

## ホスホイノシタイドによる細胞ダイナミズムの制御

### Regulation of cell dynamism by phosphoinositides

竹縄 忠臣 (TAKENAWA TADAOMI)

神戸大学・大学院医学研究科・特命教授



#### 研究の概要

ホスホイノシタイドが細胞内情報伝達や膜輸送、細胞骨格制御など様々な機能制御に関与していることが分かって来た。更に、ある種のホスホイノシタイド結合タンパク質が細胞微細構造の構築を行なっている事も分かって来た。本研究ではそのようなホスホイノシタイド結合タンパク質として、PSTPIP2, SH3YL1 や ASAP1 を取り上げ、ポドゾーム形成やドーサルラッフルへの関与を明らかにした。PSTPIP2 は FBP17 などの F-BAR ドメインタンパク質に拮抗して、ポドゾーム形成を抑制した。一方、SH3YL1 や ARAP1 はドーサルラッフル形成やその大きさを規定していた。ホスホイノシタイドの時空間制御に関しては PIP3 5-phosphatase の SKIP が如何にしてインスリンシグナル特異的に負に制御しているのかを明らかにした。また細胞間接着を制御する PI4P 4-phosphatase, Sac1 を見つけた。Sac1 はゴルジ体に存在するにもかかわらず、ゴルジ体の PI4P をコントロールして細胞接着、細胞運動、浸潤を制御していた。

研究分野：細胞生物学、脂質生化学

科研費の分科・細目：生物科学、細胞生物学

キーワード：ホスホイノシタイド、膜変形、ポドゾーム、ドーサルラッフル

#### 1. 研究開始当初の背景

細胞はホルモンや増殖因子などの外界刺激を受けて、増殖、分化、運動へと向うシグナルを細胞内へ発信する。基本的には「リン脂質を2重層とする細胞膜基本構造に様々なタンパク質が相互作用する事により、細胞膜上でシグナルが発生」する。細胞膜の成分の中でも強い負の電荷を持つイノシトールリン脂質類（ホスホイノシタイド）はその中心的役割を果たし、IP3 やジアシルグリセロールといった2次メッセンジャーの産生脂質として働き、それ以外にも、脂質そのものが細胞内情報伝達や膜輸送、細胞骨格制御など様々な機能制御に関与していることが分かってきた。

細胞はダイナミックに形を変え外側向きの突起、(糸状仮足や葉状仮足など)を形成し、運動を亢進したり、内側向きの突起(陥入構造)を形成し、細胞内膜輸送を行なう。これら微細構造形成にもホスホイノシタイド結合タンパク質が関わっていることが明らかになって来た。

#### 2. 研究の目的

ホスホイノシタイドが微細な膜構造作りに関与する事は分かって来たが、実際の生命現象(運動、物質取り込み、接着)やがんなどの病態において具体的にどのような分子がこれらの役割を担っているのか全く分かっていない。そこで我々が新たに見いだしたホスホイノシタイド結合タンパク質の中から膜変形活性の強い PSTPIP2, SH3YL1, ARAP1 に絞ってポドゾーム形成、ドーサルラッフル形成への関与を調べ、膜微細構造構築への関与を明らかにする。またホスホイノシタイドの時空間制御を調べるため①PIP3 5-phosphatase の SKIP が如何にしてインスリンシグナル特異的に負に制御するのか?②ゴルジ体に存在する PI4P 4-phosphatase の Sac1 が如何にして細胞接着を制御するか?がん細胞の浸潤、転移を如何に制御するかを明らかにする。

#### 3. 研究の方法

微細構造形成へのホスホイノシタイドの役割については、個々の PSTPIP2, SH3YL1, ARAP1 タンパク質を採り、リポソームを用いて膜変形作用を調べる。更には分子生物学的手法を用いて、様々な変異体を作成し、膜変

形作用や他の分子との結合活性を調べる。また細胞に発現させ、ポドソーム形成やドーサルラッフル形成への効果や、細胞内局在や膜の形への影響を細胞生物学的手法で明らかにする。

#### 4. これまでの成果

##### ①細胞の微細構造構築に関わるホスホイノシタイド結合タンパク質

PSTPIP2 はマクロファージに特異的に発現している F-BAR ドメインを有するタンパク質であるがその生理的意義は不明であった。ほとんどの F-BAR タンパク質は F-BAR ドメインの他に SH3 ドメインを有するが、PSTPIP2 は SH3 ドメインを欠損し、F-BAR タンパク質に対してドミナントネガティブ的に働いている事を突き止めた。FBP-17 などの F-BAR ドメインを有するタンパク質を過剰発現させると、マクロファージで異常に多くのポドゾームが形成され、PSTPIP2 の発現は逆にポドゾーム形成を抑制した。更に、PSTPIP2 のノックダウン細胞ではポドゾーム形成が著明となり、PSTPIP2 がポドゾーム形成を抑制していることを明らかにした。

SH3YL1 は SYLF ドメインと我々が名付けた新たな脂質結合ドメインを有し、PI(3,4,5)P3 と結合し、ドーサルラッフル (マクロピノサイトーシス) に局在した。SYLF ドメインにはホスホイノシタイド含有リポソームを小さな断片化する膜変形活性を有し、SYLF ドメイン中の両親媒性ヘリックスがその活性に必要である事を明らかにした。更に SH3YL1 が SHIP2 という PI(3,4,5)P3 5-ホスファターゼと結合し、PI(3,4,5)P3 を PI(3,4)P2 に変換する活性がドーサルラッフル形成に必須であった。

##### ②時空間特異的なホスホイノシタイドの調節によるホスホイノシタイド結合タンパク質の局在制御

インスリン情報伝達特異的にシグナルを負に制御する PI(3,4,5)P3 5-ホスファターゼ、SKIP が何故インスリンシグナル特異的に PI(3,4,5)P3 の時空間制御を行なえるのかを調べた。その結果、無刺激時には SKIP は小胞体中で GRP78 と結合し、活性の無い状態に保たれているが、インスリン刺激を受けると細胞膜へと移動し、GRP78 と離れて Pak1 と結合する。その結果インスリン受容体近くで産生される PI(3,4,5)P3 を時空間特異的に分解できるので、他のホスファターゼと異なり、インスリンシグナルを特異的に制御出来ることを証明した。

ゴルジ体に存在する Sac1 PI4P 4-ホスファターゼのノックダウンにより、MCF-7 細胞の細胞間接着が弛み (EMT 様現象)、運動能、浸潤能が上昇した。Sac1 ノックダウン細胞ではゴルジの PI4P 量が上昇していた。逆に PI4P を減少させる PI4KIIIβ のノックダウンでは

Cadherin-11 の細胞間接着部位での局在が増し、浸潤能も低下した。乳がん細胞の多くの症例で Sac1 の減少や PI4KIIIβ の上昇が認められていることより、これらをターゲットに新たながんの浸潤転移を抑制するような薬剤の開発が可能かもしれない。

#### 5. 今後の計画

我々が見いだしていた、細胞外突起形成に働く IRSp53 を新たな研究対象に加えたい。すでに我々は IRSp53 及びその類似体が微絨毛形成に必須である事を発見している。IRSp53 は微絨毛の先端に Eps8 と共局在し、IRSp53 のノックダウンにより微絨毛の形成が抑制される。如何にして IRSp53 が微絨毛形成に関与しているかを明らかにしたい。

ER ストレスによってどのようにして SKIP の発現が増すのか？がん患者において体重が減少し、筋肉量が減少するカヘキシアががん患者の体力を奪う大きな問題となっている。インスリンシグナルは筋肉の再生にも関与しており、実際 SKIP のヘテロノックアウトマウスでは筋肉量の増大が認められる。今後 SKIP のカヘキシアへの関与について明らかにし、SKIP 抑制で筋量の減少が抑制できるかを確かめる。

ゴルジ体での PI4P の機能についても、GOLPH3 の下流で何が細胞接着を制御しているのかを明らかにしたい。更には PI4P III の阻害剤を探し、がん細胞の浸潤転移がどの程度抑制できるかを確かめ、新たながん治療薬開発の足掛かりとしたい。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)  
Antagonistic regulation of F-BAR protein assemblies controls actin polymerization during podosome formation.: Tsujita K, Kondo A, Kurusu S, Hasegawa J, Itoh T, \*Takenawa T, *J. Cell Sci.* 126, 2267-2278 (2013)

srGAP1 regulates lamellipodial dynamics and cell migratory behavior by modulating Rac1 activity.: Yamazaki D, Itoh T, Miki H, \*Takenawa T, *Mol. Biol. Cell* 24, 3393-3405 (2013)

SH3YL1 regulates dorsal ruffle formation by a novel phosphoinositide-binding domain. Hasegawa J, Tokuda E, Tenno T, Tsujita K, Sawai H, Hiroaki H, Takenawa T, Itoh T, *J. Cell Biol.* 193, 901-916 (2011)

その他 平成 24 年度 上原賞 受賞

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/lipid/>