

受容体刺激を介したジアシルグリセロールキナーゼの動態

野部 裕美

文京学院大学 保健医療技術学部 理学療法学科

要旨

ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) の活性制御メカニズムは、さまざまな細胞や組織で検討されている。DGK は、ジアシルグリセロール (DG) とホスファチジン酸 (PA) の2つの脂質間の均衡を調節する酵素であり、細胞内情報伝達物質として重要な役割を担う酵素である。DG は、ホスホリパーゼ C (PLC) によりホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 (PIP₂) から産生され、代謝は DGK により PA にリン酸化される。これら、膜リン脂質の産生・代謝系は、ホスファチジルイノシトール代謝回転と呼ばれている。DG の作用としては、プロテインキナーゼ C (PKC) を活性化することである。PKC は、細胞増殖などさまざまな作用に関与する酵素である。このように、DG はセカンドメッセンジャーとしての作用を有し、DG、DGK、PKC の関連性やそれぞれの作用を明らかにすることは、薬理学・生理学的にも重要である。

キーワード

ジアシルグリセロールキナーゼ、プロテインキナーゼ C、細胞内カルシウム、ホスファチジン酸、ジオクタオイルグリセロール

はじめに

生体を構成する細胞は、常に多くの刺激を受けている。細胞が増殖因子、ホルモン、神経伝達物質などにより刺激を受けると、受容体を介した反応が起こる。特に、細胞膜上の G タンパク質共役型受容体にホルモンなどのリガンドが結合すると、活性化したホスホリパーゼ C (PLC) の作用によりホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 (PIP₂) が加水分解され、ジアシルグリセロール (DG) とイノシトール三リン酸 (IP₃) が産生される。これらは、セカンドメッセンジャーとして重要な役割を果たすことが知られている (図 1)^{1, 2)}。平滑筋の収縮反応において、IP₃ は細胞内カルシウムストアーからのカルシウムイオン放出の引き金として働き^{3, 4)}、DG は収縮タンパク系などのカルシウム感受性の変化に関与するプロテインキナーゼ

C (PKC) の活性化因子として重要である^{5, 6)}。細胞内における DG-PKC 系の情報伝達の役割は多彩であり、これまで多くの検討が行われてきている。

本稿では、DG のリン酸化酵素であるジアシルグリセロールキナーゼ (Diacylglycerol kinase: DGK) の酵素学的性質や動態、アイソフォームについて概説する。DGK は、DG の代謝酵素として、あるいは内因性生理活性物質であるホスファチジン酸 (PA)⁷⁻¹⁰⁾ の生成酵素として、重要な役割を果たしていることが知られている¹¹⁾。すなわち、DGK のホスファチジルイノシトール代謝回転 (PI-turnover) での役割は、受容体刺激時に産生された DG (あるいはその一部) をリン酸化し、PA を産生する脂質リン酸化酵素であり¹²⁾、DGK は DG 量を減少させることで間接的に PKC などの活性を制御する酵素でもある。また DGK は、PA を介した Raf kinase や mTOR などの活性調

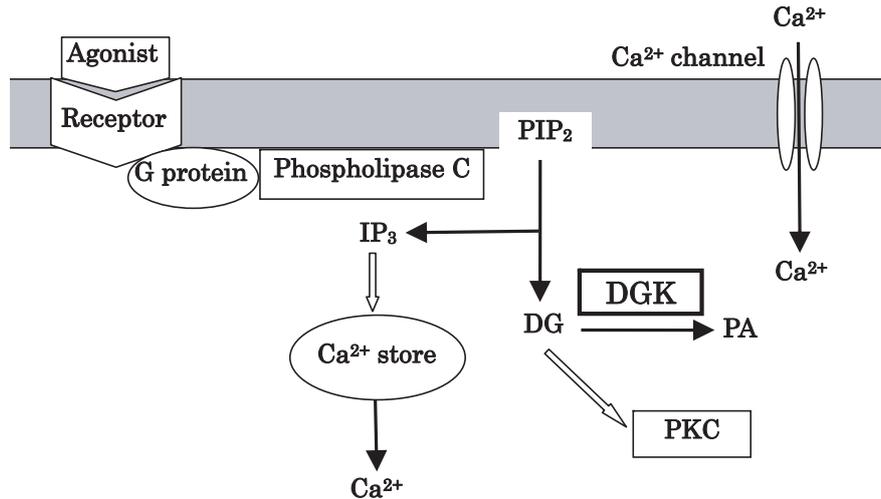


図1 受容体刺激による DGK を介した細胞内情報伝達

節に参与すると考えられている情報伝因子でもある^{12, 13)}. このように DGK は、予想以上に広範囲で多彩な生理機能制御に参与しており、PKC や G タンパク質などを介した、特異的な機能を担っている。

DGK は DG を PA に変換するリン酸化酵素であり、この DG と PA の細胞内情報伝達に参与する脂質の動態を厳密に制御する重要な役割を担い¹⁴⁻¹⁶⁾ 注目を集めている。しかし、ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼなどの脂質リン酸化酵素と比べると、まだまだ研究が遅れているのが現状である。DGK は、1990 年に一次構造が同定され¹⁷⁾、2005 年には哺乳類の DGK アイソフォームが少なくとも 10 種が類報告された¹⁸⁾。また、DG1 分子に対して 1 分子のリン酸を特異的に導入することが明らかとなっている。しかし、これらの検討のほとんどは細胞より抽出した酵素分画を使用したもので、細胞内での活性を測定している報告はない。

そこで、細胞内での DGK 活性を推定するために、我々は細胞膜透過型の DG アナログである dioctanoyl-*sn*-glycerol (diC8)¹⁹⁾ を細胞に添加し、これを外因性基質として生成する dioctanoyl phosphatidic acid (diC8-PA) を定量することにした²⁰⁾。これにより、モルモット結腸紐を用いた実験では、diC8-PA 量が神経伝達物質刺激により経時的・用量依存的に増加することを見出し、DGK 活性が受容体刺激と関連していることを明らかにした。さらに、この刺激による DGK 活性化が細胞内カルシウム濃度に強く依存するにもかかわらず、受容体刺激を介さない細胞内カルシウム濃度上昇だけでは起こらない。これらのことから、DGK 活性の制御には、カルシウム以外の別の因子が存在する可能性が考えられた。

本稿では、細胞内の DGK 制御因子を明らかにする目的で、平滑筋の収縮反応において、重要な役割を果たしているいくつかの protein kinase の関与を検討した知見を紹介する。また、本測定法の diC8 を用いた検討は、外因性の diC8 と内因性の DG が同じ DGK によってリン酸化されると考えてきたが、多くの細胞で複数種の DGK アイソフォームが共存することが明らかとなってきた^{17, 21)}。そこで、モルモット結腸紐を用いて diC8 と内因性 DG が同一の DGK アイソフォームにより、リン酸化を受けているか確認する必要性が生じ、この点についても混合ミセル法を用いて検討した知見も加える。DGK のアイソフォームに関しても、これまでの報告から得られた分子構造をまとめて紹介する。

1. 受容体刺激による DGK の活性

DGK の活性について、我々はこれまで、細胞膜透過性の DG である diC8 を用いて受容体刺激による DGK 活性の変化を測定してきた²⁴⁾。しかし、DGK は多くの細胞で複数種のアイソフォームが共存することが見い出されており^{17, 21)}、本測定法では、外因性の diC8 と内因性の DG が同一のアイソフォームによってリン酸化を受けるかが問題となってきた。そこで、モルモット結腸紐より粗精製 DGK 分画を調製し、DG を含む混合ミセル中に組み込んで、外因性 diC8 と内因性 DG のリン酸化が同一の DGK を介するか、あるいは DGK がそれぞれの基質に対してどのような選択性を示すかを検討した。

細胞分画を用いた DGK 活性測定法は、いくつか存在し、そのいずれの方法が最適であるかは、細胞種によっ

て大きく異なると報告されている²⁵⁾。我々はモルモット結腸紐を用いて、いくつかの方法で検討を行なった。その結果、オクチルグリコシドを用いた混合ミセル法では、外因性 diC8 と典型的な内因性 DG の一つである 18:0/20:4-DG が共に用量依存的にリン酸化を受けたことから (図 2)、オクチルグリコシド混合ミセル法が有用な測定方法となり得ると考えた。以後この条件下で、diC8 と 18:0/20:4-DG のリン酸化が同一の DGK 介するか測定を行なった。混合ミセル中で、18:0/20:4-DG が一定の速度でリン酸化されているところに diC8 を添加すると、この 18:0/20:4-DG のリン酸化速度が用量依存的に減少した (図 3)。このことは、diC8 と 18:0/20:4-DG が、共通の DGK に競合的に結合していることを示している。

しかし、この 2 つの基質間では、DGK に対する親和性が異なる傾向が認められた。そこで、次にモルモット結腸紐の diC8 と 18:0/20:4-DG に対する DGK の基質選択性を検討した。その結果、diC8 と 18:0/20:4-DG が同じ速度でリン酸化を受けたときの、混合ミセル中の両基質の濃度比は、4:1 であった。このことから、DGK は diC8 よりも 18:0/20:4-DG に対して、約 4 倍の親和性を有することが明らかとなった。以上、粗精製 DGK 分画を用いた検討によって、モルモット結腸中に DGK アイソフォームが何種存在するかは不明であるものの、diC8 は内因性 18:0/20:4-DG と比較して選択性は低いが、DGK と競合的に結合することが明らかとなった。このことから、diC8 は DGK 活性測定の有効な外因性基質となりうることが示唆された。また、DGK の基質選択性についてはこ

れまでにいくつかの報告があり、ヒヒの脳では特にホスファチジル基の 2 位にアラキドニルを有するものが選択性が高いとされ²⁶⁾、ラットの肝臓²⁷⁾、脳²⁸⁾ では、DGK が DG の側鎖長を区別しにくいことが報告されている。これらの報告と我々の結果をあわせて考察すると、モルモット結腸紐 DGK は、後者のタイプに分類できると考えられた。

我々のこれまでの検討では、受容体刺激薬であるカルバコール (CCh) 誘発 DGK の活性化が、細胞内のカルシウム濃度の変化に強く依存することを明らかとしてきた²⁴⁾。しかし同時に、DGK の活性化は受容体刺激を介さない、細胞内カルシウム濃度上昇のみでは起こらないことを明らかにしてきており、カルシウム濃度の上昇以外に DGK を制御する因子が存在すると考えた。細胞内での DGK の制御因子は、他の細胞でもその存在は示唆されているが、実際に何によるかは不明である。そこで、我々は DGK 活性制御因子として平滑筋細胞内情報伝達系に関わるいくつかのリン酸化酵素について、それぞれの阻害薬を用いて検討を行なった。その結果、CCh 誘発の DGK 活性化は、KN-62 (カルシウム/カルモジュリンキナーゼ阻害薬)、W-7 (ミオシン軽鎖キナーゼ阻害薬) によって全く影響を受けなかったことや、H-7 (PKC 阻害薬) では強い抑制が認められたことから (図 4)、DGK 活性化には PKC が関与している可能性が示唆された²⁴⁾。

PKC が DGK の制御因子である可能性を確認するため、PKC 活性化薬である PDBu を用いて DGK 活性への影響を測定した。その結果、PDBu による PKC の活性化だけでは、DGK 活性は認められなかったが、KCl と併用し細

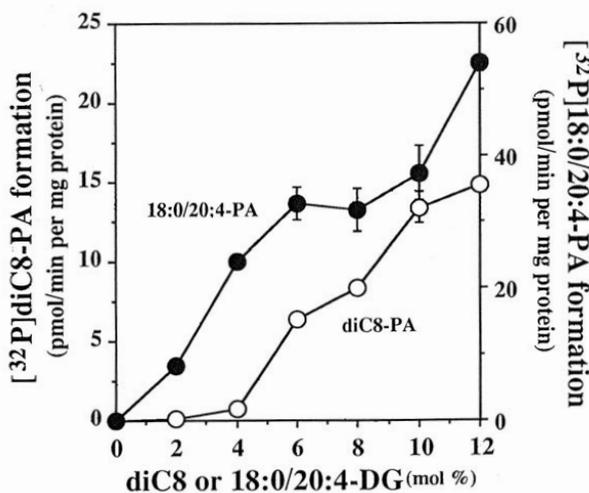


図 2 モルモット結腸紐より精製した DGK 分画による DGK の基質依存性

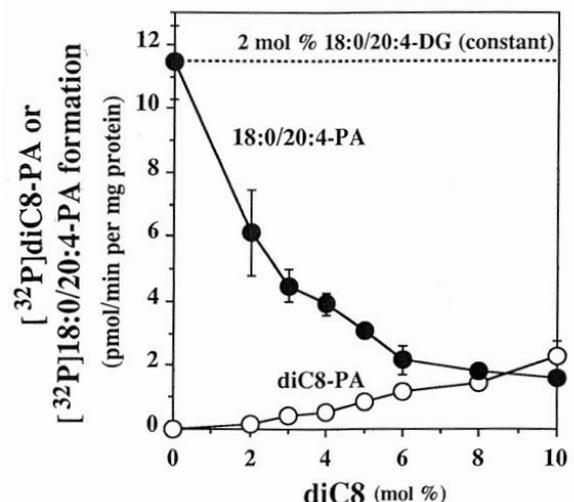


図 3 diC8 と 18:0/20:4-DG 間の精製 DGK に対する結合

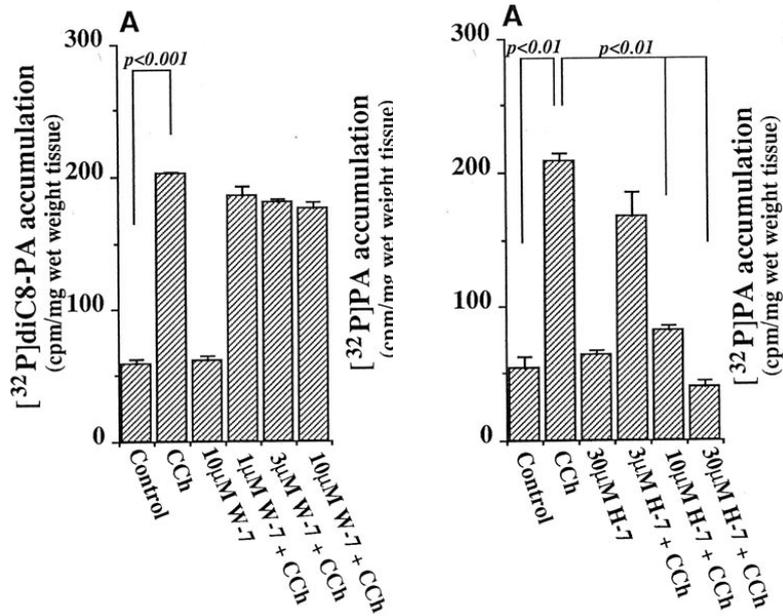


図4 CCh誘発 $[^{32}\text{P}]$ diC 8-PA の増加に対する MLCK 阻害薬の検討

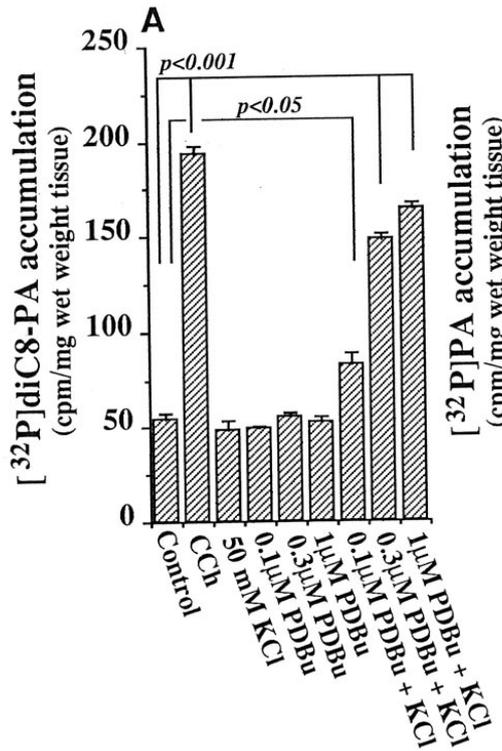


図5 KClとPDBuが $[^{32}\text{P}]$ diC 8-PA 生成に与える影響

胞内カルシウム濃度が上昇した条件下で PDBu を処理すると、DGK の活性が認められた (図5)。このことから、DGK の活性に細胞内カルシウム濃度上昇と PKC の活性化が関与していることが明らかとなった。これは、PDBu と

異なるタイプの PKC 活性化薬である SC-9 によっても同様の結果が得られたことや、KCl と PDBu や SC-9 の併用による DGK の活性が PKC 阻害薬によって抑制されたこと、さらに PKC を脱感作すると DGK の活性が認められ

なくなることから、PKCがDGKの活性調節に重要な役割を果たしていることが裏付けられた。また、 Ca^{2+} を除いた実験においてもDGKの活性は認められなかった。DGK活性に対するPKCの関与については、ブタの胸腺²⁹⁾と脳³⁰⁾から精製された80 kDaのDGKが内因性PKCによって直接リン酸化されることが報告されている。以上のことから、モルモット結腸紐でのCCh誘発DGKの活性は、細胞内カルシウム濃度とPKCの2つの因子によって制御されている可能性が強く示唆された。

PKCによりDGKが活性化を起こすことは、PKCが自らの活性化因子であるDGを減少させるために、DGKを活性化させるという正のフィードバック機構が存在する可能性を示唆している。活性化したPKCが、PLCを抑制することは多くの論文で報告されている³¹⁾。これらのことをふまえて、PKCはPLCとDGK活性を制御し、DGに対して生成・代謝の両方でその量を厳密に調節していると考えられる。

2. DGKの細胞内分布変動

DGKは、DG量を減少させることからPKCの抑制作用を間接的に引き起こしていると考えられる。PKCは、細胞質から細胞膜へのトランスロケーションが知られている。このときに、DGKはどのようにPKCと関わっているかを明らかにするために、我々はDGKの分布変動を測定した。この結果、モルモット結腸紐平滑筋細胞内での

DGK活性は、細胞膜と可溶性画分で認められたが、核やミトコンドリアではほとんど認められなかった。我々の結果は、ラットの肝細胞³²⁾、脳²⁵⁾、血管³³⁾、Swiss 3T3 cell²⁶⁾と同様であった。DGK活性の細胞内分布は、組織によって異なり、細胞によっては核に多く存在するという報告もある³¹⁾。また、我々は細胞膜と可溶性画分の粗DGKのdiC8と18:0/20:4-DGに対する基質選択性は、同様であるという結果を出しており、同一の分子種が両画分に存在している可能性を示唆している。

DGKの分布変動は、受容体刺激薬であるCChの刺激により、膜画分で上昇し、可溶性画分で減少した報告がある。これは、酵素が刺激により細胞質から細胞膜へ移動している、いわゆる「トランスロケーション」を起こすことが示唆されている。この反応は、アトロピンにより抑制されたこと、細胞を洗浄することによりもとのレベルに戻ったことから、可逆的な反応であることが明らかとなっている²⁰⁾。

我々は、DGKのトランスロケーションにおけるPKCの関与を検討した。細胞にPKC活性阻害薬を前処理しておくことで、DGKのトランスロケーションは完全に抑制された。また、PKCを脱感作させてもDGKのトランスロケーションが抑制された(図6)。さらに、PKC活性を上げた時にDGKの分布変動を測定すると、DGKのトランスロケーションは起こらなかった。しかし、PKC活性の上昇と細胞内カルシウムイオンの上昇では、トランスロケーションが起こった。これらの結果から、CCh刺激によるDGKト

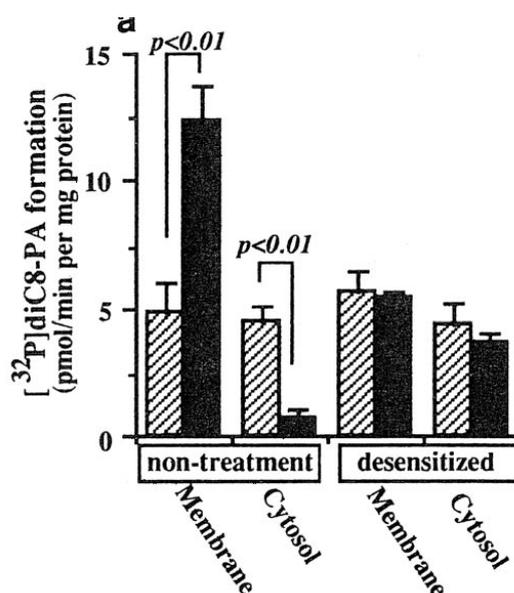


図6 CCh誘発DGK分布変動に対するPKC脱感作の影響

ランスロケーションには、PKC 活性化とカルシウムイオンの上昇が重要な役割を果たしていることが示唆された。この、PKC と DGK のランスロケーションの関連は、好中球において報告されており、カルシウムイオンは PKC を介した DGK のランスロケーションの発生に利用されていることが考えられた。

DGK と PKC は、共に受容体刺激により細胞質から細胞質膜にランスロケーションし、活性化される。これは、はじめに PKC がランスロケーションし、続いて DGK が膜に移行し、再び PKC が細胞質に戻るというリランスロケーションの報告がある³⁴⁾。PKC のリランスロケーションは、DGK 阻害薬で抑制され、PKC と DGK が直接結合し、セリンをリン酸化することで DGK の活性を亢進させている³⁴⁾。この反応は、DGK が DG の代謝により PKC の活性・局在を間接的に調節しているだけでなく、PKC によるリン酸化により DGK がフィードバック調節を受けていると考えられた。このように、DGK と PKC はお互いに機能的な関連性が強く、最近の報告では、DGK δ

のノックアウトマウスでの機能解析や、DGK ζ が PKC ϵ の活性化を抑制することにより、心肥大に抑制的に働くことが明らかとなっている^{35,36)}。

以上のことから、DGK は細胞内局在・活性を巧みに調節して、細胞内情報伝達に大きく寄与していると考えられた。

3. DGK アイソフォーム

最近の DGK アイソフォームについてまとめた。1990 年に加納らにより、DGK の遺伝子がブタからクローニングされた¹⁷⁾。DGK アイソフォームは、少なくとも 10 種類が報告され、構造上の特徴から 5 つに大別される (図 7)。Type I (α , $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$)、Type II ($\delta 1$, $\delta 2$, $\eta 1$, $\eta 2$, κ)、Type III (ϵ)、Type IV ($\zeta 1$, $\zeta 2$, $\iota 1$, $\iota 2$, $\iota 3$)、Type V (θ) である。これら、すべてのアイソフォームは、C 末端側に相同性の高い触媒領域が存在し、分子内に 2 個または 3 個の PKC と相同性のある C1 ドメイン (システインとヒスチジンに富むジンクフィンガー様構造でホル

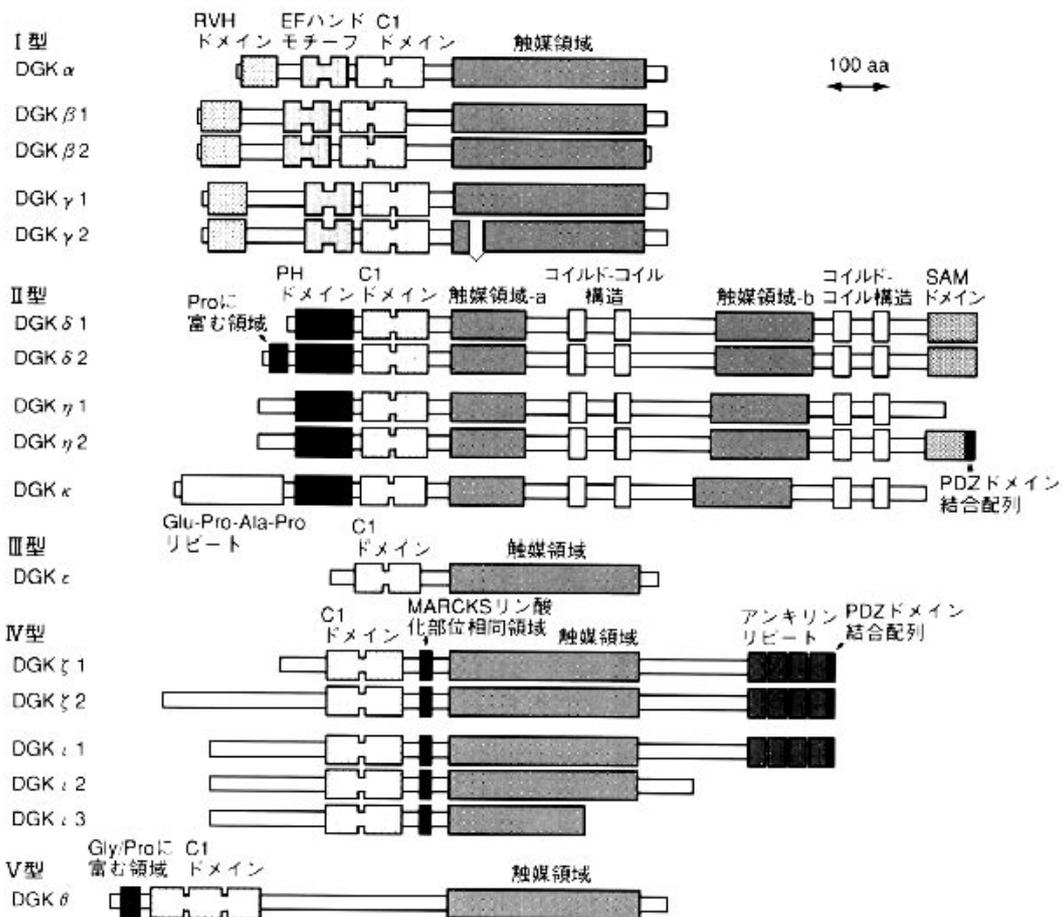


図 7 DGK アイソフォームの構造模式図 (実験医学 2005, vol.23)

ボールエステルが結合すると考えられている)を持つ。N末端側にはサブタイプに特有な調節領域が存在する。C1ドメインは、PKCの脂質結合領域によく似たものだが、DGとの結合能をもつのは β と γ であると考えられている²²⁾。

- ① Type I に属する DGK の α , β , γ の N 末端側の調節領域には、カルシウム結合ドメインである EF-hand と、カルシウムセンサーとして働く recoverin family に相同な領域 (RVH) がある。これらの領域を介して、カルシウム依存性を示すと考えられている。
- ② Type II の δ , η , κ には、N 末端側に pleckstrin homology (PH) ドメインと C 末端側に sterile α motif (SAM) ドメインや PDZ ドメインが存在している。これは、タンパク質間相互作用などに関与していると考えられている。また、分子内に触媒領域とコイルドコイル構造がそれぞれ 2 箇所存在している。
- ③ Type III の ε には、C1 ドメイン以外に特徴的な機能ドメインを持たないが、ほかのアイソフォームが基質特異性(脂肪酸種に対する)を示さないのに対して、ホスファチジルイノシトール代謝回転により生じる DG の大部分に特異性を持つ性質がある。
- ④ Type IV の ζ , ι には、C 末端側に 4 個のアンキリンリピートと PDZ ドメインが存在している。分子内には、myristoylated alanine rich C-kinase substrate (MARCKS) ホモロジドメインであるリン酸化部位類似配列 (PKC によってリン酸化される) が存在する。
- ⑤ Type V の θ は、3 個の C1 ドメインと N 末端側にグリシンとプロリンに富む領域が存在している。

10 種類の DGK アイソフォームは、それぞれ発現組織が異なっている。DGK α は、脳のグリア細胞や胸腺・脾臓などの免疫系組織に多く存在し、DGK β , γ , η , θ , ζ , ι は、脳に多い。この中でも、DGK β は線条体や海馬に、DGK γ は、小脳・海馬に認められる²³⁾。また、DGK γ は、神経細胞にも存在している。一方、DGK δ は脳には認められず、筋肉に多く存在する。これらの組織分布や活性化機構の違いから、それぞれのアイソフォームは特異的な機能を有していると推測されている。

また、哺乳動物とは異なる線虫、ショウジョウバエ、植物には、数種類の DGK アイソフォームしか見いだされていない。さらに、単細胞真核生物、酵母には DGK 遺伝子は見いだされておらず、活性も検出されていない。これ

らの生物種間の分布と組織発現から、DGK は多細胞生物(特に高等動物)特有の生命現象とその異常(例えば、発生・分化、免疫系や神経系形成、癌化など)に重要な役割を果たしているのではないかと推定される。そして、最近の研究により哺乳動物の DGK アイソフォームの具体的な生理的役割や刺激による動態変化が報告されている。この DGK のアイソフォーム別の多彩さだけでなく、1 つアイソフォームに関する多彩な機能が明らかになってきている。

おわりに

以上、DGK の細胞内における局在と役割を基礎的な研究成果からまとめた。DGK の研究は、ここ数年でとても増えており、広範囲で多彩な生理機能制御に関与し、それぞれのアイソフォームは、特異的な機能を担っていることが明らかになってきている。また、DG はさまざまな分野に応用できる酵素としても考えられる。その一つに、2000 年頃、体に吸収されない油としてジアシルグリセロールが脚光を浴び、より身近なものとして捕らえられるようになった。今後、DGK の研究成果が臨床の場で応用され、画期的な新薬の開発に至るような薬理学的研究が進むことを望む。

略語

- CCh: カルバコール (受容体刺激薬)
 DG: ジアシルグリセロール (脂質)
 DGK: ジアシルグリセロールキナーゼ (リン酸化酵素)
 diC8: ジオクタノイルグリセロール (外因性基質)
 IP₃: イノシトール三リン酸 (リン脂質)
 PA: ホスファチジン酸 (脂質)
 PIP₂: ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 (膜リン脂質)
 PKC: プロテインキナーゼ C (リン酸化酵素)
 PLC: ホスホリパーゼ C (加水分解酵素)

引用文献

- 1) Berridge MJ: Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers, *Biochem J* 1984, 220: 345-360
- 2) Berridge MJ, Irvine RF: Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction, *Nature* 1984, 312: 315-321

- 3) Streb H, Irvine RF, Berridge MJ, Schulz I: Release of Ca^{2+} from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate, *Nature* 1983, 306: 67-69
- 4) Joseph SK, Thomas AP, Williams RJ, Irvine RF, Williamson JR: myo-Inositol 1,4,5-trisphosphate. A second messenger for the hormonal mobilization of intracellular Ca^{2+} in liver, *J Biol Chem* 1984, 259: 3077-3081
- 5) Takai Y, Kishimoto A, Iwasa Y, Kawahara Y, Mori T, Nishizuka Y: Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipids, *J Biol Chem* 1979, 254: 3692-3695
- 6) Takai Y, Kishimoto A, Kikkawa U, Mori T, Nishizuka Y: Unsaturated diacylglycerol as a possible messenger for the activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase system, *Biochem Biophys Res Commun* 1979, 91: 1218-1224
- 7) Putney JW, Jr., Weiss SJ, Van De Walle CM, Haddas RA: Is phosphatidic acid a calcium ionophore under neurohumoral control?, *Nature* 1980, 284: 345-347
- 8) Moolenaar WH, Kruijer W, Tilly BC, Verlaan I, Bierman AJ, de Laat SW: Growth factor-like action of phosphatidic acid, *Nature* 1986, 323: 171-173
- 9) Murayama T, Ui M: Phosphatidic acid may stimulate membrane receptors mediating adenylate cyclase inhibition and phospholipid breakdown in 3T3 fibroblasts, *J Biol Chem* 1987, 262: 5522-5529
- 10) Kroll MH, Zavoico GB, Schafer AI: Second messenger function of phosphatidic acid in platelet activation, *J Cell Physiol* 1989, 139: 558-564
- 11) Nobe K, Ohata H, Momose K: Effect of diacylglycerol kinase inhibitor, R59022 on cytosolic free calcium level and force development in guinea pig taenia coli, *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1993, 81: 331-343
- 12) Topham MK: Signaling roles of diacylglycerol kinases, *J Cell Biochem* 2006, 97: 474-484
- 13) Avila-Flores A, Santos T, Rincon E, Merida I: Modulation of the mammalian target of rapamycin pathway by diacylglycerol kinase-produced phosphatidic acid, *J Biol Chem* 2005, 280: 10091-10099
- 14) Topham MK, Prescott SM: Mammalian diacylglycerol kinases, a family of lipid kinases with signaling functions, *J Biol Chem* 1999, 274: 11447-11450
- 15) van Blitterswijk WJ, Houssa B: Properties and functions of diacylglycerol kinases, *Cell Signal* 2000, 12: 595-605
- 16) Kanoh H, Yamada K, Sakane F: Diacylglycerol kinases: emerging downstream regulators in cell signaling systems, *J Biochem* 2002, 131: 629-633
- 17) Sakane F, Yamada K, Kanoh H, Yokoyama C, Tanabe T: Porcine diacylglycerol kinase sequence has zinc finger and E-F hand motifs, *Nature* 1990, 344: 345-348
- 18) Imai S, Kai M, Yasuda S, Kanoh H, Sakane F: Identification and characterization of a novel human type II diacylglycerol kinase, DGK kappa, *J Biol Chem* 2005, 280: 39870-39881
- 19) Davis RJ, Ganong BR, Bell RM, Czech MP: sn-1,2-Dioctanoylglycerol. A cell-permeable diacylglycerol that mimics phorbol diester action on the epidermal growth factor receptor and mitogenesis, *J Biol Chem* 1985, 260: 1562-1566
- 20) Nobe K, Ohata H, Momose K: Activation of diacylglycerol kinase by carbachol in guinea pig taenia coli, *Biochem Pharmacol* 1994, 48: 2005-2014
- 21) Schaap D, de Widt J, van der Wal J, Vandekerckhove J, van Damme J, Gussow D, Ploegh HL, van Blitterswijk WJ, van der Bend RL: Purification, cDNA-cloning and expression of human diacylglycerol kinase, *FEBS Lett* 1990, 275: 151-158
- 22) Shindo M, Irie K, Masuda A, Ohigashi H, Shirai Y, Miyasaka K, Saito N: Synthesis and phorbol ester binding of the cysteine-rich domains of diacylglycerol kinase (DGK) isozymes. DGKgamma and DGKbeta are new targets of tumor-promoting phorbol esters, *J Biol Chem* 2003, 278: 18448-18454
- 23) Adachi N, Oyasu M, Taniguchi T, Yamaguchi Y, Takenaka R, Shirai Y, Saito N: Immunocytochemical localization of a neuron-specific diacylglycerol kinase beta and gamma in the developing rat brain, *Brain Res Mol Brain Res* 2005, 139: 288-299
- 24) Nobe K, Aizawa H, Ohata H, Momose K: Protein kinase C is involved in translocation of diacylglycerol kinase induced by carbachol in guinea pig taenia coli, *Biochem Pharmacol* 1995, 50: 591-599
- 25) Kanoh H, Banno Y, Hirata M, Nozawa Y: Partial purification and characterization of phosphatidylinositol

- kinases from human platelets, *Biochim Biophys Acta* 1990, 1046: 120-126
- 26) MacDonald ML, Mack KF, Williams BW, King WC, Glomset JA: A membrane-bound diacylglycerol kinase that selectively phosphorylates arachidonoyl-diacylglycerol. Distinction from cytosolic diacylglycerol kinase and comparison with the membrane-bound enzyme from *Escherichia coli*, *J Biol Chem* 1988, 263: 1584-1592
- 27) Kanoh H, Akesson B: Properties of microsomal and soluble diacylglycerol kinase in rat liver, *Eur J Biochem* 1978, 85: 225-232
- 28) Kato M, Takenawa T: Purification and characterization of membrane-bound and cytosolic forms of diacylglycerol kinase from rat brain, *J Biol Chem* 1990, 265: 794-800
- 29) Kanoh H, Ono T: Phosphorylation of pig brain diacylglycerol kinase by endogenous protein kinase, *FEBS Lett* 1986, 201: 97-100
- 30) Kanoh H, Yamada K, Sakane F, Imaizumi T: Phosphorylation of diacylglycerol kinase in vitro by protein kinase C, *Biochem J* 1989, 258: 455-462
- 31) Berridge MJ: Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers, *Annu Rev Biochem* 1987, 56: 159-193
- 32) Rider MH, Baquet A: Activation of rat liver plasma-membrane diacylglycerol kinase by vasopressin and phenylephrine, *Biochem J* 1988, 255: 923-928
- 33) Ohanian J, Heagerty AM: Membrane-associated diacylglycerol kinase activity is increased by noradrenaline, but not by angiotensin II, in arterial smooth muscle, *Biochem J* 1994, 300 (Pt 1) : 51-56
- 34) Yamaguchi Y, Shirai Y, Matsubara T, Sanse K, Kuriyama M, Oshiro N, Yoshino K, Yonezawa K, Ono Y, Saito N: Phosphorylation and up-regulation of diacylglycerol kinase gamma via its interaction with protein kinase C gamma, *J Biol Chem* 2006, 281: 31627-31637
- 35) Goto K, Nakano T, Hozumi Y: Diacylglycerol kinase and animal models: the pathophysiological roles in the brain and heart, *Adv Enzyme Regul* 2006, 46: 192-202
- 36) Harada M, Takeishi Y, Arimoto T, Niizeki T, Kitahara T, Goto K, Walsh RA, Kubota I: Diacylglycerol kinase zeta attenuates pressure overload-induced cardiac hypertrophy, *Circ J* 2007, 71: 276-282

Mobilization of diacylglycerol kinase mediated by receptor stimulation

Hiromi Nobe (Aizawa)

Department of Physical Therapy, Faculty of Health Science Technology,
Bunkyo Gakuin University

Abstract

The regulatory mechanisms of diacylglycerol kinase (DGK) activity were studied in variety of cells or tissues. DGK plays an important role in intracellular signal transduction through modulating the balance between two signaling lipids, diacylglycerol (DG) and phosphatidic acid (PA). DG is known to be released from phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate by phospholipase C and to serve as a second messenger in protein kinase C (PKC) -mediated signal transduction. The major route for removal of DG is via its phosphorylation to PA, metabolite to activate phosphatidylinositol turnover. DGK is therefore likely to prove a key element in the regulation of DG metabolism. In this paper, treatment of the tissue with receptor agonist increased the activity in the membrane fraction and decreased the cytosolic fraction without affecting total DGK activity. In the mixed micellar assay system, exogenous DG, dioctanoyl glycerol (diC8) and endogenous type of DG, 18:0/20:4 DG were competitively bound to common DGK isozymes and phosphorylated, suggesting that diC8 is useful probe of agonist effects on DGK activity. The other

study indicated that the DGK activation was required to both intracellular calcium accumulation and PKC activation. These findings indicated the PKC regulated DGK exists in receptor stimulated, which may play as a positive feedback regulation for the decrease of DG level.

Key words —— diacylglycerol kinase, protein kinase C, intracellular calcium, phosphatidic acid, dioctanoyl glycerol,

Bunkyo Journal of Health Science Technology vol.1: 27-36