

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08532

研究課題名(和文) 膜動現象を制御するイノシトールリン脂質脱リン酸化酵素の肺発達・成熟における役割

研究課題名(英文) Physiological roles of Phosphoinositide-specific phosphatase in lung development and maturation through regulating membrane trafficking.

研究代表者

吉岡 和晃 (Yoshioka, Kazuaki)

金沢大学・医学系・講師

研究者番号：80333368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜に存在するホスファチジルイノシトール(PI)は脂質リン酸化酵素PI3キナーゼにより種々の3'-ホスホイノシチド(3'-PI)に変換され、細胞内小胞輸送やシグナル伝達に關する。Myotubularin-related protein (MTMR)ファミリーはPI-3リン酸(PI(3)P)をPIへと変換する3'-PIホスファターゼである。本研究課題では、MTMR4が肺組織においてII型肺胞上皮細胞(AECII)に高発現し、エンドソーム～リソソーム(エンドリソソーム)、オートファゴソームといった細胞内クリアランスを担う小器官の機能調節に重要な役割を果たすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サーファクタントを分泌するII型肺胞上皮(AECII)細胞は正常肺発生において肺胞を形成する組織幹細胞であり、また外部環境由来の病原体アラームシグナルをいち早く感知し、これらによる肺組織の障害に対する防御・修復応答に中心的な役割をはたすことが明らかになってきた。本研究の成果は、MTMR4がAECII細胞の細胞内クリアランス制御を介して細胞分化・増殖を調整して肺組織の構築および恒常性を維持する機能を有することを示した。この研究成果は肺形成・発達メカニズムの解明のみならず、肺線維症等の炎症性肺疾患(全世界の死亡原因第3)の病態解明と新しい治療法開発戦略において有用な情報を与える。

研究成果の概要(英文)：Phosphatidylinositol 3-phosphate (PI(3)P) is the predominant phosphoinositide species in early endosomes and autophagosomes, in which PI(3)P dictates traffic of these organelles. Phosphoinositide levels are tightly regulated by lipid-kinases and-phosphatases; however, a phosphatase that converts PI(3)P back to phosphatidylinositol in the endosomal and autophagosomal compartments is not fully understood. We investigated the subcellular distribution and functions of myotubularin-related protein-4 (MTMR4), which is distinct among other MTMRs in that it possesses a PI(3)P-binding FYVE domain, in lung alveolar epithelial cells. MTMR4 knockdown markedly suppressed the motility, fusion, and fission of PI(3)P-enriched structures, resulting in decreases in late endosomes, autophagosomes, and lysosomes. This project has unveiled that MTMR4 is essential for the integrity of endocytic and autophagic pathways.

研究分野：生理学

キーワード：ホスホイノシチド 脂質ホスファターゼ ミオチューブラリン関連タンパク質 PI3キナーゼ エンドサイトシス オートファジー リソソーム II型肺胞上皮細胞

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺線維症等の炎症性肺疾患は今日、全世界の死亡原因第3位となり約4人に1人の割合で罹患し、重篤化する。サーファクタントを分泌するII型肺胞上皮細胞(Alveolar epithelial cell type-II: AECII)は、肺組織の発生段階で重要な役割をはたす組織幹細胞としての役割を持つことが明らかになりつつある。また有害な化学物質や病原体など外部環境由来のアラームシグナルをいち早く感知し、これらによる肺組織の障害に対する防御・修復応答に中心的な役割をはたすことが明らかになってきた(参考文献1)。

各種の細胞膜イノシトールリン脂質(ポリホスホイノシタイド(PPI))は、低分子Gタンパク Rabと共に細胞内小胞輸送を精妙に制御する。このPPIは、エンドサイトーシス(内在化)、細胞内小胞輸送、オートファジー、細胞遊走などの膜動現象を制御する。形質膜・細胞内小器官膜に局在するPPIの合成・分解酵素群は、PPIレベルの調節を介して小胞輸送を制御するが、代謝酵素分子の実体と局在は十分に明らかとなっていない。我々はこれまで機能不明であったイノシトール環3位をリン酸化するPPI合成酵素“クラスII型PI3キナーゼ α 酵素(PI3K-C2 α)”が血管内皮において成長因子受容体内在化・その後のエンドソームへの輸送とシグナリングに必須であることを明らかにした(参考文献2)。その後、PI3K-C2 α と関連して機能するPPI特異的な3位脱リン酸化酵素・ミオチュブラリン関連タンパク質-4(MTMR4)を同定し、MTMR4全身性および臓器特異的ノックアウト(KO)マウスを作成した(未発表)。

2. 研究の目的

本研究課題では、MTMR4欠損マウスおよび培養肺胞上皮細胞モデルを用いて、1)肺形成・発達過程におけるAECII細胞のMTMR4の役割、2)AECII細胞の細胞内クリアランス機能(エンドリソソーム系およびオートファジー系)におけるMTMR4の役割、を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1)マウス各臓器におけるMTMR4のmRNA・タンパク質発現解析およびMTMR4遺伝子欠損マウスの表現型解析:C57BL/6J野生型マウス(雄、8週齢)より主要臓器を採取し、RNAおよびタンパク質を定法により抽出した。各臓器のmRNA量は、qPCR法により相対比較を行い、タンパク質発現量は抗MTMR4抗体を用いたウエストブロット法により定量比較した。更に、MTMR4欠損マウスの表現型を解析し、MTMR4のマウス発生・発達における役割を検討した。

2)ヒト肺胞上皮癌由来A549細胞を用いたMTMR4のエンドリソソーム・オートファゴソーム機能調節機構の解析:GFP融合MTMR4を遺伝子導入した細胞の共焦点蛍光顕微鏡観察および抗MTMR4抗体を用いた免疫染色法により、MTMR4の細胞内局在を解析した。更に、特異的siRNAによりMTMR4をノックダウンし、各オルガネラマーカーを用いたエンドソーム〜リソソーム(エンドリソソーム)経路、およびオートファジー経路の形態を詳細に解析した。また、飢餓状態におけるA549細胞のオートファジー経路を観察するために、mRFP-GFP-LC3Bオートファジーセンサーを遺伝子導入によって発現させ、オートファゴソームの形成およびリソソームとの融合によるオートリソソーム形成を評価した。

4. 研究成果

1)RaessらのGTEXデータベース解析の結果(参考文献3)によると、MTMR4のmRNAは他の臓器に比べ、脳組織(大脳皮質、小脳)に比較的多く発現していることが示されていたが、しかし実際、我々のマウス各臓器のウエストブロット解析の結果から、肺組織が最も発現量が多いことが確認された。更に、肺組織を構成する細胞の中でもAECII細胞における発現レベルが極めて高く、間質細胞(血管内皮、血管平滑筋、線維芽細胞)では殆ど検出されないことが明らかになった(図1)。興味深いことに、MTMR4欠損マウスは出生直後24時間以内に肺胞構築不全による呼吸不全が原因で全例死亡することが判明した(図2)。

2)ヒト肺胞上皮腺がん由来A549細胞において、MTMR4は主にRab7陽性後期エンドソーム

(PI(3,5)P₂プール)とLC3B陽性オートファゴソームに局在した。MTMR4はPI(3)Pに富むEEA1陽性初期エンドソームにはほとんど存在しなかった。特異的siRNAによりMTMR4をノックダウンすると、PI(3)P陽性小胞の融合・出芽のプロセスが障害され、Rab7陽性後期エンドソーム及

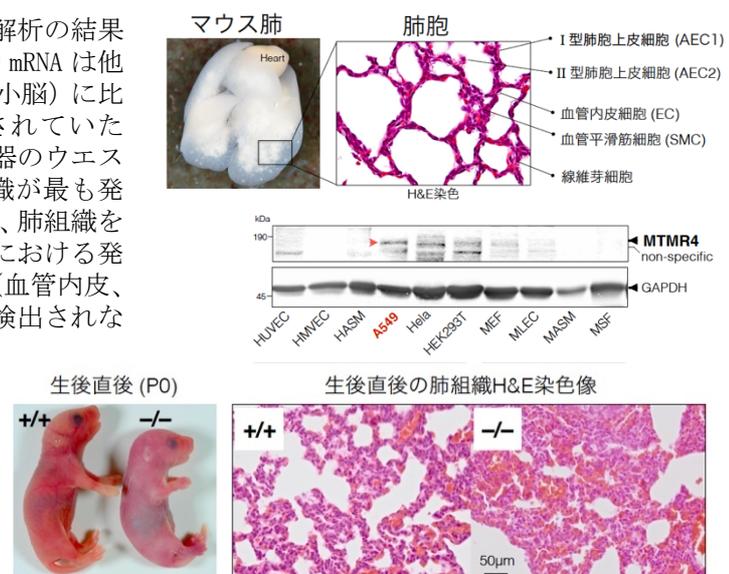


図2 MTMR4全身KOマウスは肺形成異常により生後直後に死亡

び LAMP1 陽性リソソーム数の減少、ならびに PI(3)P 陽性の肥大化・凝集した初期エンドソームと後期エンドソームが観察された。これら MTMR4 ノックダウンで観察された現象が、MTMR4 のホスファターゼ活性に依存しているのか確認するために、MTMR4 不活性化型変異 (C407S) かつ siRNA 耐性の変異体発現プラスミドおよび野生型で siRNA 耐性の MTMR4 発現プラスミドを作製し、レスキュー実験を試みた。その結果、MTMR4 ノックダウン細胞で見られた肥大化・凝集のエンドソーム異常は、野生型 MTMR4 の発現によりレスキューされ、正常な形態に戻った。

一方、MTMR4 不活性化変異体 (C407S) の強制発現では、MTMR4 ノックダウンによる異常形質をレスキュー出来なかった。これらのことから、MTMR4 は後期エンドソームにおいてホスファターゼ活性依存的に PI(3)P を PI へと分解することによって、リソソームとの融合、成熟を促進する PI 代謝酵素であることが示された(図3)。

また、飢餓状態の MTMR4 ノックダウン細胞において、エンドソームとオートファゴソームの融合小胞 (アンフィソーム) 及びオートリソソームの形成が著しく減弱しており、後期エンドソーム/オートファゴソームとリソソームとの融合の障害が示唆された。これは PI(3)P 陽性小胞 (初期エンドソーム、オートファゴソーム) から PI(3)P を分解・消去して各小胞が成熟しリソソームとの融合に進む過程に、MTMR4 が必須であることを示唆している。一方、飢餓ストレス応答性転写因子 Transcription factor-EB (TFEB) は、細胞が飢餓状態に置かれると核移行し、リソソーム・オートファジー関連遺伝子群の発現を亢進させることが知られている。興味深いことに、この過程が MTMR4 ノックダウン細胞において、著しく減弱し、これに伴うリソソーム関連遺伝子群の発現が有意に減少していた。これらの結果は、MTMR4 ノックダウン細胞におけるエンドソーム、オートファゴソーム、およびリソソームの形成異常および機能障害のメカニズムに TFEB の異常が関与することを示唆している。しかし、MTMR4 が TFEB の活性化および核移行を調節するメカニズムは現在分かっていない (図4)。

以上の結果から、後期エンドソームおよびオートファゴソームに局在する MTMR4 は、PI(3)P を脱リン酸化して PI に変換する必須の 3' -PI ホスファターゼであり、エンドリソソームおよびオートファジー経路の機能を調節して、細胞内クリアランス制御に関与することが示唆された。エンドサイトーシス、オートファジー機構によるリソソームを介した細胞内分解 (クリアランス) システムは、膜分子や外界から取り込んだ異物、不要となったタンパク質、脂肪、糖、を能動的に分解・再処理する装置である。7種のイノシトールリン脂質のうち、PI(3)P は初期エンドソーム、後期エンドソーム (多胞体) およびオートファゴソームに豊富であり、従来これらの細胞内小器官機能を制御する PI(3)P の主要産生酵素はクラス III 型 PI3K (Vps34) と考えられてきた。クラス III PI3K に加えて、近年の研究よりクラス II PI3K もエンドソームの PI(3)P レベルに寄与すると考えられている。14 種のアイソフォームからなる MTMR ファミリーの中で、MTMR4 が後期エンドソーム、オートファゴソームに局在する MTMR であることを同定した。MTMR4 はこれらの小胞分画の成熟、融合に関与し、エンドリソソーム・オートファジー経路による物質分解を調節することが示唆された。細胞内クリアランス機構は生命の重要な基本原理であり、MTMR4-KO マウスの今後の詳細な解析によって MTMR4 機能の解明が進むことが期待される。

参考文献

1. Kotton DN and Morrissey EE., Lung regeneration: mechanisms, applications and emerging stem cell populations. *Nature Medicine* (Review), 20(8), 822-832 (2014)
2. Yoshioka K. et al., Endothelial PI3K-C2α, a class II PI3K, has an essential role in angiogenesis and vascular barrier function. *Nature Med.* 18(10) 1560-1569 (2012).
3. GTEx Portal Website: <https://www.gtexportal.org/home/>

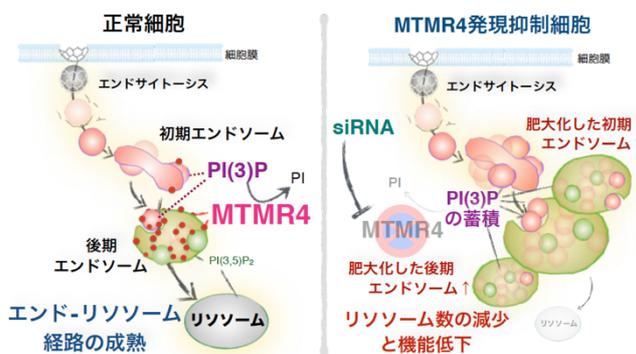


図3) MTMR4 によるエンドソーム～リソソーム (エンドリソソーム) 成熟の制御。

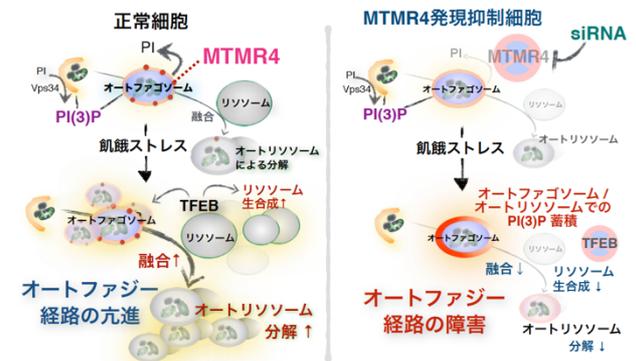


図4) MTMR4 によるオートファジー経路の制御。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Pham HQ, Yoshioka K, Mohri H, Nakata H, Aki S, Ishimaru K, Takuwa N, and Takuwa Y.	4. 巻 23
2. 論文標題 MTMR4, a phosphoinositide specific 3'-phosphatase, regulates TFEB activity and the endocytic and autophagic pathways.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 670-687
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12609.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Aung KT, Yoshioka K, Ishimaru K, Aki S, Takuwa N, and Takuwa Y.	4. 巻 69
2. 論文標題 The class II phosphoinositide 3-kinases PI3K-C2 and PI3K-C2 differentially regulate clathrin-dependent pinocytosis in human vascular endothelial cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Physiological Sciences	6. 最初と最後の頁 263-280
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12576-018-0644-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sarker AK, Aki S, Yoshioka K, Kuno K, Okamoto Y, Ishimaru K, Takuwa N, and Takuwa Y.	4. 巻 160
2. 論文標題 Class II PI3Ks and are required for Rho-dependent uterine smooth muscle contraction and parturition in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 235-248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/en.2018-00756.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kitano T, Takashima S, Inoue O, Goten C, Nomura A, Yoshioka K, Okajima M, Kaneko S, Takuwa Y, Takamura M.	4. 巻 511
2. 論文標題 Sphingosine-1-phosphate receptor 1 promotes neointimal hyperplasia in a mouse model of carotid artery injury.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Communi.	6. 最初と最後の頁 179-184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.02.047.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okumura K, Yoshida K, Yoshioka K, Aki S, Yoneda N, Inoue D, Kitao A, Ogi T, Kozaka K, Minami T, Koda W, Kobayashi S, Takuwa Y and Gabata T	4. 巻 2: 5
2. 論文標題 Photoacoustic imaging of tumor vascular permeability with indocyanine green in a mouse model.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Radiology Experimental	6. 最初と最後の頁 1 - 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41747-018-0036-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ohkura S, Usui S, Takashima S, Takuwa N, Yoshioka K, Okamoto Y, Inagaki Y, Sugimoto N, Kitano T, Takamura M, Wada T, Kaneko S and Takuwa Y.	4. 巻 12(8)
2. 論文標題 Augmented sphingosine 1 phosphate receptor-1 signaling in cardiac fibroblasts induces cardiac hypertrophy and fibrosis through angiotensin II and interleukin-6.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLOS One	6. 最初と最後の頁 e0182329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0182329	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mori M, Sakata K, Nakanishi C, Nakahashi T, Kawashiri M, Yoshioka K, Takuwa Y, Okada H, Yokawa J, Shimojima M, Yoshimuta T, Yoshida S, Yamagishi M and Hayashi K.	4. 巻 32(10)
2. 論文標題 Early endothelialization associated with a biolimus A9 bioresorbable polymer stent in a porcine coronary model.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Heart & Vessels	6. 最初と最後の頁 1244 - 1252
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00380-017-0992-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Serafimidis I, Rodriguez-Aznar E, Lesche M, Yoshioka K, Takuwa Y, Dahl A, Pan D and Gavalas A.	4. 巻 15 (3)
2. 論文標題 Pancreas lineage allocation and specification are regulated by sphingosine-1-phosphate signalling.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLOS Biology	6. 最初と最後の頁 e2000949
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) DOI:10.1371/journal.pbio.2000949	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yoshioka, K., Aung, KT., Sarker, Md.A.K., Aki, S., Biswas, K., Takuwa, N., Takuwa, Y.
2. 発表標題 Essential role of class II PI3K in endocytosis and endosomal signaling.
3. 学会等名 9th Federation of the Asia and Oceanian Physiological Societies (FAOPS2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Aki, S., Yoshioka, K., Takuwa, N., Takuwa, Y.
2. 発表標題 Sequential phosphoinositide conversion is required for TGF β -induced receptor endocytosis in ECs.
3. 学会等名 9th Federation of the Asia and Oceanian Physiological Societies (FAOPS2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Quynh Hoa Pham, Kazuaki Yoshioka, Azadul Kabir Sarker, Khin Thuzar Aung, Shahidul Islam, Sho Aki, Sato Nakamura, Noriko Takuwa, Yoh Takuwa
2. 発表標題 Myotubularin-related protein 4 (MTMR4), a phosphoinositide 3'-speciphosphatase, regulates endolysosome integrity and autophagy in A549 human lung carcinoma cells.
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Pham Quynh Hoa, Yoshioka Kazuaki, Azadul Sarker Kabir, Aung Thuzar Khin, Islam Shahidul, Aki Sho, Ishimaru Kazuhiro, Takuwa Noriko, Takuwa Yoh
2. 発表標題 Myotubularin-related protein 4 (MTMR4), a phosphoinositide 3'-phosphatase, regulates endolysosome integrity and autophagy flux in human lung alveolar epithelial A549 cells
3. 学会等名 第 95 回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sarker Kabir Azadul, Sho Aki, Yoshioka Kazuaki, Kuno Koji, Okamoto Yasuo, Aung Thuzar Khin, Pham Quynh Hoa, Islam Shahidul, Takuwa Noriko, Takuwa Yoh
2. 発表標題 Indispensable role of and isoforms of class II phosphoinositide 3-kinases (PI3K) in the uterine smooth muscle contraction during labor
3. 学会等名 第 95 回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Aung Thuzar Khin, Yoshioka Kazuaki, Aki Sho, Pham Quynh Hoa, Sarker Kabir Azadul, Islam Shahidul, Ishimaru Kazuhiro, Takuwa Noriko, Takuwa Yoh
2. 発表標題 Class II phosphoinositide 3-kinase isoforms PI3K-C2 and PI3K-C2 play essential roles in pinocytosis in vascular endothelial cells.
3. 学会等名 第 95 回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考