

機関番号：14501

研究種目：学術創成研究費

研究期間：2006～2010

課題番号：18GS0312

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 signalling molecules  
by phosphoinositides

研究代表者

竹縄 忠臣 (TAKENAWA TADAOMI)

神戸大学・大学院医学研究科・特命教授

研究者番号：40101315

研究成果の概要（和文）：

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PHドメインをQ-dotプローブに結合させ、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、可視化を確立した。本法により、同時に3種のホスホイノシタイドを定量、可視化できた。FBP17やCIP4がF-Barドメインというホスホイノシタイド結合ドメインを持ち、膜変形作用があることを発見した。更に、それらが多量体フィラメントを形成して、細胞膜をチューブ状に変形させ、内向きの突起を形成し、エンドサイトーシスに関与している事を明らかにした。また全く新しいホスホイノシタイド結合ドメインとしてSH3YL1蛋白質のSYLFドメインを見つけ、マクロピノサイトーシスに関与している事を示した。

研究成果の概要（英文）：

We developed a new method to quantify and visualize phosphoinositides by the use of Q-dot labeled PH domains which recognize phosphoinositides with high affinity and specificity. By this method, three different phosphoinositides were quantified and visualized simultaneously. We found that FBP17 and CIP4 proteins have F-Bar domains that bind phosphoinositides and deform membranes. F-Bar domain forms a polymerized filament and changes plasma membrane to tube-like structure, resulting in the formation of invaginated pits. We also found a new phosphoinositide binding domain, SYLF domain in SH3YL1, which was involved in the formation of macropinocytosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	77,200,000	23,160,000	100,360,000
2007年度	72,600,000	21,780,000	94,380,000
2008年度	63,800,000	19,140,000	82,940,000
2009年度	63,800,000	19,140,000	82,940,000
2010年度	59,800,000	17,940,000	77,740,000
総計	337,200,000	101,160,000	438,360,000

研究分野：細胞生物

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、細胞内情報伝達、脂質結合蛋白質、膜変形作用

## 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。ホスホイノシタイドの様々な生理機能を明らかにするには、まずそれら脂質の定量やイメージングの技術開発が必要である。更に、ホスホイノシタイドの様々な生理機能は脂質結合蛋白質を介して行なわれている事も明らかになってきた。よって、結合蛋白質を探索し、その機能を明らかにすることも、ホスホイノシタイドの生理小脳の時空間制御の解明に必要であると考えられた。

## 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」。③ホスホイノシタイド結合蛋白質の中で、膜をチューブ状にする膜変形活性を有するFBP17、CIP4 や IRSp53 などの膜変形の機序を明らかにする。④PI(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「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」。⑤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。⑥研究期間終了間際になって、新たなホスホイノシタイド結合ドメイン「SYLF」ドメインを見つけた。全く新しい機序の膜変形作用を有していたので、期間を一年延長してその機序の解明を行なった。

## 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。更には、細胞内の個々のホスホイノシタイドを可視化して、局在が見れるシステムを確立する。

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 ホスホイノシタイド結合蛋白質の中で、膜変形作用のあるものを選択し、膜変形機構について調べる。

④ 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。

⑤ 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。

⑥ ホスホイノシタイド結合ドメインの中でチューブ形成とは違った、膜変形作用を持つ SYLF ドメインの解析を行ない、生理機能を明らかにする。

## 4. 研究成果

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。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つた、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。本法の開発によって、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。応用例として、インスリン刺激した際の、PI(3, 4, 5)P3 や PI(4, 5)P2 及び PI(3, 4)P2 の変化を同時に定量した。更に、これらの3種の脂質の細胞内動態を同時に可視化した。

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 細胞は刺激に応答して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)を形成して細胞遊走を行ない、エンドサイトーシスに際しては内側向きの突起(陥入構造)を形成し、細胞内膜輸送を行なう。その際、FBP17 や CIP4 などのホスホイノシタイド結合タンパク質に膜変形作用があることを発見し、それらが多量体フィラメントを形成し、細胞膜を螺旋状に包み込み、チューブ状に変形させ、内向きの突起を形成するとともに N-WASP と結合して、アクチン骨格系と結びつきエンドサイトーシスに必要な運動能を獲得することを明らかにした。更に、IRSp53 がホスホイノシタイドを含む膜を外向きのチューブに形成して、糸状仮足や葉状仮足の様な膜突起構造を作る事を証明した。これらホスホイノシタイドによるダイナミックな細胞機能制御を通して細胞骨格再編、細胞膜の形作り、細胞遊走の基本概念の確立に深く寄与し、その異常ががん細胞の浸潤、転移に関与していることを明らかにした

④ 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。SKIP の活性がどのように制御されているかを調べた。SKIP はインスリン刺激のないときは小胞体で GRP73 と結合し、インスリン刺激を受けると膜に移行して、GRP73 と解離して PAK2 と結合し、インスリン受容体の近傍にあって、PI(3, 4, 5)P3 を分解してインスリンシグナルを負に制御する事を突き止めた。

⑤ 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。

⑥ SH3YL1 の持つ SYLF ドメインという新しい

ドメインは今まで見つけれられた Bar, F-Bar, I-Bar ドメインがチューブ形成するのに対して、リボソームの断片化を生じた。SH3YL1 は PI(4, 5)P2 と特異的に結合し、細胞内ではマクロピノサイトーシスにあり、SH3YL1 のノックダウンはマクロピノサイトーシスを完全に抑制した。SH3YL1 はマクロピノサイトーシスの余剰な膜を断片化して細胞膜にリサイクルするのに必要であると思われた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 38 件) (総計 98 件)

【神戸大学】

1. Ijuin, T., Takenawa, T. Regulation of insulin signalling and glucose transporter 4 (GLUT4) exocytosis by the phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate (PIP3) phosphatase, SKIP. J Biol Chem. 査読有, 2012 Jan 15. [Epub ahead of print]
2. Irino, Y., Tokuda, E., Hasegawa, J., Itoh, T., Takenawa, T. Quantification and visualization of phosphoinositides by quantum dot-labeled specific binding-domain probes. J Lipid Res. 査読有, 2012 Feb 3. [Epub ahead of print]
3. Hasegawa, J., Tokuda, E., Tenno, T., Tsujita, K., Sawai, H., Hiroaki, H., Takenawa, T., Itoh, T. SH3YL1 regulates dorsal ruffle formation by a novel phosphoinositide-binding domain. J. Cell Biol. 査読有, 193, 901-916 (2011)
4. Tsujita, K., Itoh, T., Kondo, A., Oyama, M., Kozuka-Hata, H., Irino, Y., Hasegawa, J., and Takenawa, T. Proteome of acidic phospholipid-binding proteins: Spatial and temporal regulation of coronin 1A by phosphoinositid. J Biol Chem. 査読有, 285, 6781-6789 (2010)
5. Mizokami, A., Tanaka, H., Ishibashi, H., Umebayashi, H., Fukami, K., Takenawa, T., Nakayama, KI., Yokoyama, T., Nabekura, J., Kanematsu, T., and Hirata, M. GABA(A) receptor subunit alteration-dependent diazepam insensitivity in the cerebellum of phospholipase C-related inactive protein knockout mice. J Neurochem. 査読有, 114, 302-310 (2010)

6. Takenawa, T. Phosphoinositide-binding interface proteins involved in shaping cell membranes. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 査読有, 86, 509-523 (2010)
7. Kurisu, S., and Takenawa, T. WASP and WAVE family proteins: Friends or foes in cancer invasion? *Cancer Sci.* 査読有, 101, 2093-2104 (2010)
8. Takano, K., Takano, H., Suetsugu, S., Kurita, S., Tsujita, K., Kimura, S., Karatsu, T., Takenawa, T., and Endo, T. Nebulin and N-WASP cooperate to cause IGF1-induced sarcomeric actin filament formation. *Science.* 査読有, 330, 1536-1540 (2010)
9. Itoh, T., Hasegawa, J., Tsujita, K., Kanaho, Y., and Takenawa, T. The tyrosine kinase Fer is a downstream target of the PLD-PA pathway that regulates cell migration. *Sci Signal.* 査読有, 2, ra52. (2009)
10. Ikononov, OC., Sbrissa, D., Ijuin, T., Takenawa, T., and Shisheva, A. Sac3 is an insulin-regulated phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate phosphatase: gain in insulin responsiveness through Sac3 down-regulation in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 査読有, 284, 23961-23971 (2009)
11. Yamazaki, D., Kurisu, S., and Takenawa, T. Involvement of Rac and Rho signaling in cancer cell motility in 3D substrates. *Oncogene.* 査読有, 28, 1570-1583 (2009)
12. Fujita, A., Cheng, J., Tauchi-Sato, K., Takenawa, T., and Fujimoto, T. A distinct pool of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in caveolae revealed by a nanoscale labeling technique. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 査読有, 106, 9256-9261 (2009)
13. Ijuin, T., Yu, Y.E., Mizutani, K., Pao, A., Tateya, S., Tamori, Y., Bradley, A., and Takenawa, T. Increased insulin action in SKIP heterozygous knockout mice. *Mol. Cell Biol.* 査読有, 28, 5184-5195 (2008)
14. Oikawa, T., Itoh, T., Takenawa, T. Sequential signals toward podosome formation in NIH-src cells. *J. Cell Biol.* 査読有, 182, 157-169 (2008)
15. Yamazaki, D., Kurisu, S., and Takenawa, T. : Involvement of Rac and Rho signaling in cancer cell motility in 3D substrates. *Oncogene.* 査読有, 28, 1570-1583 (2009)
16. Oikawa, T., Itoh, T., Takenawa, T. : Sequential signals toward podosome formation in NIH-src cells. *J. Cell Biol.* 査読有, 182, 157-169 (2008)
17. Ijuin, T., Yu, Y.E., Mizutani, K., Pao, A., Tateya, S., Tamori, Y., Bradley, A., and Takenawa, T. : Increased insulin action in SKIP heterozygous knockout mice. *Mol. Cell Biol.* 査読有, 28, 5184-5195 (2008)
18. Kanzaki, N., Ogita, H., Komura, H., Ozaki, M., Sakamoto, Y., Majima, T., Ijuin, T., Takenawa, T., and Takai, Y. : Involvement of the nectin-afadin complex in PDGF-induced cell survival. *J. Cell Sci.* 査読有, 121, 2008-2017 (2008)
19. Uezu, A., Horiuchi, A., Kanda, K., Kikuchi, N., Umeda, K., Tsujita, K., Suetsugu, S., Araki, N., Yamamoto, H., Takenawa, T., and Nakanishi, H. : SGIPlalpha is an endocytic protein that directly interacts with phospholipids and Eps15. *J. Biol. Chem.* 査読有, 282, 26481-26489 (2007)
20. Sbrissa, D., Ikononov, OC., Fu, Z., Ijuin, T., Gruenberg, J., Takenawa, T., and Shisheva, A. : Core protein machinery for mammalian PtdIns(3,5)P2 synthesis and turnover that regulates the progression of endosomal transport: Novel Sac phosphatase joins the ArPIKfyve-PIKfyve complex. *J. Biol. Chem.* 査読有, 282, 23878-23891 (2007)
21. Yokoyama, T., Takano, K., Yoshida, A., Katada, F., Sun, P., Takenawa, T., Andoh, T., and Endo, T. : DA-Raf1, a competent intrinsic dominant-negative antagonist of the Ras-ERK pathway, is required for myogenic differentiation. *J. Cell Biol.* 査読有, 177, 781-793 (2007)
22. Shimada, A., Niwa, H., Tsujita, K., Suetsugu, S., Nitta, K., Hanawa-Suetsugu, K., Azkasaka, R., Nishino, Y., Toyama, M., Chen, L., Sugano, S., Shirouzu, M., Nagayama, K., \*Takenawa, T., and \*Yokoyama, S. ( Correspondent author) : Curved EFC/F-Bar domain dimers are jointed end to end into a filament for membrane invagination in endocytosis *Cell.* 査読有, 129, 761-772 (2007)
23. Takenawa, T., and Suetsugu, S. : The WASP-WAVE protein network: connecting

the membrane to the cytoskeleton. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 査読有, 8, 37-48 (2007)

24. Yamazaki, D., Oikawa, T., and Takenawa, T.: Rac-WAVE-mediated actin reorganization is required for organization and maintenance of cell-cell adhesion. *J. Cell Sci.* 査読有, 120, 86-100 (2007)

【秋田大学】

25. Sasaki, J., Kofuji, S., Itoh, R., Momiyama, T., Takayama, K., Murakami, H., Chida, S., Tsuya, Y., Takasuga, S., Eguchi, S., Asanuma, K., Horie, Y., Miura, K., Davies, EM., Mitchell, C., Yamazaki, M., Hirai, H., Takenawa, T., Suzuki, A., and Sasaki, T. The PtdIns(3,4)P2 phosphatase INPP4A is a suppressor of excitotoxic neuronal death. *Nature.* 査読有, 465, 497-501 (2010)
26. Kunisaki, Y., Sasaki, T. (16名中14番), Fukui, Y.: Sequential Regulation of DOCK2 Dynamics by Two Phospholipids during Neutrophil Chemotaxis. *Science*, 査読有, 17, 384-387 (2009)
27. Mogi, C., Sasaki, T. (14名中9番), Okajima, F.: Involvement of proton-sensing TDAG8 in extracellular acidification-induced inhibition of proinflammatory cytokine production in peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 査読有, 182, 3243-3251, (2009)
28. Garcon, F., Sasaki, T. (7名中6番), Okkenhaug, K.: CD28 provides T cell costimulation and enhances PI3K activity at the immune synapse independently of its capacity to interact with the p85/p110 heterodimer. *Blood.* 査読有, 111, 1464-1471, (2008)
29. Kuroda, S., T., Sasaki, T. (14名中3番), Suzuki, A.: Effective clearance of intracellular *Leishmania major* in vivo requires Pten in macrophages. *Eur J. Immunol.* 査読有, 38, 1131-1140, (2008)
30. Iwasaki, H., Sasaki, T. (9名中8番), Okamura, Y.: A voltage-sensing phosphatase, Ci-VSP, which shares sequence identity with PTEN dephosphorylates phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 査読有, 105, 7970-7975, (2008)
31. Tsukamoto, K., Sasaki, T. (7名中6番), Hazeki, O.: Critical roles of the p110 $\beta$  subtype of phosphoinositide 3-kinase in lipopolysaccharide-induced Akt activation and negative regulation of nitrite production in RAW 264.7 cells. *J. Immunol.* 査読有, 180, 2054-2061, (2008)
32. Wang, Y., Sasaki, T. (13名中9番), Abrams, C.: Loss of PIP5KI $\gamma$ , unlike other PIP5KI isoforms, impairs the integrity of the membrane cytoskeleton in murine megakaryocytes. *J. Clin. Invest.* 査読有, 118, 812-819, (2008)
33. Inoue-Narita, T., Sasaki, T. (18名中3番), Suzuki, A.: Pten deficiency in melanocytes results in resistance to hair graying and susceptibility to carcinogen-induced melanomagenesis. *Cancer Res.* 査読有, 68, 5760-5768, (2008)
34. Terada, Y., Sasaki, T. (8名中7番), Sasaki, S.: The PI3 kinase  $\gamma$ -Akt pathway mediates renal tubular injury induced by cisplatin nephrotoxicity. *Kidney Int.* 査読有, 180, 430-445, (2008)
35. Nakasaki, M., Sasaki, T. (6名中4番), Itoh, K.: IGF-I secreted by osteoblasts acts as a potent chemotactic factor for osteoblast. *Bone.* 査読有, 43, 869-879, (2008)
36. Wang, Y., Sasaki, T. (10名中6番), Abrams, C.: Loss of PIP5KI $\gamma$  demonstrates that PIP5KI isoform-specific PIP2 synthesis is required for IP3 formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 査読有, 105, 14064-14069, (2008)
37. Horan, K., Sasaki, T. (7名中6番), Mitchell, C.: Regulation of Fc $\gamma$ R-stimulated phagocytosis by the 72 kDa inositol polyphosphate 5-phosphatase. *Blood.* 査読有, 110, 4480-4491, (2007)
38. 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.* 査読有, 9, 36-44, (2007)

〔学会発表〕（計6件）（総計75件）

1. Takenawa, T. : Interface proteins between membrane and actin cytoskeleton. (CNIC Seminar, 15 March, 2010, Madrid, Spain)
2. Takenawa, T. : Phosphoinositide-binding proteins that induce membrane deformation. (Second International Conference on F-BAR Proteins, 1-3 October, 2009, Stockholm, Sweden)
3. Takenawa, T. : WASP/WAVE proteins are involved in invasion and metastasis of cancer cells. (Physiological Meeting, 22-23 Oct 2008, Seoul, Korea)
4. Takenawa, T. : Phosphoinositide-binding proteins that induce membrane deformation with N-WASP/WAVE proteins. (2nd Singapore Lipid Symposium, 5-7 March 2008, National University of Singapore)
5. Takenawa, T. : WAVES regulate lamellipodia formation and the movement of cancer cells with high Rac activity. (4th international Symposium on Functional molecules linked to neurodegeneration and oncogenesis, 25-26 October 2007, Nagoya)
6. Ijuin, T., Takenawa, T. : Specific regulation of insulin signaling in skeletal muscle by the PIP3 phosphatase, SKIP. (2nd International Symposium on the 21st century COE program, 23-25 June 2006, Akita Univ, School of Medicine, Akita)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹縄 忠臣 (TAKENAWA TADAOMI)  
神戸大学・大学院医学研究科・特命教授  
研究者番号：40101315

### (2) 研究分担者

佐々木 雄彦 (SASAKI TAKEHIKO)  
秋田大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：50333365

### (3) 連携研究者

伊藤 俊樹 (ITO TOSHIKI)  
神戸大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：30313092

伊集院 壮 (IJUIN TAKESHI)  
神戸大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：00361626

山崎 大輔 (YAMAZAKI DAISUKE)  
神戸大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：50422415