

科学研究費補助金（学術創成研究費）公表用資料
〔研究進捗評価用〕

平成18年度採択分

平成21年4月27日現在

研究課題名（和文） ホスホイノシタイドによるシグナルの時空間制御

研究課題名（英文） Spatial and temporal regulation of signaling molecules by phosphoinositides

研究代表者

竹縄 忠臣 (Takenawa Tadaomi)

所属研究機関・部局・職 神戸大学院医学研究科 特命教授



推薦の観点：ホスホイノシタイドは様々な生理機能をコントロールしその異常で様々な疾患が生じることが分かってきた。しかし脂質は扱いが煩雑であるため、その重要性にもかかわらずその研究が進展しなかった。革新的な技術の開発を持って、ホスホイノシタイド研究を強力に押し進める事が必要である。

研究の概要：微量のホスホイノシタイドを高感度に検出する方法を開発し、細胞内での局在を観察できるようにする。ホスホイノシタイド結合ドメインを持つ蛋白質を網羅的に分析し、その生理機能を明らかにする。SKIPのインスリン特異的なGlut4の膜への移行の機序を明らかにし、ホスホイノシタイドの時空間制御に迫る。ホスホイノシタイド代謝酵素のノックアウトマウスの作成と個体機能の解明を通して、ホスホイノシタイドの制御機序を明らかにする。

研究分野：脂質生化学

科研費の分科・細目：生物化学・機能生物化学

キーワード：ホスホイノシタイド、脂質結合蛋白質、リン脂質

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物には7種のホスホイノシタイドが存在し、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の役割以外に、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。またこれらの脂質代謝の乱れが癌や糖尿病を始めとする、様々な疾病の原因になることも分かり、ホスホイノシタイドの重要性がますます認識されてきている。

2. 研究の目的

本研究では個々のホスホイノシタイドに特異的かつ高親和的に結合するドメインを利用した、①「全く新しい考えに基づくホスホイノシタイドの微量定量、検出法を確立する」。この方法を応用し、様々な細胞刺激や疾病に伴うホスホイノシタイドの変化を明らかにする。更に、②「新たなホスホイノシタイド結合ドメインを探索しその生理機能を明らかにする」。PI(3,4,5)P3はAkt/PKBやG蛋白質など数多くの重要な蛋白質の機

能制御に関わっている。PI(3,4,5)P3の量的、局所的制御機構を明らかにするため③「PI(3,4,5)P3ホスファターゼのSKIPやPTENがどのようなコンパートメントのPI(3,4,5)P3を特異的に分解し、シグナルの局在化を行っているのかを明らかにする」。④これらの代謝酵素のノックアウトマウスを作成して、糖代謝、脂質代謝、癌発生への影響を調べる。

3. 研究の方法

- ① 各々のホスホイノシタイドに特異的に結合するドメインを選定し、それらのドメインを用いてホスホイノシタイドの感度のよい検出法を開発する。
- ② ホスホイノシタイドを含むリポソームに結合する蛋白質をラットの脳の可溶性画分から網羅的にとり、質量分析器でそれらの蛋白質を同定し、それらの生理機能を明らかにする。
- ③ PI(3,4,5)P3ホスファターゼであるSKIPのノックアウトマウスの作成や、ノックダウンした細胞をもちいて、PI(3,4,5)P3の局所的制御機序を明らかにする。
- ④ ホスホイノシタイド合成、代謝酵素のノ

ックアウトマウスを作成し、個体でのホスホイノシタイドの機能を明らかにする。

4. これまでの成果

- ① ホスホイノシタイドの可視化は GFP を融合させたドメインを用いて、PI(3,4,5)P3 や PI(4,5)P2 などの細胞内局在が見られている。この方法は生きている細胞内での脂質の動態を見れるという利点がある反面、細胞にトランスフェクションする必要がある、最大の欠点は発現させたプローブが脂質と結合し、その生理機能を阻害するため、生理的機能下での局在を見る事が難しい。またこの方法はトランスフェクションできないような細胞や組織には適応できない。そこで我々は様々な局面での細胞や患者からの組織にも適応できる方法を開発した。更に感度をあげ、非特異的な自然蛍光のない領域波長の Q-dot をプローブに結合させ、同時に 3 種のホスホイノシタイドを可視化できた。この方法は今まで見る事のできなかった、細胞や病理サンプルの脂質の変化を直接見る事ができる。様々な疾患でのホスホイノシタイドの変化をみる事ができるようになった。
- ② 脳からの脂質で作ったリポソームに結合する蛋白質を質量分析装置、LS-MS-MS で解析した。大部分が従来報告されている PH ドメインや PX ドメインなどの脂質結合ドメインを持つもの、細胞骨格調節蛋白質や GTP 結合蛋白質調節蛋白質であったが、結合活性が報告されていない蛋白質もあった。Coronin1A を取り上げ詳しく調べた。Coronin1A は酸性脂質の中でも特に PI(4,5)P2 と強く結合した。Coronin1A は Arp2/3 を活性化させアクチンの重合をひきおこし、アクチン線維の枝分かれを抑制する。しかし PI(4,5)P2 はアクチンの重合と枝分かれを抑制した。ホスホリパーゼ C の活性化で PI(4,5)P2 が分解されると Coronin1A は細胞膜から外れ、アクチン繊維上に移行した。
- ③ SKIP の KO マウスは胎生致死であったので、ヘテロマウスを作成し個体での機能を調べた。SKIP の発現減少はインスリン感受性を増し、高脂肪食肥満を抑制した。更には筋肉での Akt/PKB の活性化が亢進しグルコースの取り込みも増していた。更に詳しく作用機序を C2C12 細胞を用いて調べた。SKIP は刺激が無いときは小胞体に存在し、インスリンシグナルが活性化されると、Glut4 と共に膜へ移行し、その部位の PI(3,4,5)P3 を分解し、インスリンシグナルを負に制御した。

- ④ ホスホイノシタイド代謝酵素遺伝子を全身性あるいは組織特異的に欠損するマウス、酵素活性欠失変異体ノックインマウスなど 24 系統を独自に作出した。神経系において、inositol polyphosphate phosphatase (INPP) 4A がグルタミン酸細胞毒性の発現を阻止しており、この分子が欠損すると著しい中枢神経変性と舞踏病様不随意運動が生じること、また、phosphatidylinositol phosphate kinase (PIPK) III が神経突起内微小管の構築、オリゴデンドロサイトによる髄鞘化に重要であり、その欠損が運動麻痺へとつながることを見出した。

5. 今後の計画

- ①すでに微量ホスホイノシタイド検出法についてはほぼ確立したので今後は、応用面での展開を目指す。主に 1. 様々ながん組織を染め、PI(3,4,5)P3 量の蓄積を観察し、がんの種類や悪性度などとの関係をさぐる。2. 3 次元培養の系を用いた、上皮細胞の管腔形成を行い、ホスホイノシタイドがどのような部位に局在し、極性形成にかかわるかを調べる。
- ②新たに取れたドメインを細胞に発現させ、膜変形作用を観察し、面白いものがあればそれらを先行させて解析する。
- ③SKIP に結合する蛋白質を網羅的にとり、質量分析装置で蛋白質を同定して、SKIP の膜へのベジクル輸送の機序を明らかにする。
- ④ノックアウトマウスの解析を続け、更なるホスホイノシタイドの個体での機能を明らかにしていく。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む) (研究代表者は太字、研究分担者は二重下線、 連携研究者は一重下線)

- (1) **Takenawa T.** and Suetsugu S.
The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton.
Nature Rev. Mol. Cell Biol. 8, 37-48 (2007)
- (2) Tsujita K., Sasaki N., Furutani M., Oikawa T., Suetsugu S. and **Takenawa T.**
Coordination between actin cytoskeletal reorganization and the membrane deformation by a novel membrane tubulation domain of the PCH protein family involved in endocytosis
J. Cell Biol. 172, 269-279 (2006)
- (3) Nishio, M., Sasaki T. (19 名中 19 番): Control of cell polarity and motility by the PI(3,4,5)P3 phosphatase SHIP1. Nature Cell Biol. 9, 36-44, 2007

ホームページ等

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