

機関番号： 15401
 研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2008 ~ 2010
 課題番号： 20590060
 研究課題名 (和文) イノシトールリン脂質代謝酵素欠損細胞バンクの作成
 研究課題名 (英文) Construction of a Bank of the Cells Lacking Phosphoinositide-Metabolizing Enzymes
 研究代表者
 樋木 修 (HAZEKI OSAMU)
 広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
 研究者番号： 80142751

研究成果の概要 (和文) :

RAW264.7 マクロファージを親細胞として、特定のイノシトールリン脂質代謝酵素を欠損した一群の細胞を作成した。この細胞バンクを用いて、マクロファージが異物を取りこみ、除去していく過程に関与するリン脂質代謝酵素群を特定した。リン脂質代謝酵素に対する選択的阻害薬は悪性腫瘍などの疾患の治療薬としても注目されている。今回、作成した細胞バンクはこれらの薬物の特異性の検討にも利用しうる。

研究成果の概要 (英文) :

A series of cells lacking phosphoinositide-metabolizing enzymes was prepared from RAW264.7 macrophages. The analysis with the cells identified a group of enzymes functioning in phagocytotic events. Selective inhibitors of phosphoinositide-metabolizing enzymes are attractive candidates for medicines such as anti-cancer drugs. The bank of the cells can be used to determine the specificity of the inhibitors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野： 生理化学

科研費の分科・細目： 薬学・生物系薬学

キーワード： イノシトールリン脂質代謝、shRNA、RAW264.7 細胞、ファゴサイトーシス、ファゴソーム、PtdIns(3)P、eGFP-FYVE

1. 研究開始当初の背景

イノシトールリン脂質は、他のリン脂質に比較して量的に少なく代謝回転が速いなどの理由から、細胞膜の単なる構築材料として以上の機能をもつことが古くから指摘されていた。その後の研究の進展は、このリン脂質成分がエネルギー代謝、細胞生存、細胞極性、細胞内輸送などの細胞機能の調節において

重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。イノシトールリン脂質のひとつの特徴は、イノシトール環の3/4/5位のいずれか、あるいは複数の箇所にリン酸が結合した7種の誘導体が生理的に存在し、その量的調節を可能とする多数の代謝酵素群が存在することである。一例として、クラス I 型として分類される PI3K には4種の触媒サ

ブユニットが存在している。これらは細胞の機能調節においてそれぞれ特有の役割を果たしていることが予測され、ノックアウト (KO) マウスの作成研究の成果は、個々の PI3K が担う特異的役割の一部を明らかにしてきた。また、KO マウスが致死である場合にも、さまざまな種由来のモデル細胞に特異的 siRNA や阻害薬を適用することによって、特異的機能の解析がなされてきた。しかし、機能ネットワークを形成する全てのイノシトールリン脂質代謝酵素の役割について、特定の細胞内における全貌を記述したという例はなかった。

2. 研究の目的

本研究では、生理機能の少なくとも一部を保持した細胞として RAW264.7 細胞を親株として選択し、個々のリン脂質代謝酵素を欠損した一群の細胞株を作成し、食食機能及び細胞内のイノシトールリン脂質の動態に及ぼす欠損の影響を評価することで、信頼に足る欠損細胞バンクを構築することを目的とした。

3. 研究の方法

1) イノシトールリン脂質代謝酵素欠損細胞株の作成

欠損細胞の作成手順および保存方法は下記のとおりである。

1. RAW264.7 細胞における標的酵素の mRNA の発現と塩基配列を確認する

2. 経験則に基づき、1 遺伝子に対して 3 種類の標的配列を決定する

3. ひとつの標的配列に対して 1 組 2 本のオリゴヌクレオチド (5' - C C C (X)₁₀ T T C A A G A G A (Y)₁₀ T T T T T G G A A A -3' 及び 5' - C T A G T T T C C A A A A A (Y)₁₀ T C T C T T G A A (X)₁₀ G G G T G C A -3') を合成し、pH1-DsR ベクターの Pst-XbaI サイトに組み込む。なお、ここで (X)₁₀ は標的配列を、(Y)₁₀ は相補配列を示している

4. 上記ベクターをエレクトロポレーションで RAW264.7 細胞に導入する。

5. pH1-DsR ベクターが導入された細胞を Ds-Red の蛍光を指標として 2 段階でクローニングし 10-20 クローン程度を取得する。

6. えられたクローンについて、標的蛋白質に対する特異的抗体および RT-PCR 法によって発現抑制を確認し、90%以上の消失が見られた細胞クローンを複数取得する。

7. 以上の手順でえられる酵素欠損細胞クローンは、shRNA ベクターをトランスフェクトした細胞であり、樹立株ではない。発現抑制を認めたクローンについては、継代数の浅い時期に充分数のストックを作成し、液体窒素中で凍結保存する

2) 細胞内のイノシトールリン脂質の動態の解析

作成した代謝酵素欠損細胞に、特定のイノシトールリン脂質と特異的に結合するタンパク質ドメインと蛍光タンパク質との融合タンパク質を一過的に発現させ、細胞がオゾン化された赤血球を貪食しているときの蛍光色素の動態を顕微鏡下において観察した。特異的結合ドメインとしては PtdIns (3,4,5)P₃ と特異的に結合する GRP1-PH、PtdIns (3,4)P₂ 及び PtdIns (3,4,5)P₃ と結合する Akt-PH、PtdIns (3)P と特異的に結合する EEA1-FYVE を利用した。また、蛍光タンパク質としては主に eGFP を用いたが、2種類のリン脂質の動態を同時に測定する場合には mRFP との融合タンパク質も利用した。細胞への導入はリポフェクタミンとプラス試薬を用いたリポフェクション法により行った。蛍光の動態観察には CFI Plan Apo VC60xH 油浸レンズを装着したキーエンス BZ-9000 顕微鏡を使用し、BZ-II 解析システムによってデータ解析を行った。

4. 研究成果

1) 作成したイノシトールリン脂質代謝酵素欠損細胞株

RAW264.7 細胞を親株とし、以下の酵素の mRNA 発現が 90%以上低下した細胞株を作成した。欠損細胞が得られた酵素の分類及び作成の際に用いた shRNA の標的配列は下記のとおりである。なお、p110{beta}、SHIP2 及び p150 については、ひとつの標的配列に対する siRNA を用いたのみでは十分な発現抑制を示す細胞が得られなかったため、ふたつの標的配列に対する siRNA を同時発現させることで、欠損細胞を作成した。

1. クラス I 型 PI3K

p110{alpha}: 5' -GAACAAGGGCGAGATATAT-3'
p110{beta}: 5' -GTGGAATAAACTTGAAGAT-3'
5' -GAAGCAGCCGTGTTATTAT-3'
p110{gamma}: 5' -GCAATGTGGAACAGATGAA-3'
p110{delta}: 5' -CACTGAATGACTTTGTGAA-3'

2. クラス II 型 PI3K^{α1}

C2{alpha}: 5' -GCACTGGAGAATGAAATAA-3'

3. クラス III 型 PI3K

VPS34: 5' -GCAAACCTCTCCATATAGA-3'
p150^{α2}: 5' -CCATGACTTTGAGTATGAT-3'
5' -GAAGGACTTCATGATGAAA-3'

4. PI5K

PIKfyve^{α3}: 5' -GATGATAGATTCATTCTGA-3'
VAC14^{α2}: 5' -CTCTTAAAGGACATTGTGA-3'

5. PI5Pase (type II)

SHIP1: 5' -GGAATGAAATGCTTGAAGA-3'
SHIP2: 5' -GATCCTGAACTACATTAGT-3'
5' -GAATGGATTAGCATTGATA-3'
Pharbin: 5' -GACCGAGAATTGACTTGA-3'

6. PI3Pase

PTEN: 5' -GAACAATATTGATGATGTA-3'

*1 クラス II 型 PI3K のうち C2{beta} 及び C2{gamma} については RAW264.7 細胞における mRNA の発現は認められなかった。また、PI4Pase のふたつのサブタイプ INPP4A, INPP4B の発現も認められなかった。*2 p150, VAC14 はそれぞれ VPS34, PIKfyve の制御因子である。*3 作成した欠損細胞の多くは顕著な形態上の異常を示さなかったが、PIfyve の欠損細胞においては細胞内に多数の巨大空胞の存在が認められた。このフェノタイプは研究期間内に公表された特異的阻害薬 YM201636 の作用と一致するものであった。

C2{alpha}, p150, PIKfyve, Pharbin の欠損細胞では特異的抗体が入手できなかったためタンパク質レベルでの発現変化は検討していない。これ以外の欠損細胞についてはタンパク質レベルで 70%以上の低下を観察している。

p110{alpha}, p110{beta}, p110{gamma}, p110{delta}, C2{alpha}, SHIP-1, SHIP-2 及び PTEN については RBL2H3 細胞を親株とした欠損細胞も作成した。得られた細胞は後述の研究で利用したほか、他の研究者による利用が可能のように、ストックを液体窒素中に凍結保存している。

2) RAW264.7 細胞の食食機能に及ぼす酵素欠損の影響 (p110{alpha} の特異的機能)

RAW264.7 細胞によるオプソニン化粒子の取り込みは PI3K の非選択的阻害薬であるワートマニンによって強く抑制される。この薬物の標的となることが知られる酵素のうち、p110{beta}, p110{gamma}, p110{delta}, VPS34 を欠損した細胞には食食量の変化を認めなかった。また、C2{beta} は RAW264.7 細胞での発現を認めなかった。p110{alpha} 欠損細胞ではオプソニン化された赤血球やザイモザン粒子の取り込みがほぼ消失していた他、デキストランの取り込みにも大きな低下が認められた。この結果は、食食機能の発揮における p110{alpha} の特異的機能を示したものである。p110{alpha} のどのような生化学的、細胞生物学的特性がこの特異性の発揮に関与しているかについては今後の重要な検討課題である。

PTEN の欠損細胞ではオプソニン化粒子の取り込み増大が観察された。SHIP-1 の欠損でも取り込みが増大したが、その程度は軽微なもの

であった。両酵素はいずれも PtdIns(3,4,5)P₃ の分解酵素であるが異なる代謝産物を産生する。従って、p110{alpha} が産生する PtdIns(3,4,5)P₃ が細胞の食食機能発揮に重要な役割を果たしているものと推察された。

3) 選択的 PI3K 阻害薬の特性評価における本細胞バンクの有用性

イノシトールリン脂質代謝酵素、ことに、クラス I 型 PI3K の選択的阻害薬は悪性腫瘍、リウマチ性関節炎、自己免疫疾患、セブシスなどの治療薬としての可能性が注目される。しかし、試験管内の単純化された系で発揮される選択性と、細胞環境中におかれてさまざまな制御因子と相互作用を行っている酵素に対する選択性がどの程度まで一致しているかは必ずしも明らかではない。本研究の過程で、p110{beta} の選択的阻害薬が p110{alpha} の機能である RAW264.7 細胞の食食を抑制する等の現象を観察した。この作用は p110{beta} 欠損細胞に対しても同様に観察されることから、p110{alpha} の抑制、あるいは PI3K 以外の標的に対する作用と考えられる。このように、本研究で作成された欠損細胞バンクは選択的阻害薬の特性の確認にも有用なものと評価しうる。

4) ファゴソームの PtdIns(3)P の動態に及ぼす酵素欠損の影響 (VPS34 の特異的機能と PTEN 及び PIKfyve の役割)

RAW264.7 細胞にオプソニン化された粒子を食食させ、蛍光タンパク質を用いてイノシトールリン脂質の動態を観察すると、ファゴソームの形成と成熟の過程において次のような変化が認められた。

1. 粒子を包み込むように伸びていく細胞膜上では顕著な PtdIns(3,4,5)P₃ の蓄積がおきており、これは粒子が細胞内部に取込まれファゴソームの形成が終了すると消失した。この全過程に要する時間は約4分であった。

2. 消失する PtdIns(3,4,5)P₃ と入れ替わるように、ファゴソーム膜上に PtdIns(3)P の蓄積がおこり、これもやがて消失した。ファゴソーム膜における PtdIns(3)P の寿命は約8分であった。

p110{alpha} 欠損細胞では粒子の取込みはおこらず、PtdIns(3,4,5)P₃ の蓄積も観察されなかった。PTEN 欠損細胞においては分解抑制に基づき PtdIns(3,4,5)P₃ の寿命は 2 倍ほどに延長していた。同様な寿命延長は PTEN を阻害することが知られる menadione による細胞処理によっても観察された。SHIP-1, SHIP-2, pharbin の欠損によっては顕著な寿命延長は観察できなかった。従って、ファゴソームの PtdIns(3,4,5)P₃ の合成と分解には、それぞれ、p110{alpha} と PTEN が主要な役割をしている

ものと考えられた。しかし、PTEN欠損細胞においても最終的にはPtdIns(3, 4, 5)P₃の消失がおきる。このとき、分解に関与する酵素(群)は現在不明である。

クラス III 型 PI3K に分類される唯一の触媒サブユニット VPS34、及び、その制御因子 p150 を欠損した細胞では、ファゴソーム上の PtdIns(3)P の蓄積量が大きく低下しており、寿命も短縮していた。クラス II 型 PI3K はある種の細胞において PtdIns(3)P を産生していることが知られているが、RAW264.7 に発現が確認できる唯一のアイソフォームである C2{α} を欠損させた細胞で PtdIns(3)P の動態変化は認められなかった。PTEN の欠損、PTEN 阻害薬 menadione 処理は PtdIns(3)P の消失速度の低下を導いた。PTEN は試験管レベルにおいて PtdIns(3, 4, 5)P₃ をよい基質とし、PtdIns(3)P に対する Km は 2桁大きいことが報告されているが、ファゴソームの PtdIns(3)P の除去に積極的に関与していることが想定された。PtdIns(3)P の寿命は PIKfyve の欠損細胞、PIKfyve 阻害薬 YM201636 処理によっても顕著に延長しており、PTEN と PIKfyve の機能を同時に失わせると、ファゴソームに出現した PtdIns(3)P は 30 分を経ても消失することはなかった。これまで PIKfyve の役割は PtdIns(3, 5)P₂ を産生することと考えられてきたが、このとき、PtdIns(3)P を消失させることも重要な機能のひとつと考えられた。従って PIKfyve 欠損細胞に認められる細胞内巨大空胞の形成には PtdIns(3)P の異常蓄積と PtdIns(3, 5)P₂ の欠乏の双方が関与している可能性が考えられた。PIKfyve の制御因子と目されている VAC14 の欠損細胞においては、現在のところ、巨大空胞の形成、PtdIns(3)P の寿命延長といった変化を観察できていない。VAC14 のマクロファージにおける機能に関して再検討が必要である。

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 4 件)

1. Okazaki N, Hazeki K, Izumi T, Nigorikawa K, Hazeki O; C5a controls TLR-induced IL-10 and IL-12 production independent of phosphatidylinositol 3-kinase; *J Biochem* 149, 265-274, 2011 (査読有)
2. Inui Y, Hazeki O; Acute effect of melatonin and its time of administration on core body temperature and heart rate in cynomolgus monkeys; *J Toxicol Sci* 35, 383-391, 2010 (査読有)
3. Tamura N, Hazeki K, Okazaki N, Kametani Y, Murakami H, Takaba Y, Ishikawa Y, Nigorikawa K, Hazeki O; Specific role of phosphoinositide 3-kinase p110{α} in the regulation of phago-

cytosis and pinocytosis in macrophages; *Biochem J* 423, 99-108, 2009 (査読有)

4. Takashima K, Matsunaga N, Yoshimatsu M, Hazeki K, Kaisho T, Uekata M, Hazeki O, Akira S, Iizawa Y, Ii M; Analysis of binding site for the novel small-molecule TLR4 signal transduction inhibitor TAK-242 and its therapeutic effects in mouse sepsis model; *Br J Pharmacol* 157, 1250-1262, 2009 (査読有)

[学会発表] (計 13 件)

1. 熊澤崇, 濁川清美, 榎木薫, 榎木修; 好中球の活性酸素産生を制御する PI3-キナーゼサブタイプの解明; 第 5 1 回日本生化学会中国・四国支部例会; 2010 年 5 月 15 日 (山口)
2. 高場雄貴, 榎木薫, 榎木修; マクロファージの食食におけるイノシトールリン脂質の動態の解明; 第 5 1 回日本生化学会中国・四国支部例会; 2010 年 5 月 15 日 (山口)
3. 伊藤裕太, 濁川清美, 榎木薫, 榎木修; 好中球の活性酸素産生を制御するイノシトールリン脂質 3 キナーゼ (PI3K) アイソフォームの解明; 第 8 2 回日本生化学会大会; 2009 年 10 月 24 日 (神戸)
4. 泉達宏, 小縣旬, 亀谷由紀子, 濁川清美, 榎木薫, 榎木修; Toll 様受容体を介する IL-12 産生におけるイノシトールリン脂質 3 キナーゼ (PI3K) のサブタイプ特異的な役割の解明; 第 8 2 回日本生化学会大会; 2009 年 10 月 24 日 (神戸)
5. 小縣旬, 濁川清美, 榎木薫, 榎木修; 抗体依存性食作用に関与するイノシトールリン脂質 3 キナーゼのサブタイプの解明; 第 8 2 回日本生化学会大会; 2009 年 10 月 24 日 (神戸)
6. 亀谷由紀子, 泉達宏, 小縣旬, 濁川清美, 榎木薫, 榎木修; イノシトールリン脂質 3 キナーゼ (PI3K) γ の CpG-DNA 刺激に特異的な役割 - IL-10 産生の増強と IL-12 産生の抑制 -; 第 8 2 回日本生化学会大会; 2009 年 10 月 24 日 (神戸)
7. 原里奈, 濁川清美, 榎木薫, 榎木修; マスト細胞のアレルギー反応におけるイノシトールリン脂質 3 キナーゼ (PI3K) の関与; 第 8 2 回日本生化学会大会; 2009 年 10 月 24 日 (神戸)
8. 伊藤裕太, 濁川清美, 榎木薫, 榎木修; 好中球の活性酸素産生に関わる PI3-キナーゼのサブタイプの解明; 第 8 回生命科学研究会; 2009 年 6 月 26 日 (神戸)
9. 田村奈美子, 榎木薫, 榎木修; Differential regulation of phagocytosis, macropinocytosis and micropinocytosis by phosphoinositide 3-kinase p110{α} in macrophages; 第 3 8 回日本免疫学会総会; 2008 年 12 月 3 日 (京都)

10. 岡崎夏実、樋木薫、樋木修; C5a inhibits LPS-induced IL-12 production by activation of phosphoinositide 3-kinase other than p110{gamma}; 第38回日本免疫学会総会; 2008年12月2日(京都)

11. 樋木修; (招待講演) ナフトキノン化合物のインスリンシグナル経路活性化作用; 生体キノン研究会; 2008年9月26日(大阪)

12. 樋木修; (招待講演) Class IA型PI 3-kinaseのサブタイプ特異的な機能; 千葉大学大学院薬学研究院特別講演; 2008年7月24日(千葉)

13. 田村奈美子、樋木薫、濁川清美、樋木修; マクロファージのエンドサイトーシスの制御におけるPI3K各サブタイプの役割; 第7回生命科学研究会; 2008年5月29日(別府)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樋木 修 (HAZEKI OSAMU)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 80142751

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし