

# イノシトールリン脂質とシグナル蛋白質の分子相関

## Molecular Interaction of Inositolphospholipids with Signal Proteins

(研究プロジェクト番号：JSPS-RFTF 96L00308)

プロジェクトリーダー

竹縄 忠臣 東京大学医科学研究所・教授

コアメンバー

深見希代子 東京大学医科学研究所・講師

望月 康弘 東京大学医科学研究所・教務職員



### 1. 研究目的

イノシトールリン脂質はホルモンなどの刺激を受けて分解され、イノシトール1,4,5-リン酸とジアシルグリセロールという2つの2次メッセンジャーを産生するが、イノシトールリン脂質そのものが細胞骨格、細胞運動、分泌などの細胞機能を直接調節していることが明らかになりつつある(図1)。これらの調節は脂質量の調節および脂質を認識し、結合して機能変化をおこすドメインを介して行われる。本プロジェクトでは1. イノシトールリン脂質の合成や分解がどのような機序で調節されているかを明らかにする。2. 新たなイノシトールリン脂質結合蛋白質の探索と機能調節機序の解明、の2点に絞り研究をすすめた。

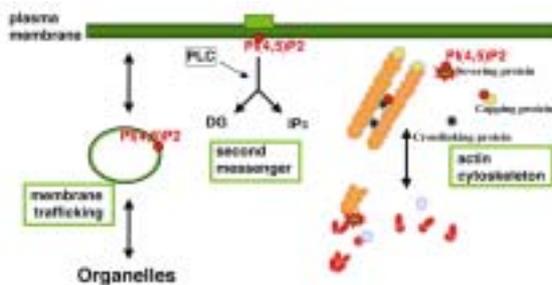


図1. イノシトールリン脂質は様々な機能を有する。

PIP キナーゼが刺激依存的な脱リン酸化によって活性化され、代償性の PI(4,5)P2 合成を引き起こすことを示している(図2)。PI(4,5)P2 はアクチン調節蛋白質に結合し、細胞骨格系をコントロールする重要な役割を果たしているにも関わらず、PLC のそれらの蛋白質に結合している PI(4,5)P2 を切る活性は弱い。よってホスファターゼがアクチン調節蛋白質に結合した PI(4,5)P2 を分解し、アクチン線維の構築を調節しているのではないかと考えた。その通り、このホスファターゼの1つであるシナプトジヤニンはアクチン調節蛋白質に結合している PI(4,5)P2 を切断し、細胞骨格系に影響を与えることができることを示した。

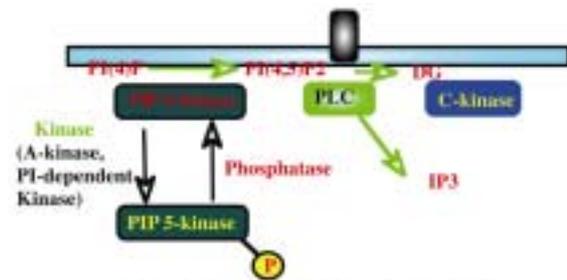


図2. PIPキナーゼのリン酸化による調節

### 2. 研究成果概要

#### 2.1 イノシトールリン脂質の合成、分解酵素とその調節機序

PI(4,5)P2 は外部刺激を受けて活性化された PLC によって分解され急激にその量が減少するが、やがて代償性の再合成が起こるため、PI(4,5)P2 の枯渇が防がれ、持続的な 2nd メッセンジャー供給ができると考えられてきたが、その機序は不明であった。そこで我々はタイプ I PIP キナーゼのリン酸化による活性調節を調べた。タイプ I PIP キナーゼは通常の細胞内ではリン酸化された状態で存在し、刺激を受けて脱リン酸化を受け、活性化された。タイプ I PIP キナーゼは蛋白質リン酸化活性も併せ持ち、自己リン酸化を起した。この自己リン酸化はリン脂質の PI によって特異的に著明に促進し、活性は逆にリン酸化によって阻害された。これらの結果は PI 存在下で抑制されていたタイプ I

#### 2.2 新たなイノシトールリン脂質結合蛋白質の探索と機能調節機序の解明

我々は PI(4,5)P2 がアクチン調節蛋白質に結合して、活性を調節し、細胞骨格の再編に関わっていることを示してきたが、今回新たな PI(4,5)P2 の機能を見つけるため新たな PI(4,5)P2 結合ドメインの探索を行った。PH ドメイン以外の PI(4,5)P2 結合ドメインを探索し、エンドサイトーシスに関与する epsin 蛋白質の ENTH ドメインを新たな PI(4,5)P2 結合ドメインとして見いだした。更に結合の分子機序を明らかにするため NMR による高次構造を調べた。ENTH ドメインは合計 6 個のアロファーヘリックスのみより成る構造をしていた。PI(4,5)P2 との結合には N 末の構造を取らない塩基性に富むアミノ酸配列とヘリックス 3 とヘリックス 4 の間の塩基性に富むループが必須であった(図3)。その部位の塩基性アミノ酸をアラニンに置換すると結合活性は完全に失われた。

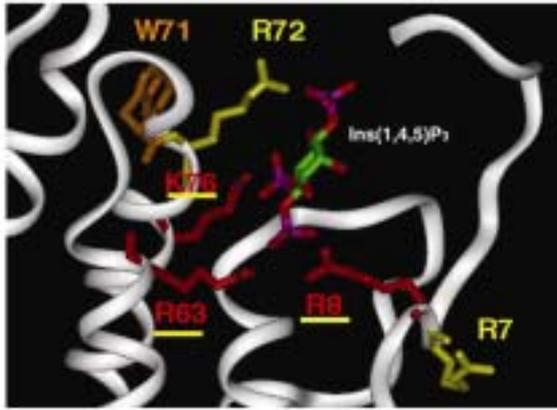


図3. PI(4,5)P<sub>2</sub>のIP<sub>3</sub>部位とENTHドメインのアミノ酸との相互作用

Epsin はエンドサイトーシスの際に形成されるクラスリン複合体よりなるベジクル形成に必須であることが分かっている。その際に Epsin の ENTH ドメインに PI(4, 5)P<sub>2</sub> が結合することが必要であることを証明するため、PI(4, 5)P<sub>2</sub> に結合できない変異体 Epsin を細胞に発現させ EGF の細胞内への取り込みへの影響を調べた。このような変異体は EGF の細胞内取り込みを完全に抑制した。ENTH ドメインを持つ蛋白質は更に数種類存在し全てがエンドサイトーシスに関わる蛋白質であることから PI(4, 5)P<sub>2</sub> の結合はベジクル輸送の膜へのターゲティングに深く関わっていることが示唆される。

### 主な発表論文

- (1) Itoh T., Ishihara. H., Shibasaki, Y., Oka Y. and Takenawa T: Autophosphorylation of type I phosphatidylinositol phosphate kinase regulates its lipid kinase activity. *J. Biol. Chem.* 275 19389-19394 (2000)
- (2) Sakisaka, T., Ito, T., Miura, K., and Takenawa, T: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphatase regulates the rearrangement of actin filaments. *Mol. Cell Biol.* 17, 3641-3649 (1997)
- (3) Itoh, T., Yokoyama, S., Kikuchi, H. and Takenawa T: Autophosphorylation of type I phosphatidylinositol phosphate kinase regulates its lipid kinase activity. *Science* 291, 1047-1051 (2001)