre -/- loxP -/-の遺伝子を持つ野生型 (wild type) の DGK $\delta$  +/-マウス

## 【要約】

脂質代謝酵素ジアシルグリセロール (DG) キナーゼ (DGK) は DG のリン酸化を触媒してホスファチジン酸 (PA) を産生する酵素である。我々は DGK の $\delta$ アイソザイムはマウス脳に高発現することを明らかにしているが、DGK $\delta$ の脳における機能や神経疾患との関連は未だほとんどわかっていない。そこで、その解明のための基礎的知見を得るために、まず、1~32 週齢の発達中のマウスの脳における DGK $\delta$ の蛋白質・mRNA の局在を解析した。その結果、DGK $\delta$ は大脳皮質に最も強く、次いで嗅球、海馬、小脳に多く発現すること、さらに、DGK $\delta$ 蛋白質の発現量は神経突起が盛んに形成される生後 1~4 週齢に急激に増加することがわかった。次に、最近作製した脳特異的 DGK $\delta$ 欠損マウスの行動解析を行った。強迫性障害の指標となるビー玉埋め試験を行ったところ、DGK $\delta$ 欠損マウスはコントロールに比べより多くのビー玉を埋める傾向があった。また、新規物体探索試験から、物体に対して不合理で過剰な接触行動をとることがわかった。これらの結果は、本マウスが強迫性障害様の表現型を示すことを強く示唆している。更に、この DGK $\delta$ 欠損マウス由来の神経初代培養細胞は、3 本以上の長い神経突起を持つ細胞の割合がコントロールに比べ有意に増加することがわかった。また、DGK $\delta$ の発現を低下させた Neuro-2a 神経芽腫細胞でも同様の傾向が確認された。以上の結果から、DGK $\delta$ は大脳皮質や海馬、小脳において神経突起の本数を負に制御し、DGK $\delta$ の発現低下は脳神経の過剰なネットワーク形成を誘導し、強迫性障害様の行動を引き起こすことが示唆された。

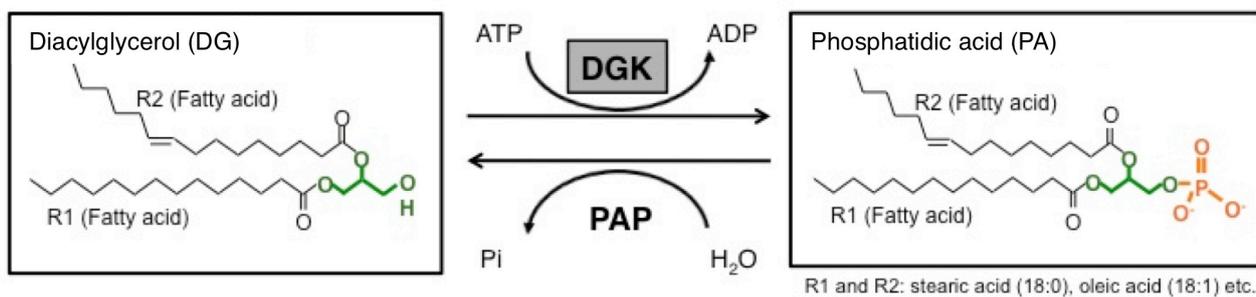
## 【序章】

ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) は脂質ジアシルグリセロール (DG) をリン酸化してホスファチジン酸 (PA) へと変換する脂質代謝酵素である (図 I-1). DG 及び PA はトリアシルグリセロールやリン脂質の生合成の中間体であるだけでなく、様々な生理機能に関与する脂質セカンドメッセンジャーとしての役割を持つ。例えば、DG は conventional protein kinase C (PKC), novel PKC, RAS グアニルヌクレオチド放出タンパク質 (Ras-GRP), Unc-13 などの複数のシグナル分子を活性化しており [1~3], 一方で PA も Ras-GTPase 活性化蛋白質 [4] や、ホスファチジルイノシトール-4-リン酸 5-キナーゼ [5, 6], 哺乳類ラパマイシン標的蛋白質 [7] などの様々な標的蛋白質を持つ。このように生理活性に重要な役割を持つ脂質である DG と PA の濃度は、その代謝酵素である DGK によって厳密に制御されており、近年その裏付けとなる研究として、DGK が癌、自己免疫疾患、II 型糖尿病、双極性障害などに関与することが明らかとなっている [8]。すなわち、DGK は DG を介したシグナリングを減弱化し、PA を介したシグナリングを活性化することで、DG と PA のバランスを制御し、様々な生命活動に重要な役割を担っていると考えられている [9~13]。

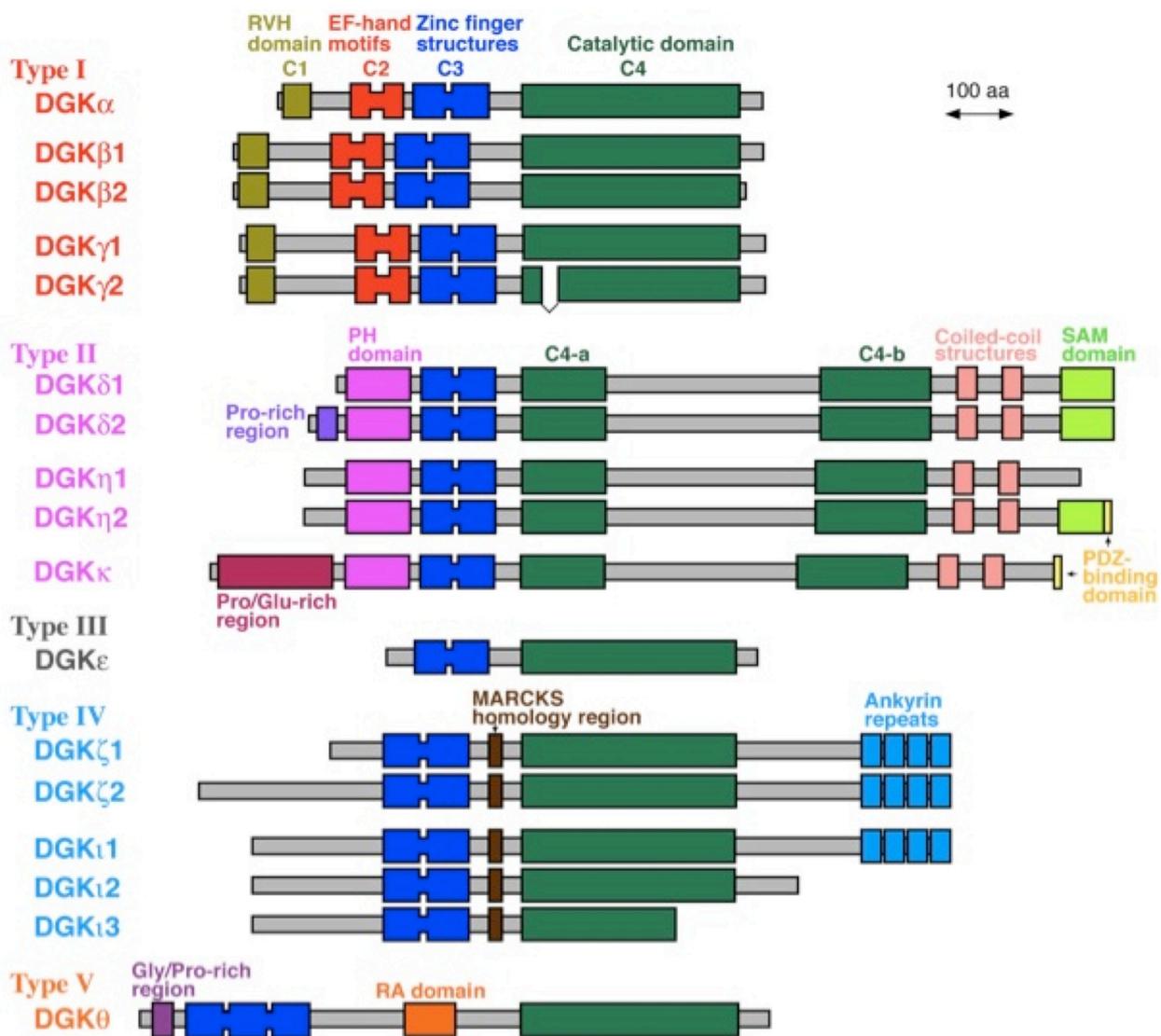
現在までに、哺乳類の DGK には 10 種類のアイズォイム ( $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon, \eta, \iota, \kappa, \theta, \zeta$ ) が存在する事が確認されている (図 I-2) [8, 11]。DGK のアイズォイムは特徴的な機能ドメインを持ち、その構造によって I から V 型の 5 つのグループに分けられている。DGK は我々の先の研究にもあるように、現在までにその生理機能や制御機構などが解明されつつあるが、その中でも 3 つの DGK アイズォイム  $\delta, \eta, \kappa$  からなる II 型 DGK は、癌や II 型糖尿病、双極性障害等の精神疾患など、難治性の疾患に関与する可能性が報告されている [13]。II 型 DGK のうち  $\delta$  と  $\eta$  は、それぞれ  $\delta 1, \delta 2$  [14] 及び、 $\eta 1, \eta 2$  [15] のスプライズバリエーションを持つ。II 型 DGK は図 I-2 に示す様にプレクストリン相同ドメイン、亜鉛フィンガー様ドメイン、触媒部位、コイルドコイル構造、sterile  $\alpha$  motif ドメインを共通に持つ [8, 11]。また、DGK $\delta 2$  は、N 末端側に proline rich な特徴的な配列を持つ。

我々は、DGK $\delta$  はグルコース刺激時のインスリン受容体シグナル伝達を正に制御することを明らかとしている [16, 17]。まず、細胞外グルコース濃度の急激な増加があると、DGK $\delta$  は細胞質から細胞膜へ移行し、活性化する [18]。また、DG を消費することにより、カスケード下位に位置する DG により活性化される酵素である PKC $\alpha$  の活性を低下させる [16]。PKC $\alpha$  はインスリン受容体をリン酸化し不活性化するため、DGK による DG の PA への変換による PKC $\alpha$  活性の減弱により、インスリン受容体のシグナル伝達は促進され、最終的にグルコースの取り込みが促進される。我々のグループは、II

図I-1: ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) の脂質代謝反応. 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) を産生する.



図I-2: DGKの10種類のアイズォイム及びそのスプライスバリアント. これらのアイズォイムは構造的な特徴により5つのサブタイプに分類され, それぞれのアイズォイムは特徴的な機能を持つ.



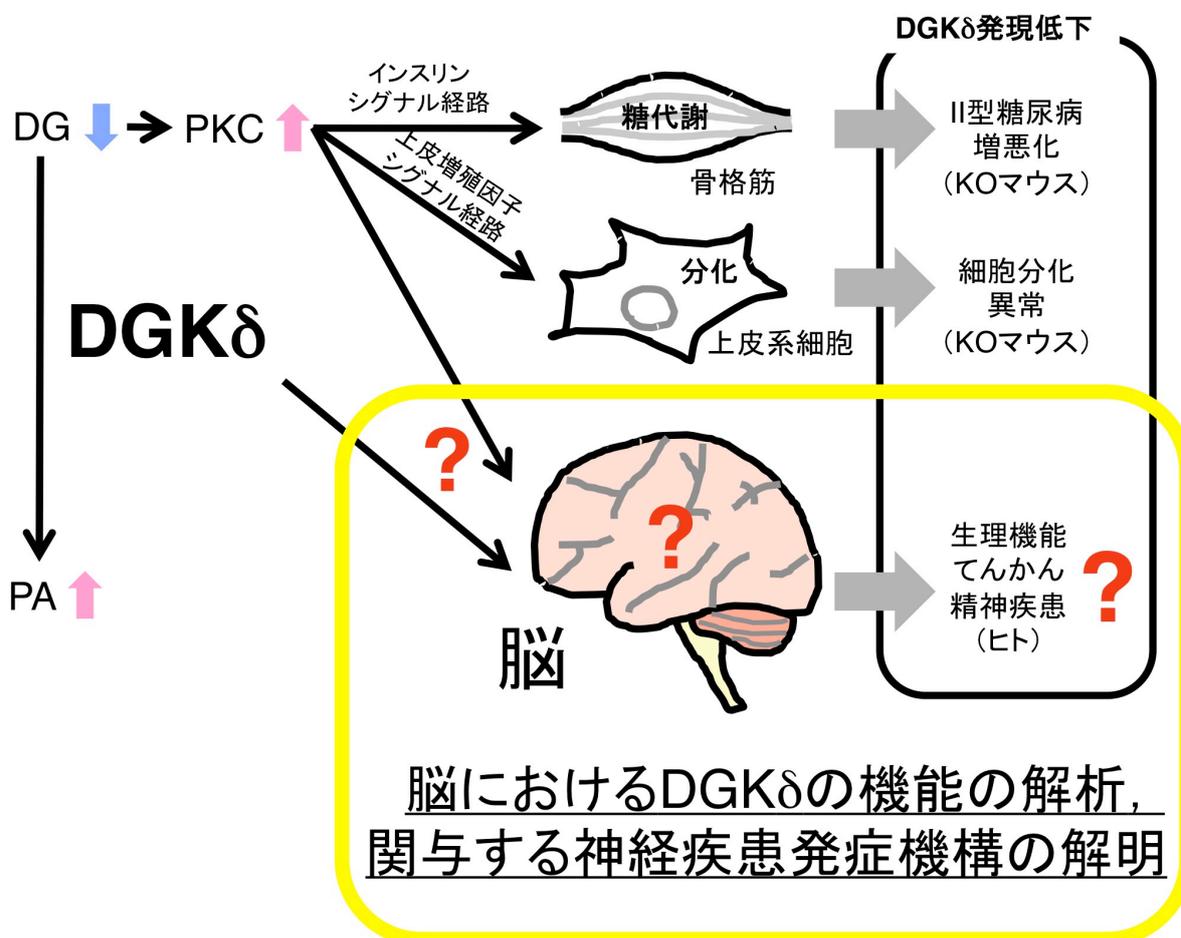
型糖尿病患者の骨格筋においては DGK $\delta$ 発現量が半減することを見出しており [16], DGK $\delta$ の発現低下によって PKC 活性が上昇しインスリンシグナル伝達経路が減弱化することで II 型糖尿病の増悪化を引き起こすことが強く示唆されている。

近年までに, DGK の制御機構の解明のために DGK ノックアウト (KO) マウスが数種作製されているが [19~23], その中でも DGK $\delta$  を欠失させたマウスは特徴的な表現型を示す. Conventional (全身の) DGK $\delta$ -KO マウスは, まぶたがない状態で出生し, 体重も野生型マウスに比べ少なく, 出生後 24 時間以内に死亡する [23]. この conventional DGK $\delta$ -KO マウスの生化学的解析から, DGK $\delta$ は PKC の活性を負に制御し, 上皮細胞の増殖シグナル伝達を正に制御することが解明された. しかしながら, このマウスは生後 24 時間以内に死亡するため, その詳細な表現型解析は未だ十分に行われていない.

一方で DGK $\delta$ 遺伝子を部分欠損 (DGK $\delta$  +/-) したヒト患者が, てんかんや自傷行動, 学習能力の低下などの神経症状を示したことが報告されている [24]. 更に, genome-wide association study から, DGK $\delta$ 遺伝子がアルツハイマー病, クロウン病, 脳梗塞に関与する可能性が報告されている (<http://www.gwascentral.org/>). また, 我々は DGK $\delta$ はマウスの脳に最も強く発現することを明らかとしている [25] (図 1-1A). そのため, DGK $\delta$ は脳においても何らかの重要な役割を担っていることが推察されるが, 現在までに DGK $\delta$ の脳における生理機能はほとんど明らかになっていない (図 I-3). それどころか, DGK $\delta$ の脳における詳細な発現部位も十分に報告されていなかった.

そこで, まず DGK $\delta$ 蛋白質及び mRNA の脳における詳細な発現部位の同定を, 同じ II 型に属する DGK $\eta$ と比較しつつ行った (第 1 章). また, DGK $\delta$ は出生時にはすでに脳に発現していることから (図 1-2A), 発生時にも重要な役割を担っていることが推察されたため, 胎仔期での DGK $\delta$  mRNA の発現分布も調べた. さらに, DGK $\delta$ は脳に次いで雌雄生殖器での発現が多いため, 生殖器での発現分布解析も行った. DGK $\delta$ の脳における機能の解明は, DGK $\delta$ が関与する神経疾患の治療のための基礎的知見となることが期待出来る. しかし, conventional DGK $\delta$ -KO マウスは生後間もなく死亡するため, 脳神経系の異常を解析する事が出来ない. そのため我々は近年新たに脳特異的な conditional DGK $\delta$ -KO マウスを作製した (第 2 章). DGK $\delta$ の脳における役割の解明を目的として, 本 KO マウスの個体レベル・組織レベル・細胞レベル・分子レベルでの解析を行った. まず, 脳特異的 DGK $\delta$ -KO マウスの行動解析を行い, 恐怖心, 社会性, 記憶力, 攻撃性, 鬱状態の程度, 認知力, 強迫性障害について解析した (第 2 章). また, 脳特異的 DGK $\delta$ 欠損マウス脳組織の構造異常の解析のために, 脳のヘマトキシリン・エオシン染色と Golgi-Cox 染色を行った (第 3 章). 次に, DGK $\delta$ 欠損時のより詳細な神経突起形成異常について解析するために, 脳特異的 DGK $\delta$ -KO マウスから得た大脳皮質神

図I-3: DGK $\delta$ の現在までに解明されている機能と本研究との関わり. DGK $\delta$ は骨格筋においてはインスリンシグナル経路を介して糖代謝に, 上皮系の細胞においては上皮増殖因子シグナル経路を介して分化に関与する. 本研究では, 未だ解明されていないDGK $\delta$ の脳における機能とDGK $\delta$ が関与する神経疾患発症機構の解明を目的とした研究を行った.



経初代培養細胞の形態を観察した（第4章）. さらに，マウス神経芽腫由来の Neuro-2a 細胞を用いて DGK $\delta$ ノックダウン時の神経突起の形態変化を調べた. 第5章では, DGK $\delta$ が選択的に代謝する DG 分子種の解明のために，脳特異的 DGK $\delta$ -KO マウスの脳と Neuro-2a 細胞の PA 分子種の測定を行った. さらに，脳特異的 DGK $\delta$ 欠損マウス脳または DGK $\delta$ ノックダウン Neuro-2a 細胞での種々のシグナル分子, 疾患マーカー, 神経マーカーの発現量の変化をウェスタンブロッティングで検出し, DGK $\delta$ が関与するシグナルの探索を行った.

## 第 1 章

### DGK $\delta$ の発現部位の解析

## 1-1 緒言

我々は近年脳特異的 DGK $\delta$ -KO マウス (Usuki, T., et al. unpublished work) を作製したが, この KO マウスの脳における表現型の解析と機能の解明のためには, DGK $\delta$ の脳における発現部位を同定することが不可欠であった. しかしながら, DGK $\delta$ の脳における詳細な発現パターンは現在までに報告されていなかった. また, DGK $\delta$ の週齢依存的な発現も明らかとなっていなかった. そこで, 今回初めてマウスの発達中の脳における DGK $\delta$ の蛋白質及び mRNA の発現部位の同定を, ウェスタンブロットと *in situ* hybridization 法を用いて行った [25]. また, DGK $\delta$ は出生時にはすでに脳に発現していることから (図 1-2A), 発生時にも重要な役割を担っていることが推察されたため, 胎仔期での DGK $\delta$  mRNA の発現分布も調べた. また, 比較のため DGK $\eta$ の発現分布についても同様に解析した. さらに, DGK $\delta$ は脳に次いで雌雄生殖器での発現が多いため, 生殖器における発現分布解析を行った [26].

## 1-2 試薬と実験手法

### 1-2-1 動物種及び組織摘出

C57BL/6N マウスは日本 SLC 株式会社より購入した。組織は断頭後直ちに摘出した。全ての動物実験は、「千葉大学が定めた動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」に沿って行った。

### 1-2-2 ウェスタンブロット

全ての組織は、cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostic) を含む lysis buffer (50 mM HEPES (pH 7.2), 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) 中でホモジェナイズした。1,000 × g で 5 分遠心した後、上清の蛋白質濃度を Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit (Thermo Scientific) を用いて測定した。組織ライセート (蛋白質 20 または 30 μg) は sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) によって分離し、polyvinylidene difluoride membrane (Pall Life Sciences) に転写した。メンブレンは 5% スキムミルク / 0.1% Tween20 含有 phosphate-buffered saline (PBS: 137 mM NaCl, 2.67 mM KCl, 8.09 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (PBS-T) でブロッキングし、それぞれ抗 DGKδ 抗体 (1:1,000 希釈) [14], 抗 DGKη 抗体 (13873-1-AP, ProteinTech Group) (1:3,000 希釈), または抗 β-actin 抗体 (A2066, Sigma-Aldrich) (1:5,000 希釈) を用い、4°C で 16 時間インキュベートした。蛋白質は、ペルオキシダーゼ結合抗 rabbit IgG 抗体 (111-036-045, Jackson ImmunoResearch Laboratories) (1:10,000 希釈) を用い ECL Western Blotting Detection System (GE Healthcare Bio-Sciences) により検出した。抗体の希釈では 5% スキムミルク / PBS-T を用いた。一次抗体及び二次抗体反応後はメンブレンを PBS-T で 3 分 × 5 回洗浄した。

### 1-2-3 Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

マウス脳を QIAzol lysis reagent (Qiagen) を用いてホモジェナイズし、全 RNA を RNeasy Lipid Tissue Midi Kit (Qiagen) により単離した。cDNA は、0.5 μg の RNA と random hexamer primers を用いて Transcriptor First-Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics) により合成した。DNA の PCR 増幅には KOD-Plus (Toyobo) と下記のマウス DGKδ 遺伝子に対するオリゴヌクレオチドプライマーを用いた。DGKδ primers: forward primer (nucleotide positions 4506–4527, 5'-CGGGATCCGGAAGTGACATATGCCATGAGA-3'); reverse primer (nucleotide positions 5484–5505, 5'-GGGGTACCTCCTTCATTCTATCCCTCTCCA-3'). PCR 条件: 94°C for 3 min, 35 cycles

of 94°C for 30 sec, 56°C for 30 sec, and 68°C for 1.5 min, and 68°C for 5 min. DGK $\eta$  primers: forward primer (nucleotide positions 2417–2436, 5'-GGGAATTCCGGGAGCTACTACAGAGATC-3'); reverse primer (nucleotide positions 3224–3243, 5'-GGGGGTCGACCTCCACAGAGTGTAAGGCAC-3'). PCR 条件: 94°C for 3 min, 35 cycles of 94°C for 30 sec, 58°C for 30 sec, and 68°C for 2 min, and 68°C for 5 min. PCR 産物はそれぞれ, pBluescript SK (+) vector (Stratagene-Agilent Technologies) の BamHI/KpnI または EcoRI/SalI サイトに挿入した. コントロールとして, マウス glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA も増幅した. GAPDH-specific oligonucleotide primers: forward primer (nucleotide positions 103–128, 5'-TCGGTGTGAACGGATTTGGCCGTATT-3'); reverse primer (nucleotide positions 1056–1079, 5'-CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC-3'). PCR 条件: 94°C for 3 min, 35 cycles of 94°C for 30 sec, 45°C for 30 sec, and 72°C for 1 min, and 72°C for 5 min. PCR 産物はエチジウムブロマイド (Wako Pure Chemical) 含有アガロースゲル電気泳動にて分離し, 365 nm の UV 照射により検出した.

#### 1-2-4 ジゴキシゲニン標識プローブ作製

環状プラスミドは直鎖状にするために, DGK $\delta$  mRNA のプローブ作製では制限酵素 Asp718 (Roche Diagnostics) (センス鎖の作製) または BamHI (アンチセンス鎖の作製) で処理し, DGK $\eta$  mRNA のプローブ作製のために, SalI (センス鎖の作製) または EcoRI (アンチセンス鎖の作製) で切断した. DGK $\eta$  mRNA のアンチセンスプローブは DGK $\eta$ 1, - $\eta$ 2 どちらも認識する. Digoxigenin (DIG) -labeled プローブの作製は, 3  $\mu$ g の直鎖化 DNA と T3 または T7 RNA ポリメラーゼ (Promega) を用い, DIG RNA Labeling Kit protocol (Roche Diagnostics) に従って行った.

#### 1-2-5 *In situ* hybridization

単離したマウス脳は直ちにヘキサンドライアイス内で 100% OCT compound (Tissue-Tek Sakura Finetek USA, Inc.) 内に包埋した. 凍結脳から 25  $\mu$ m の切片を Leica CM 1800 を用いて作製し, APS (アミノシラン) -coated スライドガラス (Matsunami) にのせた. 切片は 4% paraformaldehyde (PFA) /PBS (Wako Pure Chemical) で 10 分間固定した後, 塩基性蛋白質を 0.5% acetic anhydride in 0.1 M triethylamine (pH 8.0) でアセチル化した. アセチル化の前後にスライドガラスを PBS で洗浄した. プレハイブリダイゼーションはリボプローブ非含有ハイブリダイゼーションバッファー (40% deionized formamide, 10% dextran sulfate, 1  $\times$  Denhard's solution, 4  $\times$  SSC (1  $\times$  SSC: 0.15 M

NaCl, 15 mM sodium citrate), 10 mM dithiothreitol, 1 mg/mL tRNA from baker's yeast, 1 mg/mL boiled deoxyribonucleic acid from salmon sperm) を用い, 室温 20 分で行った. ハイブリダイゼーションは, 80°C で 5 分間変性させた 0.25 mg/mL DIG-labeled リボプローブ含有ハイブリダイゼーションバッファーで 72°C, 16 時間行った. インキュベート後, 切片を 72°C の 1 × SSC, 0.2 × SSC, 0.1 × SSC, 0.05 × SSC で段階的に洗浄した. その後切片を Blocking Reagent Solution (Roche Diagnostics) で 1 時間ブロッキングし, anti-DIG Fab fragments conjugated with alkaline phosphatase (Blocking Reagent Solution で 1:5,000 希釈) で 4°C, 16 時間インキュベートした. 染色は, Nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (NBT/BCIP) Staining Solution を用い, DIG Nucleic Acid Detection Kit protocol (Roche Diagnostics) に従って行った.

## 1-3 結果

### 1-3-1 マウス脳における DGK $\delta$ 蛋白質の発現

マウスの各臓器における DGK $\delta$ 蛋白質の発現量を確認するため、マウス脳、肺、肝臓、腎臓、脾臓、骨格筋、心臓、胃、小腸、大腸、精巣、卵巣に発現している DGK $\delta$ 蛋白質を、我々が作製した抗 DGK $\delta$ 抗体 [14] を用いたウェスタンブロッティングにより検出した。DGK $\delta$ 2 は様々なマウス臓器で幅広く発現していたが、その発現は脳において最も強く検出された (図 1-1A)。また、精巣、脾臓、肺、卵巣にも強く発現していた。DGK $\delta$ 2 のスプライスバリエントである DGK $\delta$ 1 (130 kDa) はマウス脳では検出されなかった。

DGK $\delta$ の脳におけるより詳細な発現分布を解析するために、マウス脳を大脳皮質、小脳、脳幹、嗅球、海馬、その他の部位 (中脳や視床下部を含む) に分け (図 1-1B)、ウェスタンブロッティングにより DGK $\delta$ を検出した。その結果、12 週齢のマウスでは、DGK $\delta$ は大脳皮質に最も強く、次いで、嗅球、海馬、小脳に多く発現することがわかった (図 1-1C)。

### 1-3-2 マウス脳における週齢依存的 DGK $\delta$ 蛋白質・mRNA の発現

次に、DGK $\delta$ のマウス脳における週齢依存的な発現を調べた。そのために、生後 0 日から 32 週齢のマウス全脳における DGK $\delta$ の発現量をウェスタンブロッティングにより検出した。図 1-2A に示すように、DGK $\delta$ は生後 0 日のマウス全脳に、わずかではあるが既に発現していた。さらに、興味あることに、その発現量は生後増加し、4 週齢で急激に上昇しほぼ最大量に達することがわかった。脳部位別の週齢依存的な DGK $\delta$ の発現量を検出したところ、大脳皮質では全脳と同様に生後 4 週齢までに発現量が増加していた (図 1-2B)。しかしながら、小脳、嗅球、海馬では週齢依存的な DGK $\delta$ の発現量の変化はみられなかった (図 1-2C~E)。DGK $\delta$ は脳のそれぞれの部位で異なった、特に大脳皮質では特異的な週齢依存的発現パターンを示すことがわかった。このことから、DGK $\delta$ の全脳での生後 4 週齢までの発現量の増加は、大脳皮質での発現量の増加が強く影響しているものと考えられる。

次に、DGK $\delta$ のより詳細な発現分布を調べるために、組織染色を行った。我々は以前 DGK $\delta$ の抗体を 3 種類作製しているが [8, 27], 非特異的な染色が強かったため、組織染色には使用することが出来なかった。そのため、mRNA を検出する *in situ* hybridization 法を用いて DGK $\delta$ の発現分布を解析した。1, 4, 12, 32 週齢のマウスの脳の凍結切片を作

図1-1: マウスの各組織におけるDGK $\delta$ 蛋白質の発現. (A) 25週齢のマウスから得た組織 (蛋白質30  $\mu$ g) 中のDGK $\delta$ をウェスタンブロットにより検出した. 成熟したマウスでは, DGK $\delta$ は脳に最も強く, 次いで精巣や卵巣などの生殖器や肺に強く発現することがわかった. (B) マウス脳は1~6の部位に分割した. 1: cerebral cortex (大脳皮質), 2: cerebellum (小脳), 3: brain stem (脳幹), 4: olfactory bulb (嗅球), 5: hippocampus (海馬), 6: other (その他). (C) 12週齢のマウス脳を(B)に示した6つの部分に分割し, DGK $\delta$ と $\beta$ -actinをウェスタンブロットにより検出した. DGK $\delta$ は大脳皮質に最も強く検出された. また, 海馬, 嗅球, 小脳にも強く発現していた. グラフでは, DGK $\delta$ の発現量を大脳皮質での発現を100%として相対量で示した. DGK $\delta$ のバンドはImage J software (NIH) で定量し,  $\beta$ -actin量で割って補正した. 4回の独立した実験の平均 $\pm$ 標準偏差を示した. 有意性はANOVA, Tukey's post hoc testにより解析した (\* $p$ <0.05 vs cerebral cortex).

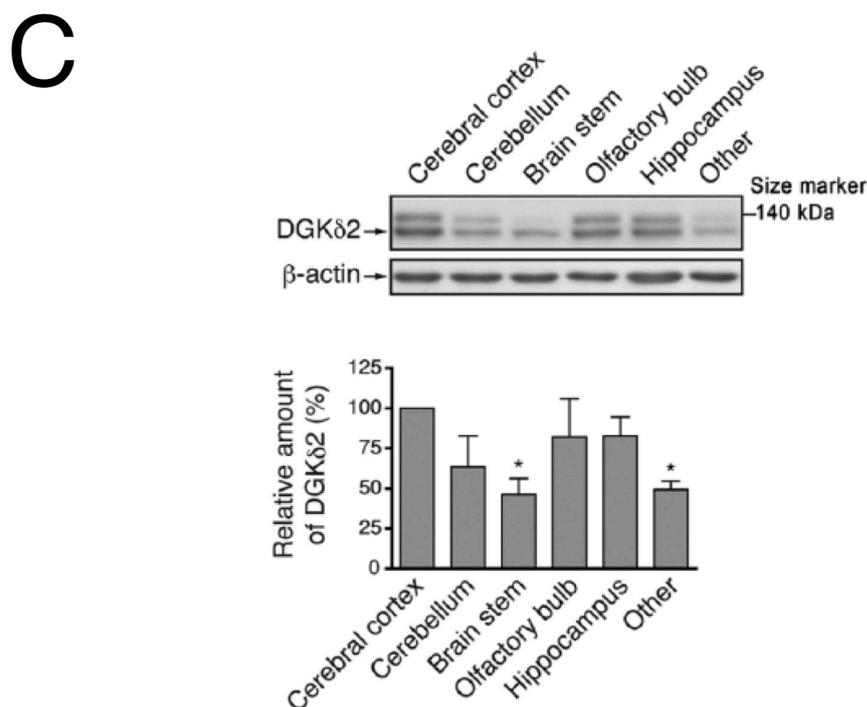
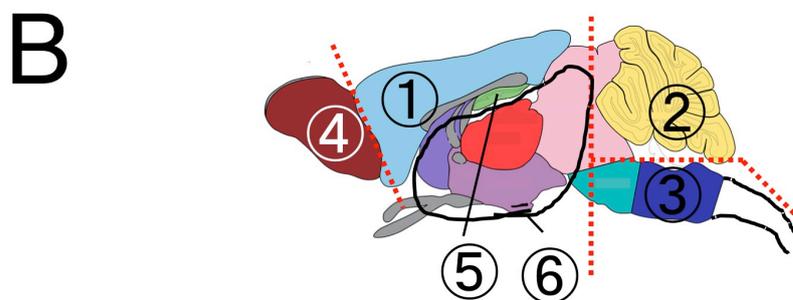
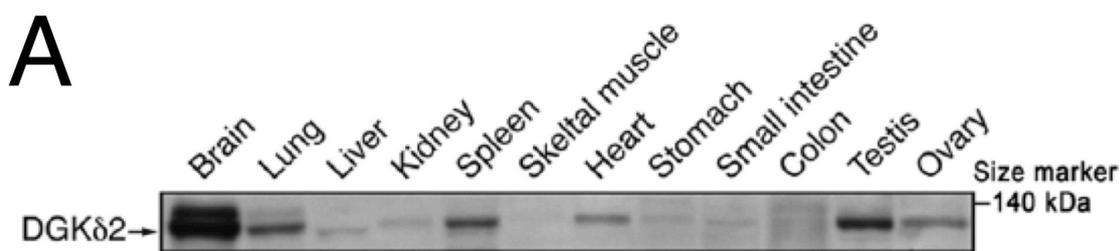
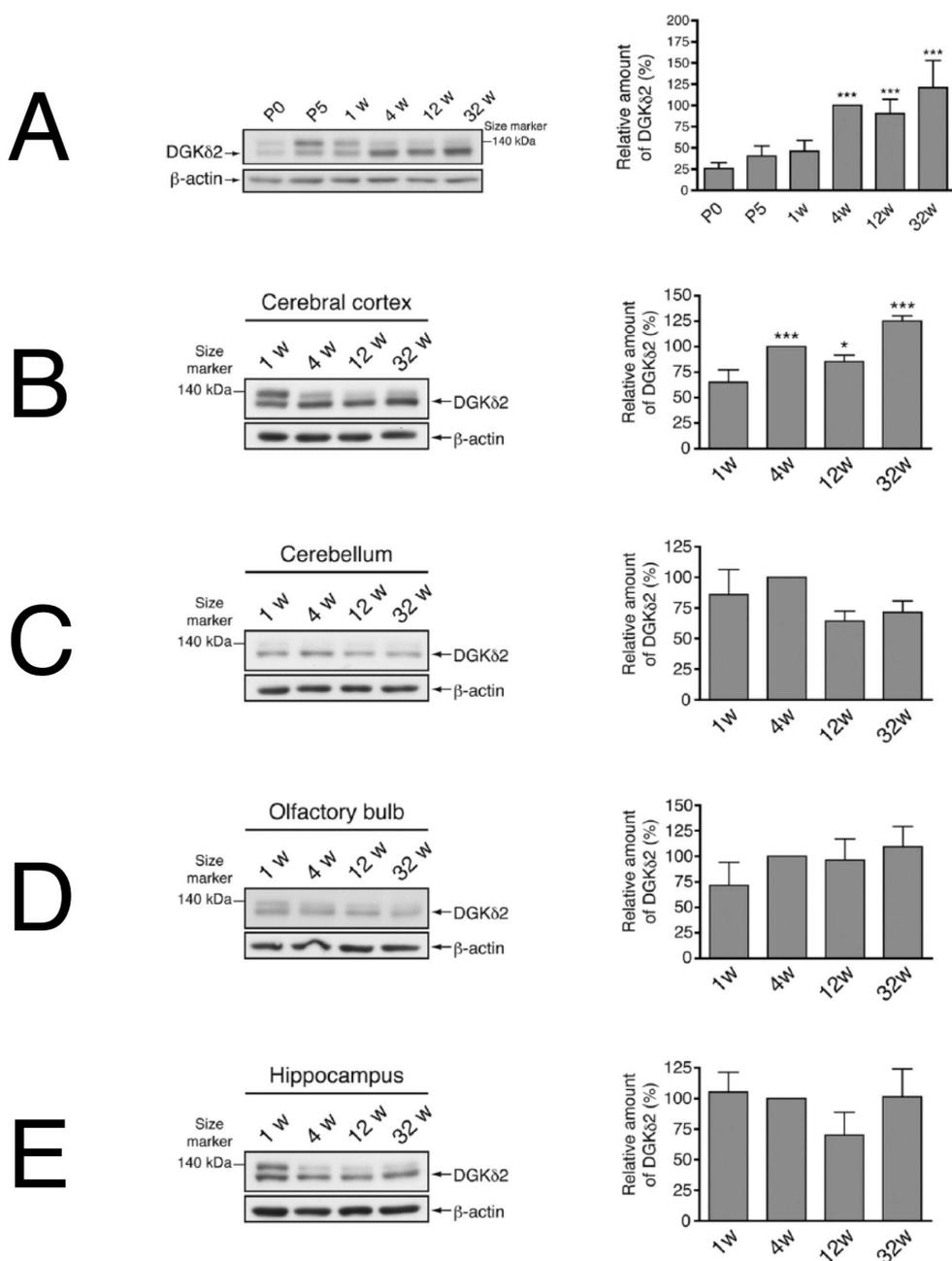


図1-2: マウス脳におけるDGK $\delta$ 蛋白質の週齢依存的な発現量の変化. (A) 生後0日から32週齢のマウス全脳でのDGK $\delta$ ,  $\beta$ -actinの発現量をウェスタンブロットで検出した. DGK $\delta$ は出生時には既に発現しており, その発現は生後1週齢から4週齢で急増した. (B~E) 1~32週齢マウスの大脳皮質(B), 小脳(C), 嗅球(D), 海馬(E)のDGK $\delta$ の発現量. DGK $\delta$ の発現は, 大脳皮質において生後1週齢から4週齢で顕著に増加することがわかった. グラフでは, DGK $\delta$ 2の発現量を4週齢での発現を100%として相対量で示した. DGK $\delta$ のバンドはImage J software (NIH)で定量し,  $\beta$ -actin量で割って補正した. 4回の独立した実験の平均 $\pm$ 標準偏差を示した. 有意性はANOVA, Tukey's post hoc testにより解析した(\* $p$ <0.05, \*\*\* $p$ <0.005 vs P0 (A) or 1 week (B~E)). P, postnatal age; w, week(s).



製し、DGK $\delta$  mRNA のアンチセンス RNA プローブ (mRNA はセンス鎖なのでハイブリッドを形成する) とハイブリダイズさせ、NBT/BCIP 発色反応により検出した。大脳皮質では DGK $\delta$  蛋白質は強く発現していたが、mRNA レベルでも大脳皮質に広く発現が確認出来、大脳皮質の II から VI 層 (II : 外顆粒層, III : 外錐体細胞層, IV : 内顆粒層, V : 神経細胞層, VI : 多型細胞層) に発現が確認された (図 1-3A, -4A)。一方で、I 層目の分子層では DGK $\delta$  は検出されなかった。また、DGK $\delta$  mRNA は小脳、嗅球、海馬でも検出された。小脳では DGK $\delta$  mRNA は顆粒層のみに発現し、プルキンエ細胞層では検出されなかった (図 1-3B, -4B)。嗅球では、僧帽層、糸球層、顆粒層に発現が確認された (図 1-3C, -4C)。さらに、海馬の歯状回、CA1~3 の錐体層で発現することがわかった (図 1-3D, -4D~G)。しかしながら、これらの部位での DGK $\delta$  mRNA の週齢依存的な発現パターン変化は確認されなかった。

### 1-3-3 マウス脳における DGK $\eta$ 蛋白質の発現

DGK $\delta$  の発現分布と比較するために、同じ II 型 DGK である  $\eta$  アイソザイムのマウス脳における発現を調べた。DGK $\eta$  には  $\eta$ 1 と  $\eta$ 2 のスプライスバリエーションがある (図 I-2)。まず、市販の抗 DGK $\eta$  抗体を用いて検出されるバンドを、野生型および DGK $\eta$  欠損マウス脳 (DGK $\eta$  のバンドは検出されない) で比較することで、DGK $\eta$ 1 が 130 kDa、 $\eta$ 2 が 135 kDa に発現することを確認した (図 1-5)。DGK $\delta$  蛋白質と同様に、DGK $\eta$ 1、 $\eta$ 2 はどちらも他の臓器に比べ脳に強く検出された。また、肺や卵巣でも DGK $\delta$  と同様に強く発現していたが、一方で、DGK $\delta$  と異なり小腸や大腸、胃にも多く発現していた (図 1-6A)。脳の部位別での発現パターンも DGK $\delta$  とは異なっていた (図 1-6B)。DGK $\eta$ 1 は、12 週齢のマウスの大脳皮質、小脳、海馬に非常に強く検出されたが、嗅球や脳幹での発現は非常に弱かった。一方で、DGK $\eta$ 2 は大脳皮質や嗅球、海馬、小脳などに発現がみられたが、DGK $\eta$ 1 に比べ発現量は非常に少ないことがわかった (図 1-6B)。

### 1-3-4 マウス脳における週齢依存的 DGK $\eta$ 蛋白質・mRNA の発現

DGK $\eta$ 1 と  $\eta$ 2 の週齢依存的な脳での発現を検出したところ、それぞれ異なった特異的な発現パターンを示すことがわかった。DGK $\eta$ 1 と  $\eta$ 2 どちらも生後 0 日でマウス脳に発現しており、DGK $\eta$ 1 は DGK $\delta$  と同様に、生後 4 週齢までに急激に発現量が増加して最大量に到達することがわかった (図 1-7A)。一方で、DGK $\eta$ 2 の発現は生後 5 日で最大量に達し、その後は DGK $\eta$ 1 の発現増加と反比例するように、32 週齢まで減少することがわかった。脳の各部位における発現を検出したところ、DGK $\eta$ 1 の発現は、大脳

図1-3: マウスの発達中の脳におけるDGK $\delta$  mRNA発現量を *in situ* hybridization法を用いて調べた。1~32週齢のマウスの大脳皮質(A)、小脳(B)、嗅球(C)、海馬(D)におけるDGK $\delta$  mRNAを、DGK $\delta$  mRNAのアンプリコンで検出した。DGK $\delta$ は大脳皮質のII-VI層、小脳の顆粒層、嗅球の僧帽層、顆粒層、糸球体層、海馬のCA1-3領域と歯状回に検出された。DGK $\delta$  mRNAの発現は年齢依存的な発現パターン変化は検出されなかった。センスプローブのハイブリダイゼーションでは発色は検出されなかった。3回の独立した実験を行い、代表例を示した。I, 大脳皮質I層; II-VI, 大脳皮質II層からVI層; GCL, 顆粒層; PCL, プルキンエ細胞層; EPL, 外網状層; GL, 糸球体層; IPL, 内網状層; MCL, 僧帽層。Scale bar, 400  $\mu$ m.

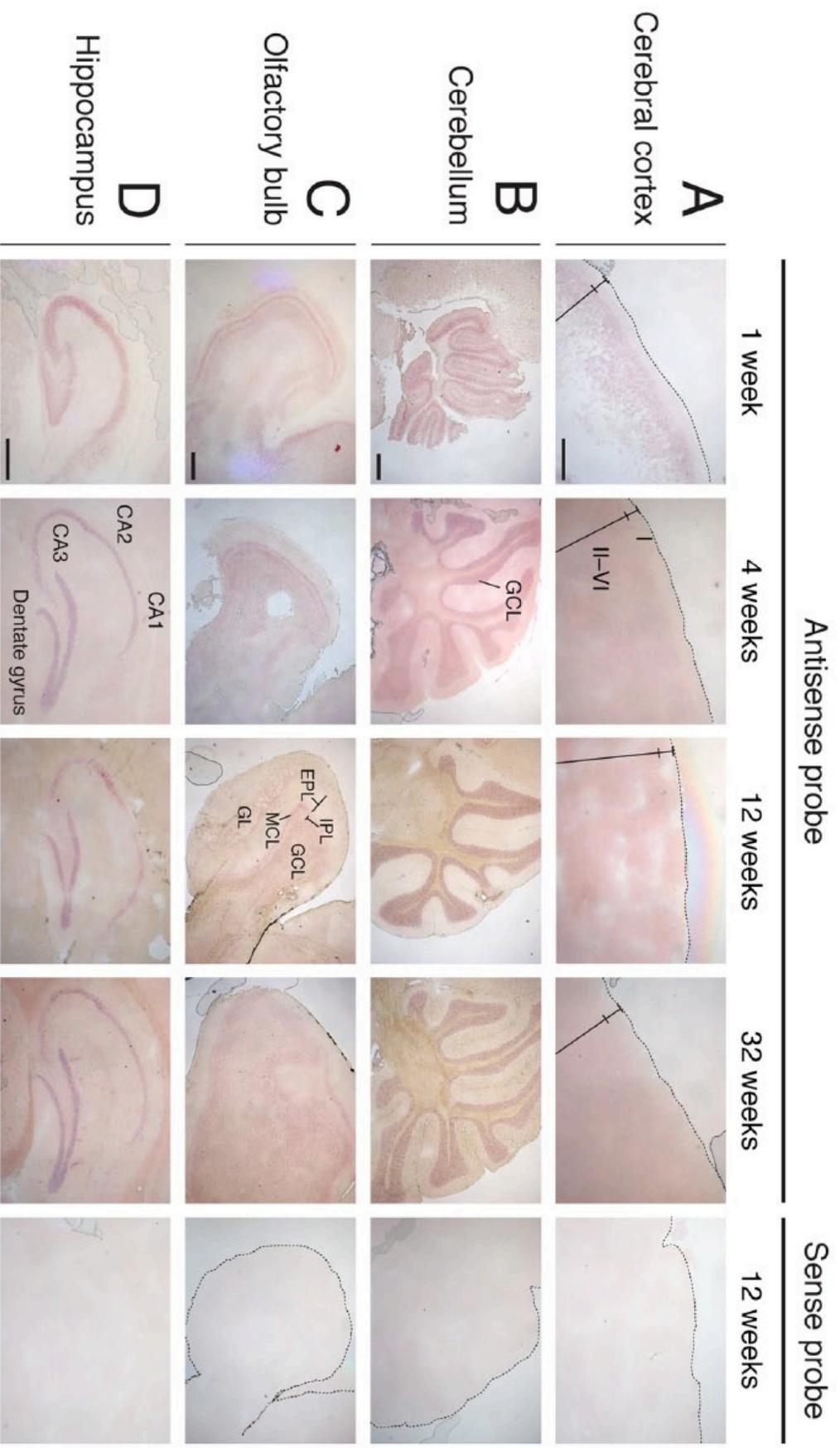


図1-4: *In situ* hybridizationによってDGK $\delta$  mRNAを検出した4週齢マウス的大脑皮質(A), 小脳(B), 嗅球(C), 海馬(D~G)の高倍率図. I, 大脑皮質I層; II, 大脑皮質II層; GCL, 顆粒層; EPL, 外網状層; GL, 糸球体層; IPL, 内網状層; MCL, 僧帽層. Scale bar, 40  $\mu$ m.

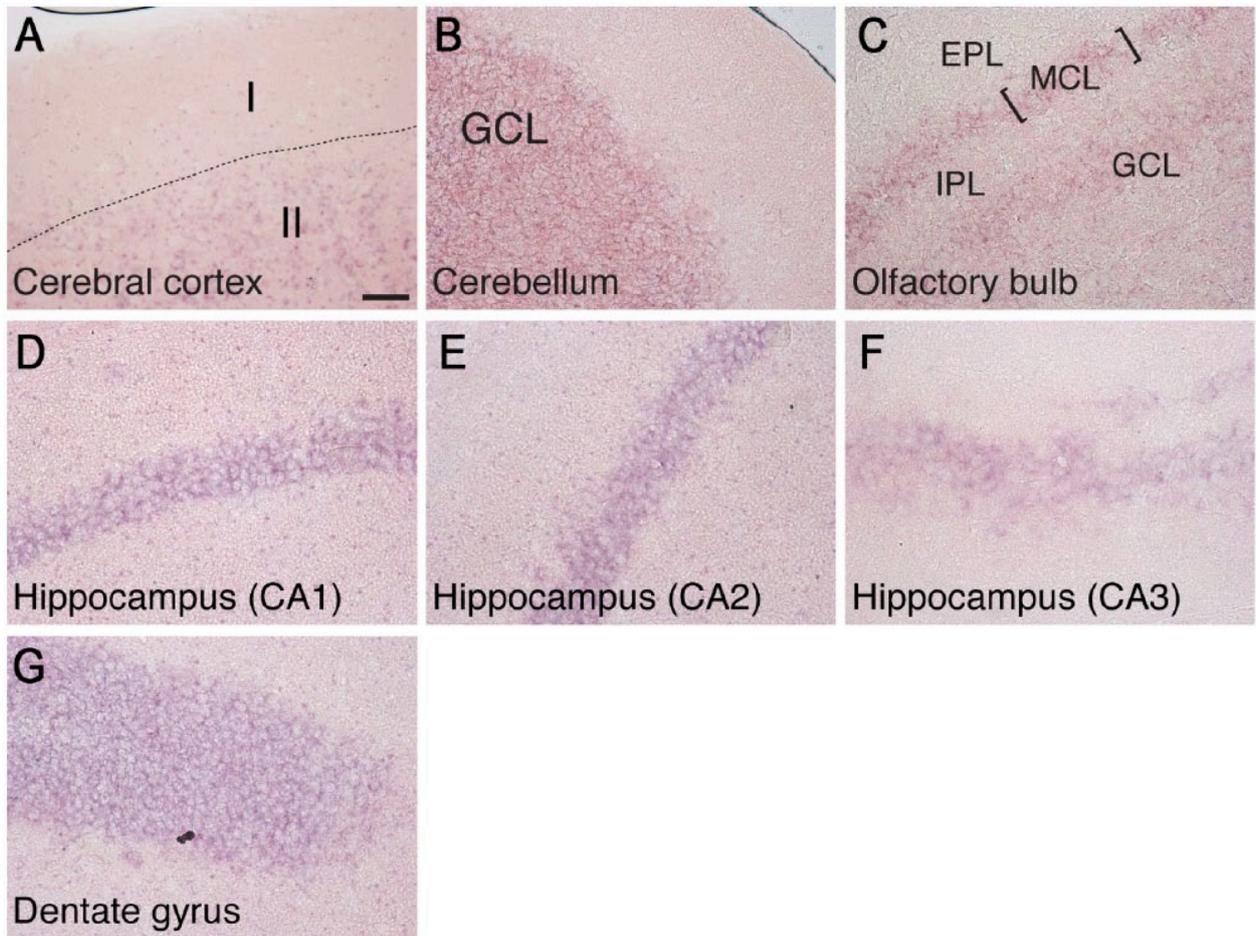


図1-5: ウェスタンブロットによる, 野生型またはDGK $\eta$ -KOマウスの脳におけるDGK $\eta$ 蛋白質の検出. WT, 野生型マウス; KO, DGK $\eta$ -KOマウス.

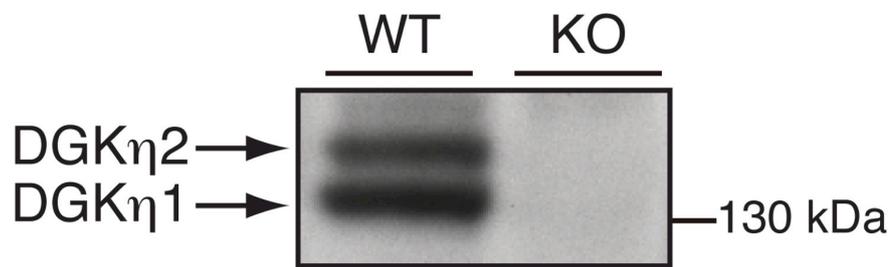
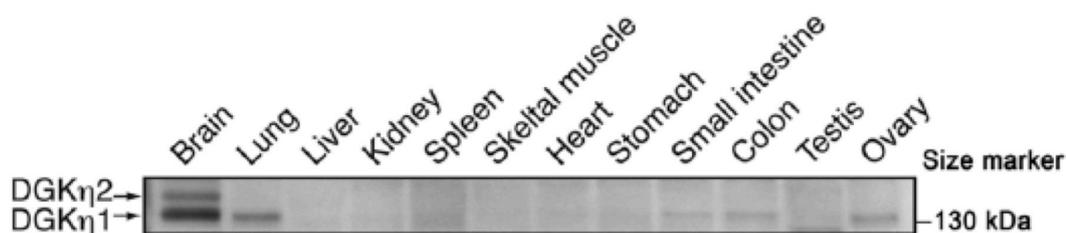


図1-6: マウスの各組織におけるDGK $\eta$ 蛋白質の発現. (A)25週齢のマウスから得た組織 (蛋白質30  $\mu$ g)中のDGK $\eta$ をウェスタンブロットにより検出した. DGK $\eta$ 1と $\eta$ 2はどちらも脳に強く発現した. また, DGK $\eta$ 1は肺や卵巣でも発現が検出された. (B)12週齢のマウス脳を図1-1Bに示したように6つの部位に分割し, DGK $\eta$ と $\beta$ -actinをウェスタンブロットにより検出した. DGK $\eta$ は大脳皮質に最も強く検出された. また, 海馬, 小脳にも強く発現していた. グラフでは, DGK $\eta$ 1の発現量を脳皮質での発現を100%として相対量で示した. DGK $\eta$ 1のバンドはImage J software (NIH)で定量し,  $\beta$ -actin量で割って補正した. 4回の独立した実験の平均 $\pm$ 標準偏差を示した. 有意性はANOVA, Tukey's post hoc testにより解析した (\*\*\*) $p < 0.005$  vs cerebral cortex).

A



B

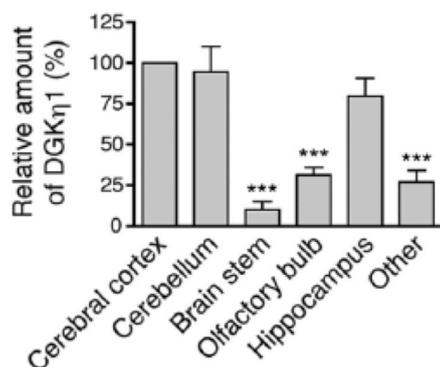
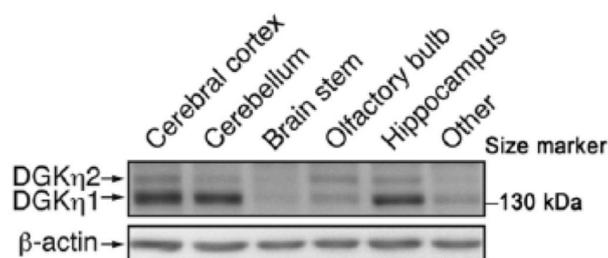
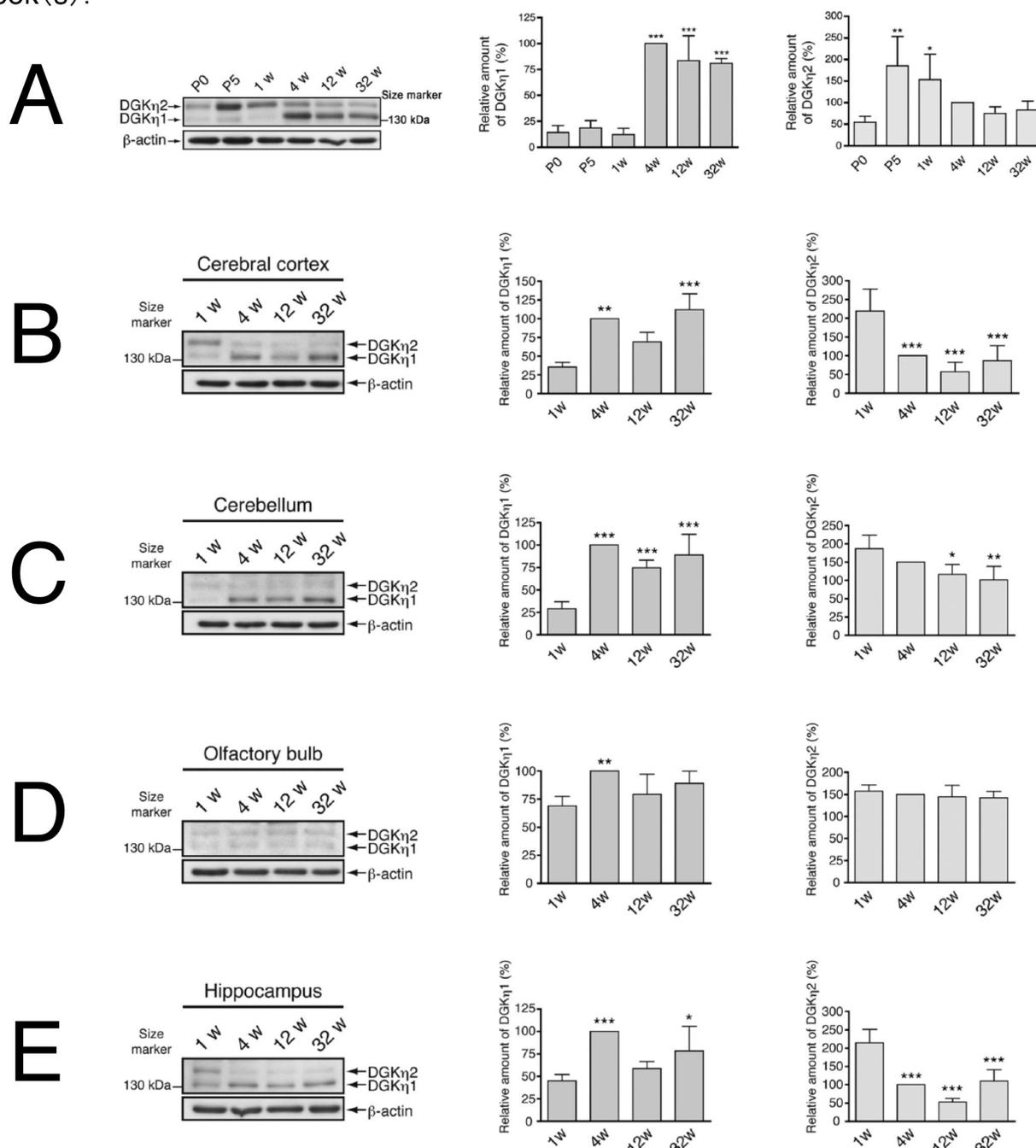


図1-7: マウス脳におけるDGK $\eta$ 1, - $\eta$ 2蛋白質の週齢依存的な発現量の変化. (A) 生後0日から32週齢のマウス全脳でのDGK $\eta$ ,  $\beta$ -actinの発現量をウェスタンブロットで検出した. DGK $\eta$ 1は生後0日でマウス脳に弱くしか発現しておらず, 生後4週齢までに急激に発現量が増加した. 一方で, DGK $\eta$ 2は生後0日でマウス脳に発現しており, 生後5日で最大量に達し, その後はDGK $\eta$ 1の発現増加と反比例するように, 32週齢まで減少した. (B~E) 1~32週齢マウスの大脳皮質(B), 小脳(C), 嗅球(D), 海馬(E)のDGK $\eta$ の発現量. DGK $\eta$ 1の発現は, 大脳皮質, 小脳, 海馬で1週齢から4週齢にかけて増加した. DGK $\eta$ 2は大脳皮質と海馬においてのみ強く発現し, 1週齢から4週齢の間に急激に減少した. グラフでは, DGK $\eta$ の発現量を4週齢での発現を100%として相対量で示した. DGK $\eta$ のバンドはImage J software (NIH)で定量し,  $\beta$ -actin量で割って補正した. 4回の独立した実験の平均 $\pm$ 標準偏差を示した. 有意性はANOVA, Tukey's post hoc testにより解析した (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.005 vs P0 (A) or 1 week (B~E)). P, postnatal age; w, week(s).



皮質 (図 1-7B), 小脳 (図 1-7C), 海馬 (図 1-7E) で 1 週齢から 4 週齢にかけて増加していた。反対に, DGK $\eta$ 2 は大脳皮質 (図 1-7B) と海馬 (図 1-7E) で週齢依存的な発現変化が見られ, その発現は 1 週齢で最も強く, その後は急激に減少することがわかった。小脳と嗅球では, DGK $\eta$ 1 の週齢依存的な発現変化はみられたが, DGK $\eta$ 2 の発現は変化しなかった (図 1-7C, D)。DGK $\eta$  の発現パターンは脳の部位によって異なること, さらに, 出生時には DGK $\eta$ 2 の発現量より DGK $\eta$ 1 の発現が多いが生後 1~4 週齢で DGK $\eta$ 1 は発現が減少し, 反対に DGK $\eta$ 2 は発現が増加することが分かった。DGK $\delta$  は DGK $\eta$ 1 と同様に大脳皮質において 1 週齢から 4 週齢に発現が増加するが, 出生後発現が低下する DGK $\eta$ 2 の発現とは全く異なることが明らかになった。

次に, DGK $\eta$  の発現分布を調べるために, *in situ hybridization* 法による脳組織染色を行った。DGK $\eta$  mRNA は大脳皮質, 小脳, 嗅球, 海馬に強く検出された。1~32 週齢の大脳皮質では, DGK $\eta$  mRNA は II から VI 層に広く発現しており, DGK $\delta$  と同じ発現分布を示した (図 1-8A, -9A)。一方で, 小脳, 嗅球, 海馬では DGK $\delta$  とは異なった部位に発現していることがわかった。小脳では, DGK $\eta$  mRNA は 4~32 週齢のプルキンエ細胞に強く発現していた (図 1-8B, -9B)。DGK $\eta$  蛋白質は 4~32 週齢の小脳ではスプライスバリエント 1 が主に発現していることから, 小脳で検出された mRNA は主に DGK $\eta$ 1 のものだと考えられる。また, DGK $\delta$  mRNA の発現がみられた顆粒層では, DGK $\eta$  mRNA は全く検出されなかった。DGK $\delta$  mRNA は嗅球の僧帽層, 糸球層, 顆粒層に発現していたが (図 1-3C, -4C), DGK $\eta$  では 1~32 週齢の僧帽層と非常に弱く糸球層での発現がみられた (図 1-8C, -9C)。海馬では, DGK $\eta$  mRNA は非常に特徴的な発現パターンを示した。1 週齢の CA 領域では, DGK $\eta$  mRNA は CA1~3 領域に広く発現していたが, 4 から 32 週齢では CA3 領域ではほとんど発現しておらず, CA1, 2 の領域に発現することが分かった (図 1-8D, -9D~F)。DGK $\eta$  蛋白質の発現パターンと比較すると, 1 から 4 週齢の間に減少した CA3 領域での発現は DGK $\eta$ 2 のものだと考えられる。歯状回では, 1 週齢では CA 領域と同レベルの DGK $\eta$  mRNA の発現がみられたが, 4 週齢以降では, CA 領域での発現に比べて歯状回で DGK $\eta$  が非常に強く発現することがわかった (図 1-8D, -9G)。DGK $\eta$ 1 の蛋白質は 1 週から 4 週齢の間に発現が増加するため, 歯状回では主に DGK $\eta$ 1 が発現していると考えられる。DGK $\delta$  mRNA と  $\eta$  mRNA は大脳皮質では同じ発現パターンを示すが, 小脳, 嗅球, 海馬では異なった発現分布を示すこと, DGK $\delta$  mRNA は週齢依存的な発現パターンの変化は示さないが, DGK $\eta$  mRNA は海馬と歯状回において週齢依存的に特徴的な発現パターンを示すことが分かった。

図1-8: マウスの発達中の脳におけるDGK $\eta$  mRNA発現量を *in situ* hybridization法を用いて調べた。1~32週齢のマウスの大脳皮質(A)、小脳(B)、嗅球(C)、海馬(D)におけるDGK $\eta$  mRNAを、DGK $\eta$  mRNAのアプテセンスプローブで検出した。DGK $\eta$ は、4週齢以降では大脳皮質のII-VI層、小脳のプルキンエ細胞層、嗅球の僧帽層、糸球体層、海馬のCA2-3領域と歯状回に検出された。生後1週齢でのみ、DGK $\eta$  mRNAはCA3領域に検出された。センスプローブのハイブリダイゼーションでは発色は検出されなかった。3回の独立した実験を行い、代表例を示した。1、大脳皮質II層; II-VI、大脳皮質III層からVI層; GCL、顆粒層; PCL、プルキンエ細胞層; EPL、外網状層; GL、糸球体層; IPL、内網状層; MCL、僧帽層。Scale bar, 400  $\mu$ m.

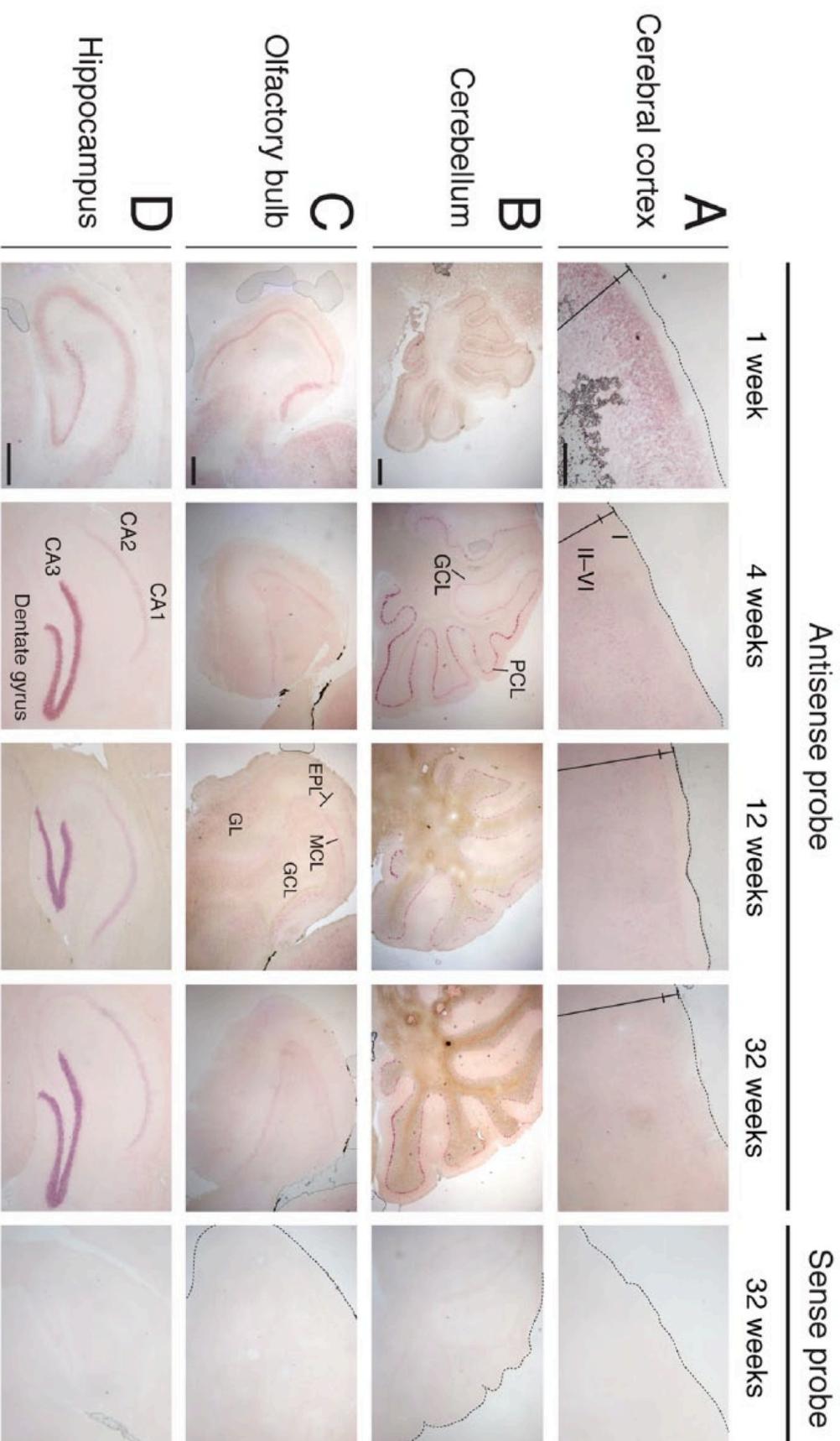
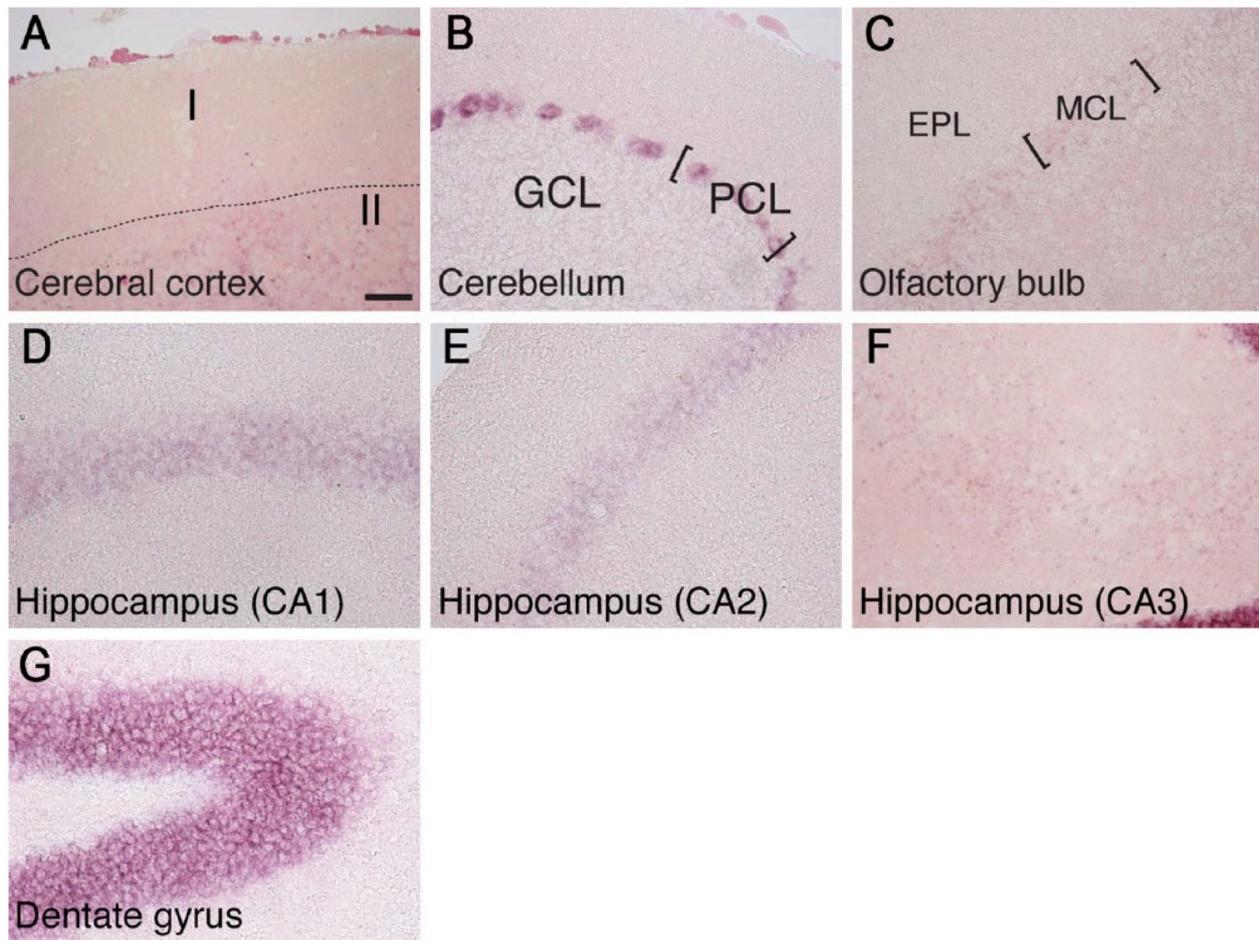


図1-9: *In situ* hybridizationによってDGK $\eta$  mRNAを検出した4週齢マウス的大脑皮質(A), 小脳(B), 嗅球(C), 海馬(D~G)の高倍率図. I, 大脑皮質I層; II, 大脑皮質II層; GCL, 顆粒層; PCL, プルキンエ細胞層; EPL, 外網状層; MCL, 僧帽層. Scale bar, 40  $\mu$ m.



### 1-3-5 DGK $\delta$ , $\eta$ mRNA のマウス胎仔における発現

さらに DGK $\delta$  mRNA のマウスの発達期の発現部位を網羅的に調べるために、胎齢 17.5 日のマウス胎仔の全身の凍結切片を作製し、*in situ* hybridization を行った。アイソザイム間の比較のために、DGK $\eta$  mRNA についても同様の実験を行った。DGK $\delta$  と  $\eta$  蛋白質は、生後 0 日の脳にすでに発現していることを明らかとしているが (図 1-2A), 胎齢 17.5 日の頭部においても、DGK $\delta$  と  $\eta$  mRNA どちらも脳に広く分布していた。その中でも嗅脳に強く発現がみられた (図 1-10A, B)。また、三叉神経節と考えられる部位にも DGK $\delta$ ,  $\eta$  mRNA はどちらも検出されており、特に DGK $\eta$  mRNA は非常に強く検出された (図 1-10A, C)。マウスの上体部分では、DGK $\delta$  mRNA は顎下腺に発現がみられたが、DGK $\eta$  mRNA は検出されなかった (図 1-11A, B)。また、褐色脂肪においても DGK $\delta$  mRNA のみの発現がみられた (図 1-11A, C)。後根神経節では DGK $\delta$ ,  $\eta$  mRNA どちらも検出された (図 1-11A, C)。マウス腹部では、微量ではあるがどちらの mRNA も、十二指腸に発現していた (図 1-12A, B)。更に、DGK $\delta$  蛋白質は生殖器に強く発現することを明らかとしているが (図 1-1A), 精巣になる髄質の精細管においても、DGK $\delta$  mRNA は非常に強く検出された (図 1-12A, C)。DGK $\delta$  mRNA と  $\eta$  mRNA はどちらも胎仔期のマウスの脳や神経系の組織に強く発現しており、一方で、顎下腺や褐色脂肪などには DGK $\delta$  mRNA のみの特異的に発現することがわかった。

### 1-3-6 DGK $\delta$ mRNA のマウス生殖器における発現

DGK $\delta$  蛋白質は、脳に次いで精巣に強く発現する (図 1-1A)。また、胎齢 17.5 日で DGK $\delta$  mRNA はすでに精細管に非常に強く発現していることが明らかになった (図 1-12C)。そこで、10, 12 週齢のマウスの雌雄生殖器における DGK $\delta$  蛋白質と mRNA の発現を調べた。まず、マウス各生殖器における DGK $\delta$  mRNA と蛋白質の発現を調べた。図 1-13A に示すように、DGK $\delta$  mRNA から RT-PCR により増幅された 999 bp の cDNA は、精巣、卵巣に非常に強く、また子宮にも強く発現していることがわかった。また、各組織における DGK $\delta$  蛋白質の発現をウェスタンブロッティングにより検出したところ、DGK $\delta$  が精巣に非常に強く、次いで、卵巣、子宮にも発現していることがわかった (図 1-13B)。DGK $\delta$ 1 は生殖器ではその発現は検出限界以下であった。

次に、*in situ* hybridization 法を用い精巣における DGK $\delta$  mRNA の分布を調べた。その結果、DGK $\delta$  mRNA は主に一次精母細胞に発現していることがわかった (図 1-14A, B)。また、精原細胞にも発現がみられ、次いで、二次精母細胞にも検出された。しかしながら、円形精子細胞や伸長精子細胞、ライディッヒ細胞での発現はほぼ検出されなかった。

図1-10: 胎齢17.5日マウス胎仔の頭部におけるDGK $\delta$ と $\eta$ のmRNA発現部位を*in situ* hybridization法を用いて調べた。DGK $\delta$ と $\eta$  mRNAどちらも嗅脳をはじめとする脳に広く検出された。また、三叉神経節と考えられる部位にも発現しており、特にDGK $\eta$  mRNAは非常に強く検出された。(A)頭部、(B)嗅脳高倍率図、(C)三叉神経節高倍率図。

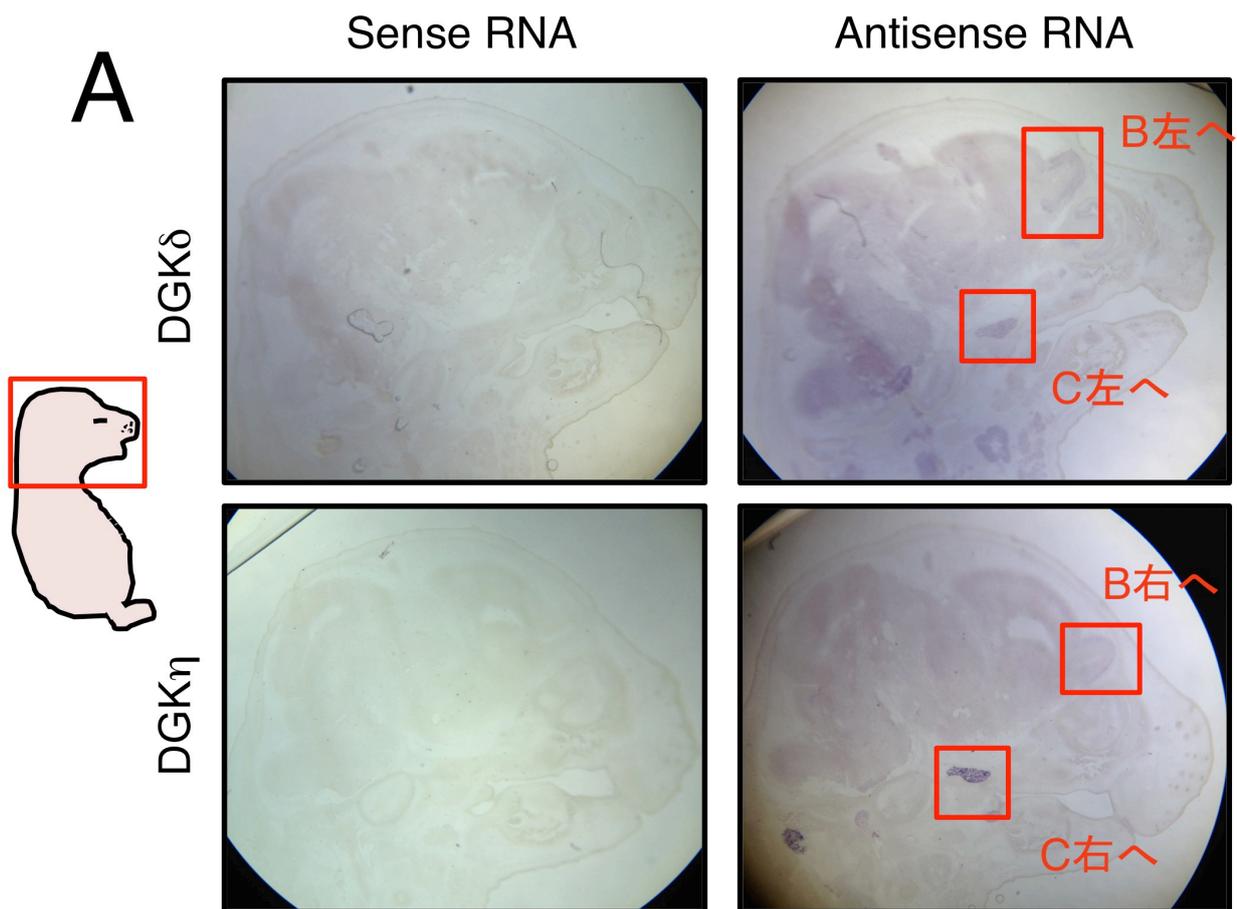
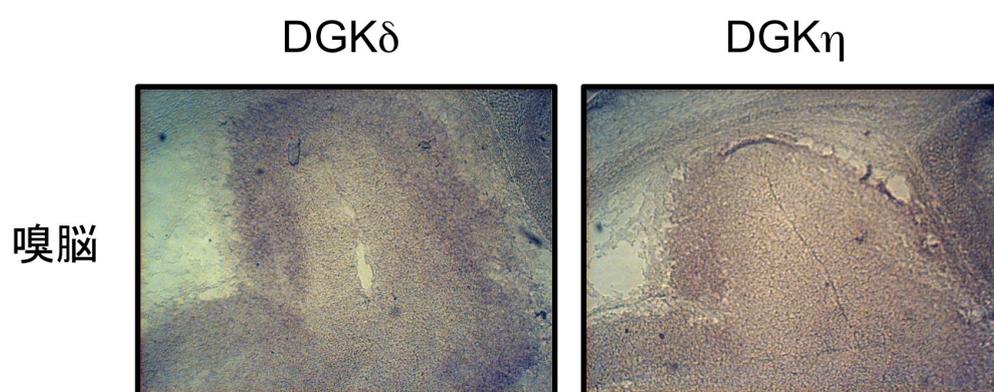


図1-10

B



C

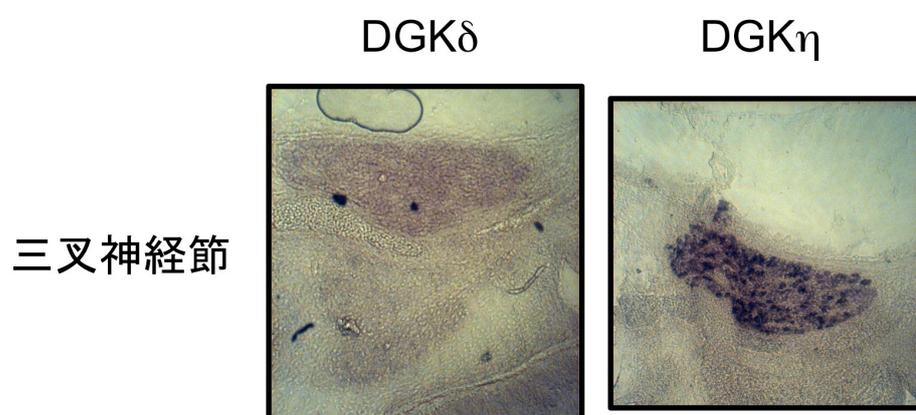


図1-11: 胎齢17.5日マウス胎仔の首から腹部におけるDGK $\delta$ と $\eta$ のmRNA発現部位を*in situ* hybridization法を用いて調べた。DGK $\delta$  mRNAのみ顎下腺と褐色脂肪において発現がみられた。後根神経節ではDGK $\delta$ ,  $\eta$  mRNAどちらも検出された。(A) 首から腹部, (B) 顎下腺高倍率図, (C) 褐色脂肪及び後根神経節高倍率図。

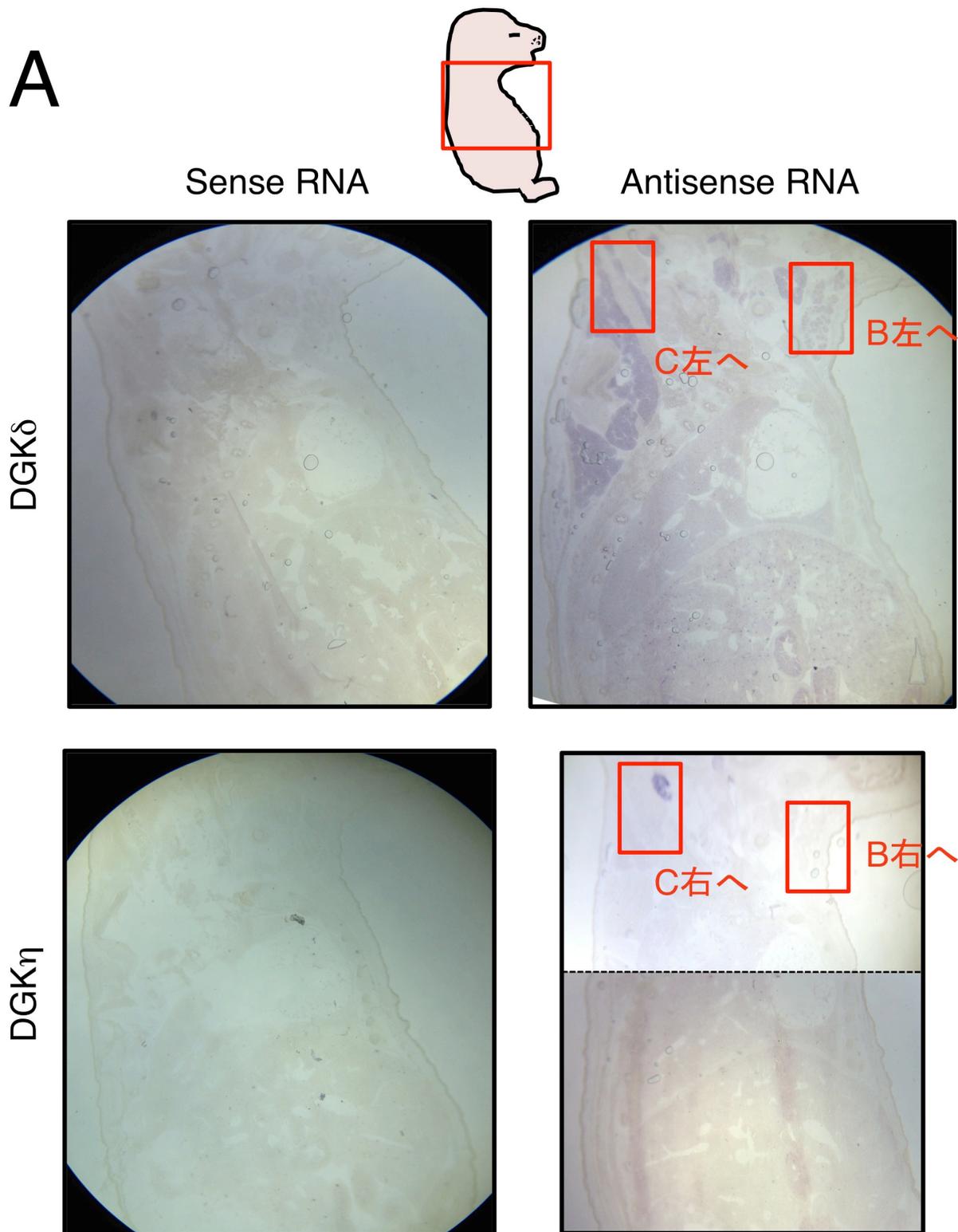


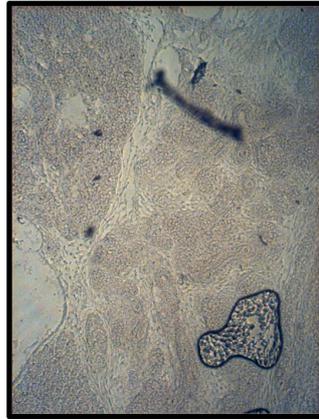
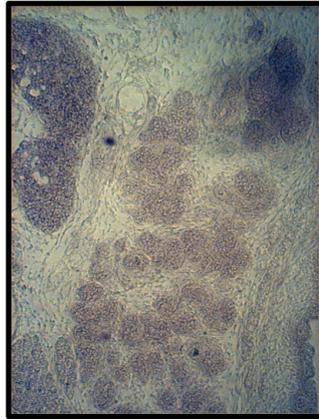
圖1-11

**B**

DGK $\delta$

DGK $\eta$

顎下腺

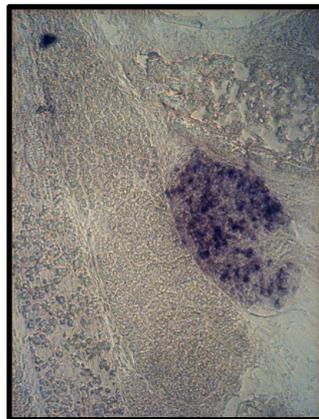
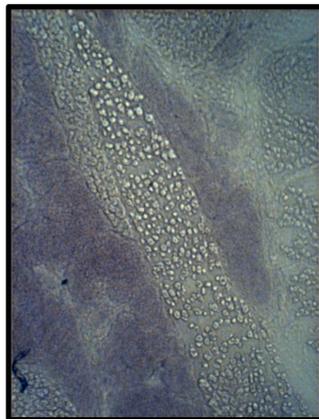


**C**

DGK $\delta$

DGK $\eta$

褐色脂肪



後根神經節

図1-12: 胎齢17.5日マウス胎仔の下腹部におけるDGK $\delta$ と $\eta$ のmRNA発現部位を*in situ* hybridization法を用いて調べた。どちらのmRNAも、十二指腸に弱い発現がみられた。DGK $\delta$  mRNAは精巣になる髄質の精細管においても、非常に強く検出された。(A)下腹部, (B)十二指腸高倍率図, (C) 精細管高倍率図。

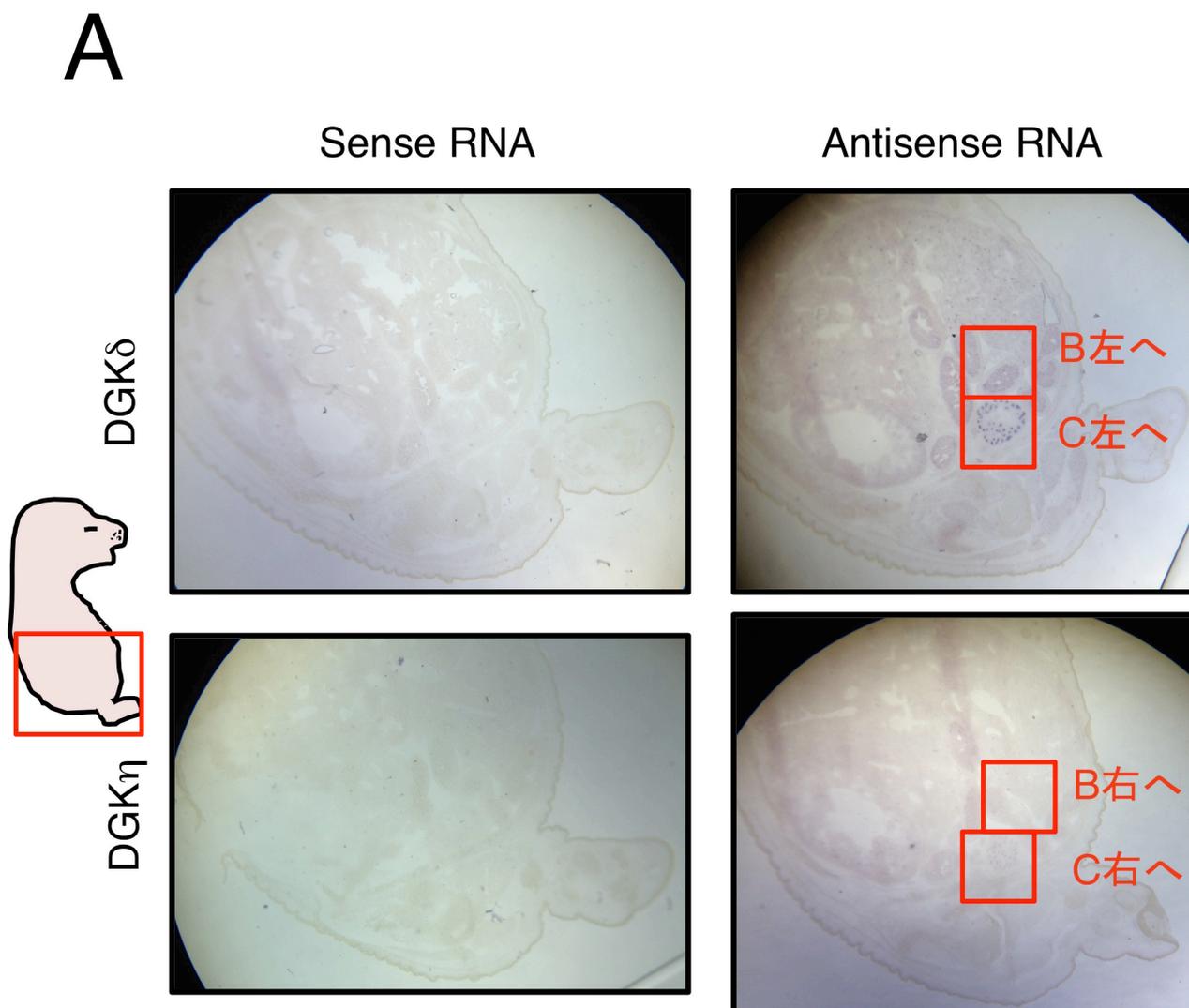


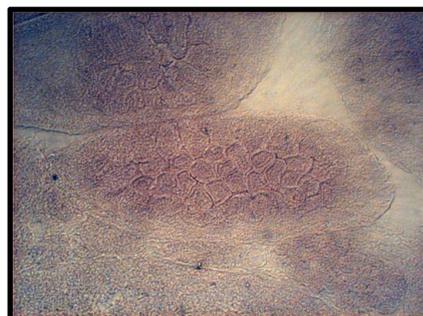
圖1-12

**B**

DGK $\delta$

DGK $\eta$

十二指腸



**C**

DGK $\delta$

DGK $\eta$

精細管



図1-13: 精巣, 卵巣, 子宮におけるDGK $\delta$  mRNA(A)と蛋白質(B)の発現量. (A) 12週齢のマウスの各生殖器官から得たmRNAのRT-PCRを行い, アガロースゲル電気泳動で分離した. DGK $\delta$ は999 bpのcDNA, マウスGAPDHは842 bpのcDNAが増幅された. (B) ウェスタンブロットにより, 10週齢における各組織(蛋白量30  $\mu$ g)中のDGK $\delta$ 蛋白質を検出した. DGK $\delta$ 2の蛋白質, mRNAどちらも精巣に非常に強く, 次いで卵巣, 子宮にも検出された. 5回の独立した実験を行い, 同様の結果が得られた. 代表的な結果を示した.

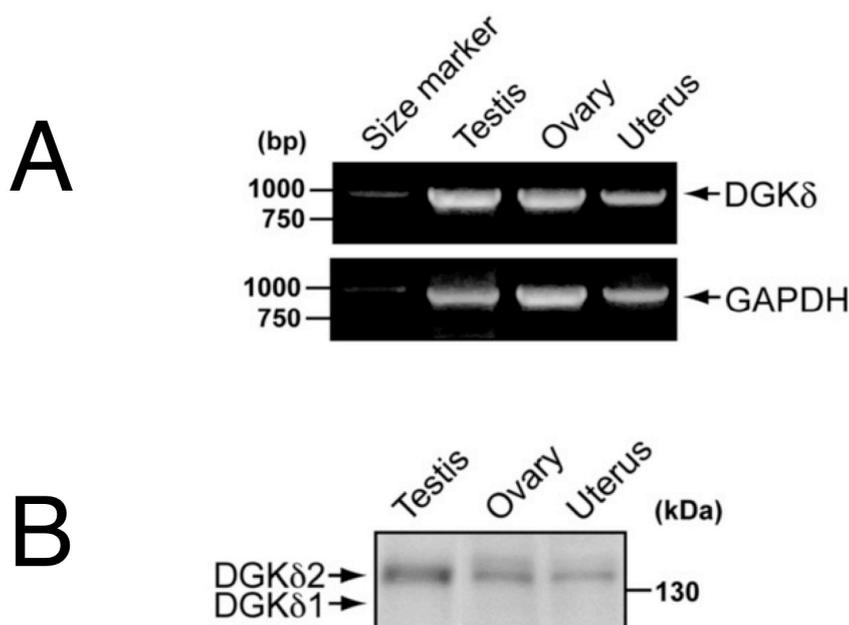
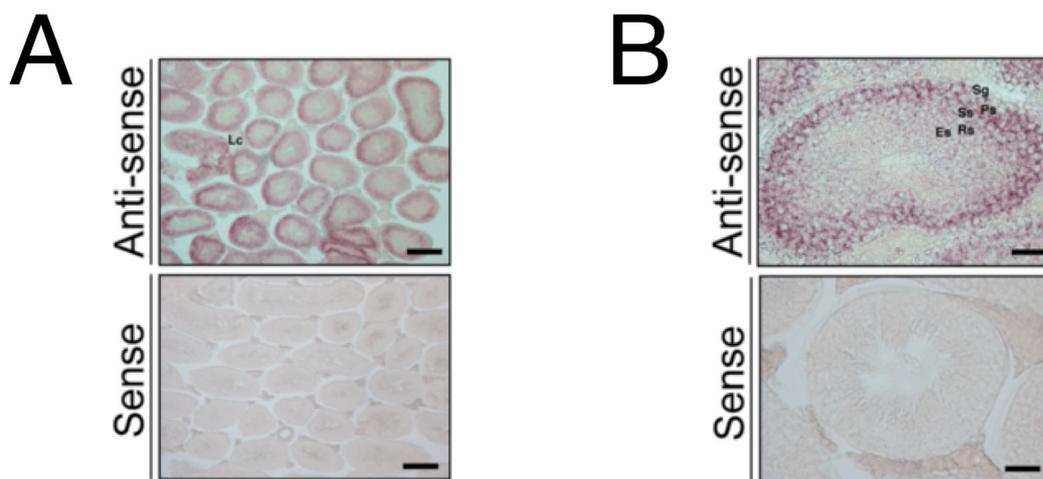


図1-14: (A) 精巣のDGK $\delta$  mRNAをDGK $\delta$  mRNAアンチセンスプローブで検出した. DGK $\delta$  mRNAは主に一次精母細胞に発現していることがわかった. また, 精原細胞にも発現がみられ, 次いで, 二次精母細胞にも検出された. (B) 精細管の高倍率図. センスプローブのハイブリダイゼーションでは発色は検出されなかった. 3回の独立した実験を行い, 代表的な図を示した. Sg, 精原細胞; Ps, 一次精母細胞; Ss, 二次精母細胞; Rs, 円形精子細胞; Es, 伸長精子細胞; Lc, ライディッツヒ細胞. Scale bar, 200  $\mu$ m (A), and 40  $\mu$ m (B).



次に、雌生殖器での DGK $\delta$  mRNA の発現を調べた。図 1-15A, B に示すように、卵巣では、DGK $\delta$  mRNA は一次、二次、成熟卵胞と黄体に広く発現していることがわかった。また、髄質と卵管上皮細胞にも弱い発現がみられた。子宮では、管腔上皮に弱く発現しているのみであった（図 1-16A, B）。DGK $\delta$  mRNA はマウスの雌雄生殖器に強く、かつ部位特異的に発現していることから、生殖機能にも関与する可能性が考えられる。

図1-15: (A) 12週齢のマウス卵巣のDGK $\delta$  mRNAをDGK $\delta$  mRNAアンチセンスプローブで検出した。卵巣では、DGK $\delta$  mRNAは一次、二次、成熟卵胞と黄体に広く発現していることがわかった。また、髄質と卵管上皮細胞にも弱く検出された。(B) 二次卵胞の高倍率図。センスプローブのハイブリダイゼーションでは発色は検出されなかった。5回の独立した実験を行い、代表的な図を示した。Pf, 一次卵胞; Sf, 二次卵胞; Mf, 成熟卵胞; Cl, 黄体; Gc, 顆粒膜細胞; M, 髄質。Scale bar, 200  $\mu$ m(A), and 40  $\mu$ m(B).

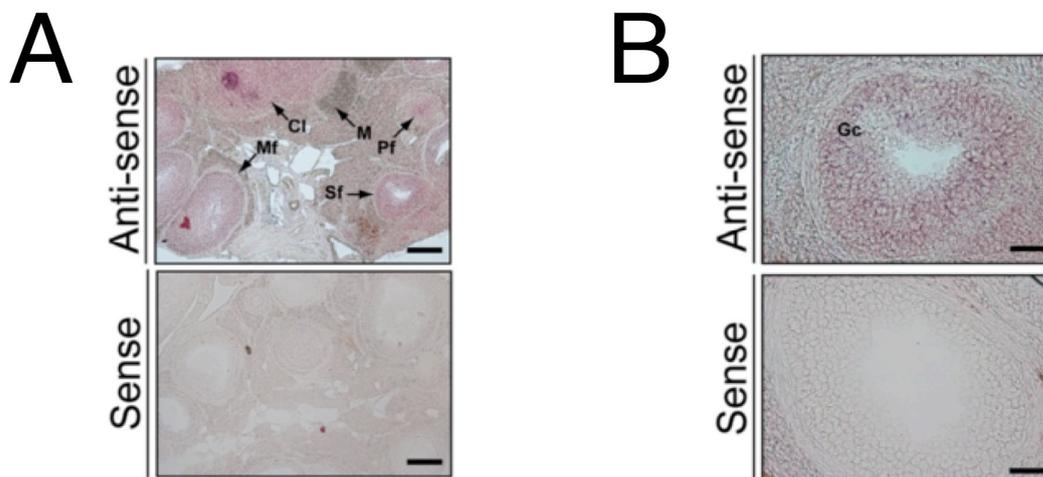
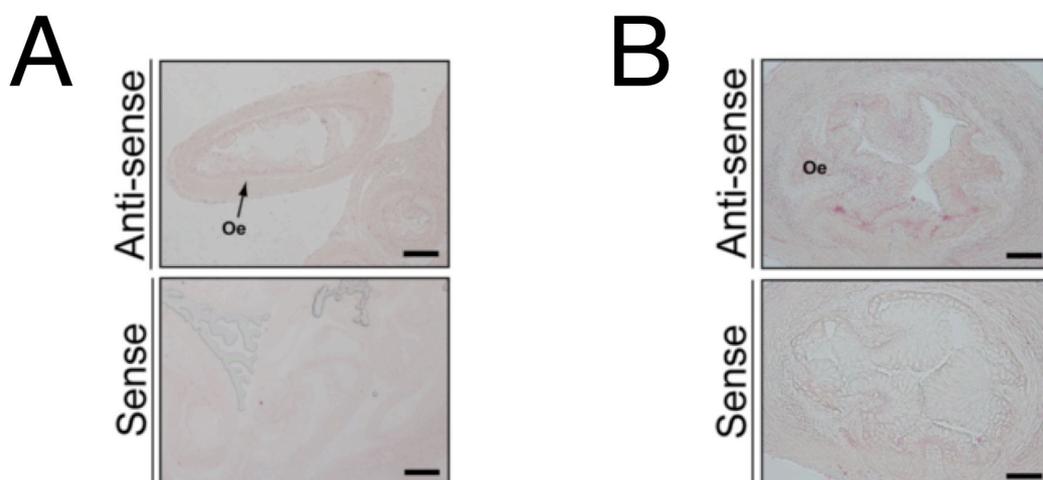


図1-16: (A) 12週齢のマウス卵管のDGK $\delta$  mRNAをDGK $\delta$  mRNAアンチセンスプローブで検出した。DGK $\delta$  mRNAは管腔上皮にのみ弱く検出された。(B) 卵管の高倍率図。センスプローブのハイブリダイゼーションでは発色は検出されなかった。4回の独立した実験を行い、代表的な図を示した。Oe, 卵管上皮細胞。Scale bar, 200  $\mu$ m(A), and 40  $\mu$ m(B).



## 1-4 考察

我々は近年脳特異的 DGK $\delta$ -KO マウス (Usuki, T., et al. unpublished work) を作製したが, この KO マウスの脳における表現型の解析, 機能の解明のためには, DGK $\delta$ の脳における発現部位を同定することが不可欠であった. しかしながら, DGK $\delta$ の脳における詳細な発現パターンは現在までに報告されていなかったため, 今回初めて DGK $\delta$ 脳における発現部位の同定を行った [25]. また, 比較のため DGK $\eta$ についても同様に解析した.

DGK $\delta$ と $\eta$ はマウス脳においてそれぞれ非常に特徴的な発現パターンを示した. 図 1-3 から, DGK $\delta$ は 1 から 32 週齢のマウス大脳皮質の II-VI 層, 海馬, 齒状回, 嗅球の僧帽層, 糸球層, 顆粒層, 小脳の顆粒層に強く発現することを明らかにした. DGK $\delta$ は以前, 成熟マウスの新皮質錐体神経細胞, 海馬, 小脳の顆粒層に発現することが報告されており [24], 今回の結果と一致することがわかった. DGK $\eta$ は 1~32 週齢のマウス大脳皮質の II-VI 層, 海馬, 齒状回, 嗅球の僧帽層, 糸球層, 小脳のプルキンエ細胞層に強く検出された (図 1-8). DGK のその他のアイソザイムの脳における発現パターンは, 現在までに以下のように報告されている. DGK $\alpha$ : 脳梁, 小脳の髄質 [28], DGK $\beta$ : 尾状核被殻, 海馬, 嗅結 [29, 30], DGK $\gamma$ : 海馬, 小脳のプルキンエ細胞と顆粒細胞 [29, 31], DGK $\zeta$ : 海馬, 齒状回, 小脳のプルキンエ細胞と顆粒細胞 [32], DGK $\epsilon$ : 灰白質 [33]. 一方で, DGK $\delta$ は大脳皮質の II-VI 層, 海馬, 齒状回, 嗅球の僧帽層, 糸球層, 顆粒層, 小脳の顆粒層に発現していた. このように, DGK は脳においてアイソザイムごとにそれぞれ異なった特徴的な発現パターンを示しており, このことから, DGK は脳においてアイソザイムごとに特徴的な役割を担うことが推察される.

マウス脳における DGK $\delta$ の週齢依存的なウェスタンブロットの発現パターンの解析から, DGK $\delta$ は生後すぐの時点ですでに発現しており, その発現量は脳においてシナプスが形成される時期である生後 1~4 週齢の間に劇的に増加することがわかった (図 1-1). したがって, DGK $\delta$ は脳の発達に関与する可能性が考えられる. 非常に興味深いことに, DGK $\eta$ 2 の発現量は生後 5 日に最大量に達し, 5 週齢までに減少することがわかった. 一方で, DGK $\eta$ 1 の発現量は, DGK $\delta$ と同様に生後 1~4 週齢に最大量まで増加しており, DGK $\eta$ 2 とは正反対の発現パターンを示すことがわかった (図 1-7). このような発現の逆転は, DGK $\eta$ 1 と $\eta$ 2 の発現の多い大脳皮質, 小脳, 海馬での神経の発達に, それぞれアクセル役とブレーキ役として重要な役割を担う可能性が考えられる. 図 1-2 に示すように, DGK $\eta$ 1 と $\eta$ 2 の構造を比較すると DGK $\eta$ 2 のみが sterile  $\alpha$  motif domain を持つことがわかる. そのため, 神経発達の初期の段階では, この sterile  $\alpha$  motif domain

の有無が重要な意味を持つ可能性が推察される。

DGK $\delta$ と $\eta$ の脳における機能の詳細は未だ明らかとなっていない。Leach らによって、以前 DGK $\delta$ 遺伝子が部分的に欠損している女性の患者が発見されており、この患者はてんかん性発作を示すこと、更に様々な精神疾患の症状を示すことが報告されている [24]。海馬は側頭葉てんかんで損傷する最も一般的な部位であり、てんかん性発作では海馬の萎縮や硬化を示すことが多い [34]。側頭葉てんかんでは海馬の神経ネットワークの欠陥が引き起こされることが報告されている [35]。一方で、DGK $\delta$ が強く発現していた小脳の顆粒層 (図 1-4B) もまた、てんかん性発作に重要な部位である。小脳の顆粒層の発育不全が神経ネットワークの異常を引き起こし、てんかん性発作を引き起こすことが報告されている [36]。そのため、DGK $\delta$ の海馬または小脳の顆粒層での発現異常が、てんかん性発作を引き起こすことが推察された。DGK $\epsilon$ は小脳のプルキンエ細胞層、海馬の錐体細胞、嗅球の僧帽層に発現するが、このアイソザイムもまた、てんかんに関与することが分かっている [21, 37]。DGK $\epsilon$ と DGK $\delta$ の脳における発現部位は異なっているため、これらのアイソザイムはそれぞれ異なったメカニズムによっててんかん性発作に関与すると考えられる。また、第 2 章に記すように、脳特異的 DGK $\delta$ 欠損マウスは強迫性障害様の行動異常を示すことがわかった。強迫性障害の患者では、大脳皮質の島皮質でセロトントランスポーター (神経細胞から放出されたセロトニンを細胞内に取り込む蛋白質) が減少していることが報告されている。DGK $\delta$ は大脳皮質での発現が多く、これらのことを踏まえると、DGK $\delta$ が大脳皮質においてセロトントランスポーターの発現量を正に制御している可能性が考えられる [38]。

我々の研究グループは以前ヒト腎臓で DGK $\eta$ 1, - $\eta$ 2 mRNA は脳より強く発現することを報告している [15]。しかしながら、今回の結果では、マウスにおいては DGK $\eta$ 1 と  $\eta$ 2 は他のどの臓器よりも、脳に特に強く発現していた (図 1-6A)。この結果の相違は、解析した臓器がヒト由来かマウス由来であるかに起因している可能性が高い。また、それぞれの年齢・週齢の違いも影響している可能性がある。

DGK $\eta$  mRNA は、1 週齢ではマウス海馬 CA3 領域に発現していたが、4 週齢以降の CA3 領域での発現はほとんど検出されなかった。生後 1 週齢では DGK $\eta$ 1 蛋白質が強く発現していることから、CA3 領域に発現する DGK $\eta$ はスプライスバリエント 1 であると考えられる。一方で、CA1, CA2 領域、歯状回では、DGK $\eta$  mRNA は CA3 に比べ非常に強く検出された (図 1-8D)。グルココルチコイド受容体は、マウス脳に広く発現しているが、海馬では特徴的な発現パターンを示すことがわかっている。グルココルチコイド受容体の CA3 での発現は、CA1 や CA2 領域、歯状回に比べ非常に弱く [39, 40]、DGK $\eta$  mRNA の海馬での発現パターンに類似している。興味深いことに、Klauck ら [41]

や我々 (Murakami ら) [15] は、グルココルチコイド刺激は細胞での転写レベルで DGK $\eta$ 1 の発現量を著しく増加させ、DGK $\eta$ 2 の発現量を減少させることを報告している。そのため、DGK $\eta$ 1 と $\eta$ 2 mRNA の海馬での発現は、少なくとも一部は、グルココルチコイドによって制御されることが示唆された。グルココルチコイドは、恐怖や不安、精神疾患に関与することが知られており、グルココルチコイド受容体の発現異常はヒトで鬱や不安様の症状を示す [42, 43]。さらに、脳特異的グルココルチコイド受容体欠損マウスは、視床下部-垂体-副腎軸を介した神経内分泌系に異常を示し、不安行動の増加を示す [44, 45]。

Genome-wide association study により、DGK $\eta$ と双極性障害が関連する可能性が報告されている [46, 47]。また、双極性障害の患者では、DGK $\eta$  mRNA の発現量が増加することがわかっている [48]。DGK $\eta$  mRNA は海馬の CA 領域よりも歯状回に強く発現することを図 1-8D に示した。歯状回の形成異常は双極性障害を引き起こすことが報告されており [49, 50]、DGK $\eta$  mRNA の歯状回での発現異常が双極性障害の発症に関与している可能性が考えられる。DGK $\eta$ は一方で、小脳のプルキンエ細胞にも強く発現していた (図 1-9B)。プルキンエ細胞は、脳の様々部位からの情報を統合しており、運動記憶などの小脳の役割において極めて重要な役割を担っていることから、DGK $\eta$ は小脳の機能においてなんらかのキーとなる制御を担っていることが推察される。プルキンエ細胞もまた双極性障害との関連が示唆されており [51]、DGK $\eta$ との双極性障害との関与について、DGK $\eta$ 欠損マウスを用いた詳細な研究が求められる。

DGK $\delta$ ,  $\eta$ は生後 0 日のマウスの脳に既に発現していたが、胎齢 17.5 日のマウス胎仔脳でも DGK $\delta$ と $\eta$ の mRNA は脳に広く発現していることがわかった (図 1-10A)。また、どちらの mRNA も三叉神経節と後根神経節に強く検出された。三叉神経節は眼神経、上顎神経、下顎神経の三神経からなる体性運動性と知覚性の混合神経であり、脳神経の中で最大の神経である。後根神経節は、脊髄背根に位置し、末梢からの感覚情報の中間地点としての役割を持つ神経である。このことから、DGK $\delta$ と $\eta$ は、脳においての役割だけではなく、中枢神経以外の神経においても重要な役割を担っていることが考えられる。

DGK $\delta$ は成熟期のマウスだけでなく、マウス胎仔における精細管でも強く発現することが明らかとなっているが、雌雄生殖器での発現パターンや機能は未だ明らかとなっていなかった。成熟マウス生殖器における *in situ hybridization* により、DGK $\delta$  mRNA は精巣の精原細胞と一次精母細胞に発現することがわかった (図 1-14)。精子形成では、精原細胞が有糸分裂を行うことで、一次精母細胞となる [52, 53]。その後、減数分裂を経て、一次精母細胞から二次精母細胞が作られる。一方、II 型 DGK である DGK $\kappa$  mRNA

は一次及び二次精母細胞に、DGK $\eta$  mRNA は二次精母細胞と二次精母細胞から第二減数分裂によって作製される円形精子細胞に検出された [26]. このことから、II 型の DGK はそれぞれ精子形成の段階ごとに異なる役割を持っており、その中でも DGK $\delta$  は初期の精子形成段階である精原細胞の有糸分裂に関与する可能性がある。このために、胎仔期の精細管では、DGK $\delta$  mRNA は強く、DGK $\eta$  mRNA は弱く検出されたと推察される (図 1-12C). 雌性生殖器では、DGK $\delta$  は一次、二次、成熟卵胞の顆粒膜細胞と黄体、子宮の管腔上皮に発現することがわかった (図 1-15, -16). 卵巣顆粒膜細胞と管腔上皮は発情サイクルの間に増殖する [54]. 管腔上皮には上皮成長因子受容体が強く発現することがわかっている [55]. DGK $\delta$  は PKC の不活性化を通して、上皮増殖因子受容体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) を活性化することが分かっており、このことから、DGK $\delta$  は管腔上皮の EGFR を介して細胞の増殖を制御している可能性が考えられる。

以上、DGK $\delta$  と  $\eta$  のマウスの脳における空間的、週齢依存的な発現解析から、DGK $\delta$  は同じ II 型 DGK である DGK $\eta$  とは異なった発現パターンを示すことがわかった。また、DGK $\delta$  は、マウスの発達中の脳や神経節だけでなく、生殖器において II 型 DGK の中でも特徴的な役割を担うことが推察された。

## 第 2 章

### 脳特異的 DGK $\delta$ 欠損マウスの行動解析

## 2-1 緒言

DGK $\delta$ の conventional 欠損マウスは、生後 24 時間以内に死亡することを我々のグループは明らかにしている [23]. そのため、マウス生体内での DGK $\delta$ の各臓器における詳細な役割は今までにほとんど解明されていない. 今回我々は、DGK $\delta$ の発現が強い脳に特異的な conditional DGK $\delta$ 欠損マウスを cre-loxP システムを用いて作製し、DGK $\delta$ の脳における機能の解明のためにその行動解析を行った. DGK $\delta$ 欠損マウスの行動解析では、恐怖心（高架十字試験とオープンフィールド試験）、社会性、記憶力（八方十字迷路とバーンズ迷路）、攻撃性（cotton bud biting 試験）、鬱状態の程度（尾懸垂試験）、認知力（新規物体探索試験）、強迫性障害（ビー玉埋め試験）を解析するための試験を行った.

## 2-2 実験手法

### 2-2-1 マウスの飼育

全てのマウスは、通常状態ではマウス・ラット飼料（飼育・各種試験用）F-2（フナバシファーム）を与えて飼育した。交配期間は雄マウスと雌マウスを同ケージに入れてから2~4日とし、交配開始から出産後4週間はマウス・ラット飼料（近交系維持・繁殖専用）F-1（フナバシファーム）を与えた。仔マウスは、出生後4週齢で母マウスから分けて雄雌別に飼育した。交配には8週齢以降のマウスを用いた。

### 2-2-2 脳特異的 DGK $\delta$ ノックアウトマウスの作製

脳特異的 conditional DGK $\delta$ -KO マウスの作製には cre-loxP system を用いた。DGK $\delta$ の配列に loxP を組み込んだ DGK $\delta$ 遺伝子を導入したマウス（理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター 変異マウス開発ユニットとの共同研究により作製）を掛け合わせる事で loxP +/+ (cre -/- loxP +/+) マウスを得た。DGK $\delta$ の配列に loxP を組み込んだ DNA コンストラクトを図 2-1 に示した。次に、loxP +/+マウスと、脳で特異的に発現する calcium/calmodulin-dependent protein kinase II  $\alpha$  (CaMKII  $\alpha$ ) の promoter と cre の遺伝子を融合した DNA を導入した C57BL/6-TgN (a-CaMKII-nlCre) /10 マウス（以後 cre +/- loxP -/- と記す、理化学研究所バイオリソースセンター実験動物開発室より購入）と掛け合わせ、遺伝子組み換えを誘発する事で、脳特異的な conditional DGK $\delta$ -KO マウス (cre +/- loxP +/+) を得た (図 2-2)。本 KO マウスは C57BL/6N と 5 回戻し交配を行い、更に、background が C57BL/6 である cre +/- loxP -/- とかけ合わせて作製したので、C57BL/6 の background の割合は 96.8% である。

### 2-2-3 ジェノタイピング

各マウスのジェノタイプは、マウス尾から抽出した DNA に対して PCR を行うことで決定した。尻尾を 3 mm 程度切断回収し、50 mM の NaOH を 180  $\mu$ l 加えて 95°C で 30 分加熱した。ボルテックスで攪拌した後、1M Tris-HCl (pH 8.0) を 20  $\mu$ l 加えて中和させ、再度ボルテックスで攪拌した。室温 12,000 rpm で 10 分遠心後、上清 1  $\mu$ l を PCR 反応に用いた。LoxP の挿入確認のための DNA の PCR には、以下のプライマーを用いた (図 2-1)。Forward primer : 5'-TCCTACCTCTCTCTCCATTCCC-3' (loxP に挟まれた floxed arm 内の配列) ; reverse primer : 5'-AAGGTGTTGAATAATACTCTGTGAC-3' (floxed arm の下流の配列)。PCR 産物はエチジウムブロマイド含有アガロースゲル電気泳動にて分離し、検出した。LoxP -/- マウス (野生型) では 348 bp の増幅バンド、loxP +/+ マウス

図2-1: DGKδ loxPのターゲットコンストラクト.

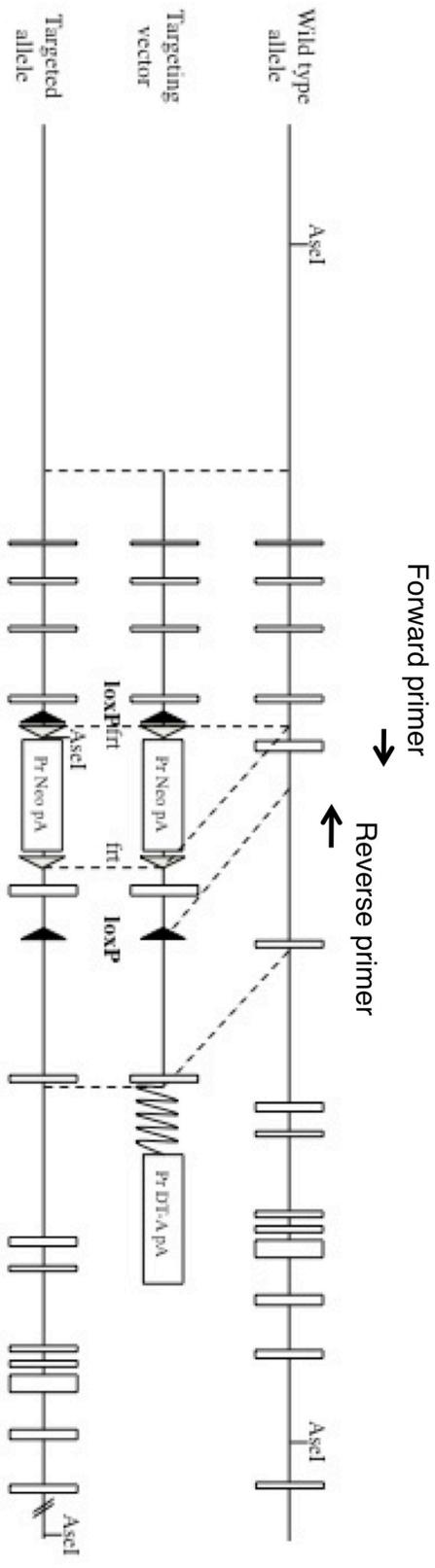
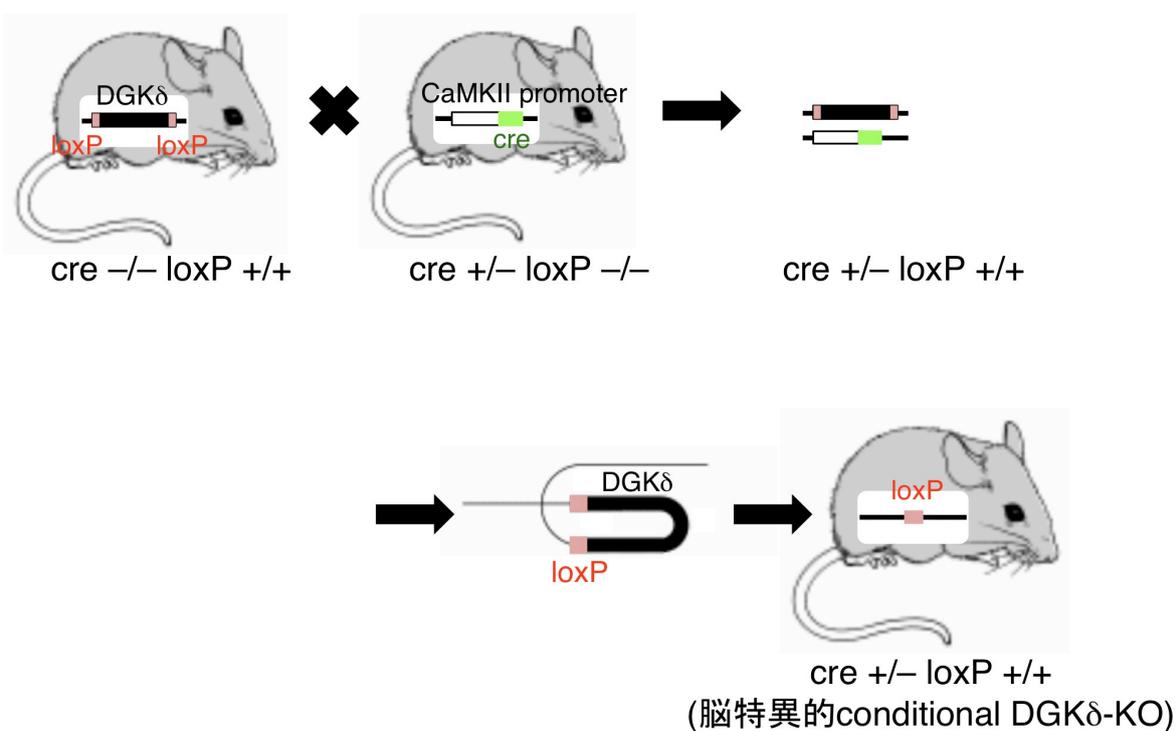


図2-2: Cre-loxP systemによる脳特異的conditional DGK $\delta$ -KOマウスの作製. DGK $\delta$ 遺伝子をloxP遺伝子で挟んだ遺伝子を持つマウスと, 脳特異的に発現するCaMKII promoterに, loxP遺伝子の組み換えを誘発するcre遺伝子を結合したマウスを掛け合わせることで, 脳特異的にDGK $\delta$ 遺伝子が欠損したマウスを作製した.



では 549 bp, loxP +/-マウスでは 348 bp と 549 bp の両方のバンドが検出される. PCR 条件: 94°C for 3 min, 32 cycles of 94°C for 30 sec, 58°C for 30 sec, and 72°C for 2 min, and 72°C for 5 min. Cre の DNA に対する PCR には, 以下のプライマーを用いた. Forward primer : 5'-ACGGGAACAGGGCGTTTCGGAGGTGGTTGC-3' (CaMKII の promoter の配列) ; Reverse primer : 5'-CTAATCGCCATCTTCCAGCACGG-3' (cre の配列). このプライマーを用いた PCR では, cre +/-では, 1300 bp のバンドが検出されるが, cre -/-ではバンドは検出されない. なお, PCR が正常に行われていることを確認するためのコントロールとして以下のプライマーも用いた. Control forward primer : 5'-TGAGCGAGCTCATCAAGATAATCAGGT-3' ; Control reverse primer : 5'-GTTAGCATTGAGCTGCAAGCGCCGTCT-3'. PCR 条件: 94°C for 3 min, 32 cycles of 94°C for 30 sec, 60°C for 30 sec, and 72°C for 1.5 min, and 72°C for 5 min. このコントロールでは 500 bp の DNA が増幅される. Cre の遺伝子型は +/-でも十分に loxP の遺伝子組み換えを誘発し, DGK $\delta$ を検出限界以下まで発現低下させるため, 本研究では cre の遺伝子型は +/-に統一した.

#### 2-2-4 高架十字試験

マウスは通常では壁のある走路 (closed arm) より壁のない走路 (open arm) に対し恐怖を感じるため, 高架十字試験では open arm に侵入する事が, 恐怖心が少ないことの指標となる. 図 2-3 のような一方の走路に高さ 15 cm の壁を設けた高さ 50 cm の木製の高架式迷路を作製し, 床にアクリル板を敷いた. Open arm 側に頭の向きを統一して壁のある走路 (closed arm) との交差部分 5 cm  $\times$  5 cm にマウスを置き, 10 分間マウスの行動を撮影した. マウスが open arm に進入する回数, open arm に滞在する時間を 5 分毎に解析した. 測定ごとに 70%エタノールでアクリル板を拭いてから試験を行った. 実験には 10~21 週齢の脳特異的 DGK $\delta$ -KO マウス (cre +/- loxP +/+, 脳特異的 DGK $\delta$  -/-, 以下 DGK $\delta$ -KO マウスとする) を用い, コントロールとして同腹子の cre -/- loxP +/+ マウス (DGK $\delta$  +/+, 以下 loxP マウスとする) の行動解析を行った.

#### 2-2-5 オープンフィールド試験

オープンフィールド試験では中央領域に滞在する事が, 恐怖心が少ない・新規環境への適応性が高い・活動性が高いことなどへの指標になる. 図 2-4 のような高さ 40 cm, 底面が 60 cm 四方の木製のオープンフィールドを作製し, 5 cm 四方ごとに線を引いたアクリル板を底に敷いた. マウスを頭の向きを統一して底面の中央に置き, 30 分間マウスの行動を撮影した. 底面の中央 30 cm  $\times$  30 cm を中央領域とし, マウスの中央領

図2-3: 高架十字試験に用いる用具. マウスは壁のないopen armに対して恐怖を感じるため, open armでの滞在時間が長いマウスは恐怖心の低下を示すと考えられる.

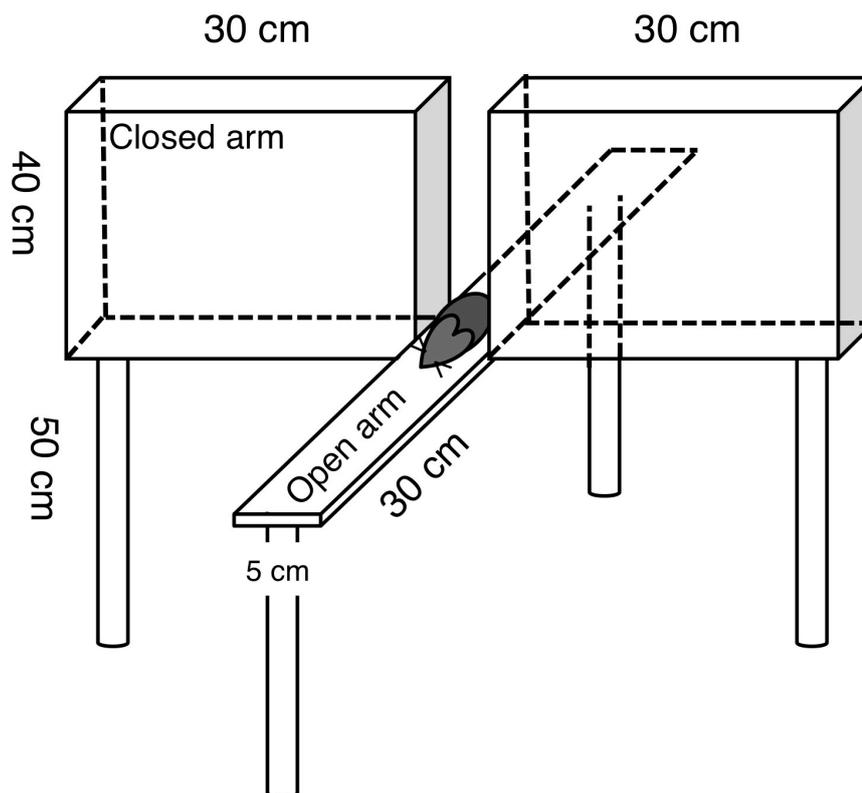
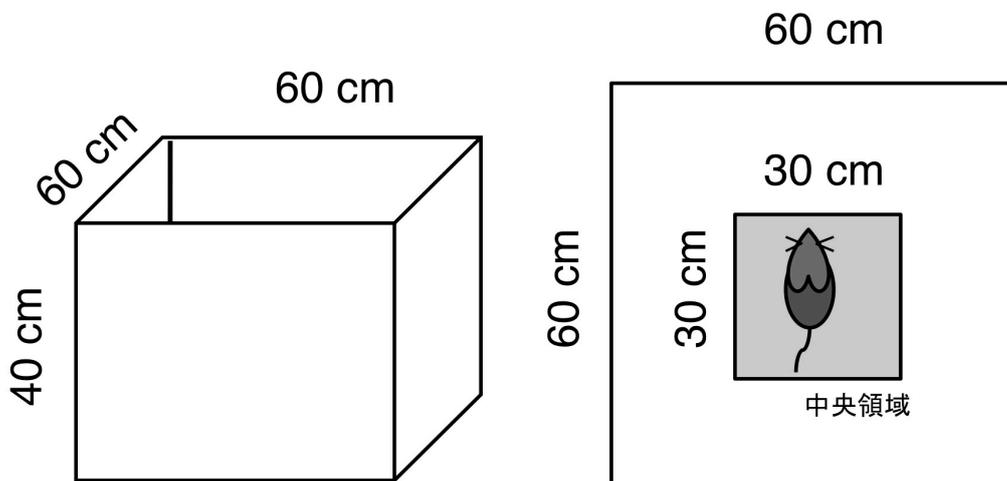


図2-4: オープンフィールド試験に用いる用具. マウスは図のような広い空間では, 中央領域に対して恐怖を感じるため, 中央領域滞在時間が長いことは恐怖心が少ない・新規環境への適応性が高い・活動性が高いことなどへの指標になる.



域への5分ごとの進入回数、滞在時間を測定した。なお、本実験では全ての行動観察はマウスの四肢が完全に領域に侵入した状態を領域進入とした。各実験終了後は70%エタノールでアクリル板を拭き、十分に乾かした後次の試験を行った。実験には10~21週齢の脳特異的 DGK $\delta$ -KO マウス (cre +/- loxP +/+) を用い、コントロールとして同腹子の loxP マウス (cre -/- loxP +/+) の行動解析を行った。

#### 2-2-6 社会性試験

本試験ではマウスの他のマウスに対する興味を測定することで、社会性の異常を調べることが出来る。図 2-5 のように 17 cm × 28 cm × 15 cm のプラスチックケージの端に刺激マウスをワイヤーケージに囲われた状態で設置した。試験マウスを刺激マウスと点对称的な位置から入れ、試験マウスが刺激マウスを覆う網の 3 cm 以内に鼻先を入れた回数と時間を 10 分間撮影し、そのうちはじめの 3 分間のみ解析した。刺激マウスには、試験マウスと週齢が近く、同性かつ、試験マウスと一度も接触したことの無い C57BL/6N マウスを用いた。試験後はケージを 70%エタノールで拭いた。10~21 週齢の脳特異的 DGK $\delta$ -KO マウス (cre +/- loxP +/+) を用い、コントロールとして同腹子の loxP マウス (cre -/- loxP +/+) の行動解析を行った。

#### 2-2-7 八方十字迷路試験

八方十字迷路では空間参照記憶と空間作業記憶の異常を調べることが出来る。本試験は体重調整期間・慣らし期間・トレーニング期間からなる。体重調整期間では、2 日間かけてマウスの体重を試験前の体重の 80~90%に調節し、マウスを空腹状態にした。慣らし期間は 1 日のみで、8 つの全ての arm に 0.1 g 以下に砕いた餌を置いた (図 2-6)。迷路の 3 つの arm の壁には、それぞれ異なる色・形の色紙を貼ることで空間参照記憶の手がかりとした。頭の向きを arm 1 の向きに統一して中央領域にマウスを置き、30 分間マウスを探索させた。1 時間後、同様に 2 回目の慣らしの作業を行った。トレーニング期間では、各試行で arm 2, 3, 6, 8 に餌を置いた。頭の向きを arm 1 に統一して中央領域にマウスを置き、20 分間マウスを探索させ撮影した。1 時間後、同様に 2 回目の試行を行った。トレーニングは 4 日間行い、マウスが全ての餌を食べるまでの時間 (試行 20 分間における割合で示した (%))、元から餌の入っていない arm に入った回数 (空間参照エラー)、餌を食べた arm に再び入った回数 (空間作業エラー) をカウントした。各試行後は 70%エタノールで床に敷いたアクリル板を拭いた。13~34 週齢の脳特異的 DGK $\delta$ -KO マウス (cre +/- loxP +/+) を用い、コントロールとして同腹子の loxP マウス (cre -/- loxP +/+) の行動解析を行った。

図2-5: 社会性試験に用いる用具. 新しい飼育ケージに, 試験マウスと試験マウスにとって未知のマウス(刺激マウス)を入れた. マウス同士が接触出来ないよう, 未知のマウスは網ケージに入れ設置した. 未知のマウスへの接触回数が少ない試験マウスは, 社会性が低いと考えられる.

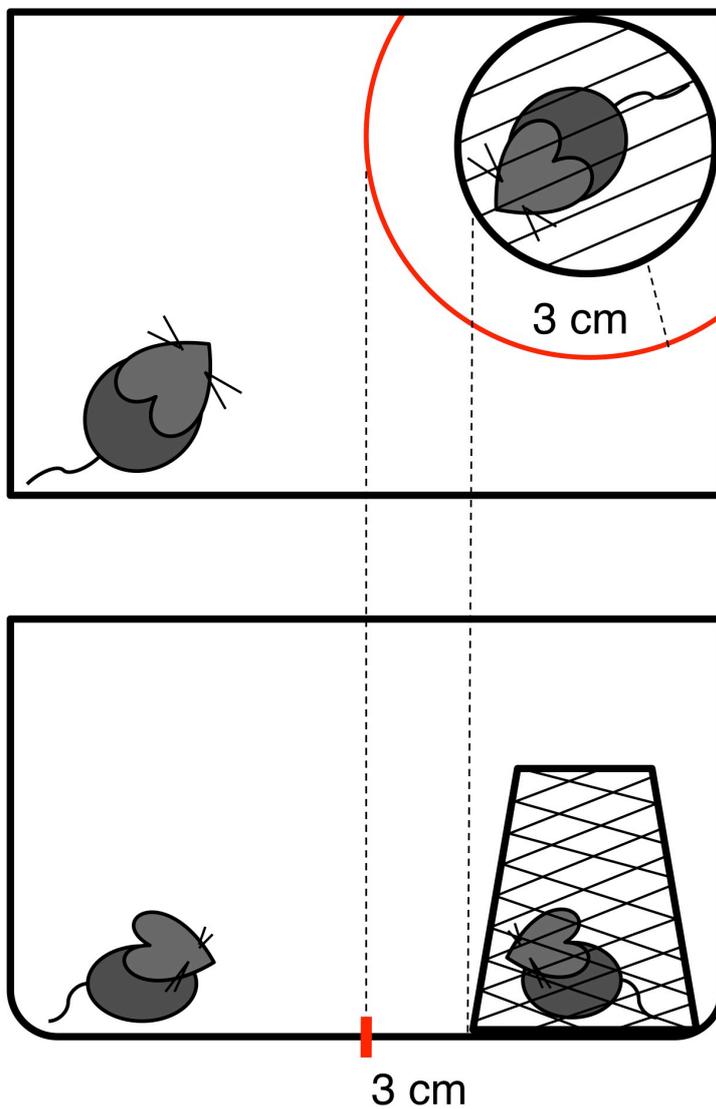


図2-6: 八方十字迷路試験に用いた用具. 八方十字迷路の4つのarmに餌を置き, 空腹状態のマウスに餌のあるarmを記憶させる. マウスがarmを記憶するための空間参照の目印として, 青い四角, 緑の三角, 黄色い丸の印をarmの壁に貼った. 本試験では学習能力や記憶力の異常を調べることが出来る.

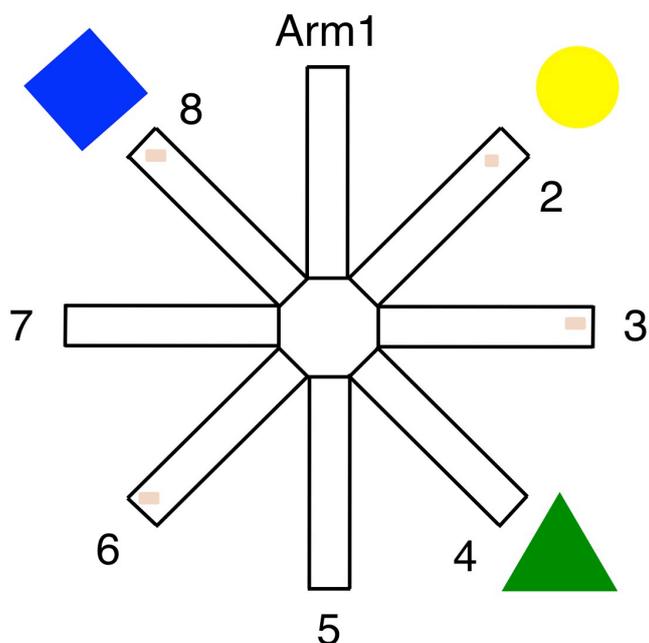
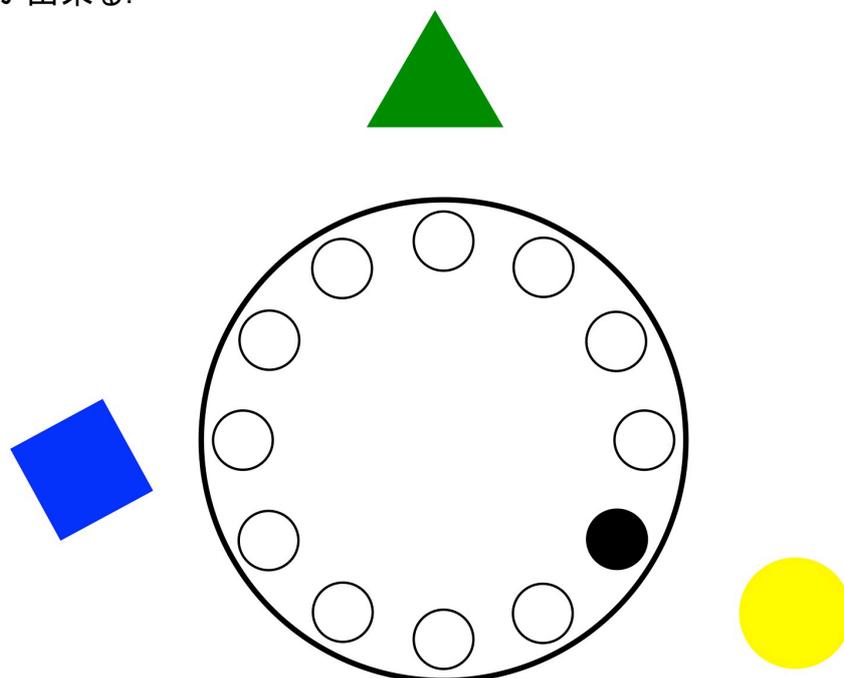


図2-7: バーンズ迷路試験に用いた用具. 円盤上はマウスが不快に感じる様十分に明るくし, 高さ90 cmの位置に設置した. 黒丸は避難箱設置穴を示す. マウスが避難箱を記憶するための空間参照の目印として, 青い四角, 緑の三角, 黄色い丸の印をバーンズ迷路の周囲の壁に貼った. 避難箱に入るまでの時間を測定することで, マウスの記憶・学習能力を解析することが出来る.



#### 2-2-8 バーンズ迷路試験

マウスが不快な状況において、逃避箱に入るまでの探索時間と逃避箱を見つけるまでのミスのカウントすることで、空間参照記憶を検証する。円盤に 20 個の穴を等間隔に作り、高さ 90 cm の位置に設置した (図 2-7)。穴の 1 つの下に逃避箱を設置し、空間参照記憶の手がかりとするために、円盤を取り囲む壁に 3 つのオブジェクトを設置した。部屋の電気は付けず、卓上用ライトを二つ用いて円盤上を十分に明るい状態とした。試験は 4 日間行い、25 分の間隔を開けて 1 日 3 回行った。マウスを円盤の中央にワイヤーの筒に入れて置き、10 秒後に放った。その後 3 分間円盤を探索させ撮影した。3 分以内に逃避箱を見つけることが出来なかった場合は手で優しく逃避箱へと誘導した。逃避箱に入った時点でライトを消して円盤上を完全に暗くし、1 分放置した。逃避箱に入るまでの時間と逃避箱が設置された穴以外の穴を覗き込んだ回数を測定した。なお、1 日目に、試験を行う前にマウスを逃避箱に 3 分間入れ、逃避箱に慣らした。空間参照記憶以外の要因を排除するために、円盤本体のみ毎日回転させ (逃避箱とオブジェクトの位置は変えない)、また、周囲の環境の影響を最小限に抑えるため円盤を高い壁で囲った。各試行後は 70%エタノールで円盤上及び逃避箱内部を拭き、十分に乾かした。10~20 週齢の脳特異的 DGK $\delta$ -KO マウス (cre +/- loxP +/+) を用い、コントロールとして同腹子の loxP マウス (cre -/- loxP +/+) の行動解析を行った。

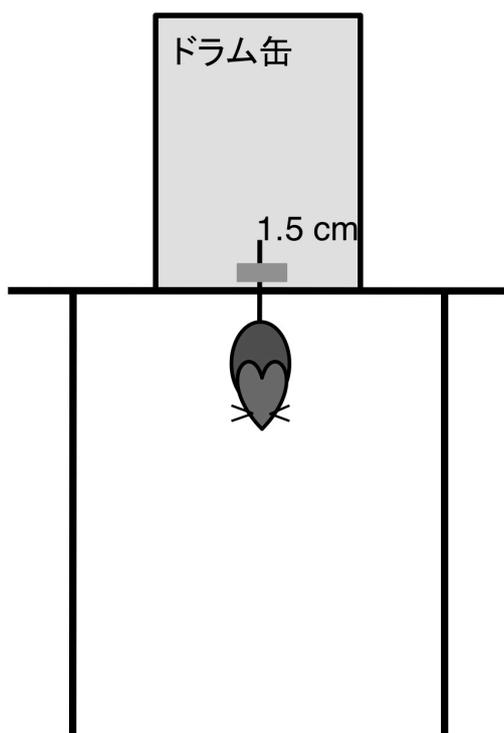
#### 2-2-9 Cotton bud biting 試験

保定されている状態で、マウスが顔前に差し出された綿棒に対して攻撃する回数をカウントすることで攻撃性を測定する。手でマウスの首を掴んで保定し、マウスの身体を床と垂直にした状態でマウスの口元にオートクレーブ済み綿棒を差し出した。5 回試験を行い、マウスが綿棒に噛み付いた割合を示した。10~35 週齢の脳特異的 DGK $\delta$ -KO マウス (cre +/- loxP +/+) を用い、コントロールとして同腹子の loxP マウス (cre -/- loxP +/+) の行動解析を行った。

#### 2-2-10 尾懸垂試験

図 2-8 のようにドラム缶にマウスの尻尾先端から約 1.5 cm の部分をガムテープで固定し、頭を下に向けた状態で懸垂した。10 分間のマウスの行動を撮影し、懸垂下での呼吸を除く行動の不動時間を測定した。不動時間が長いことが鬱の指標になる。8~17 週齢の脳特異的 DGK $\delta$ -KO マウス (cre +/- loxP +/+) を用い、コントロールとして同腹子の loxP マウス (cre -/- loxP +/+) を解析した。

図2-8: 尾懸垂試験に用いた用具. 尾懸垂時の不動時間が長いことが鬱の指標になる.



#### 2-2-11 新規物体探索試験

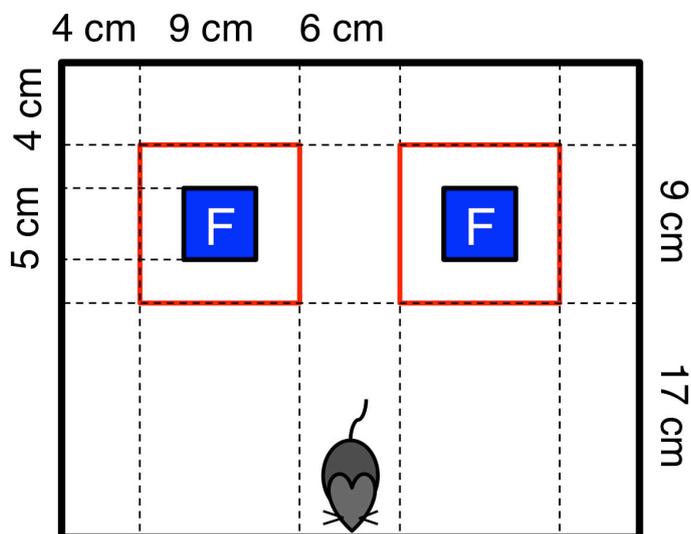
本試験では慣らした object と新規 object に対する興味の度合いを接触行動から測定する。マウスは慣れた物体より新規物体に興味を示すため、本試験の結果は新規物体への認知力の異常を調べる指標となる。また、object に対する興味の強さ（執着、不合理な接触）は強迫性障害の指標にもなり得ると考えられる。まず、32 cm × 30 cm × 26 cm のプラスチックの箱で5分間マウスを探索させた。10分後、同じ箱に2つの同じ object（以下 object F とする。今回は約 4 cm × 4 cm × 4 cm の黄色いアヒルの人形を用いた）を図 2-9A の位置に置いた状態で、マウスを 10 分間探索させた（慣らし、図 2-9A）。10 分後、object F のうち一つを novel object（以下 object N とする。今回は約 4 cm × 4 cm × 4 cm の円錐状の無色透明のガラスを用いた）に置き換え、マウスを 10 分間探索させ撮影した（試験、図 2-9B）。マウスを箱に入れる時は、図 2-9 のように頭が object と反対を向くように壁沿いに置いた。試験中にマウスが各 object の周辺 2 cm 以内に鼻を入れた回数、時間を測定した。各試験後は 70%エタノールで床及びオブジェクトを拭き、完全に乾燥させてから次の試験を行った。10~21 週齢の脳特異的 DGK $\delta$ -KO マウス (cre +/- loxP +/-) を用い、コントロールとして同腹子の loxP マウス (cre -/- loxP +/-), cre 遺伝子のコントロールとして cre +/- loxP -/- (DGK $\delta$  +/-, 以下 cre マウスとする)マウス及び cre -/- loxP -/-マウス (DGK $\delta$  +/-, 以下 WT マウスとする)の行動解析も行った。

#### 2-2-12 ビー玉埋め試験

17 cm × 28 cm × 15 cm のプラスチックケージに床敷を厚さ 3 cm 程度敷き詰め、マウスを 30 分間探索させた。マウスを一旦取り出し、図 2-10 のように等間隔にビー玉 15 個を押し込んだ。その後、マウスをビー玉を設置したケージに入れ、30 分間放置し撮影した。マウスが床敷で表面の 50%以上を隠したビー玉の数をカウントした。隠したビー玉の数が多いほど、強迫性障害の傾向を示すと考えられている。10~21 週齢の脳特異的 DGK $\delta$ -KO マウス (cre +/- loxP +/-) を用い、コントロールとして同腹子の loxP マウス (cre -/- loxP +/-), cre 遺伝子のコントロールとして cre マウス (cre +/- loxP -/-) 及び WT マウス (cre -/- loxP -/-) の行動解析も行った。

図2-9:新規物質探索試験に用いた用具. 本試験では図のような箱の中で, マウスの慣れたobjectまたは新規objectに対する興味の度合いを接触行動から測定する. (A)慣らしでは, 2つの同じobject(object F)を設置した. (B)試験では, object Fのうち一つを新規object(object N)に置き換えた. マウスは慣れた物体より新規物体を好むため, 本試験の結果は新規物体への認知力の異常を調べる指標となる. また, objectに対する興味の強さ(執着, 不合理な接触)は強迫性障害の指標にもなり得ると考えられる. F, familiar object; N, novel object.

## A 慣らし



## B 試験

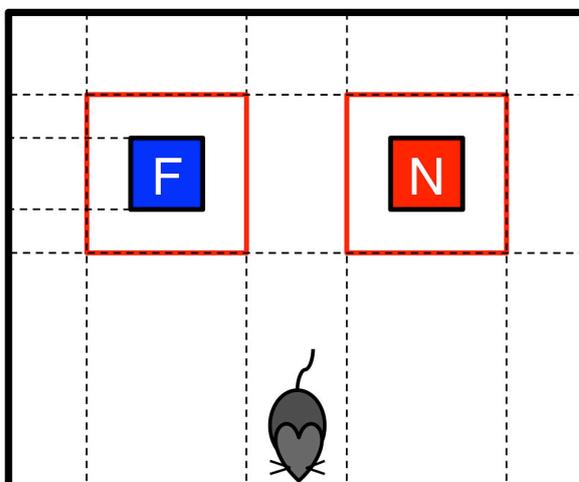
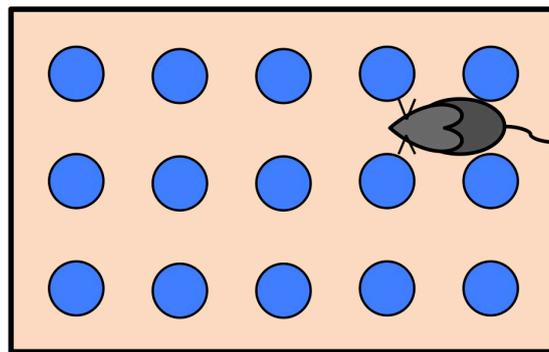


図2-10:ビー玉埋め試験. ビー玉をケージの床敷に軽く押し込んだ後, マウスを入れた. 無害であるビー玉を埋め隠そうとする不合理な行為が強迫性障害様の行動と類似すると考えられている.



## 2-3 結果

### 2-3-1 脳特異的 DGK $\delta$ 欠損マウスの作製

2-1-1 に示すように脳特異的 DGK $\delta$ 欠損マウスの作製を行った。DGK $\delta$ に関するプライマーを用いた PCR では、loxP 遺伝子が挿入されていない DNA では 348 bp (図 2-11A 右), loxP 遺伝子が導入されている遺伝子では 549 bp のバンドが増幅された (図 2-11A 左)。なお、loxP ヘテロ型では 348 bp と 549 bp の両方のバンドが検出された。また、cre 遺伝子に関するプライマーを用いた PCR では、cre が挿入されていない DNA ではコントロールの 500 bp のみが (図 2-11B 右), cre 遺伝子が導入されている遺伝子ではコントロールと cre の 500 bp, 1300 bp の DNA が検出された (図 2-11B 左)。したがって、脳特異的 DGK $\delta$ -KO マウスの尾部から抽出した DNA からは、loxP の有無を調べる PCR では 549 bp の、cre の有無を調べる PCR では 500 bp と 1300 bp の DNA 断片が増幅された。また、本 KO マウスの脳ライセート蛋白質を抗 DGK $\delta$ 抗体で検出したところ、DGK $\delta$ 2 の発現量は検出限界以下であることが確認された (図 2-11C)。一方、野生型脳ライセートでは、DGK $\delta$ 2 は 135 kDa に検出された。このことから、今回作製した DGK $\delta$ 欠損マウスは cre 遺伝子 (ヘテロ) と loxP 遺伝子 (ホモ) を持ち、脳において DGK $\delta$ がノックアウトされていることが確認出来た。また、この欠損マウスの精巣 (図 2-11C) や腎臓 (data not shown) では DGK $\delta$ 蛋白質の発現が検出されたことから、脳特異的に DGK $\delta$ が欠損していることが確認された。

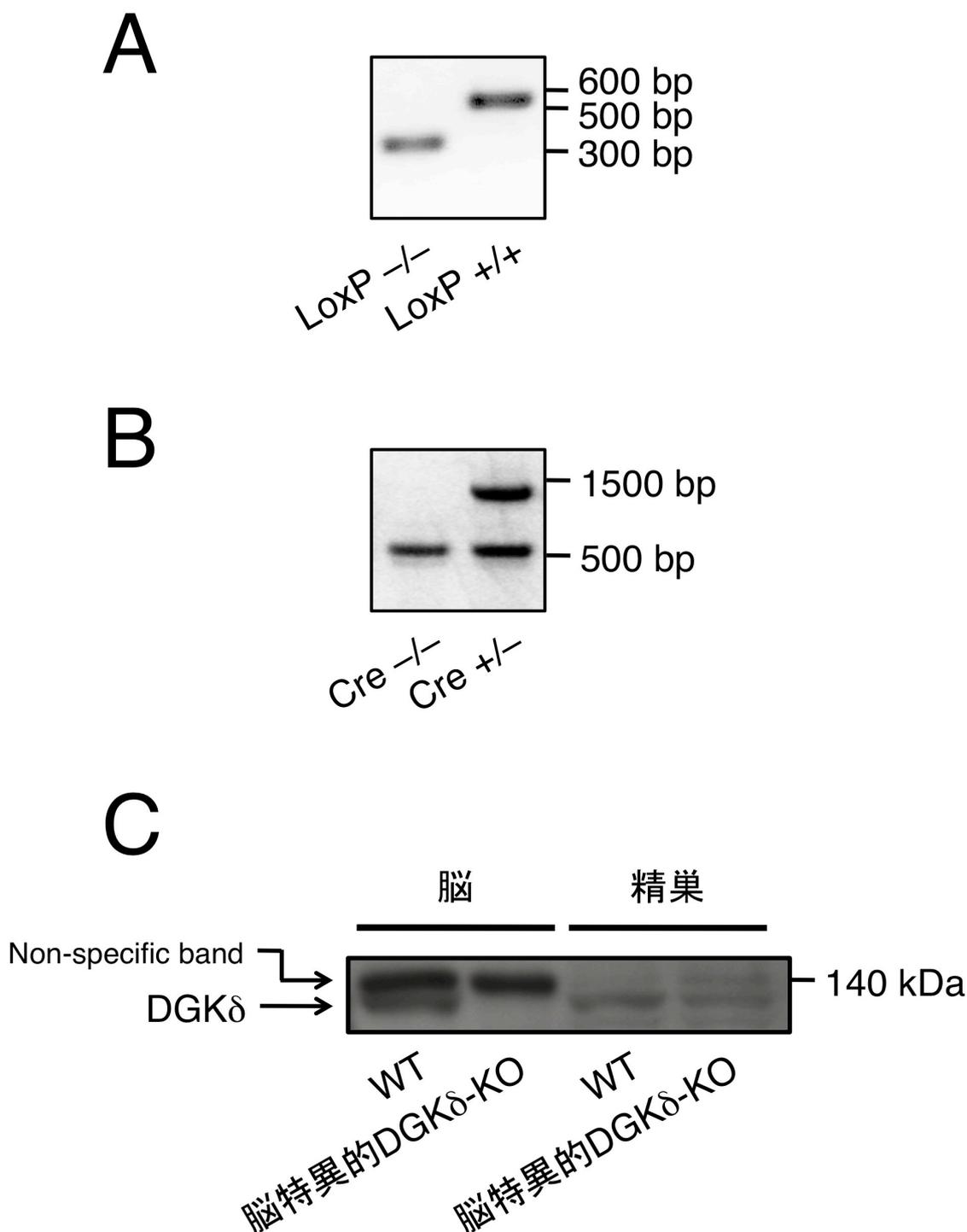
### 2-3-2 一般的初見

脳特異的 DGK $\delta$ 欠損マウスは出生から死亡まで健康状態に顕著な異常はみられなかった。また、DGK $\delta$ 欠損マウスの体重を生後 5 週齢と 14 週齢で同腹子のコントロール loxP マウスと比較したところ、これらの週齢では体重には有意な差はなかった (data not shown)。また、出生するマウスの遺伝型や雄雌の出生率はメンデルの法則に従っており有意な差はなかった (data not shown)。

### 2-3-3 高架十字試験

DGK の $\beta$ や $\eta$ アイソザイムの欠損マウスは双極性障害様の行動を示し、恐怖心が増加することが明らかとなっている [20, Isozaki, T., et al. 論文投稿中]。そこで、まず脳特異的 DGK $\delta$ -KO マウスの恐怖心の異常を調べるために、高架十字試験を行った。高架十

図2-11: 脳特異的DGK $\delta$ -KOマウスの遺伝型の確認及びDGK $\delta$ 蛋白質の発現確認. (A) LoxPを持つ遺伝子 (loxP +/+) では, 野生型 (loxP -/-) に比べ長いPCR産物が検出される. (B) Creを持つ遺伝子 (cre +/-) のみ, 1300 bpにcre遺伝子に対するPCR産物が検出される. (C) ウェスタンブロットによる野生型 (cre -/- loxP -/-) または作製したDGK $\delta$ -KO (cre +/- loxP +/+) マウスの脳におけるDGK $\delta$ 蛋白質の検出. 本KOマウスでは, 野生型では検出された135 kDaのDGK $\delta$ 2の発現が検出限界以下であることが確認された. 一方で, このKOマウスの精巣ではDGK $\delta$ 蛋白質が検出されたことから, 作製したDGK $\delta$ -KOマウスは脳特異的にDGK $\delta$ が欠損していることが確認された. WT, 野生型マウス.



字試験では、通常マウスは壁のない open arm に対しては恐怖を感じるため、壁のある closed arm での滞在時間が長くなる傾向を示す。そのため、open arm での侵入回数や滞在時間が長いマウスは恐怖心が低下していると考えられる。脳特異的 DGK $\delta$ -KO マウスの open arm への侵入回数は、コントロールとする loxP マウスと比べて有意な差は認められなかった (図 2-12A)。Open arm に滞在する時間に関しては、脳特異的 DGK $\delta$ -KO マウスに増加の傾向はあるものの loxP マウスと比べて有意な差は認められなかった (図 2-12B)。この試験の結果から、特異的 DGK $\delta$ -KO マウスには顕著な恐怖心の異常はないと考えられる。

#### 2-3-4 オープンフィールド試験

次に、恐怖心の異常に加えて、新規環境への適応性や活動性を広く観察することが出来るオープンフィールド試験を行った。オープンフィールド試験では、マウスが恐怖心を感じるオープンフィールド内の中央領域での滞在時間と侵入回数をカウントすることで、恐怖心・新規環境への適応性・活動性の異常などを調べた。5分ごとのマウスの中央領域への滞在時間と侵入回数を解析した。しかしながら、脳特異的 DGK $\delta$ -KO マウスの侵入回数及び滞在時間は、コントロールである loxP マウスと比べ大きな差はなかった (図 2-13A, C)。また、30分間の合計侵入回数または合計侵入時間を比較したが、有意な差は認められなかった (図 2-13B, D)。高架十字試験の結果に加え、オープンフィールド試験からも、脳特異的 DGK $\delta$ -KO マウスの恐怖心には異常がないことが示唆された。

#### 2-3-5 社会性試験

社会性の低いマウスは、統合失調症様の状態と類似すると考えられている。Genome-wide association study により、DGK の $\eta$ アイソザイムは統合失調症との関連が示唆されていることから [43]、DGK $\delta$ -KO マウスの社会性の異常について検討した。ワイヤーケージに入った新規の刺激マウスに対し、試験マウスが近付いた回数を測定した。刺激マウスに対する接触回数が少ないマウスは社会性が低いと考えられる。脳特異的 DGK $\delta$ -KO マウスの刺激マウスに対する接触回数は、loxP マウスの接触回数とほぼ同じであった (図 2-14A)。接触時間は DGK $\delta$ -KO マウスでは減少する傾向があったものの、顕著な差は認められなかった (図 2-14B)。

図2-12: 高架十字試験. コントロールloxP及びDGK $\delta$ -KOマウスの, open arm侵入回数 (A)及び滞在時間(%) (B). DGK $\delta$ -KOマウスのopen armへの侵入回数と滞在時間は, loxPマウスと比べて有意な差は無かった. グラフは平均 $\pm$ 標準誤差を示しており, 有意性はpaired t-testにより解析した.

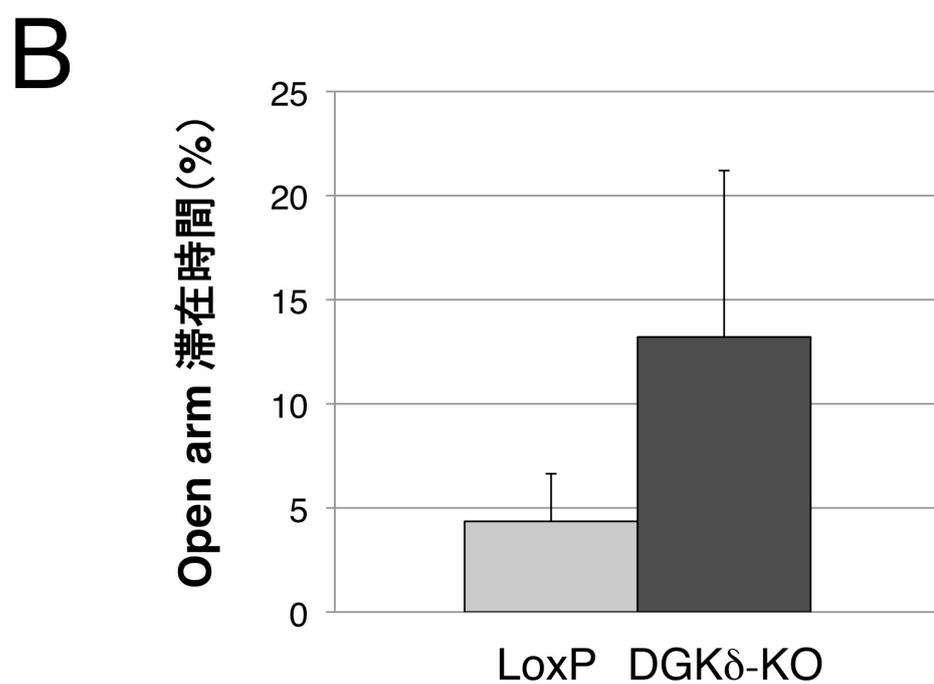
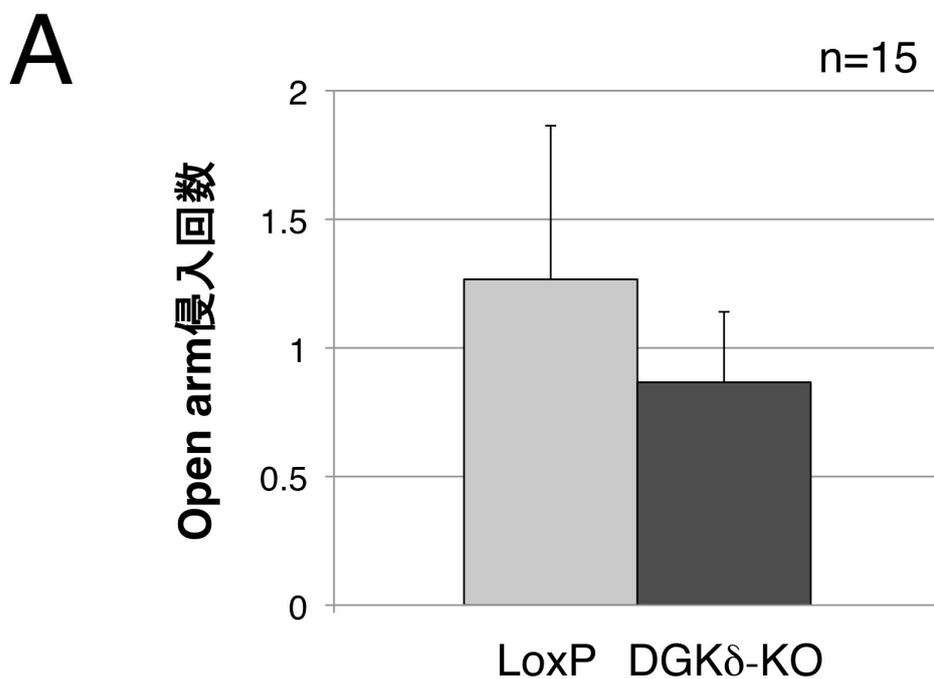


図2-13: オープンフィールド試験. 5分ごとの中央領域侵入回数(A)及び滞在時間(C). 30分間の中央領域侵入回数(B)と滞在時間(sec)(D). DGK $\delta$ -KOマウスの中央領域への侵入回数と滞在時間は, loxPマウスと比べて有意な差は無かった. グラフは平均 $\pm$ 標準誤差を示しており, 有意性はpaired t-testにより解析した.

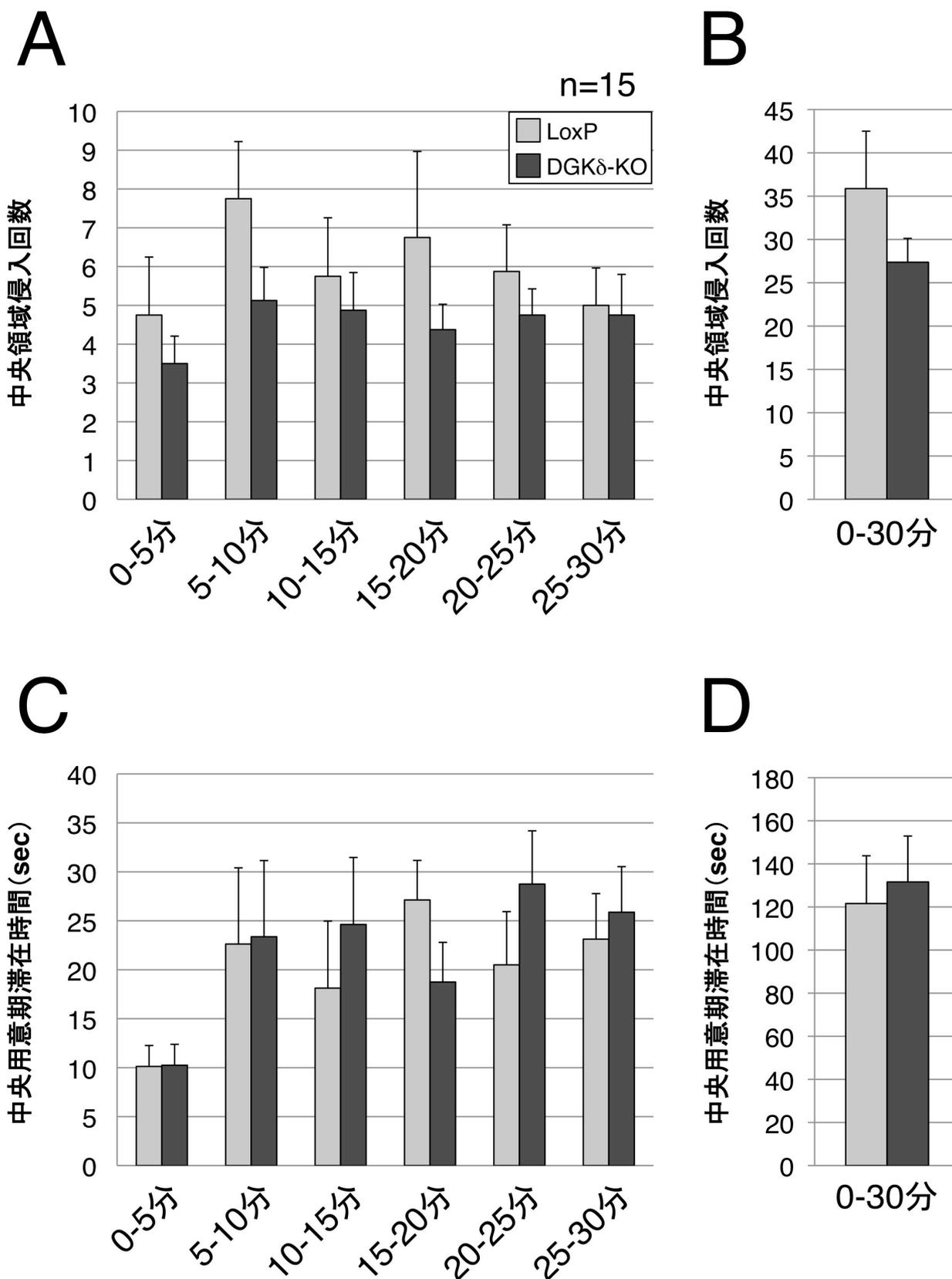
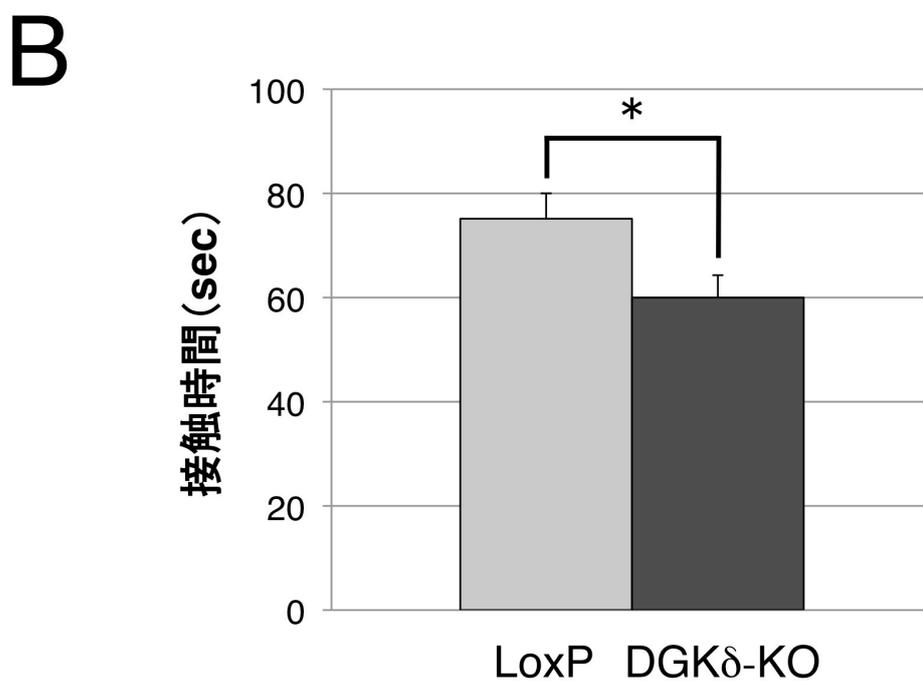
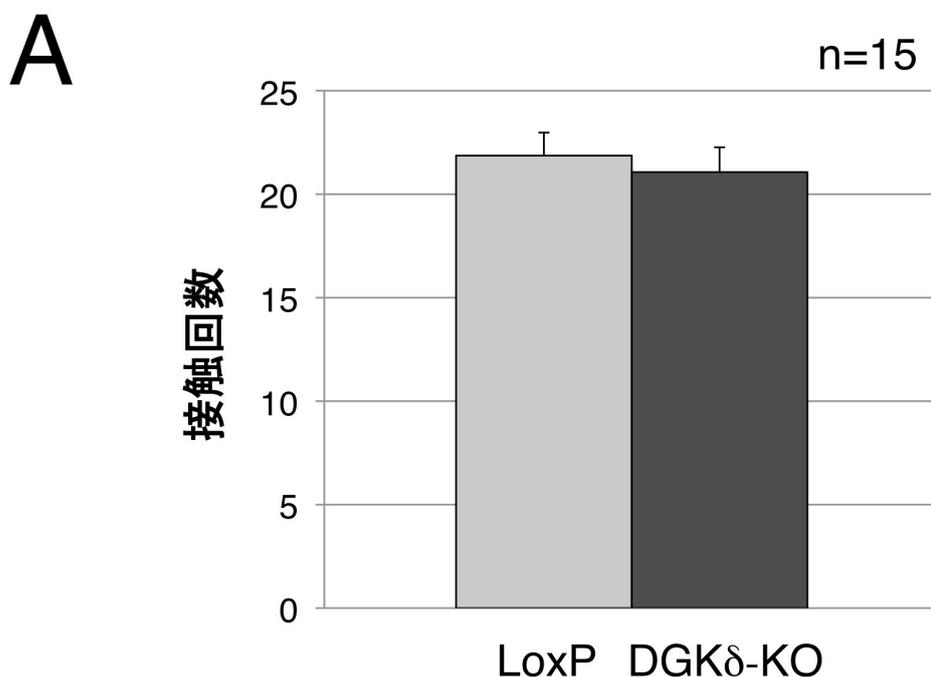


図2-14: 社会性試験. コントロールloxP及びDGK $\delta$ -KOマウスの, 未知のマウスに対する接触回数(A)及び接触時間(sec)(B)を測定した. 脳特異的DGK $\delta$ -KOマウスの未知のマウスに対する接触回数は, loxPマウスの接触回数とほぼ同じであった. 接触時間はDGK $\delta$ -KOマウスでは減少する傾向があったものの, 顕著な差は得られなかった. グラフは平均 $\pm$ 標準誤差を示しており, 有意性はpaired t-testにより解析した. (\* $p < 0.05$ )



### 2-3-6 八方十字迷路試験

DGK $\delta$ はマウス脳で海馬に強く発現することがわかった (図 1-1C) . 海馬は長期記憶を制御している [67]. そこで, 次に, 本 KO マウスの記憶力の異常の有無について八方十字迷路試験を用いて調べた. 八方十字迷路試験では, マウスが周囲の様子から餌の置かれている arm を記憶する空間参照記憶力と, 餌回収後もマウスを探索させることで, 餌を回収したことへの空間作業記憶力を検討することが出来る. DGK $\delta$ -KO マウスとコントロール loxP マウスの, 全ての餌を食べ終わるまでの時間 (図 2-15A), 空間参照エラーの回数 (図 2-15B), 空間作業エラーの回数 (図 2-15C) を比較したが, 有意な差は認められなかった.

### 2-3-7 バーンズ迷路試験

空間参照記憶力を検討するために, 八方十字迷路試験に加えバーンズ迷路試験を行った. バーンズ迷路試験では, 繰り返し試験を行い, マウスが円盤上の複数の穴から逃避箱が設置された穴に入るまでの時間とエラー回数を測定することで, マウスの空間参照記憶力を解析した. DGK $\delta$ -KO マウスはコントロールに比べエラー回数または逃避箱に入るまでの時間が少ない傾向があったが, 顕著な差はなかった (図 2-16A, B).

### 2-3-8 Cotton bud biting 試験

DGK $\delta$ -KO マウスを含む複数の同腹子の雄を一つのケージで飼育した場合, C57BL/6N の複数の雄を飼育する場合に比べ, 喧嘩が多くなる傾向があった. そのため, DGK $\delta$ -KO マウスの攻撃性について検討するために, cotton bud biting 試験を行った. 測定は連続 5 回行い, そのうちのマウスが綿棒に噛み付いた割合を解析した. コントロール loxP マウスと比較したところ脳特異的 DGK $\delta$ -KO マウスの攻撃性の増加は認められなかった (図 2-17).

### 2-3-9 尾懸垂試験

DGK $\delta$ と同じ II 型 DGK である DGK $\eta$ は, 双極性障害の発症に関与することが genome-wide association study や DGK $\eta$ 欠損マウスの行動解析から示唆されている [45]. これを踏まえ, 脳特異的 DGK $\delta$ -KO マウスの鬱の状態を検討するために, 尾懸垂試験を行った. 尾懸垂試験は鬱の有無を調べるために広く用いられている方法であり, 鬱状態を示すマウスは尾懸垂時の不動時間が長くなることが分かっている. 尾懸垂試験の結果,

図2-15: 八方十字迷路試験. コントロールloxP及びDGK $\delta$ -KOマウスの, 1日目1回目の試験 (Day1-1) から4日目2回目の試験 (Day4-2) までの, (A) Day1-1を100%とした時の全ての餌を食べ終わるまでの時間(%), (B) 空間参照エラーの回数, (C) 空間作業エラーの回数の相対値. これらの点においてDGK $\delta$ -KOマウスの異常は認められなかった. グラフは平均 $\pm$ 標準誤差を示しており, 有意性はpaired t-testにより解析した.

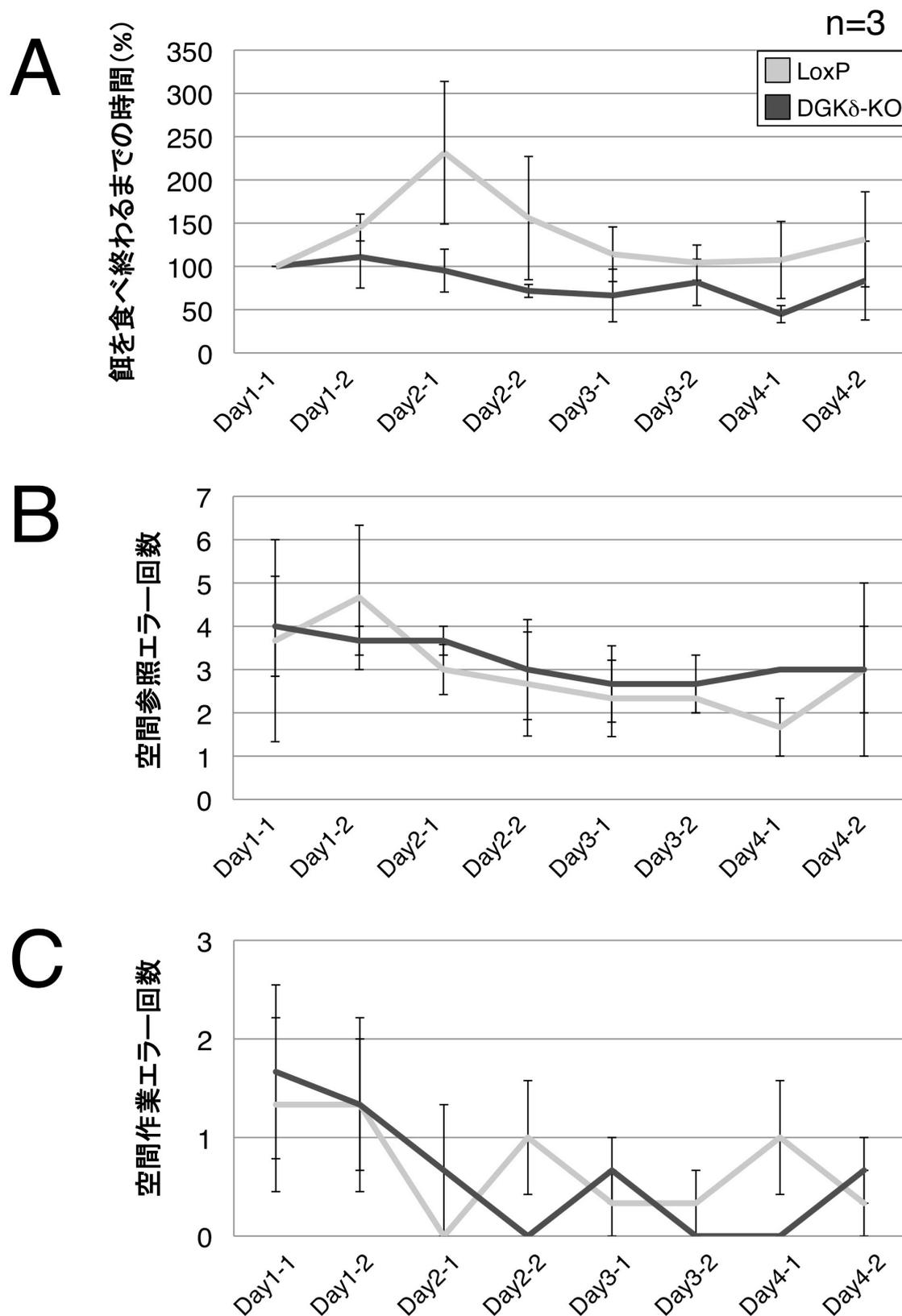
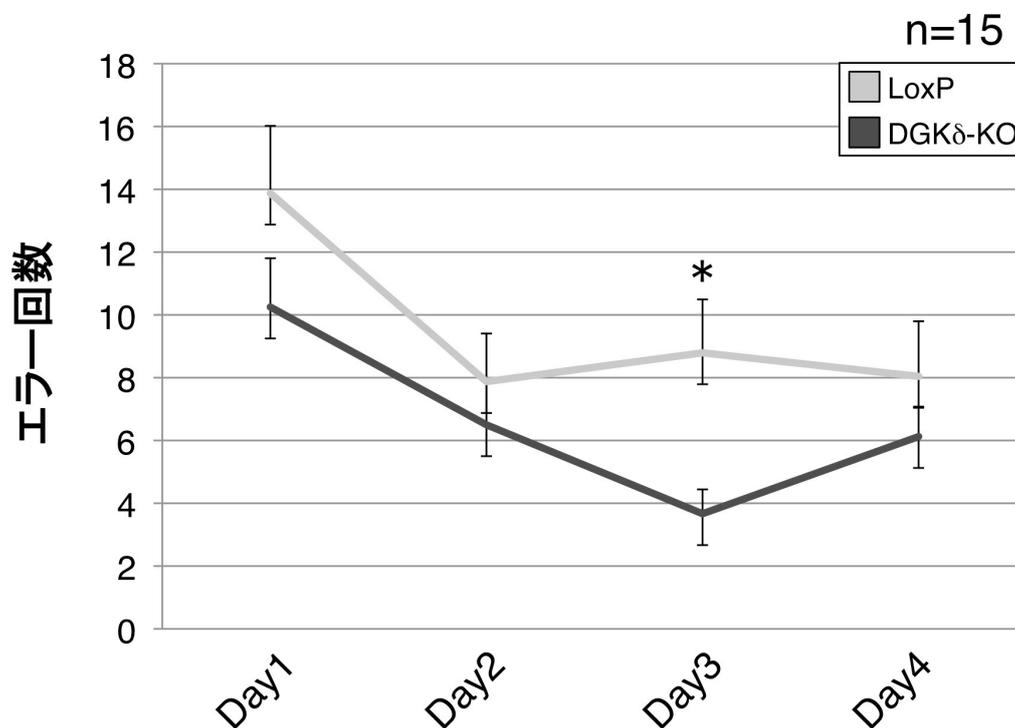


図2-16: バーンズ迷路試験. コントロールloxP及びDGK $\delta$ -KOマウスの逃避箱に入るまでのエラー回数(A)及び逃避箱に入るまでの時間(sec)(B)の各日の3回の試験における平均を示した. DGK $\delta$ -KOマウスはコントロールに比べエラー回数が少ない傾向があったが, 顕著な差はなかった. グラフは平均 $\pm$ 標準誤差を示しており, 有意性はpaired t-testにより解析した. (\* $p < 0.05$ )

A



B

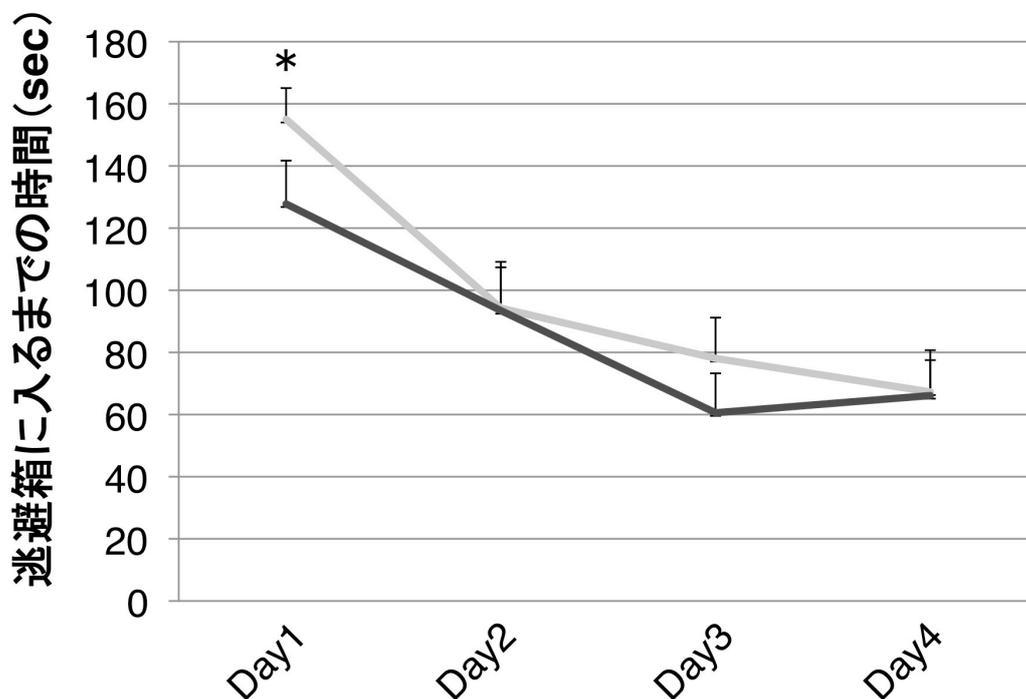


図2-17: Cotton bud biting試験. コントロールloxP及びDGK $\delta$ -KOマウスの, 5回の試行における噛み付いた割合を示した(%). 脳特異的DGK $\delta$ -KOマウスの綿棒に対する攻撃性はloxPマウスと比べて有意な差はなかった. グラフは平均 $\pm$ 標準誤差を示しており, 有意性はpaired t-testにより解析した.

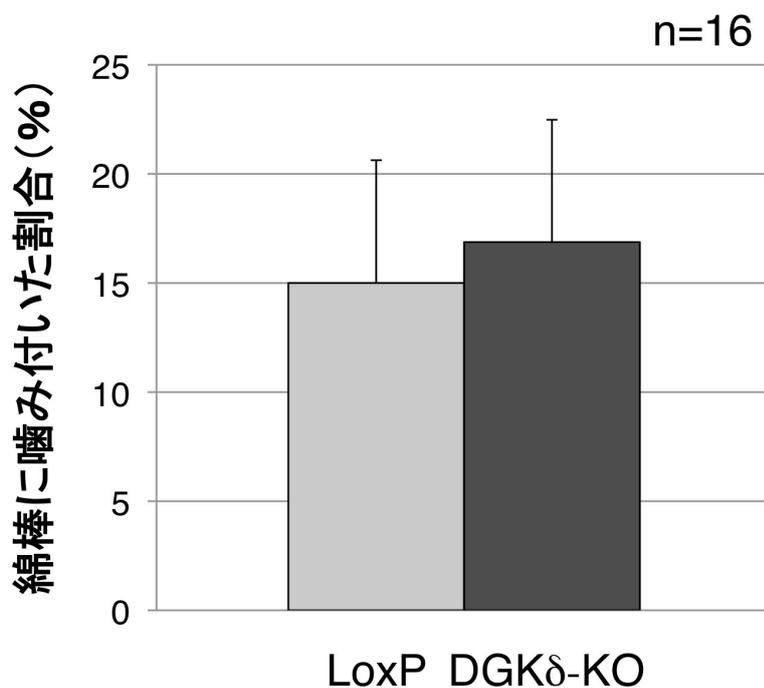
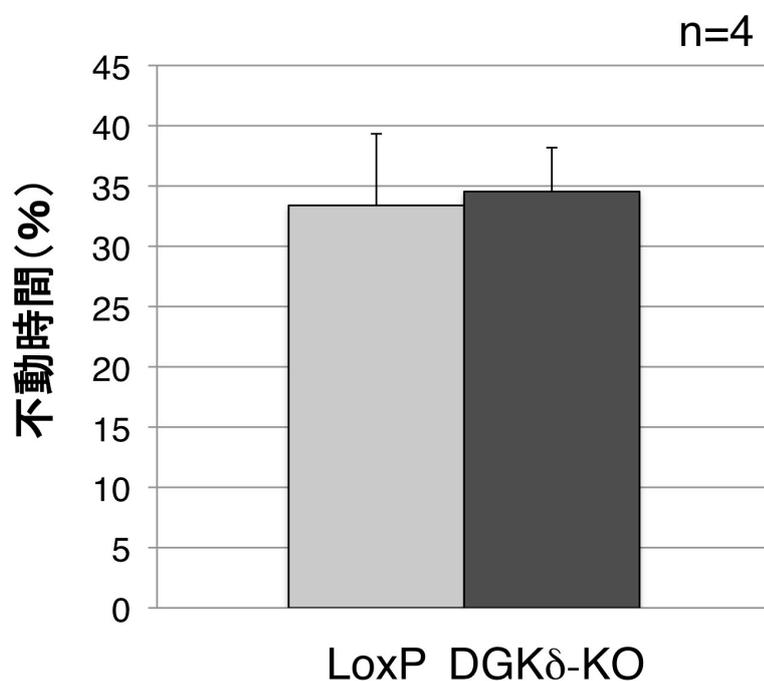


図2-18: 尾懸垂試験. コントロールloxP及びDGK $\delta$ -KOマウスの, 10分間の尾懸垂試験での不動時間を示した(%). 脳特異的DGK $\delta$ -KOマウスの尾懸垂時の不動時間は, loxPマウスとほぼ同じであった. グラフは平均 $\pm$ 標準誤差を示しており, 有意性はpaired t-testにより解析した.



脳特異的 DGK $\delta$ -KO マウスの不動時間は、コントロール loxP マウスと比べても差は認められなかった (図 2-18)。このことから、脳特異的 DGK $\delta$ -KO マウスには鬱状態はみられず、DGK $\delta$ は鬱には関与しないことが示唆された。

### 2-3-10 新規物体探索試験

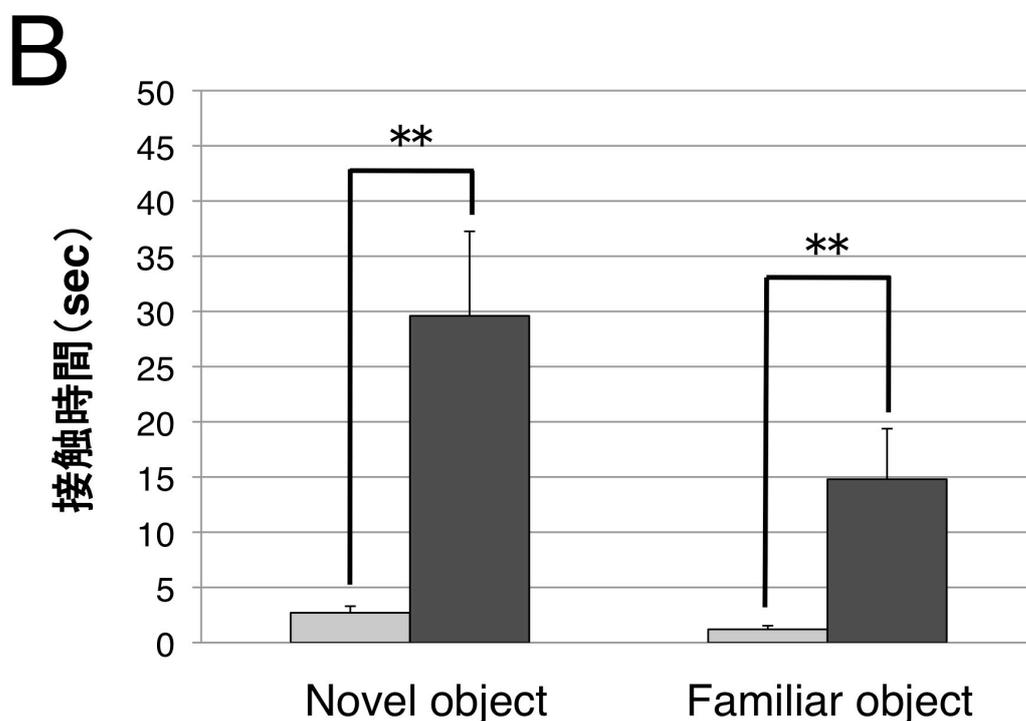
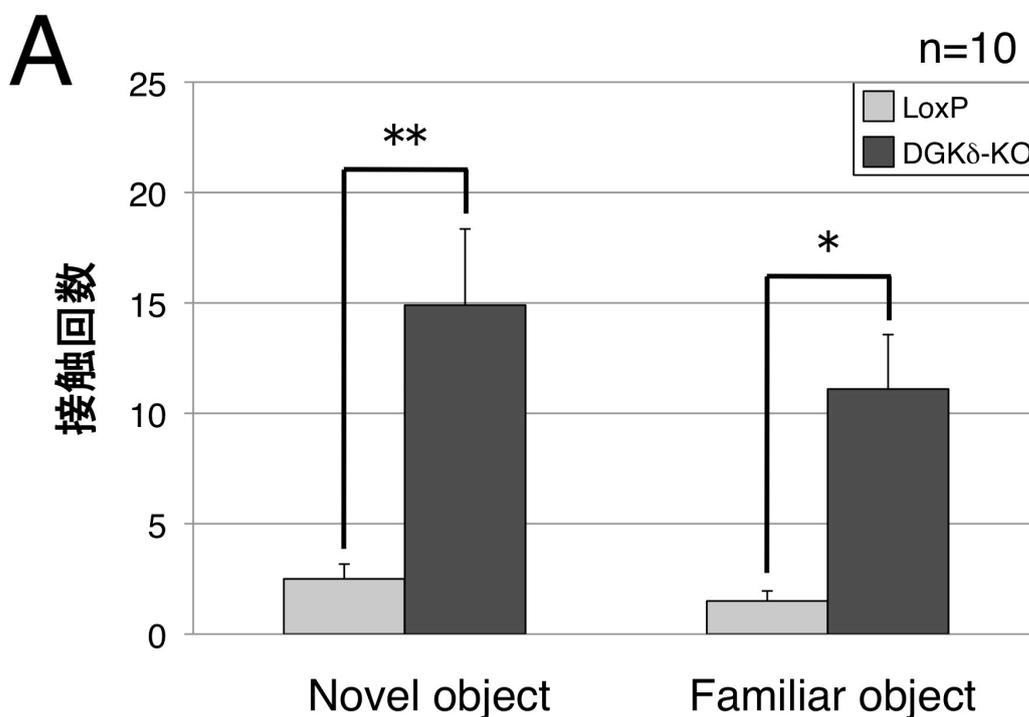
マウスは慣れた物体よりも新規の物体に強く興味を示すが (新規物体嗜好性)、認知力の低いマウスは、新規であること認識することが難しく、新規物体嗜好性が低い。脳特異的 DGK $\delta$ -KO マウスの認知力について調べるために、新規物体探索試験を行った。興味深いことに、DGK $\delta$ -KO マウスが novel object または familiar object に接触する様子をコントロールと比較すると、本 KO マウスはどちらの object に対しても接触する回数が非常に増加しており、また、object への接触時間も長いことがわかった (図 2-19A, B)。このことから、脳特異的 DGK $\delta$ -KO マウスは物体に対し極めて強い興味を示すと考えられる。このような物体に対する不合理な接触は、強迫性障害様の行動と関連付けられると考えられる。コントロール WT, cre マウスの接触量は loxP マウスの接触量と比べ有意な差はないことが確認された (data not shown)。

Novel object への接触量が familiar object への接触量と同等またはそれ以下である場合には、新規物体嗜好性が低く認知力が低いと考えられる。しかしながら、DGK $\delta$ -KO マウスの新規物体嗜好性 (novel object に接触した回数または時間 / novel object と familiar object に接触した回数または時間の合計) は、コントロール loxP マウスと比べほとんど差がないことがわかった (図 2-19C, D)。

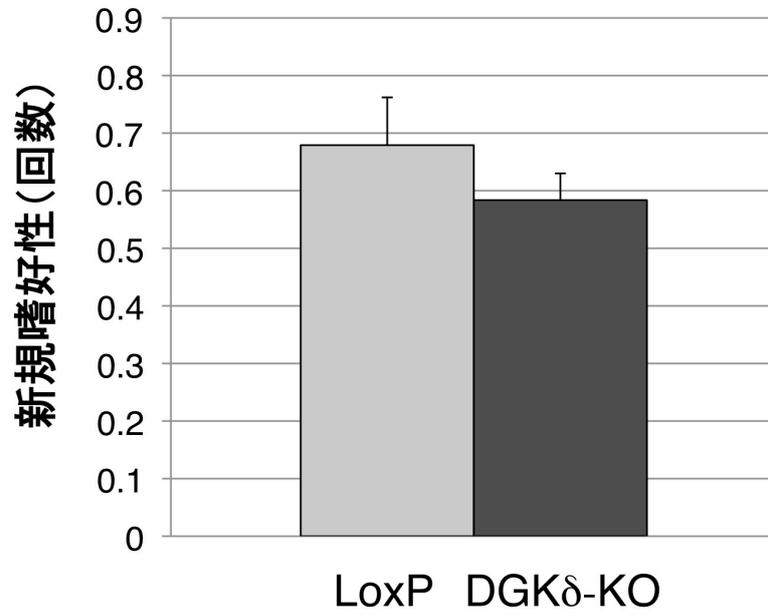
### 2-3-11 ビー玉埋め試験

ビー玉埋め試験では、マウスが無害であるビー玉を床敷で埋め隠した数を測定することで、強迫性障害の傾向を検討することが出来る。図 2-20A にビー玉埋め試験の代表的な試験の結果を示した。大変興味深いことに、図 2-20A, B に示すように、ビー玉埋め試験では、脳特異的 DGK $\delta$ -KO マウスはコントロール loxP マウスに比べ、より多い数のビー玉の数を埋めることがわかった。また、DGK $\delta$ -KO マウスはコントロールマウスに比べ床敷を激しく掘り返しており、そのことによって、より多くの数のビー玉を埋めると考えられた。この実験結果と新規物体探索試験の結果 (図 2-19A, B) から、脳特異的 DGK $\delta$ -KO マウスには、強迫性障害様の傾向があることが示唆された。また、コントロール WT, cre マウスが埋めたビー玉の数は、loxP マウスが埋めるビー玉の数と比べ有意な差はないことが確認された (data not shown)。

図2-19:新規物質探索試験. (A, B)コントロールloxP及びDGK $\delta$ -KOマウスの, novel object及びfamiliar objectに接触する回数(A)と時間(sec)(B). DGK $\delta$ -KOマウスがnovel object及びfamiliar objectに接触する時間及び回数は, loxPマウスに比べ顕著に増加した. (C, D)コントロールloxP及びDGK $\delta$ -KOマウスの新規物質嗜好性(novel object接触/(novel object接触+familiar object接触))を, 接触回数(C), 接触時間(D)それぞれで示した. DGK $\delta$ -KOマウスの新規嗜好性はloxPマウスと比べ有意な差はなかった. グラフは平均 $\pm$ 標準誤差を示しており, 有意性はpaired t-testにより解析した. (\*p<0.05, \*\*p<0.01)



C



D

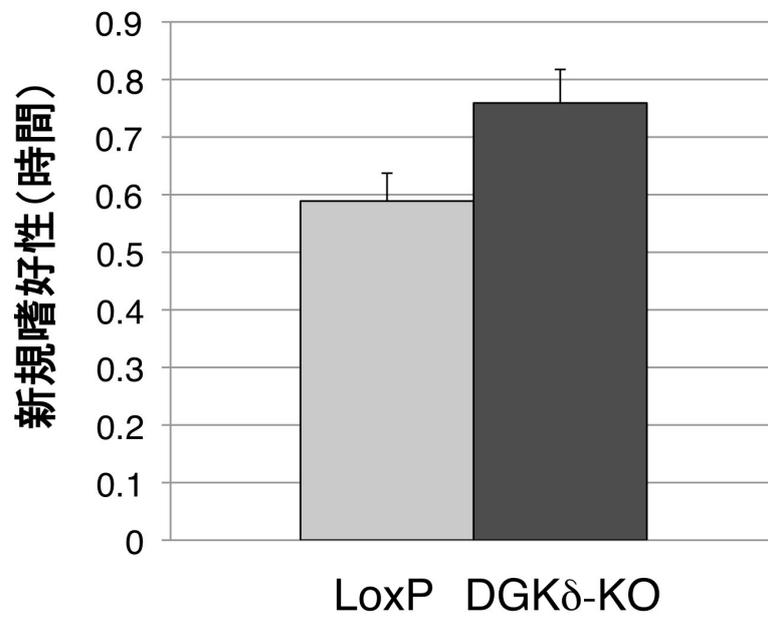
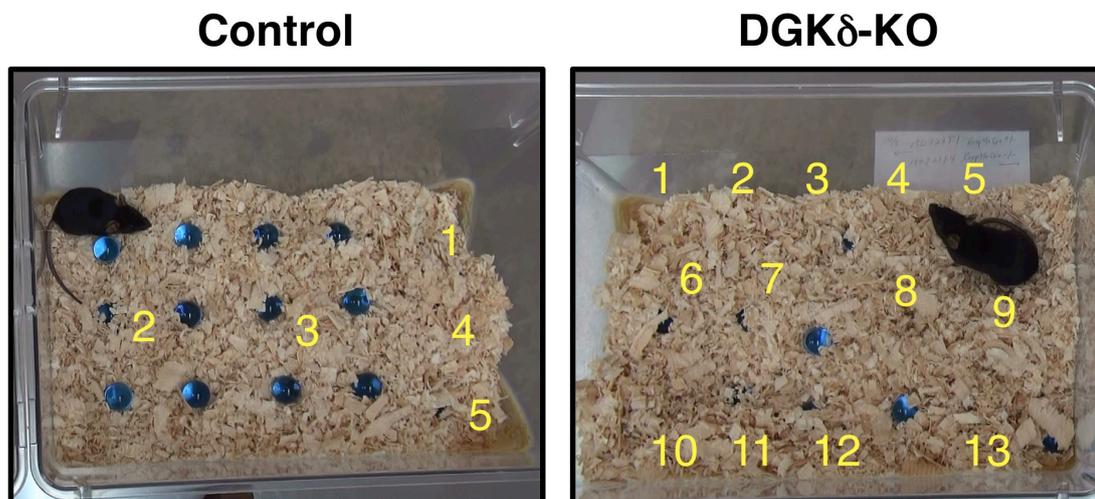
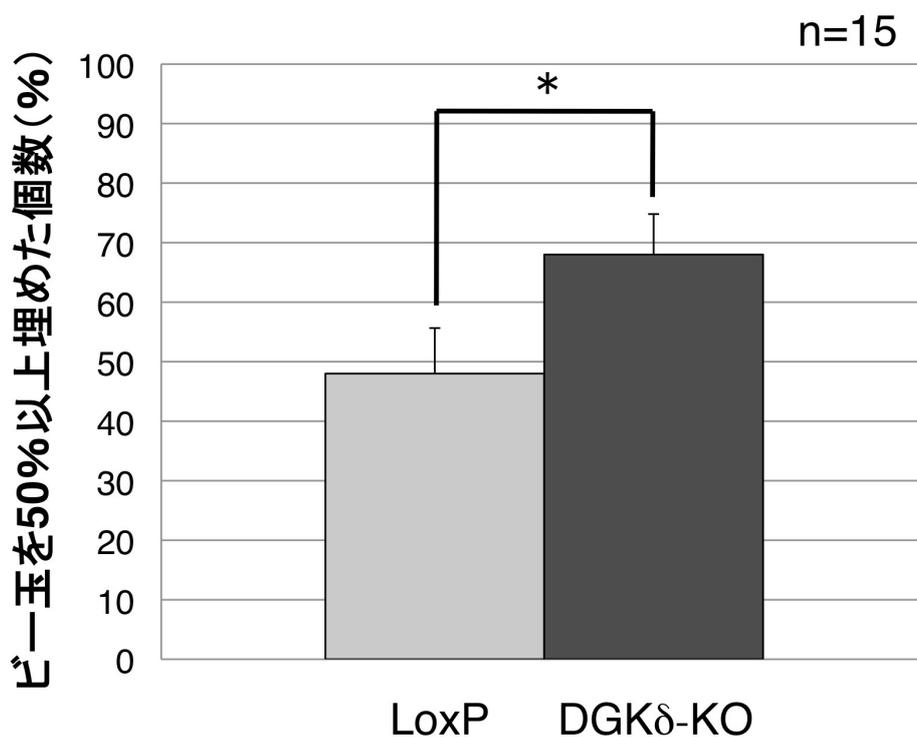


図2-20:ビー玉埋め試験. (A)ビー玉埋め試験の代表的な結果. コントロールマウスは5つ, DGK $\delta$ -KOマウスは13個のビー玉を埋めた. (B)コントロールloxP及びDGK $\delta$ -KOマウスの, 15個のビー玉のうち表面の50%以上を床敷で埋めた個数の割合を示した(%). DGK $\delta$ -KOマウスはコントロールマウスに比べより多くのビー玉を埋めた. グラフは平均 $\pm$ 標準誤差を示した. 有意性はpaired t-testにより解析した. (\* $p$ <0.05)

A



B



## 2-4 考察

我々のグループの以前の研究により、DGK $\delta$ の conventional 欠損マウスは、生後 24 時間以内に死亡することが明らかとなっている [23]. そのため、マウス生体内での DGK $\delta$ の各臓器における詳細な役割は今までにほとんど解明されていない. 今回我々は、DGK $\delta$ の発現が最も強い脳に特異的な DGK $\delta$ 欠損マウスを作製し、その行動解析を行った. その結果、脳特異的 DGK $\delta$ -KO マウスは恐怖心、社会性、記憶力、攻撃性、鬱状態、認知力に異常は認められなかった. しかし、物体に対して過剰に接触行動を取ること (図 2-19A, B), さらに、ビー玉埋め試験でコントロールマウスに比べより多くのビー玉を埋めることから (図 2-20) 強迫性障害様の行動を示すことがわかった (表 1).

強迫性障害は、不合理な行動を繰り返し行ってしまいう障害であり、ビー玉埋め試験においてマウスが無害なビー玉を繰り返し覆い隠そうとする不合理な行為と類似すると考えられているため、ビー玉埋め試験は強迫性障害の指標として広く用いられる [57]. 強迫性障害の発症メカニズムはほとんど解明されていないが、皮質-線条体-視床-皮質回路の異常が関与するという報告がある [58~60]. Welch らは線状体で高発現している興奮性シナプスにおけるシナプス後足場蛋白質を欠損させることで、強迫性障害モデルマウスを作製したが、このマウスはビー玉埋め試験の異常に加え、毛繕いの回数が増加し、オープンフィールド試験、明暗箱試験、高架十字試験で不安様の行動が大幅に増加した [61]. このように、強迫性障害モデルマウスでは、しばしば不安行動の増加がみられる. また、強迫性障害の薬物療法では抗不安薬、抗精神薬、抗鬱剤などが用いられており、実際に、強迫性障害モデルマウスでは、その表現型が抗鬱剤で軽減されることが報告されている [61]. しかしながら、強迫性障害様の行動を示した脳特異的 DGK $\delta$ 欠損マウスは、高架十字試験、オープンフィールド試験、明暗箱試験 (data not shown) から不安行動には異常を示さないと考えられた (図 2-12, -13). また、通常状態では、DGK $\delta$ 欠損マウスには異常な毛繕いは観察されなかった (data not shown). Thomas らは以前、10 種類の近交系マウスで明暗箱試験、オープンフィールド試験を用いて不安行動とビー玉試験の結果との相関性を検討しているが、これらの不安行動試験とビー玉試験で埋めたビー玉の数には相関性が無いことを報告している [62]. また、一般に不安行動を解析する試験では、一度試験を行いその恐怖環境を体験してしまうと、再度同じ試験を行ってもその恐怖環境に対する慣れが生じ恐怖の程度が最初の試験より小さくなる. このことに関して Thomas らは、ビー玉埋め試験では、複数回試験を行ってマウスをビー玉に慣れさせても、埋めるビー玉の数が減少しないことから、本試験は新規物体に対する恐怖とは無関係であると報告している. また、マウスの穴掘り行動と埋

表1:種々の行動解析試験結果. 脳特異的DGK $\delta$ -KOマウスの恐怖心, 社会性, 記憶力, 攻撃性, 鬱状態, 認知力に異常は認められなかった. DGK $\delta$ -KOマウスは, 新規物体探索試験及びビー玉埋め試験で強迫性障害様の行動を示した.

行動解析試験	解析対象	DGK $\delta$ 欠損マウスでの異常
高架十字試験	恐怖心	-
オープンフィールド試験		-
社会性試験	社会性	-
八方十字迷路試験	記憶力	-
バーンズ迷路試験		-
Cotton bud biting試験	攻撃性	-
尾懸垂試験	鬱	-
新規物体探索試験	認知力	-
	強迫性障害	+
ビー玉埋め試験	強迫性障害	+

めるビー玉の数が相関性を持つ可能性も示唆しており、不合理な穴掘り行動を繰り返すことは強迫性障害の指標となり得る。したがって、脳特異的 DGK $\delta$ 欠損マウスは、不安様の行動には異常がない新たな強迫性障害のモデルマウスとなることが期待出来る。また、新規物体探索試験より、DGK $\delta$ -KO マウスはコントロールマウスと同様に新規物体嗜好性があり、認知力には異常がないことがわかったが (図 2-19C,D), 非常に興味深いことに、DGK $\delta$ 欠損マウスは 10 分間慣らした object, 新規 object どちらの物体に対しても、コントロールに比べ接触頻度と接触時間が増加していることがわかった (図 2-19A,B). このような object に対する不合理な接触から DGK $\delta$ -KO マウスは物体に対する強迫性障害を示す可能性が示された。今後は、脳特異的 DGK $\delta$ 欠損マウスに強迫性障害の治療薬として用いられる塩酸フルオキセチンを投与し、ビー玉埋め試験と新規物体探索試験の結果の改善を確認することで、DGK $\delta$ と強迫性障害との関連を更に確かなものとする。一方で、物体に対して過剰な接触を行うという表現型と現在までに報告されている精神疾患との決定的な関連はまだ不明であり、複合的な精神疾患の表現型である可能性も考えられる。

DGK $\delta$ と同じ II 型に属する DGK $\eta$ は、genome-wide association study やヒト患者の組織から、その発現異常が統合失調症や双極性障害を引き起こす可能性が報告されている [45~47]。また、我々の研究室では conventional DGK $\eta$ 欠損マウスを作製しており、このマウスは双極性障害様の行動を示すことを近年明らかにしている (Isozaki, T., et al. 論文投稿中)。双極性障害では、躁状態又は不安様の行動と鬱症状の増加がみられるが、DGK $\delta$ -KO マウスでは、高架十字試験、オープンフィールド試験、尾懸垂試験では異常がなく、恐怖心の異常と鬱状態は観察されなかったことから、双極性障害様の表現型は示していないと考えられる。また、統合失調症の症状である社会性と攻撃性についても、社会性試験、cotton bud biting 試験を用いて検討した。しかしながら、DGK $\delta$ -KO マウスの社会性、攻撃性についての顕著な異常は観察されず、DGK $\delta$ が統合失調症に関与する可能性も低いことが示された。

海馬は記憶や空間学習能力に関わり、長期記憶を制御する。DGK $\delta$ は海馬での発現が強いことから (図 1-1C), 八方十字迷路試験及びバーンズ迷路試験を行った。しかし、DGK $\delta$ -KO マウスの記憶力・空間学習能力には異常が無かったことから (図 2-15, -16), DGK $\delta$ は記憶・学習のメカニズムには強く関与しないことが示唆された。また、DGK $\delta$ 遺伝子の部分欠損の患者がてんかん性発作を示すことが報告されているが [24], 平常状態では脳特異的 DGK $\delta$ 欠損マウスにてんかん性発作は観察されなかった。今後はてんかん誘発剤ペンチレンテトラゾールの腹腔内投与によりてんかんを誘発し、DGK $\delta$ -KO マウスのてんかんの重症度を解析することで、DGK $\delta$ -KO マウスとてんかん性発作との

関連をより詳細に解析する。

DGK の欠損マウスは現在までに数種類作製されている。DGK はアイソザイムごとに脳での発現部位が異なり, その欠損マウスまたは genome-wide association study の解析から, 次に示すように様々な脳神経疾患に関与することが報告されている。DGK $\beta$  : 双極性障害 [20], DGK $\epsilon$  : てんかん [21], DGK $\eta$  : 統合失調症と双極性障害 (Isozaki, T., et al. 論文投稿中), DGK $\theta$  : パーキンソン病 [63]. 今回明らかにした脳特異的 DGK $\delta$ 欠損マウスの行動異常は, 他の DGK のアイソザイムとは明らかに異なる表現型である。そのため, 強迫性障害を含め今までに報告されていない DGK の脳における新たな機能の解明に繋がることが期待出来る。

## 第 3 章

### 脳特異的 DGK $\delta$ 欠損マウスの脳組織の形態観察

### 3-1 緒言

第2章で、DGK $\delta$ 欠損マウスは強迫性障害様の行動異常を示すことが示唆されたが、神経疾患様の表現型を示すマウスは脳の構造の一部に異常を持つことがある [64, 65]. そこで DGK $\delta$ 欠損が引き起こす脳の構造異常の解明のために、脳特異的 DGK $\delta$ 欠損マウスの脳の構造をヘマトキシリン・エオシン染色を用いて観察した. また、DGK $\delta$ 欠損脳の神経細胞の観察のために、Golgi-Cox 染色を行った.

## 3-2 試薬と実験手法

### 3-2-1 マウスの飼育・作製・ジェノタイプピング

2-2-1, -2, -3 に示した.

### 3-2-2 ヘマトキシリン・エオシン染色

マウス脳は摘出後、3分割し、4% PFA/PBS で4℃、20時間固定した。脳をPBSで4時間洗浄した後、15時間30% (w/v) スクロース溶液で置換した。その後、スクロース溶液を交換して再び15時間置換し、ヘキサンドライアイス内でOCT compoundに包埋した。凍結切片は7µmの厚さで作製した。切片を約30分風乾後、PBSで3分間×2回洗浄した。切片に45℃に温めたマイヤーヘマトキシリン液 (Wako Pure Chemical) を滴下し、5分間インキュベートした。45℃の脱イオン (DI) 水で2回洗浄した後、45℃のDI水で3分間洗浄した。次に、1%エオシン液 (1%エオシン Y (Wako Pure Chemical) /0.1%酢酸/DI水) で5分間染色した。95, 100%エタノールで各1分2回ずつ脱水した。最後にキシレンで3分間×3回透徹し、非水溶性マウント剤 VECTA MOUNT (VECTOR Laboratories) で封入した。

### 3-2-3 Golgi-Cox 染色

5% (w/v) ニクロム酸カリウム 50 mL, 5% (w/v) 塩化水銀 (II) 50 mL, 5% (w/v) クロム酸カリウム 100 mL を混合し (以下この混合溶液をゴルジ液とする), 遮光して1週間静置した。マウス脳は摘出後3分割し、PBSで洗浄した後、ゴルジ液が十分に入ったガラスバイアル瓶に入れ常温で遮光保存した。2日後にゴルジ液を交換し、2週間静置した。2日間ゴルジ液を30% (w/v) スクロース溶液に置換した後、ヘキサンドライアイスで凍結した。切片は60µmで作製し、APS-coated スライドガラスにのせた。切片はDI水で4分間×2回洗浄し、その後20% NH<sub>4</sub>溶液を滴下し、30分遮光して反応させた。DI水で3分間×2回洗浄し、75, 95, 100%エタノールで段階的に各3分ずつ脱水した。最後にキシレンで3分間×3回透徹し、非水溶性マウント剤 VECTA MOUNT (VECTOR Laboratories) で封入した。

## 3-3 結果

### 3-3-1 ヘマトキシリン・エオシン染色による脳の形態観察

ヘマトキシリンは細胞核など好塩基性の組織を青紫色に染め、エオシンは、細胞質などの好酸性の組織をピンク色に染色する。脳特異的 DGK $\delta$ -KO マウスの脳組織の形態変化を解析するために、まず、ヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色を行った。DGK $\delta$  の発現は大脳皮質、小脳の顆粒層、嗅球、海馬に多いため、DGK $\delta$ -KO マウスとコントロール loxP マウスの脳切片のこれらの部位に着目して比較した (図 3-1A~D)。しかしながら、HE 染色では DGK $\delta$  の強い発現がみられた海馬の萎縮などの構造異常は観察されなかった (図 3-1D)。また、小脳の顆粒層の構造異常もみられなかった (図 3-1B)。

### 3-3-2 Golgi-Cox 染色による脳の形態観察

次に、Golgi-Cox 染色を行った。Golgi-Cox 染色では、ごく限られた神経細胞を、細胞体だけでなく樹状突起まで明瞭に染色することが出来る。DGK $\delta$ -KO マウスとコントロール loxP マウスの Golgi-Cox 染色切片の大脳皮質を図 3-2 に示した。DGK $\delta$ -KO マウスの脳は、コントロールマウスの脳に比べ神経ネットワークが密である印象を受ける。しかしながら、細胞の密度が高く、細胞数や神経突起伸長の変化を定量することが難しかった。そこで、DGK $\delta$  欠損による神経細胞への影響を細胞レベルで観察した (第 4 章)。

図3-1: コントロールloxP及びDGK $\delta$ -KOマウスの大脳皮質(A), 小脳(B), 嗅球(C), 海馬(D)のヘマトキシリン・エオシン染色. ヘマトキシリン・エオシン染色ではDGK $\delta$ -KOマウス脳の構造異常を検出することが出来なかった.

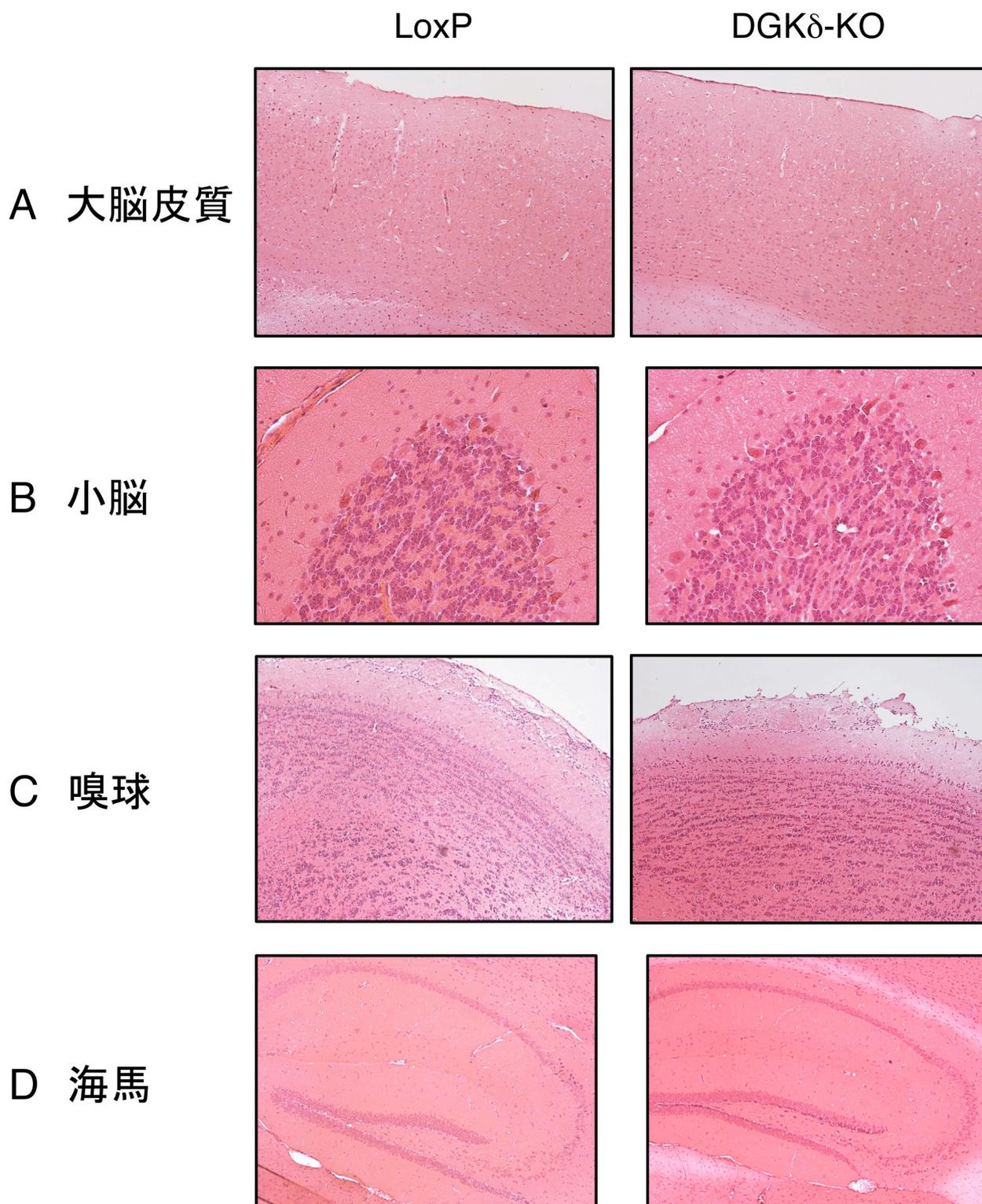
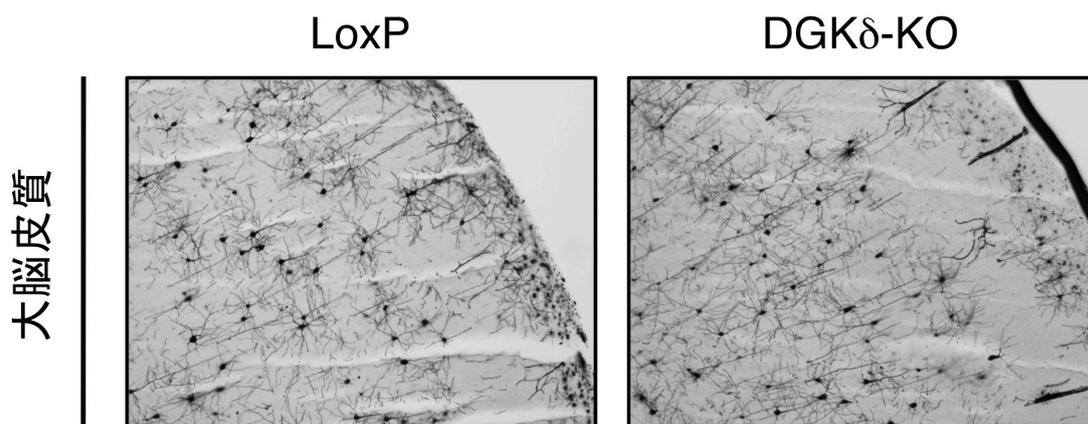


図3-2: コントロールloxP及びDGK $\delta$ -KOマウス大脳皮質のGolgi-Cox染色図. 神経細胞の密度が高く, 細胞数や神経突起伸長の変化を定量することが難しかった.



### 3-4 考察

神経疾患様の表現型を示すマウスは脳の構造の一部に異常を持つことがある [64, 65]. そこで脳特異的 DGK $\delta$ 欠損マウスの脳の構造変化をヘマトキシリン・エオシン染色を用いて観察した. DGK $\delta$ は大脳皮質, 小脳, 嗅球, 海馬に強く発現する (図 1-1C). しかしながら, HE 染色では DGK $\delta$ 欠損マウス脳の海馬の萎縮や, 大脳, 小脳, 嗅球の形態変化が観察されなかった (図 3-1). ビー玉埋め試験より, 脳特異的 DGK $\delta$ -KO マウスは強迫性障害様の行動異常を示すことがわかった (図 2-20). 強迫性障害では, 皮質-線条体-視床-皮質回路に異常を示す可能性が報告されており, 脳特異的 DGK $\delta$ -KO マウスの線状体の構造に関して今後検討する必要がある.

また, Golgi-Cox 染色によって検出された神経細胞を図 3-2 に示したが, DGK $\delta$ -KO マウスの脳の方がコントロールマウスの脳に比べ神経ネットワークが密である印象を受ける. しかし, 神経ネットワークが非常に混み合っていたため, 神経細胞や神経突起を定量的に解析することが出来なかった. そこで, 次に, 細胞レベルでの DGK $\delta$ 欠損による神経細胞の形態変化を解析した.

## 第 4 章

### DGK $\delta$ 欠損細胞の形態解析

## 4-1 緒言

第 3 章に示した通り，Golgi-Cox 染色では，DGK $\delta$ -KO マウス脳神経細胞の形態変化を定量的に解析出来なかった．そこで，DGK $\delta$ の欠損が引き起こす神経細胞の形態変化をより詳細に解析するために，DGK $\delta$ -KO マウス脳由来の神経初代培養細胞とマウス神経芽腫細胞株 Neuro-2a 細胞を用いた細胞レベルでの解析を行った．DGK $\delta$ -KO マウスから得た大脳皮質神経初代培養細胞の神経突起を抗 $\beta$ -III tubulin 抗体を用いて染色し，神経突起伸長を観察した．次に，siRNA を用いて DGK $\delta$ をノックダウンした Neuro-2a 細胞の神経突起の形態を解析した．

## 4-2 試薬と実験手法

### 4-2-1 大脳皮質神経細胞の初代培養

胎齢 13~14 日のマウスの胎仔の大脳皮質細胞の初代培養を行った。Opti-Mem (Gibco-Life Technologies) の中でマウス胎仔を子宮から取り出した後、断頭し、身体部分をジェノタイピング用に 1.5 mL tube に移した。顕微鏡を用いて頭蓋骨を剥き、大脳皮質のみをピンセットで摘出し、3 mL の Opti-Mem を入れた 50 mL tube に入れた。オートクレーブと乾熱滅菌済のパスツールピペット (IK-PAS-9P, IWAKI/ASAHI TECHNO GLASS 株式会社) の先端をガスバーナーで加熱して先端の切り端を丸め、このパスツールピペットで数十回ピペッティングし、細胞を懸濁した。B27 Supplement (Gibco-Life Technologies), 100 unit/mL ペニシリン, 100 mg/mL ストレプトマイシン含有 Opti-Mem を培地とし、poly-L-lysine コートした 12 well plate (IWAKI/ASAHI TECHNO GLASS 株式会社) に  $1.5 \times 10^4$  cells/well 播種した。培養は 7 日間行い、5 日目に半量の培地を新しい培地に交換した。

### 4-2-2 Neuro-2a 細胞の培養

マウス神経芽細胞腫細胞株 Neuro-2a 細胞は、10%ウシ胎仔血清 (FBS), 100 unit/mL ペニシリン, 100 mg/mL ストレプトマイシン (Wako Pure Chemical) を含む高グルコース含有ダルベッコ改変イーグル培地 (D-MEM, Wako Pure Chemical) で、37°C, 5% CO<sub>2</sub> の条件で培養した。前継代から 48 時間後に Trypsin/EDTA によって細胞を剥離し培地で懸濁した後、60 mm dish (IWAKI/ASAHI TECHNO GLASS 株式会社) に  $5 \times 10^5$  cells 播種して継代を行った。神経細胞の分化誘導は、siRNA をトランスフェクションした 24 時間後に 20  $\mu$ M のレチノイン酸を添加した 2% FBS, 100 unit/mL ペニシリン, 100 mg/mL ストレプトマイシン含有 D-MEM 培地に交換することで行い、48 時間後に新しい分化誘導培地に交換した。分化誘導は 72 時間行った。実験に用いる細胞は poly-L-lysine コートした dish に播種した。共焦点顕微鏡での観察のための培養には、poly-L-lysine コートしたカバーガラスを 4 枚敷いた 60 mm dish を用いた。

### 4-2-3 siRNA 及びプラスミドの細胞導入

siRNA はエレクトロポレーションを用いて導入した。800 pmol の control-siRNA または DGK $\delta$ -siRNA を、4 mm cuvette, 350 V, 300  $\mu$ F,  $\infty \Omega$  の条件で Gene Pulser Xcell™ Electroporation System (Bio-Rad Laboratories) を用いてエレクトロポレーションした。60 mm dish あたり  $2 \times 10^5$  cells 播種した。

Stealth RNAi duplexes (Invitrogen) は以下のものを使用した． DGK $\delta$ -siRNA:  
5'-UACUCACAGAGACUGAGGUGCUCCA-3' ,  
5'-UGGAGCACCUCAGUCUCUGUGAGUA-3'; control-siRNA:  
5'-UGGCACCUCUGACUCUGUAGAGGUA-3' ,  
5'-UAUCUUUGCAUCCAAGCCAAUGCCA-3'.

#### 4-2-4 ウェスタンブロット

1-2-2に示した Neuro-2a 細胞は PBS で洗浄し, cOplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostic), Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 (Sigma-Aldrich), Phosphatase Inhibitor Cocktail 3 (Sigma-Aldrich) 及び phenylmethylsulfonyl fluoride 含有 lysis buffer (50 mM HEPES (pH 7.2), 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Nonidet P-40, 1 mM dithiothreitol) を用いて回収した．回収した細胞溶液を超音波破碎後, 13,800 × g で 5 分遠心分離し, 上清を cell lysate とした．EGFP tag の検出には, 抗 GFP 抗体 (sc9996, Santa Cruz Biotechnology) を用いた．

#### 4-2-5 免疫染色

細胞を PBS で洗浄し, 3.7%ホルムアルデヒド/PBS で 5 分, 遮光しながら固定した．0.1% TritonX-100/PBS を加え, 5 分間遮光放置した．次に, 2% bovine serum albumin (BSA)/PBS で 30 分間, 室温, 遮光でインキュベートした．一次抗体には抗 $\beta$ -III tubulin 抗体 (T2200, Sigma-Aldrich) (1:800 希釈) を, 二次抗体には FITC 標識抗 Rabbit IgG 抗体 (sc2099, Santa Cruz Biotechnology) (1:400 希釈) を用いて, それぞれ一時間, 室温, 遮光状態でインキュベートした．その後, 1  $\mu$ g/mL 4', 6-diamidino-2-phenylindole 溶液 (DAPI, Sigma-Aldrich) で 15 分間反応し, 核を染色した．細胞の封入には VECTASHIELD (VECTOR Laboratories) を使用した．一次抗体及び二次抗体は 2% BSA/PBS で希釈した．各試薬または抗体の反応後は, カバーガラスを PBS で洗浄した．共焦点蛍光顕微鏡は FV1000-D (Olympus) を用いた．

初代培養では, 各解剖でそれぞれの genotype あたり 2~6 匹の胎仔を用い, 免疫染色では各胎仔あたり 15~35 cells を観察した．Neuro-2a 細胞の免疫染色では, control siRNA または DGK $\delta$  siRNA を導入した細胞のうち, 細胞体が他の細胞体と接していない細胞を各実験で 250~650 cells 観察した．細胞体から直接伸長している神経突起の中で, 初代培養細胞では細胞体の 2 倍以上の長さの神経突起を, Neuro-2a 細胞では細胞体の等倍以上の長さの神経突起の本数をカウントした．なお, 複数の神経突起が細胞体の同じ部位から伸長しているものは 1 本と数えた．

## 4-3 結果

### 4-3-1 脳特異的 DGK $\delta$ 欠損マウスの神経初代培養細胞の形態変化

第 3 章に示した通り, Golgi-Cox 染色では, DGK $\delta$ -KO マウス脳 of 神経細胞の形態変化を定量的に解析することが出来なかった. DGK $\delta$ はマウス脳では大脳皮質に最も強く発現するため [25], 次に, DGK $\delta$ -KO マウスから得た大脳皮質神経初代培養細胞の形態を解析した. 神経初代培養細胞は播種後 7 日間培養し, 抗 $\beta$ -III tubulin 抗体を用いて染色した (図 4-1A). 染色された神経突起のうち, 1 細胞あたりの細胞体の 2 倍以上の長さの細胞体から直接伸長する神経突起の数を測定した. 図 4-1B に示すように, DGK $\delta$ -KO マウスから得た大脳皮質神経初代培養細胞は, 長い神経突起が 2 本以下の神経細胞の割合はコントロール細胞と比べ有意な差はなかったものの, 長い神経突起を 3 本以上持つ神経細胞の割合が有意に増加していた.

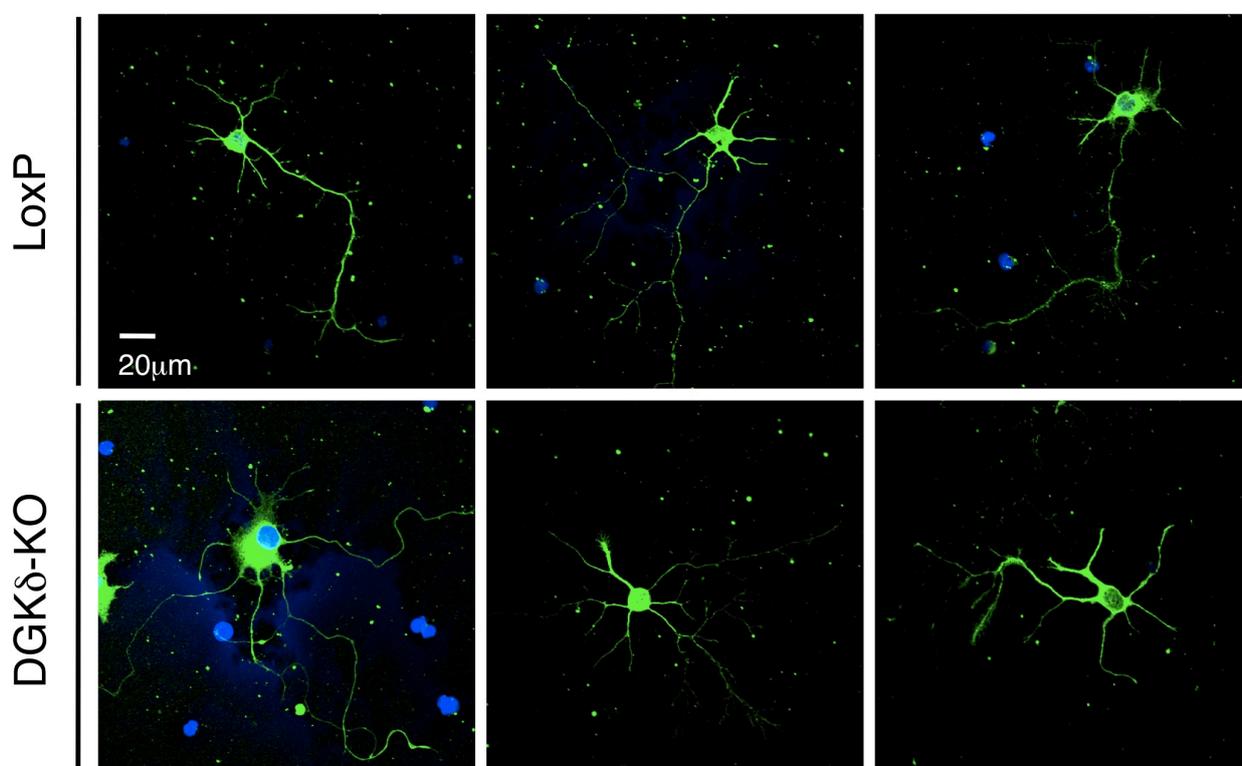
### 4-3-2 DGK $\delta$ ノックダウン Neuro-2a 細胞の形態変化

脳特異的 DGK $\delta$ -KO マウスから得た大脳皮質神経初代培養細胞は, コントロールの細胞に比べ長い神経突起を 3 本以上持つ神経細胞が増加する傾向があることがわかった. そこで, 次に siRNA を用いた DGK $\delta$ ノックダウン時のマウス神経芽細胞腫由来 Neuro-2a 細胞の神経突起の形態を解析した. Control の siRNA または DGK $\delta$ の siRNA をエレクトロポレーション法で Neuro-2a 細胞に導入し, 24 時間後に分化誘導培地に置換した. エレクトロポレーションから 72 時間後に培地替えし, 分化誘導開始から 72 時間で細胞を回収した. DGK $\delta$ の発現をウェスタンブロット法により検出したところ, DGK $\delta$ の発現が顕著に低下していることが確認された (control siRNA に比べ約 50%の発現量)

(図 4-2A). 図 4-2B に示すように, DGK $\delta$ ノックダウン細胞では, コントロールに比べ, 神経突起の本数が多い細胞が増加する傾向が認められた. 定量したところ, 神経突起を 3 本以上持つ神経細胞の割合が, コントロールと比較すると 2 倍以上増加しており, DGK $\delta$ 欠損神経初代培養細胞と同じ傾向を示すことが確認された (図 4-2C).

図4-1: (A)コントロールloxP及びDGK $\delta$ -KOマウス的大脑皮質神経初代培養細胞. (B)胎仔ごとにカウントした細胞の中で0本, 1本, 2本, 3本以上の神経突起を持つ神経細胞の割合(%). DGK $\delta$ -KOマウスから得た大脑皮質神経初代培養細胞では, 長い神経突起を3本以上持つ神経細胞の割合が有意に増加した. 独立した実験を三回行い, 平均 $\pm$ 標準誤差を示した. 有意性はpaired t-testにより解析した. (\*\* $p < 0.01$ )

A



B

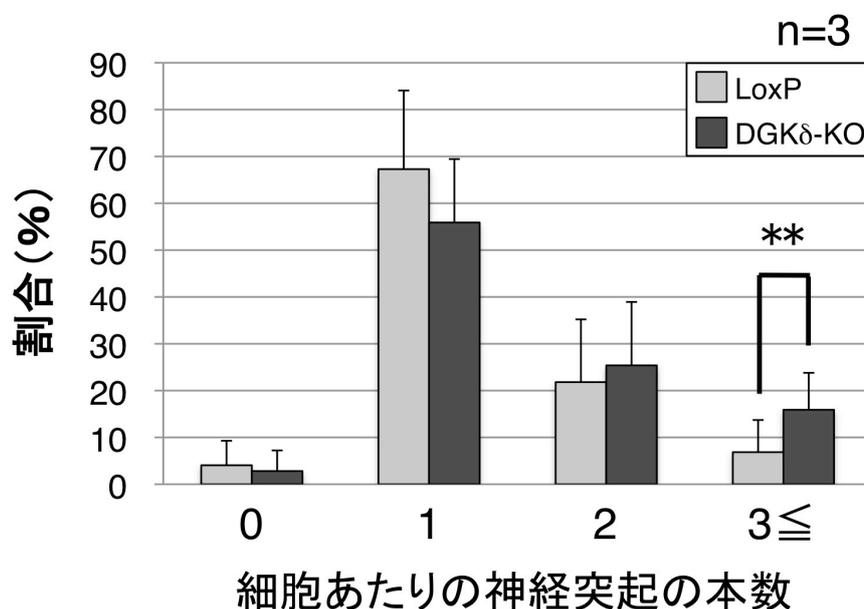
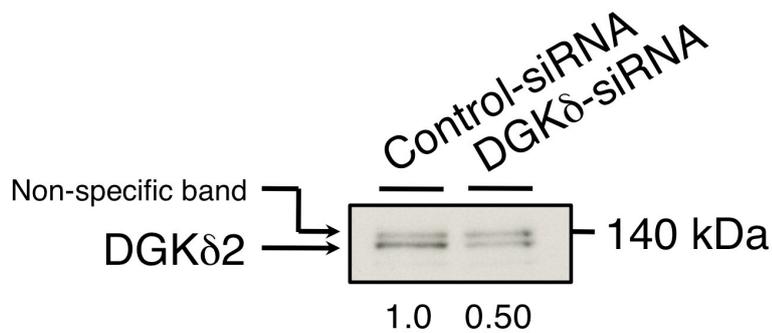
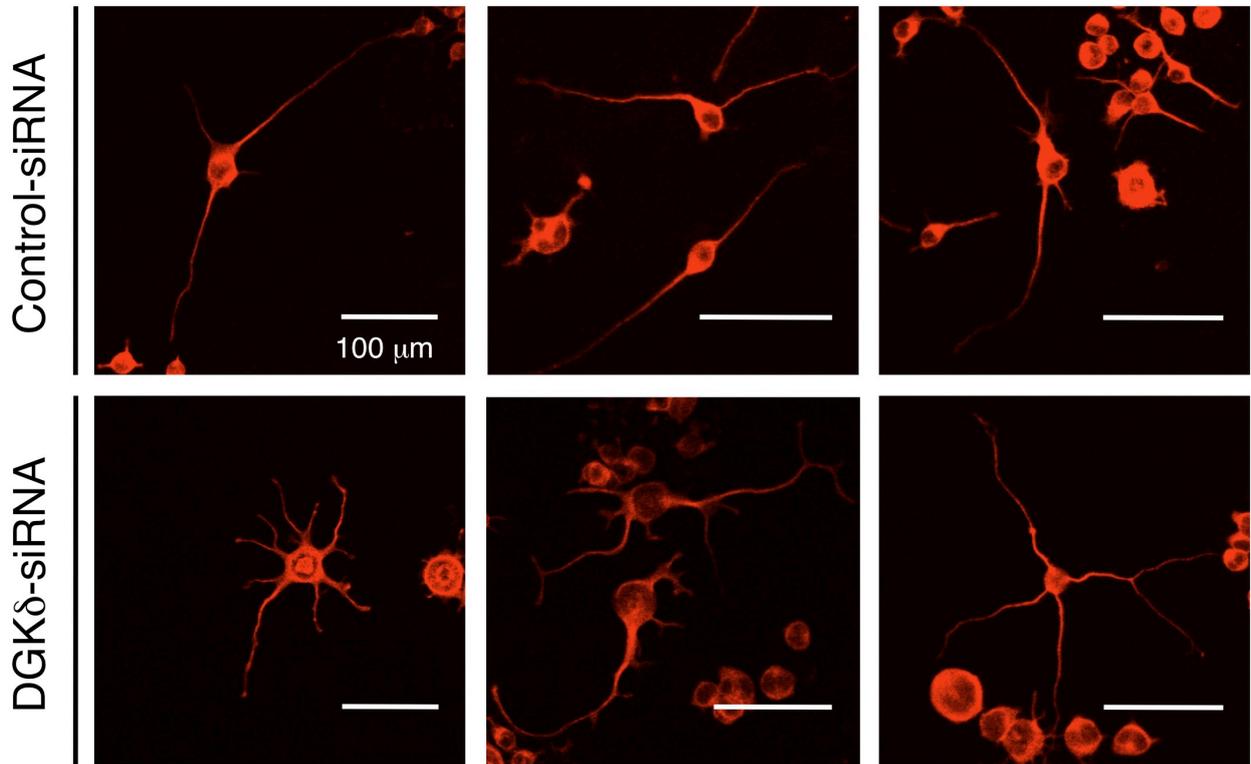


図4-2: Control-siRNAまたはDGK $\delta$ -siRNAを導入したNeuro-2a細胞の分化誘導時の神経突起伸長. (A) siRNA導入時のDGK $\delta$ の発現低下をウェスタンブロットにより確認した. DGK $\delta$ の発現はcontrolに比べ約50%程度にまで減少した. (B) ControlまたはDGK $\delta$ -siRNAを導入したNeuro-2a細胞. (C) 0本, 1本, 2本, 3本以上の神経突起を持つ神経細胞の割合(%). 長い神経突起を3本以上持つ神経細胞の割合が, コントロールと比較すると2倍以上増加した. 独立した実験を三回行い, 平均 $\pm$ 標準誤差を示した. 有意性はpaired t-testにより解析した. (\*p<0.05)

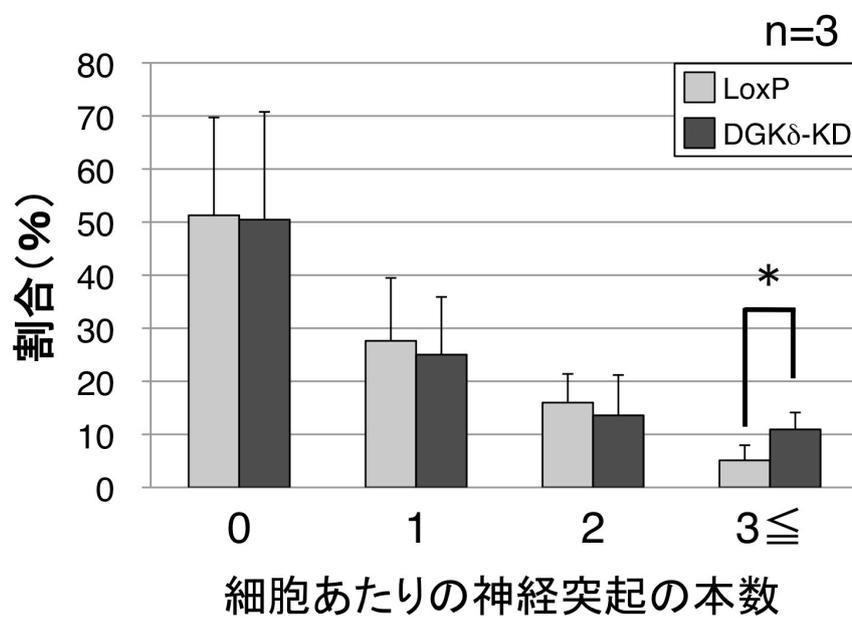
A



# B



# C



## 4-4 考察

我々のグループは、ヒト胎児腎臓細胞 HEK293 細胞、ヒト子宮頸部癌細胞 HeLa 細胞、マウス筋芽細胞 C2C12 細胞では、DGK $\delta$ 1 は平常状態では細胞質に発現し、高濃度グルコース刺激により細胞膜へ移行することを明らかとしている [18]。また、DGK $\delta$ 2 は細胞内では顆粒状に発現するという予備的知見を得ている。しかしながら、現在までに DGK $\delta$ の欠損が引き起こす神経細胞の形態変化については報告されていなかった。また、神経細胞における DGK $\delta$ の生理機能や動態についても明らかとなっていない。今回の実験では、脳特異的 DGK $\delta$ 欠損マウスから得た大脳皮質神経初代培養細胞を用いることで、DGK $\delta$ 欠損細胞では長い神経突起を 3 本以上持つ細胞の数がコントロールに比べ増加することを明らかにした (図 4-1)。また、siRNA を用いて DGK $\delta$ をノックダウンしたマウス神経芽腫培養細胞株 Neuro-2a においても同様の結果が得られた (図 4-2)。このことから、初代培養細胞と培養細胞株のどちらの神経細胞においても、DGK $\delta$ の発現低下は、神経突起の伸長を促進することが示された。我々は以前、DGK $\delta$ は上皮系の細胞において PKC を介して EGFR シグナルを正に制御しており、conventional DGK $\delta$ 欠損マウスから得たケラチノサイト初代培養細胞では transforming growth factor- $\alpha$ 刺激時の EGFR シグナルが減弱化されることを明らかとしている [23]。DGK $\delta$ の欠損は DG によって活性化される PKC の不活性化を促進し、上皮増殖シグナル伝達を抑制することがわかっている [23]。通常、細胞の増殖と分化は同時には起こらず、両立しない。細胞の増殖と分化のバランスは様々な要因によって協調的に制御されており、特に、神経細胞においてはその協調機構は厳密に制御されている。これらのことから、DGK $\delta$ 発現低下細胞では、増殖因子受容体シグナルが減弱化され細胞増殖が負に制御されることで、細胞の増殖と分化のバランスに異常が生じ、神経細胞の分化が促進される可能性が推察された。また、第 2 章では脳特異的 DGK $\delta$ 欠損マウスが強迫性障害様の行動異常や新規物体に対して過度に興味を示すことを示した (図 2-19A, B, -20)。脳特異的 DGK $\delta$ -KO マウスでは、脳神経細胞の分化が促進されて神経突起の本数が増加することにより、神経のネットワーク形成が過剰になり、このような行動異常を示すことが推察された。また、脳の神経細胞は、胎仔期に過剰な樹状突起を形成し、生後不要な樹状突起を除去し残った樹状突起の枝分かれを増加させることで神経回路を形成する。DGK $\delta$ 発現低下細胞はコントロールに比べ神経突起の本数が多かったことから、DGK $\delta$ が樹状突起を除去する因子を制御している可能性も考えられる。

## 第 5 章

# DGK $\delta$ 欠損によって引き起こされる 分子レベルでの変化

## 5-1 緒言

第2, 3章より, DGK $\delta$ は大脳皮質や海馬, 小脳などの発現の強い部位において神経突起の本数を負に制御すること, DGK $\delta$ の発現低下は脳神経の過剰なネットワーク形成を誘導し, 強迫性障害様の行動を引き起こすことが示唆された. 次に, DGK $\delta$ が制御する神経突起伸長のメカニズムと, DGK $\delta$ の脳における生理機能の分子レベルでの解明を目的とした実験を行った. まず, 脳特異的 DGK $\delta$ 欠損マウスの脳および DGK $\delta$ ノックダウン Neuro-2a 細胞における種々の脂質量を質量分析法と薄層クロマトグラフィーを用いて解析した.

次に, 各種シグナル分子の発現量の変化をウェスタンブロットを用いて検出した. Akt-glycogen synthase kinase (GSK) 3 $\beta$ シグナルは, 神経伸長や生存を制御しており, このシグナル経路の異常は精神疾患を引き起こすことが明らかになっている. さらに DGK $\beta$ ,  $\eta$ 欠損マウスでは, リン酸化 Akt とリン酸化 GSK3 $\beta$ の発現が低下することで Akt-GSK3 $\beta$ シグナリングが減弱化していることが報告されている [20, Isozaki, T., et al. 論文投稿中]. そこで, DGK $\delta$ の発現低下が引き起こす神経突起形成と Akt-GSK3 $\beta$ シグナルとの関連を検討するために, DGK $\delta$ 発現低下時の Akt, GSK3 $\beta$ の発現量とそのリン酸化の程度をウェスタンブロットで検出した. さらに, 我々のグループは以前, DGK $\delta$ は PKC 活性を制御していることを明らかとしているため, DGK $\delta$ 発現低下時の PKC 発現量とそのリン酸化量を調べた.

DGK のアイソザイムは炎症やアポトーシスに関与する可能性が報告されている. そこで, DGK $\delta$ 欠損時の抗アポトーシス蛋白質 Bcl-X<sub>L</sub> (B-cell lymphoma-extra large), 炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$ 変換酵素 TACE (TNF- $\alpha$  converting enzyme) の発現量の変化を調べた. また, DGK $\delta$ 遺伝子は genome-wide association study でアルツハイマー病と関与する可能性が報告されていることから, アルツハイマー病のマーカー蛋白質の発現量を調べた. さらに, 様々な神経関連マーカーの抗体を用いて, DGK $\delta$ 発現低下時の神経の異常を分子レベルで探索した.

## 5-2 試薬と実験手法

### 5-2-1 質量分析

マウス脳：マウス脳を摘出し、DI 水でホモジェナイズした。蛋白濃度測定後、蛋白量 500  $\mu\text{g}$  の組織ホモジェネートから Bligh-Dyer 法により脂質を抽出し、我々が開発した PA に特化した質量分析法 [66] により PA 分子種を調べた。18 週齢の脳特異的 DGK $\delta$ -KO 雄マウスを用い、コントロールとして同腹子の loxP マウスを解析した。

Neuro-2a 細胞：PBS で回収した細胞の総脂質を Bligh-Dyer 法により抽出し、300 ng の内部標準試料 (28:0-PA) を加えた。窒素乾固した後 75  $\mu\text{L}$  のクロロホルム/メタノール (2:1) に溶解し、各サンプル 10  $\mu\text{L}$  中に含まれる PA 分子種を液体クロマトグラフィー質量分析で解析した。各 PA 分子種は、内部標準試料 (28:0-PA) のピーク面積に対する相対値を、モリブデンブルー法から求めた各サンプル中のリン量で補正した値で示した。Neuro-2a 細胞の質量分析解析は当教室の水野悟氏に依頼した。

なお、PA 分子種は“2 本の脂肪酸炭素総数：不飽和結合総数”の表記で表した。例えば 34:1 は、2 本の脂肪酸炭素総和数が 34 かつ 1 つの不飽和結合を持つ事を意味する。

### 5-2-2 薄層クロマトグラフィー

脂質は 5-1-1 と同様にマウス脳 (蛋白質 500  $\mu\text{g}$ ) から Bligh-Dyer 法を用いて抽出した。抽出した脂質は適当量のクロロホルム/メタノール (2:1) に溶解し、Silica Gel 60 high performance thin layer chromatography plates (TLC, 10  $\times$  20 cm, Merck) の下から約 2 cm のところに 0.5 cm 幅でスポットした。TLC を用いた PA の分離のために、酢酸エチル/2,2,4-トリメチルペンタン/酢酸/DI 水 (90:50:20:10, v/v) を混合し、30 分間静置した後、水層のみ除去したものを展開溶媒として用いた。DG, トリアシルグリセロール, コレステロールの分離では、ヘキサン/ジエチルエーテル/酢酸 (75:25:1, v/v) を展開溶媒として用いた。展開後、プレートを風乾させ、10% (w/v) 硫酸銅溶液/8%リン酸を噴霧し、180 $^{\circ}\text{C}$ で脂質が検出されるまで加熱した。16 週齢の若年期または 65 週齢の高齢期の雌のコントロール loxP マウスと脳特異的 DGK $\delta$ 欠損マウスの脳を用いた。

### 5-2-3 ウェスタンブロット

ウェスタンブロットの方法は 4-2-4 に示した。抗リン酸化 Akt, GSK3 $\beta$ 抗体を用いたウェスタンブロットでは、メンブレンのブロッキングに 5%スキムミルク/0.1% Tween20 含有 tris-buffered saline (TBS: 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl (pH7.4)) (TBS-T),

一次抗体の希釈に 5% BSA/TBS-T, 二次抗体の希釈に 5% スキムミルク/TBS-T を用いた。一次抗体は 4°C で 16 時間インキュベートした。メンブレンの洗浄には TBS-T を用い、ブロッキング後は 5 分, 一次抗体及び二次抗体のインキュベート後は 3 分 × 5 回洗浄した。

抗 Akt 抗体 (sc8312, Santa Cruz Biotechnology), 抗リン酸化 Akt 抗体 (Ser473) (9271, Cell Signaling Technology), 抗 Glycogen synthase kinase (GSK) 3 $\beta$  抗体 (sc9166, Santa Cruz Biotechnology), 抗リン酸化 GSK3 $\beta$  抗体 (Ser9) (93365, Cell Signaling Technology), 抗 PKC $\alpha$  (610108, BD biosciences),  $\beta$ I (sc8049, Santa Cruz Biotechnology),  $\beta$ II (sc210, Santa Cruz Biotechnology),  $\delta$  (610398, BD biosciences),  $\epsilon$  (610086, BD biosciences),  $\gamma$  (sc211, Santa Cruz Biotechnology),  $\iota$  (P20520, Transduction Laboratories),  $\mu$  (sc935, Santa Cruz Biotechnology),  $\theta$  (P15120, Transduction Laboratories),  $\zeta$  (sc216, Santa Cruz Biotechnology) 抗体, 抗 pPKC $\alpha$ / $\beta$ II (9375S, Cell Signaling Technology),  $\zeta$ / $\lambda$  (9378S, Cell Signaling Technology),  $\beta$ II/ $\delta$  (sc11760, Santa Cruz Biotechnology) 抗体, 抗 B-cell lymphoma-extra large (Bcl-X<sub>L</sub>) 抗体 (sc8392, Santa Cruz Biotechnology), 抗 Tumor Necrosis Factor (TNF)  $\alpha$  converting enzyme (TACE) 抗体 (sc13973, Santa Cruz Biotechnology), 抗 amyloid precursor protein (APP) 抗体 (MAB348, Millipore), 抗 soluble NSF attachment proteins (SNAP) 25 抗体 (sc7538, Santa Cruz Biotechnology), 抗 myelin basic protein (MBP) 抗体 (sc13914, Santa Cruz Biotechnology), 抗 NeuN 抗体 (bs-1613R, Bioss), 抗 Tau 抗体 (610672, BD biosciences), ペルオキシダーゼ結合抗 mouse IgG 抗体 (A90-116P, Bethyl Laboratories, Inc.) を用いた。

## 5-3 結果

### 5-3-1 DGK $\delta$ 欠損脳における脂質量の解析

DGK $\delta$ 欠損による各種脂質量の変化を調べるために、16 週齢及び 65 週齢マウスの全脳から抽出した脂質を、薄層クロマトグラフィーによって分離した。図 5-1A に示すように、若年期と高齢期のどちらの週齢の脳においても、DGK $\delta$ 欠損による PA 量の大きな変化はみられなかった。また、図 5-1B に示すように、DG、トリアシルグリセロール、コレステロールの量も、DGK $\delta$ 欠損による顕著な変化は検出されなかった。

### 5-3-2 DGK $\delta$ 欠損脳における PA 分子種の解析

マウスの脳における DGK $\delta$ の DG 分子種選択性の解析のために、脳特異的 DGK $\delta$ -KO マウス脳における PA 分子種量 (DGK による DG のリン酸化物) を質量分析法により解析した。しかしながら、コントロール loxP マウスと DGK $\delta$ -KO マウスの全脳の PA 分子種を比較したところ、いずれの PA 分子種においても顕著な減少または増加は見られなかった (図 5-2)。

### 5-3-3 DGK $\delta$ 欠損脳における各種シグナル分子の変化

4 章から、DGK $\delta$ -KO マウスから得た神経初代培養細胞は神経突起形成に異常を示すことがわかった。DGK のアイソザイム $\beta$ 欠損マウスは、リチウム感受性の行動異常を引き起こすことが分かっており、DGK $\beta$ -KO マウスの脳では、リン酸化 Akt (Ser473) とリン酸化 GSK3 $\beta$  (Ser9) の発現が低下することで Akt-GSK3 $\beta$ シグナリングが減弱化していること、さらに、大脳皮質のスパインの密度が減少することが報告されている [20]。Akt-GSK3 $\beta$ シグナルは、神経伸長や生存を制御しており、このシグナル経路の異常は精神疾患を引き起こす。またホスファチジルイノシトール 3-キナーゼは Akt-GSK3 $\beta$ シグナルを直接的に制御している。以上のことから、DGK $\delta$ の発現低下が引き起こす神経突起形成が Akt-GSK3 $\beta$ のシグナルに関与する可能性を検討するために、脳特異的 DGK $\delta$ 欠損マウス脳の lysate の Akt, リン酸化 Akt (Ser473), GSK3 $\beta$ , リン酸化 GSK3 $\beta$  (Ser9) の発現量をウェスタンブロッティングによって調べた。DGK $\delta$ 欠損マウス脳サンプルのコントロールは、WT (cre -/- loxP -/-), loxP (cre -/- loxP +/+), cre (cre +/- loxP -/-) マウスの脳サンプルとした。図 5-3 に示すように、脳の全ての部位において DGK $\delta$ 欠損によって total Akt の発現量は変化していなかった。また、リン酸化 Akt (Ser473) の量も DGK $\delta$ の欠損によってほとんど変化しておらず、顕著な差はみられなかった (図 5-3)。次に、マウス脳の GSK3 $\beta$ の発現を検出した。Total Akt と同様に、total GSK3 $\beta$ の

図5-1:コントロールloxP及びDGK $\delta$ -KOマウス脳から抽出した脂質の薄層クロマトグラフィーによる(A)PA, (B)TAG, Cho, DGの分離. 若年期と高齢期のどちらの週齢の脳においても, DGK $\delta$ 欠損によるPA, DG, トリアシルグリセロール, コレステロール量の顕著な変化は検出されなかった. PA, ホスファチジン酸; TAG, トリアシルグリセロール; Cho, コレステロール; DG, ジアシルグリセロール.

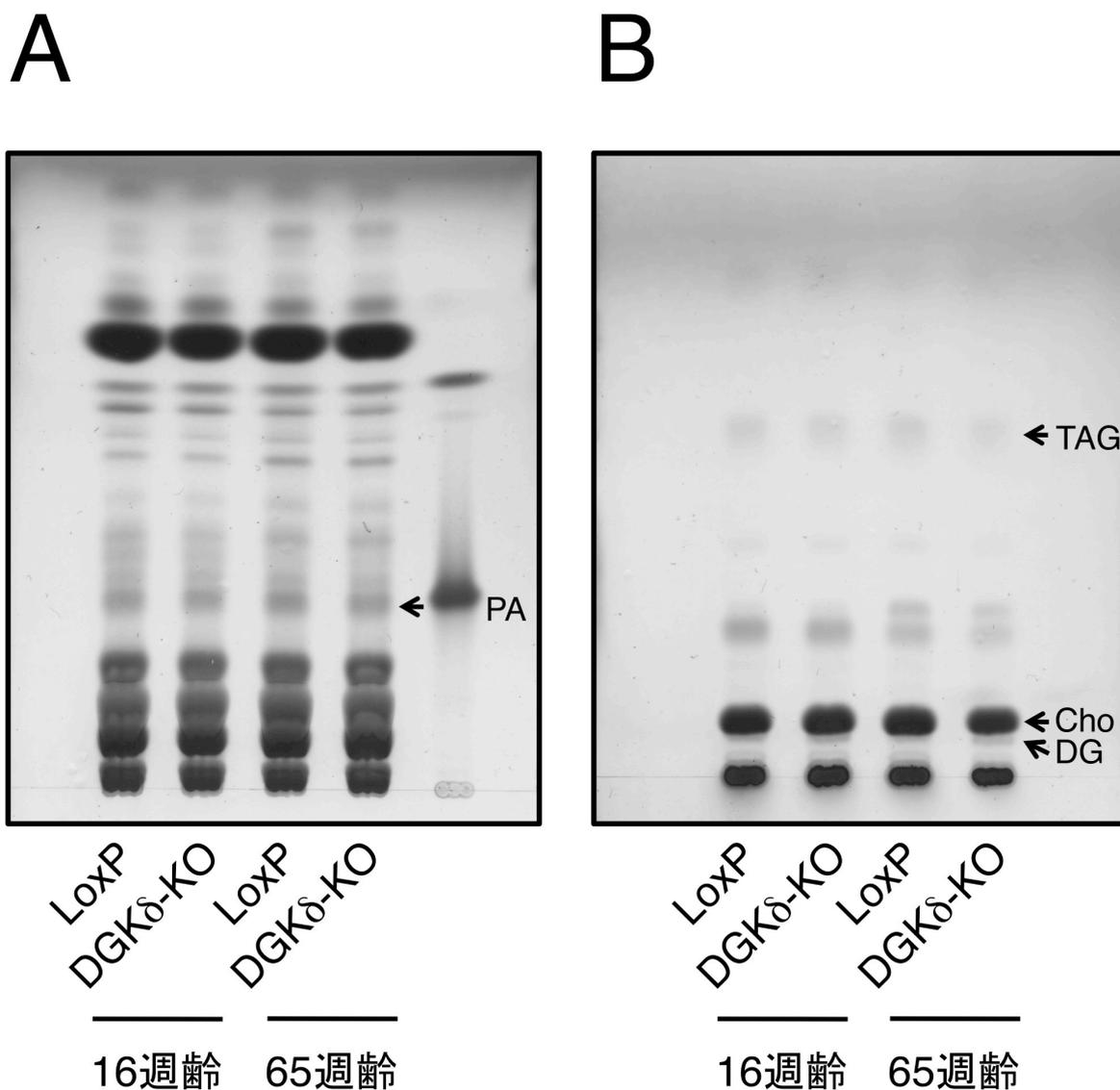
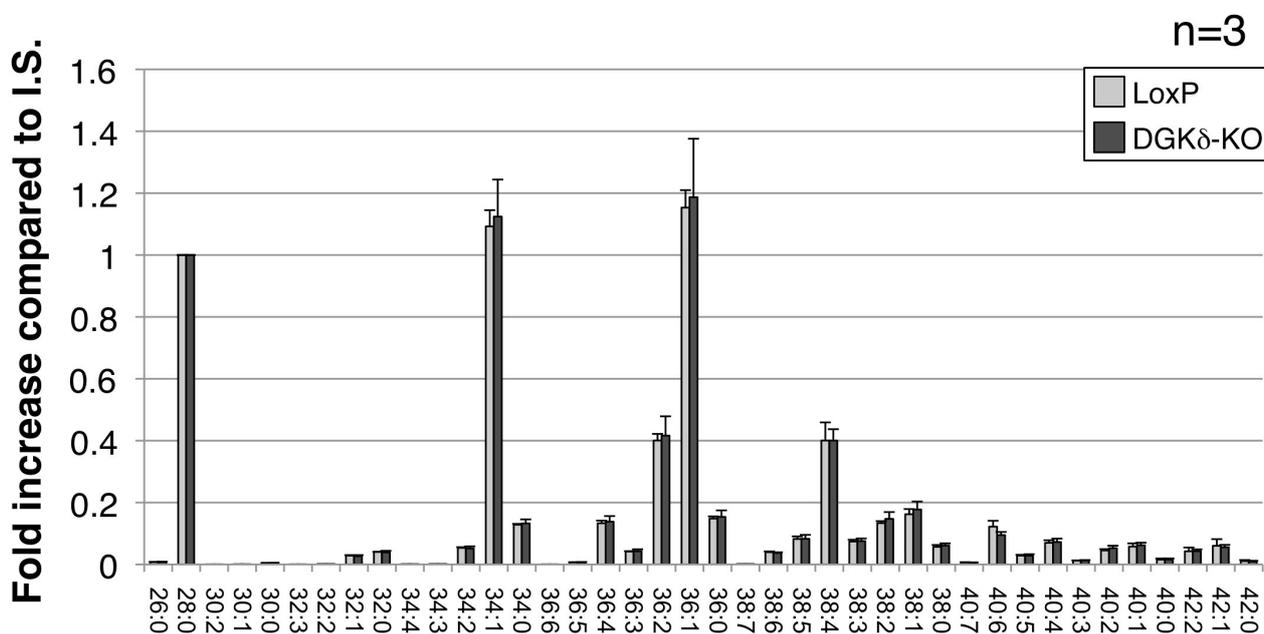


図5-2: (A)コントロールloxPマウス及びDGK $\delta$ -KOマウスの全脳におけるPA分子種. PA分子種量は内部標準I. S. (28:0) に対する量比で表した. (B)コントロールloxPマウス及びDGK $\delta$ -KOマウスの全脳におけるPA分子種をPA分子種の組成比で表した. いずれのPA分子種においてもDGK $\delta$ 欠損による顕著な減少または増加は検出されなかった.

A



B

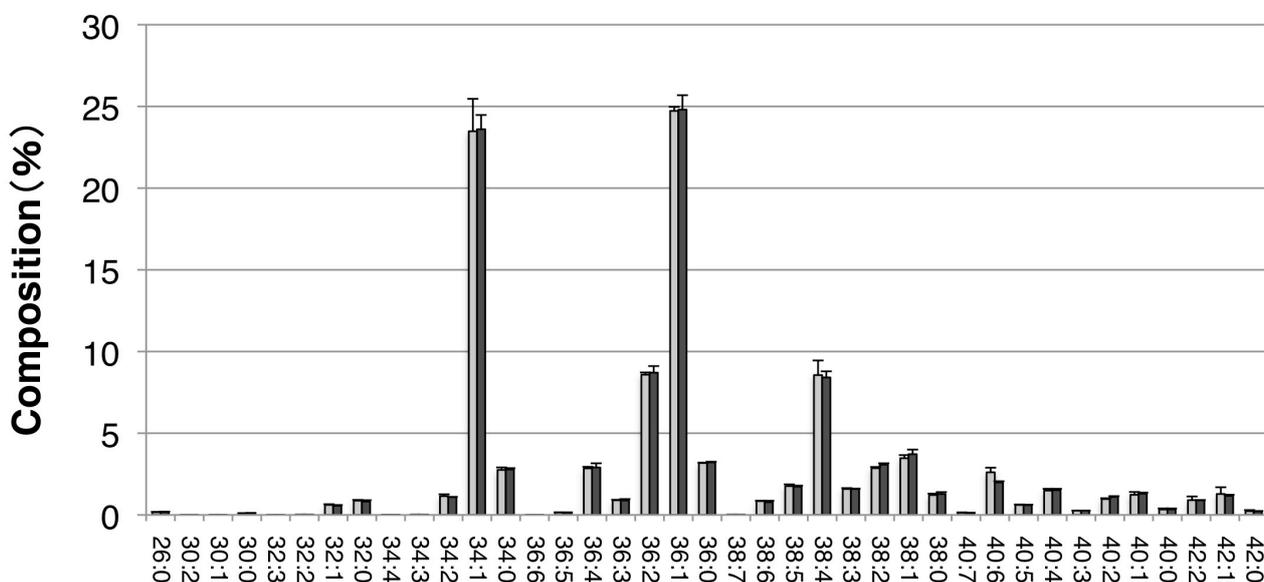
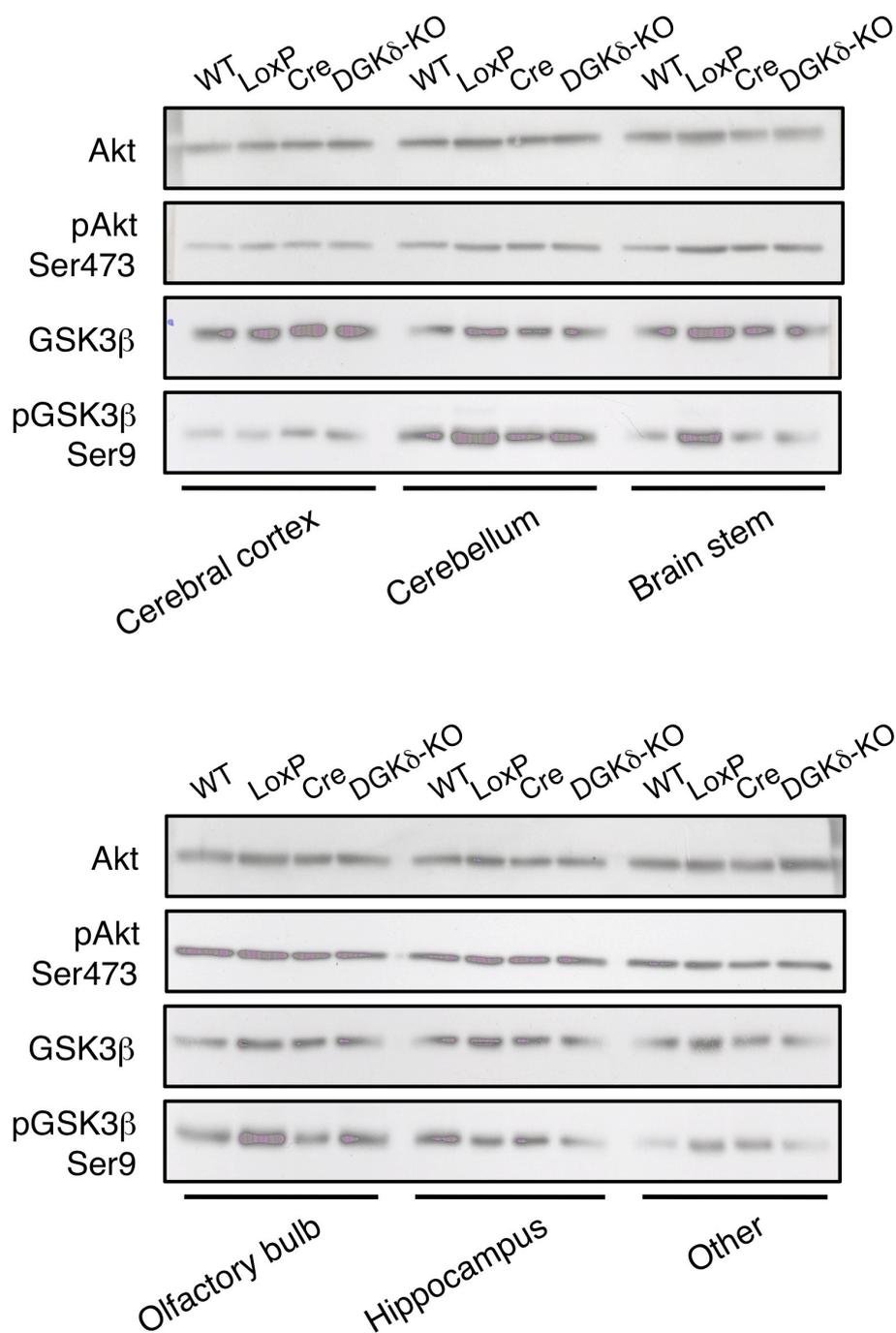


図5-3: コントロールマウス(WT, loxP, cre)とDGK $\delta$ -KOマウスの大脳皮質, 小脳, 脳幹, 嗅球, 海馬のAktとGSK3 $\beta$ の発現量とそのリン酸化の程度をウェスタンブロットで検出した. DGK $\delta$ 欠損によるtotal Akt, total GSK3 $\beta$ , リン酸化Akt(Ser473), リン酸化GSK3 $\beta$ (Ser9)量の顕著な差は検出されなかった.



発現量は DGK $\delta$ の欠損によって大きく変化しなかった。また、リン酸化 GSK3 $\beta$  (Ser9)の量は、コントロールである WT, loxP, cre マウスでのばらつきが大きく、DGK $\delta$ 欠損脳でのリン酸化 GSK3 $\beta$ 量と比較することが難しいことがわかった(図 5-3)。そのため、脳内では GSK3 $\beta$  (Ser9) のリン酸化への DGK $\delta$ の関与については解明することが出来なかった。

我々のグループは以前、DGK $\delta$ は PKC 活性を制御していることを明らかとしている [23]。そこで、脳特異的 DGK $\delta$ 欠損マウスの脳の PKC $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\iota$ ,  $\mu$ ,  $\theta$ ,  $\zeta$ の発現量をコントロール loxP マウスと比較した。図 5-4 に示すように、DGK $\delta$ 欠損マウス脳の PKC $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\theta$ ,  $\zeta$ の発現量は、コントロールと比較したところ有意な差は観察されなかった。PKC $\mu$ は、DGK $\delta$ 欠損時に loxP マウスと比べ、大脳皮質、小脳、海馬で増加していたが、同様の傾向がコントロールである WT と cre を比較した際の、cre マウスの脳でも認められた (data not shown)。このことから、DGK $\delta$ 欠損時の PKC $\mu$ の増加は、cre 遺伝子の影響を受けている可能性があり、DGK $\delta$ との関与は検討出来なかった。PKC  $\iota$ はマウス脳では検出されなかった。次に、リン酸化 PKC $\alpha/\beta$ ,  $\zeta/\lambda$ ,  $\beta$ II/ $\delta$ の量(活性化の程度を示す)を調べた。リン酸化 PKC は、DGK $\delta$ 欠損時に大脳皮質と小脳において量が増加しているようにみられたが(図 5-4)、コントロール cre マウスにおける発現量も WT と比較すると同様に増加していたため、DGK $\delta$ 欠損による影響は顕著ではないと考えられた。

DGK はアイソザイムごとに異なる生理機能を持つことが近年明らかとなっており、それぞれ炎症やアポトーシスに関与する可能性が報告されている。そこで、DGK $\delta$ 欠損脳における、抗アポトーシス蛋白質 Bcl-X<sub>L</sub> 及び炎症性サイトカイン TNF $\alpha$ 変換酵素 TACE の発現量の変化を調べた。また、DGK $\delta$ 遺伝子は genome-wide association study でアルツハイマー病と関与する可能性が報告されており、更に神経突起の伸長異常はアルツハイマー病で多くみられることから、アルツハイマー病のマーカー蛋白質である APP の発現量も調べた。その結果、Bcl-X<sub>L</sub> と APP の発現量は DGK $\delta$ の欠損によって大きく変化しないことがわかった(図 5-5A, B)。TACE の発現量は嗅球と海馬で増加していたが、 $\beta$ -actin の発現量と比較したところ、この増加は $\beta$ -actin 量とほぼ平行であったため、TACE の発現量も DGK $\delta$ の欠損によって変化しないと考えられる(図 5-5A)。

次に、種々の神経関連マーカーの抗体を用いて、DGK $\delta$ 欠損時の神経の異常を探索した。ミエリンマーカーである MBP, シナプスで神経伝達物質放出に中心的な役割を持つ SNAP25, 成熟神経核マーカーである NeuN, 微小管結合蛋白質である Tau の DGK $\delta$ -KO のマウス脳における発現量をウェスタンブロットで調べた。Tau は中枢神経細胞に多量に存在し、軸索の輸送機能を調節しており、この Tau 蛋白質の異常により、

図5-4: コントロールloxPマウスとDGK $\delta$ -KOマウスの大脳皮質, 小脳, 脳幹, 嗅球, 海馬の各PKC及びそのリン酸化の程度をウェスタンブロットで検出した. DGK $\delta$ 欠損によるPKCアイソザイム, リン酸化PKCアイソザイム量の顕著な変化は検出されなかった.

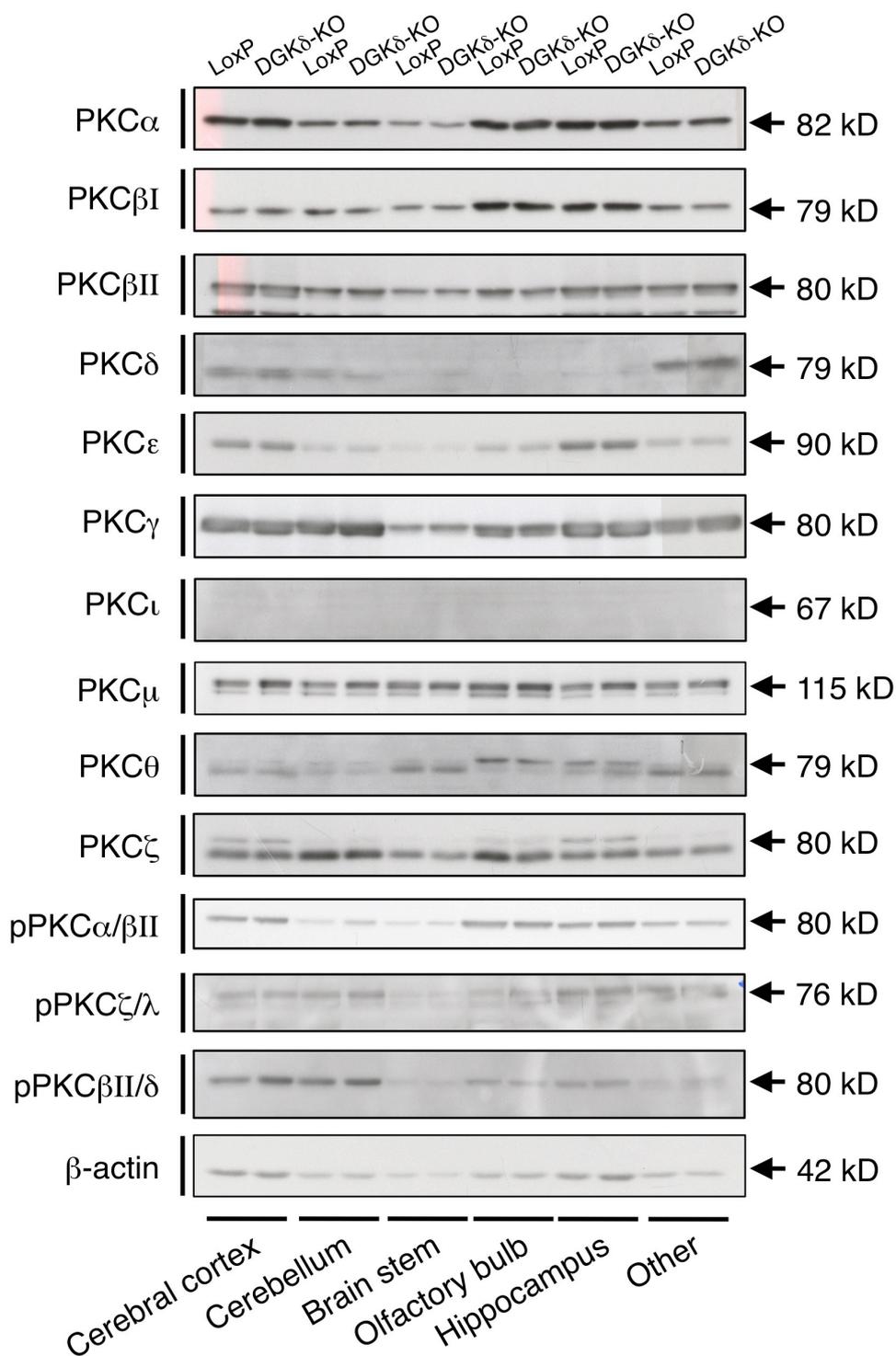
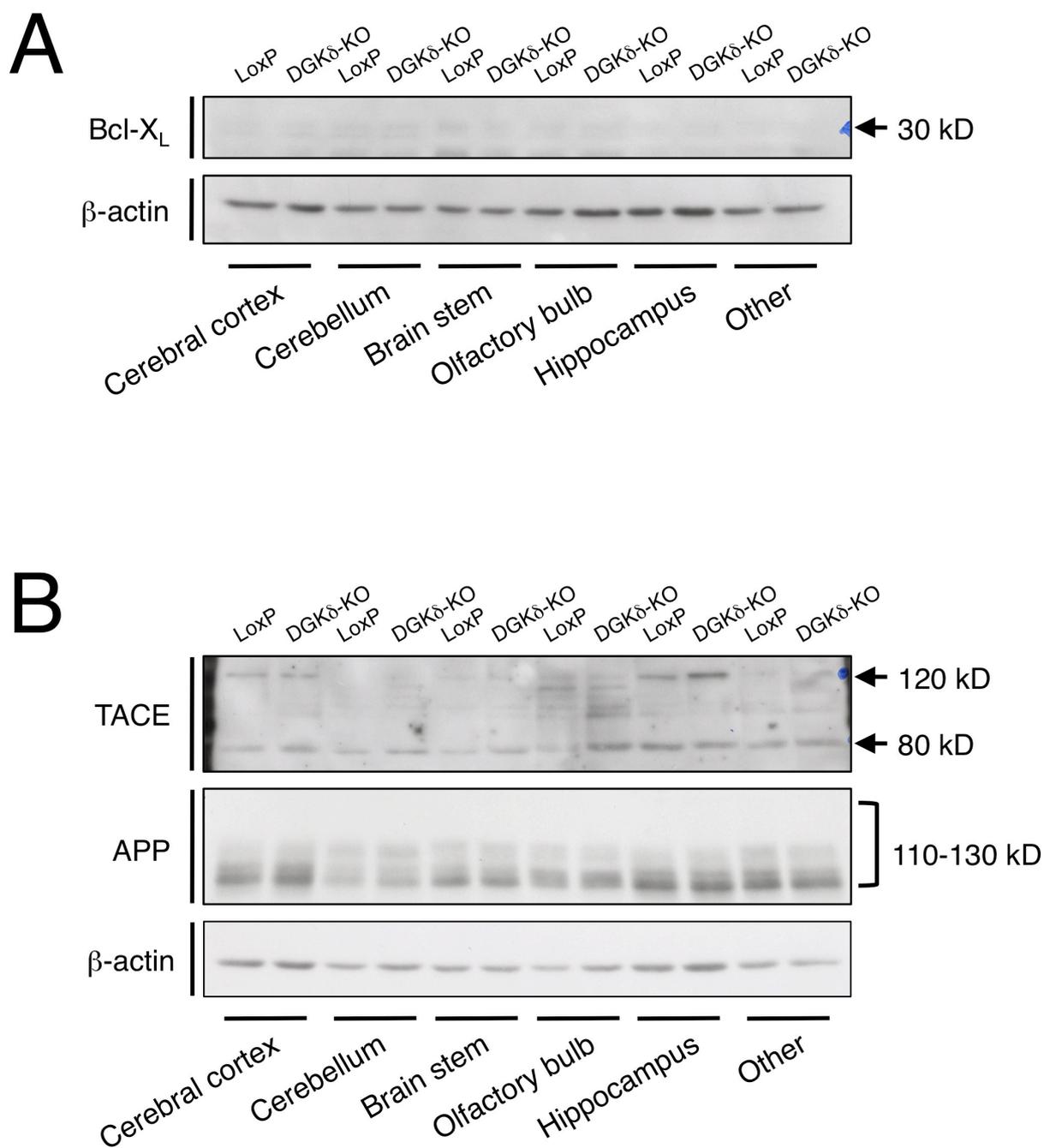


図5-5: コントロールloxPマウスとDGK $\delta$ -KOマウスの大脳皮質, 小脳, 脳幹, 嗅球, 海馬の (A) Bcl-X<sub>L</sub>, (B) TACE, APP,  $\beta$ -actinの発現量をウェスタンブロットで検出した. DGK $\delta$ 欠損によるBcl-X<sub>L</sub>, TACE, APP 量の顕著な変化は検出されなかった.



認知症などを引き起こすことが報告されている。しかしながら、MBP, SNAP25, NeuN, Tau の発現量は DGK $\delta$ 欠損ではほとんど変化しないことがわかった (図 5-6)。

#### 5-3-4 DGK $\delta$ ノックダウン Neuro-2a 細胞における PA 分子種量の変化

5-3-2 に示したように、マウス脳を用いて PA 分子種量の変化を検出することは困難であった。そのため、次に、siRNA を用いて DGK $\delta$ の発現を低下させた Neuro-2a 細胞の PA 分子種の解析を行った。その結果、図 5-7 に示すように、DGK $\delta$ 発現低下細胞では、コントロールに比べ 30:0-と 32:0-PA 分子種の量が有意に増加することがわかった。

#### 5-3-5 DGK $\delta$ ノックダウン Neuro-2a 細胞における各種シグナル分子の変化

マウス脳では、DGK $\delta$ 欠損による Akt-GSK3 $\beta$ シグナル経路への影響を検出することが出来なかった。そこで、siRNA 導入によって DGK $\delta$ の発現を低下させた Neuro-2a 細胞の Akt, リン酸化 Akt (Ser473), GSK3 $\beta$ , リン酸化 GSK3 $\beta$  (Ser9) の発現量をウェスタンブロッティングによって調べた。Neuro-2a 細胞に siRNA を導入したところ、顕著に DGK $\delta$ の発現が低下したことが確認された (図 5-8)。DGK $\delta$ ノックダウン Neuro-2a 細胞においても、total Akt の発現量及びそのリン酸化量はほとんど変化しておらず、DGK $\delta$ 欠損マウス脳と同様の結果が得られた (図 5-8)。また、total GSK3 $\beta$ とリン酸化 GSK3 $\beta$  (Ser9) の発現量も DGK $\delta$ の発現低下によって変化しなかった (図 5-8)。以上のことから、DGK $\delta$ が Akt-GSK3 $\beta$ シグナル経路へ関与する可能性は低いと考えられる。

図5-6: コントロールloxPマウスとDGK $\delta$ -KOマウスの大脳皮質, 小脳, 脳幹, 嗅球, 海馬のSNAP25, MBP, NeuN, Tauの発現量をウェスタンブロットで検出した. DGK $\delta$ 欠損によるこれらの蛋白質の顕著な量変化は検出されなかった.

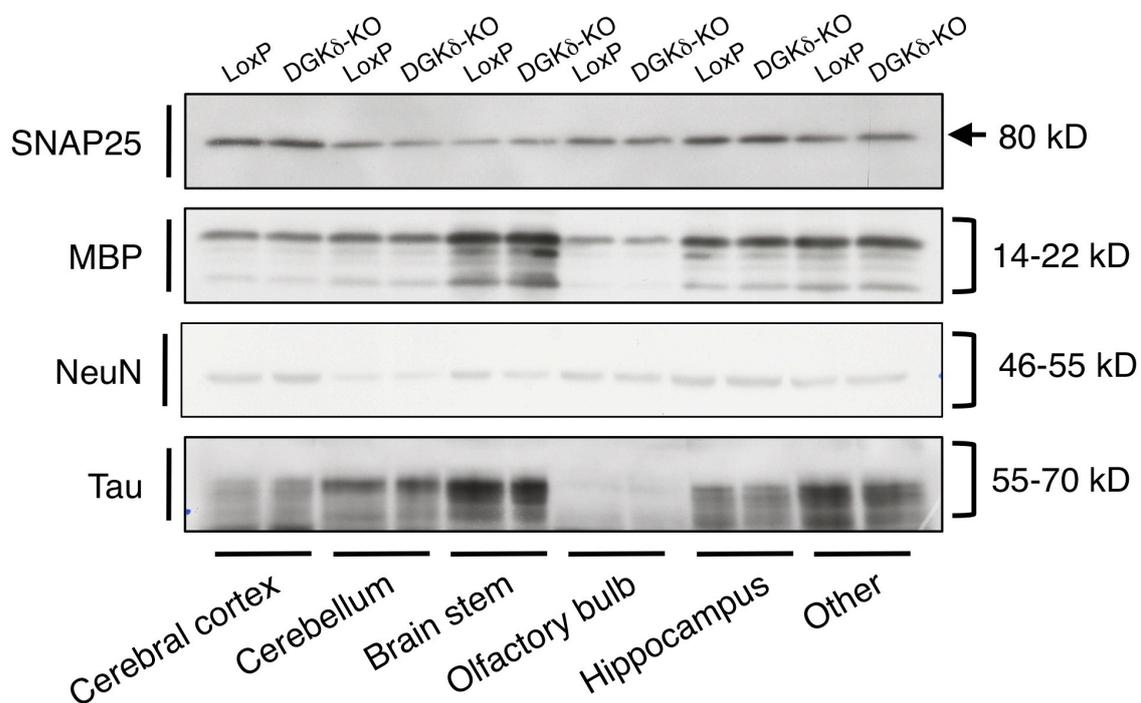


図5-7: Control-siRNAまたはDGK $\delta$ -siRNAを導入したNeuro-2a細胞のPA分子種. PA分子種量は内部標準I. S. (28:0) に対する量比で表した. DGK $\delta$ 発現低下細胞では, コントロールに比べ30:0-と32:0-PA分子種の量が有意に増加した. 平均 $\pm$ 標準誤差を示した. 有意性はt-testにより解析した. (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.005)

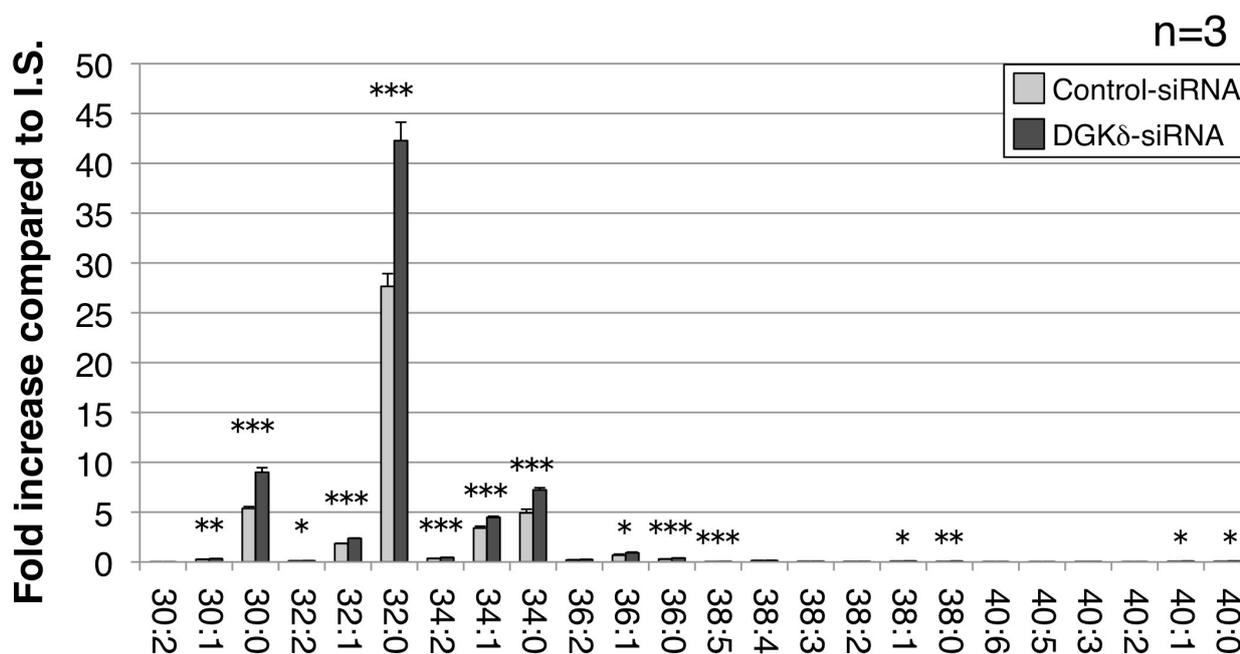
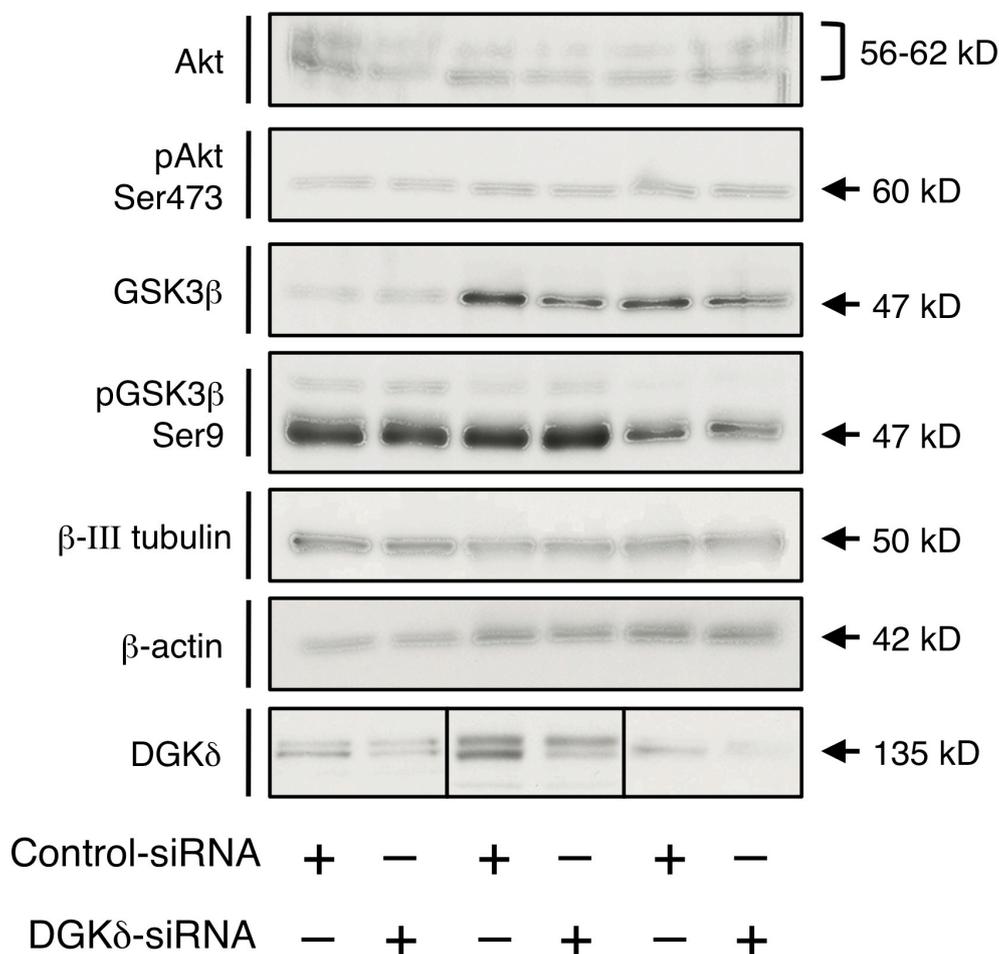


図5-8: Control-siRNAまたはDGK $\delta$ -siRNAを導入したNeuro-2a細胞のAktとGSK3 $\beta$ の発現量とそのリン酸化の程度をウェスタンブロットで検出した. 3回の独立した実験結果を示した. DGK $\delta$ 欠損によるAkt, GSK3 $\beta$ 発現量及びそのリン酸化量の変化は認められなかった. また,  $\beta$ -III tubulinと $\beta$ -actin量も変化しなかった.



## 5-4 考察

DGK $\delta$ はマウス筋芽細胞 C2C12 細胞において、グルコース刺激時にホスファチジルコリン特異的ホスホリパーゼ C 由来のパルミチン酸含有 DG 分子種を選択的代謝することが明らかとなっている [67]。しかしながら今回 DGK $\delta$ 欠損マウス全脳の PA 分子種を質量分析法で解析したところ、マウス脳における DGK $\delta$ 欠損による PA 分子種の量変化はみられなかった (図 5-2)。また、薄層クロマトグラフィーによる DGK $\delta$ 欠損マウス脳の脂質の分離でも、PA 量の変化はみられなかった (図 5-1A)。PA は DGK 以外の経路からも様々な経路から合成されている。また、脳では DGK $\delta$ が発現していない細胞が多くあると考えられる。そのため、マウス脳においては DGK $\delta$ が産生する PA 量が、他の経路によって産生される PA 及び DGK $\delta$ が発現していない細胞の PA 量に比べ相対的に微量であったために、PA 分子種の変化が検出されなかった可能性が推察された。また、DGK $\delta$ が欠損し特定の DG 分子種が蓄積する場合には、他の DGK のアイソザイムによってその DG 分子種が代謝されることも考えられる。

図 4-1, -2 より、DGK $\delta$ 発現低下により神経突起の本数が増加することがわかった。Akt-GSK3 $\beta$ シグナルは神経伸長を制御することがわかっており、また、DGK $\beta$ の欠損マウスでは Akt-GSK3 $\beta$ シグナルが減弱化していることが分かっている。そのため、DGK $\delta$ 欠損による神経突起形成の異常がこのシグナル経路に関与することを仮定し、DGK $\delta$ 欠損マウスの脳におけるリン酸化 Akt, リン酸化 GSK3 $\beta$ の量を解析した。しかしながら、リン酸化 Akt 量の変化は検出することが出来なかった (図 5-3)。

DGK $\delta$ は、上皮系の細胞において PKC シグナルを介して EGFR を正に制御しているが [23]、DGK $\delta$ 欠損マウスの脳では PKC, リン酸化 PKC の発現量の変化は検出されなかった (図 5-4)。このことから、DGK $\delta$ の神経細胞における機能は、上皮系の細胞とは異なった機構で制御されている可能性が推察された。また、DGK $\delta$ 欠損マウス脳において Bcl-X<sub>L</sub>, APP, TACE の発現量の変化は検出されなかったため (図 5-5A, B), DGK $\delta$ が炎症, アポトーシス, アルツハイマー病に関与する可能性は低いと考えられる。さらに、MBP, SNAP25, NeuN, Tau の発現量においても有意な差は検出されなかった (図 5-6)。DGK $\delta$ の欠損によるこれらのシグナル分子への影響は、マウス脳においては他の経路や細胞の影響と比べて相対的に微量であったために検出出来なかった可能性がある。

上述の様に、DGK $\delta$ が発現している神経細胞以外の細胞の影響によって、脳の神経細胞内の DGK $\delta$ 欠損による微量なシグナル分子の変化を観察することが困難となった可能性が考えられたため、siRNA を用いて DGK $\delta$ の発現を低下させた Neuro-2a 細胞での脂質量の変化と Akt-GSK3 $\beta$ 経路への影響を解析した。DGK $\delta$ 発現低下 Neuro-2a 細胞で

は、マウス脳と同様に DGK $\delta$ 欠損による Akt, GSK3 $\beta$ 発現量及びそのリン酸化量の変化は認められなかった (図 5-8). このことから, DGK $\delta$ は Akt-GSK3 $\beta$ シグナル伝達系以外の経路を介して神経突起の形成を制御していると考えられる. 図 5-7 に示すように, DGK $\delta$ 発現低下 Neuro-2a 細胞では, 30:0-, 32:0-PA 分子種が control-siRNA を導入した Neuro-2a 細胞に比べ有意に増加していた. PA の増加は神経突起伸長を著しく促進することがわかっている [68]. そのため, DGK $\delta$ の発現低下によって生じる神経突起の本数の増加 (図 4-1, -2) は, PA 量の増加によって引き起こされる可能性が考えられた. また, DGK $\zeta$ ノックダウン Neuro-2a 細胞では 30:0-, 32:0-PA 分子種量が減少しており, 神経突起の伸長が抑制されることが明らかとなっている (Mizuno, S., et al. unpublished work). DGK $\delta$ の発現低下が, DGK $\zeta$ の発現を促進/活性化することで (もしくは DGK $\zeta$ を介さずに), 30:0-, 32:0-PA 分子種の増加を引き起こし, 神経突起の本数を増加させる可能性が推察された. DGK は DG を代謝し PA を産生するにもかかわらず, 我々の実験では, DGK $\delta$ の発現低下によって Neuro-2a 細胞では PA 分子種が増加するという意外な結果が得られた (図 5-7). DGK の脂質代謝に関するこのような事実は未だ報告されたことが無く, DGK $\delta$ が神経細胞においてユニークな機能を担っていることを示唆している. 今後は DG を含む関連脂質量のより詳細な解析を行い, そのメカニズムの解明を行う.

## 【参考文献】

1. Nishizuka, Y. (1992) Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*, **258**, 607–614
2. Hurley, J.H., Newton, A.C., Parker, P.J., Blumberg, P.M., and Nishizuka, Y. (1997) Taxonomy and function of C1 protein kinase C homology domains. *Protein Sci.*, **6**, 477–480
3. Ron, D. and Kazanietz, M.G. (1999) New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *FASEB J.*, **13**, 1658–1676
4. van Blitterswijk, W.J. and Houssa, B. (2000) Properties and functions of diacylglycerol kinases. *Cell. Signal.*, **12**, 595–605
5. Jenkins, G.H., Fiset, P.L., and Anderson, R.A. (1994) Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase isoforms are specifically stimulated by phosphatidic acid. *J. Biol. Chem.*, **269**, 11547–11554
6. Moritz, A., DeGraan, P.N.E., Gispen, W.H., and Wirtz, K.W.A. (1992) Phosphatidic acid is a specific activator of phosphatidylinositol-4-phosphate kinase. *J. Biol. Chem.*, **267**, 7207–7210
7. Fang, Y., Vilella-Bach, M., Bachmann, R., Flanigan, A., and Chen, J. (2001) Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science*, **294**, 1942–1945
8. Sakane, F., Imai, S., Kai, M., Yasuda, S., and Kanoh, H. (2008) Diacylglycerol kinases as emerging potential drug targets for a variety of diseases. *Curr. Drug. Targets*, **9**, 626–640
9. Kanoh, H., Yamada, K., and Sakane, F. (2002) Diacylglycerol kinases: emerging downstream regulators in cell signaling systems. *J. Biochem.*, **131**, 629–633
10. Topham, M.K. (2006) Signaling roles of diacylglycerol kinases. *J. Cell. Biochem.*, **97**, 474–484
11. Sakane, F., Imai, S., Kai, M., Yasuda, S., and Kanoh, H. (2007) Diacylglycerol kinases: why so many of them? *Biochim. Biophys. Acta*, **1771**, 793–806
12. Shulga, Y.V., Topham, M.K., and Epan, R.M. (2011) Regulation and functions of diacylglycerol kinases. *Chem. Rev.*, **111**, 6186–6208
13. Sakai, H. and Sakane, F. (2012) Recent progress on type II diacylglycerol kinases: the physiological functions of diacylglycerol kinase d, h and k and their involvement in disease. *J. B.*, **152**, 397–406
14. Sakane, F., Imai, S., Yamada, K., Murakami, T., Tsushima, S., and Kanoh, H. (2002) Alternative splicing of the human diacylglycerol kinase d gene generates two isoforms differing in their expression patterns and in regulatory functions. *J. Biol. Chem.*, **277**, 43519–43526
15. Murakami, T., Sakane, F., Imai, S., Houkin, K., and Kanoh, H. (2003) Identification and characterization of two splice variants of human diacylglycerol kinase h. *J. Biol. Chem.*, **278**, 34364–34372
16. 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., and Zierath, J.R. (2008) Downregulation of diacylglycerol kinase delta contributes to hyperglycemia-induced insulin resistance. *Cell*, **132**, 375–386
17. Miele, C., Paturzo, F., Teperino, R., Sakane, F., Fiory, F., Oriente, F., Ungaro, P., Valentino, R., Beguinot, F., and Formisano, P. (2007) Glucose regulates diacylglycerol intracellular levels and protein kinase C activity by modulating diacylglycerol kinase subcellular

- localization. *J. Biol. Chem.*, **282**, 31835–31843
18. Takeuchi, M., Sakiyama, S., Usuki, T., Sakai, H., and Sakane F. (2012) Diacylglycerol kinase  $\delta$ 1 transiently translocates to the plasma membrane in response to high glucose. *B. B. A.*, **1823**, 2210–2216
  19. Olenchock, B.A., Guo, R., Carpenter. J.H., Jordan. M., Topham. M.K, Koretzky. G.A., and Zhong. X.P. (2006) Disruption of diacylglycerol metabolism impairs the induction of T cell anergy. *Nat. Immunol.*, **7**, 1174-1181
  20. Kakefuda, K., Oyagi, A.,Ishisaka, M., Tsuruma, K., Shimazawa, M, Yokota, K., Shirai, Y., Horie, K., Saito, N., Takeda, J., and Hara, H. (2010) Diacylglycerol Kinase  $\beta$  Knockout Mice Exhibit Lithium-Sensitive Behavioral Abnormalities, *PLoS One.*, **10**, 18;5
  21. Rodriguez de Turco, E.B., Tang, W., Topham, M.K., Sakane, F., Marcheselli, V.L., Chen C., Taketomi, A., Prescott, S.M., and Bazan, G.N. (2001) Diacylglycerol kinase regulates seizure susceptibility and long-term potentiation through arachidonoyl– inositol lipid signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **98**, 4740-4745
  22. Zhong, X.P., Hainey, E.A., Olenchock, B.A., Jordan, M.S., Maltzman, J.S., Nichols, K.E., Shen, H., and Koretzky, G.A. (2003) Enhanced T cell responses due to diacylglycerol kinase zeta deficiency. *Nat Immunol.*, **4**, 882-890
  23. Crotty, T., Cai, J., Sakane, F., Taketomi, A., Prescott, S. M. and Topham, M. K. (2006) Diacylglycerol kinase  $\delta$  regulates protein kinase C and epidermal growth factor receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **103**, 15485–15490
  24. 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., and Morton, C.C. (2007) Disruption of Diacylglycerol Kinase Delta (DGKD) Associated with Seizures in Humans and Mice. *Cell*, **80**, 792–799
  25. Usuki, T., Sakai, H., Shionoya, T., Sato, N., and Sakane, F. (2015) Expression and Localization of Type II Diacylglycerol Kinase Isozymes  $\delta$  and  $\eta$  in the Developing Mouse Brain. *J. Histochem. Cytochem.*, **63**(1), 57–68
  26. Shionoya, T., Usuki, T., Komenoi, S., Isozaki, T., Sakai, H. and Sakane, F. (2015) Distinct expression and localization of the type II diacylglycerol kinase isozymes  $\delta$ ,  $\eta$  and  $\kappa$  in the mouse reproductive organs. *BMC Dev. Biol.*, **15**, 6
  27. Imai, S., Yasuda, S., Kai, M., Kanoh, H. and Sakane, F. (2009) Diacylglycerol kinase delta associates with receptor for activated C kinase 1, RACK1. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1791**, 246–253
  28. Goto, K., Watanabe, M., Kondo, H., Yuasa, H., Sakane, F., and Kanoh, H. (1992) Gene cloning, sequence, expression and in situ localization of 80 kDa diacylglycerol kinase specific to oligodendrocyte of rat brain. *Brain Res. Mol. Brain. Res.*, **16**, 75–87
  29. Adachi, N., Oyasu, M., Taniguchi, T., Yamaguchi, Y., Takenaka, R., Shirai, Y., and Saito, N. (2005) Immunocytochemical localization of a neuron-specific diacylglycerol kinase beta and gamma in the developing rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **139**, 288–299
  30. Goto, K. and Kondo, H. (1993) Molecular cloning and expression of a 90-kDa diacylglycerol kinase that predominantly localizes in neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 7598–7602
  31. Goto, K., Funayama, M., and Kondo, H. (1994) Cloning and expression of a cytoskeleton-associated diacylglycerol kinase that is dominantly expressed in cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 13042-13046

32. Goto, K., and Kondo, H. (1996) A 104-kDa diacylglycerol kinase containing ankyrin-like repeats localizes in the cell nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 11196-11201
33. Goto, K. and Kondo, H. (1999) Diacylglycerol kinase in the central nervous system--molecular heterogeneity and gene expression. *Chem. Phys. Lipids*, **98**, 109-117
34. Sendrowski, K. and Sobaniec, W. (2013) Hippocampus, hippocampal sclerosis and epilepsy. *Pharmacol. Rep.*, **65**, 555-565
35. Koyama, R., Tao, K., Sasaki, T., Ichikawa, J., Miyamoto, D., Muramatsu, R., Matsuki, N., and Ikegaya, Y. (2012) GABAergic excitation after febrile seizures induces ectopic granule cells and adult epilepsy. *Nat. Med.*, **18**, 1271-1278
36. Hisatsune, C., Kuroda, Y., Akagi, T., Torashima, T., Hirai, H., Hashikawa, T., Inoue, T. and Mikoshiba, K. (2006) Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 in granule cells, not in Purkinje cells. *J. Neurosci.*, **26**, 10916-10924
37. Musto, A. and Bazan, N. G. (2006) Diacylglycerol kinase epsilon modulates rapid kindling epileptogenesis. *Epilepsia*, **47**, 267-276
38. Matsumoto, R., Ichise, M., Ito, H., Ando, T., Takahashi, H., Ikoma, Y., Kosaka, J., Arakawa, R., Fujimura, Y., Ota, M., Takano, A., Fukui, K., Nakayama, K. and Suhara, T. (2010) Reduced serotonin transporter binding in the insular cortex in patients with obsessive-compulsive disorder: A [<sup>11</sup>C]DASB PET study. *Neuroimage*, **49**, 121-126.
39. Bizon, J. L., Helm, K. A., Han, J. S., Chun, H. J., Pucilowska, J., Lund, P. K. and Gallagher, M. (2001) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and corticosterone receptor expression in behaviourally characterized young and aged Long-Evans rats. *Eur. J. Neurosci.*, **14**, 1739-1751
40. Soontornniyomkij, V., Risbrough, V. B., Young, J. W., Wallace, C. K., Soontornniyomkij, B., Jeste, D. V., and Achim, C. L. (2010) Short-term recognition memory impairment is associated with decreased expression of FK506 binding protein 51 in the aged mouse brain. *Age (Dordr)*, **32**, 309-322.
41. Klauck, T. M., Xu, X., Mousseau, B. and Jaken, S. (1996) Cloning and characterization of a glucocorticoid-induced diacylglycerol kinase. *J. Biol. Chem.*, **271**, 19781-19788
42. Holsboer, F. (2000) The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology*, **23**, 477-501
43. Korte, S. M. (2001) Corticosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **25**, 117-142
44. Tronche, F., Kellendonk, C., Kretz, O., Gass, P., Anlag, K., Orban, P. C., Bock, R., Klein, R. and Schutz, G. (1999) Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat. Genet.*, **23**, 99-103
45. Wei, Q., Lu, X. Y., Liu, L., Schafer, G., Shieh, K. R., Burke, S., Robinson, T. E., Watson, S. J., Seasholtz, A. F. and Akil, H. (2004) Glucocorticoid receptor overexpression in forebrain: a mouse model of increased emotional lability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **101**, 11851-11856
46. Baum, A. E., Akula, N., Cabanero, M., Cardona, I., Corona, W., Klemens, B., Schulze, T. G., Cichon, S., Rietschel, M., Nothen, M. M., Georgi, A., Schumacher, J., Schwarz, M., Abou, J. R., Hofels, S., Propping, P., Satagopan, J., Detera-Wadleigh, S. D., Hardy, J., and McMahon, F. J. (2008) A genome-wide association study implicates diacylglycerol kinase eta (DGKH) and several other genes in the etiology of bipolar disorder. *Mol. Psychiatry*, **13**, 197-207

47. Weber, H., Kittel-Schneider, S., Gessner, A., Domschke, K., Neuner, M., Jacob, C. P., Buttenschon, H. N., Boreatti-Hummer, A., Volkert, J., Herterich, S., Baune, B. T., Gross-Lesch, S., Kopf, J., Kreiker, S., Nguyen, T. T., Weissflog, L., Arolt, V., Mors, O., Deckert, J., Lesch, K. P. and Reif, A. (2011) Cross-disorder analysis of bipolar risk genes: further evidence of DGKH as a risk gene for bipolar disorder, but also unipolar depression and adult ADHD. *Neuropsychopharmacology*, **36**, 2076–2085
48. Moya, P. R., Murphy, D. L., McMahon, F. J. and Wendland, J. R. (2010) Increased gene expression of diacylglycerol kinase eta in bipolar disorder. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, **13**, 1127–1128
49. Hagihara, H., Takao, K., Walton, N. M., Matsumoto, M. and Miyakawa, T. (2013) Immature dentate gyrus: an endophenotype of neuropsychiatric disorders. *Neural Plast.*, **2013**, 318596
50. Walton, N. M., Zhou, Y., Kogan, J. H., Shin, R., Webster, M., Gross, A. K., Heusner, C. L., Chen, Q., Miyake, S., Tajinda, K., Tamura, K., Miyakawa, T. and Matsumoto, M. (2012) Detection of an immature dentate gyrus feature in human schizophrenia/bipolar patients. *Transl. Psychiatry*, **2**, e135
51. Maloku, E., Covelo, I. R., Hanbauer, I., Guidotti, A., Kadriu, B., Hu, Q., Davis, J. M. and Costa, E. (2010) Lower number of cerebellar Purkinje neurons in psychosis is associated with reduced reelin expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **107**, 4407–4411
52. Cheng, Y. H., Wong, E. W. and Cheng, C. Y. (2011) Cancer/testis (CT) antigens, carcinogenesis and spermatogenesis. *Spermatogenesis*, **1**, 209–220
53. Cooke, H. J. and Saunders, P. T. (2002) Mouse models of male infertility. *Nat. Rev. Genet.*, **3**, 790–801
54. Li, R. and Albertini, D. F. (2013) The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **4**, 141–152
55. Garnett, K., Wang, J. and Roy, S. K. (2002) Spatiotemporal expression of epidermal growth factor receptor messenger RNA and protein in the hamster ovary: follicle stage-specific differential modulation by follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, estradiol, and progesterone. *Biol. Reprod.*, **67**, 1593–1604
56. Bliss, T.V. and Collingridge, G.L. (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, **361**, 31–39
57. Joel, D. (2006) Current animal models of obsessive compulsive disorder: a critical review. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **30**, 374–88
58. Swedo, S. E. and Snider, L. A. (2004) The Neurobiology and treatment of obsessive-compulsive disorder. In: Nestler EJ, Charney DS, editors. *Neurobiology of Mental Illness*, Oxford University Press; New York, 628–638
59. Graybiel, A. M. and Rauch, S. L. (2008) Toward a neurobiology of obsessive-compulsive disorder. *Neuron*, **28**, 343–347
60. Aouizerate, B., Guehl, D., Cuny, E., Rougier, A., Bioulac, B., Tignol, J. and Burbaud, P., (2004) Pathophysiology of obsessive-compulsive disorder: a necessary link between phenomenology, neuropsychology, imagery and physiology. *Prog. Neurobiol.*, **72**, 195–221.
61. Welch, J. M., Lu, J., Rodriguiz, R. M., Trotta, N. C., Peca, J., Ding, J. D., Feliciano, C., Chen, M., Adams, J. P., Luo, J., Dudek, S. M., Weinberg, R. J., Calakos, N., Wetsel, W. C. and Feng, G. (2007) Cortico-striatal synaptic defects and OCD-like behaviors in SAPAP3 mutant mice. *Nature*, **448**, 894–900

62. Thomas, A., Burant, A., Bui, N., Graham, D., Yuva-Paylor, L. A. and Paylor, R. (2009) Marble burying reflects a repetitive and perseverative behavior more than novelty-induced anxiety. *Psychopharmacology (Berl)*, **204**, 361–373
63. Pankratz, N., Wilk, J. B., Latourelle, J. C., DeStefano, A. L., Halter, C., Pugh, E. W., Doheny, K. F., Gusella, J. F., Nichols, W. C., Foroud, T., Myers, R.H.; PSG-PROGENI and GenePD Investigators, Coordinators and Molecular Genetic Laboratories. (2009) Genomewide association study for susceptibility genes contributing to familial Parkinson disease. *Hum. Genet.*, **124**, 593–605
64. Arnone, D., Cavanagh, J., Gerber, D., Lawrie, S.M., Ebmeier, K.P., and McIntosh AM. (2009) Magnetic resonance imaging studies in bipolar disorder and schizophrenia: meta-analysis. *Br. J. Psychiatry*, **195**, 194–201
65. Pujol, J., Soriano-Mas, C., Alonso, P., Cardoner, N., Menchón, J. M., Deus, J. and Vallejo, J. (2004) *Arch. Gen. Psychiatry*, **61**, 720–730
66. Mizuno, S., Sakai, H., Saito, M., Kado, S. and Sakane, F. (2012) Diacylglycerol kinase-dependent formation of phosphatidic acid molecular species during interleukin-2 activation in CTLL-2 T-lymphocytes. *FEBS Open Bio*, **2**, 267–272
67. Sakai, H., Kado, S., Taketomi, A. and Sakane, F. (2014) Diacylglycerol kinase  $\delta$  phosphorylates phosphatidylcholine-specific phospholipase C-dependent, palmitic acid-containing diacylglycerol species in response to high glucose levels. *J. Biol. Chem.*, **289**, 26607–20617
68. Kurooka, T., Yamamoto, Y., Takai, Y. and Sakisaka, T. (2010) Dual regulation of RA-RhoGAP activity by phosphatidic acid and Rap1 during neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.*, **286**, 6832–6843

## 【謝辞】

本研究を行うにあたり、終始熱心なご指導及びご指摘を頂いた坂根郁夫教授に深く感謝いたします。本論文作製にあたっては、審査委員として本学大学院理学研究科 村田武士教授、勝田正一教授、米澤直人准教授に多くのご助言を頂きました。ありがとうございました。本研究の組織染色では、本学大学院融合科学研究科 佐藤成樹講師に多大なるご助言を頂き、また、近畿大学工学部 福嶋伸之准教授には神経初代培養に関してご指導頂きました。長年学生生活を暖かく見守って下さいました本学化学科の先生方に心より感謝すると共に、辛抱強く指導し研究生活を支えて下さった堺弘道博士や本研究を支援して下さいました高戸珠恵氏をはじめとする研究室の皆さま方に厚く御礼申し上げます。