

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 5 月 24 日現在

機関番号：11401

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21200075

研究課題名（和文） イノシトールリン脂質研究に新展開をもたらすパラダイムの構築

研究課題名（英文） Establishment of a new paradigm in the phosphoinositide research

研究代表者

佐々木 純子 (SASAKI JUNKO)

秋田大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：30333371

研究成果の概要（和文）：機能未知のイノシトールリン脂質 PI(3,4)P<sub>2</sub> を脱リン酸化して分解する酵素には、2 つのアイソザイム (L-PIPase と P-PIPase) が存在する。本研究では、L-PIPase と P-PIPase の各々が特異的に担う生理機能を明らかにし、この特異性の分子メカニズムを、各アイソザイムの基質となる PI(3,4)P<sub>2</sub> の分子種の違いに求めて詳解することを目指した。その結果、L-PIPase は神経細胞死に、P-PIPase は発癌に特異的に関与することを見出した。また、L-PIPase と P-PIPase が種々の PI(3,4)P<sub>2</sub> 分子種に対して異なる活性を有することを見出した。以上の結果より、両分子の生理機能の差が、基質とする PI(3,4)P<sub>2</sub> 分子種の違いに起因する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：There are two isozymes (L-PIPase and P-PIPase) which dephosphorylate PI(3,4)P<sub>2</sub>. However the functions of L-PIPase and P-PIPase are unclear. In this study we showed that L-PIPase suppresses neuronal cell death after brain ischemia while P-PIPase contributes to malignant progression. We also found that each enzyme has different activities against several PI(3,4)P<sub>2</sub> species. It is suggested that the different functions between L-PIPase and P-PIPase might be caused by the substrate specificity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2010 年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
2011 年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
年度			
年度			
総計	22,100,000	6,630,000	28,730,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：分子病態学

## 1. 研究開始当初の背景

リン酸化部位の組み合わせによって 8 種類に分類されるイノシトールリン脂質 (PIs) のうち、ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 (PI(4,5)P<sub>2</sub>) とホスファチジルイ

ノシトール 3,4,5-三リン酸 (PI(3,4,5)P<sub>3</sub>) については精力的な研究がなされ、多彩な細胞機能の制御、疾病の発症・進行への関与が明らかになっている。一方、ホスファチジルイノシトール 3,4-二リン酸 [PI(3,4)P<sub>2</sub>] は従来、PI(3,4,5)P<sub>3</sub> の単なる分解産物である

と捉えられることが多く、特異的な機能は不明であった。哺乳類には leucine-rich phosphoinositidephosphatase (L-PIPase) と proline-rich PIPase (P-PIPase) という二種類の PI(3,4)P<sub>2</sub> 分解酵素 (4 位脱リン酸化酵素) アイソザイムが存在する。研究代表者は、この 2 分子の遺伝子欠損マウスを作製・解析し、PI(3,4)P<sub>2</sub> が重要な生理活性脂質であること、そして、L-PIPase と P-PIPase は異なる生理機能を有するという予備知見を得ていた。同じ PIs 変換反応を有するアイソザイムが異なる生理機能を有するのはなぜか、これまでの PIs 代謝研究においてはこの点について明らかにされていなかった。

PI(3,4)P<sub>2</sub> は文字通り、イノシトール環の 3 位と 4 位がリン酸化されたホスファチジルイノシトールである。機能の違いを構造に求めると、それは、グリセロール骨格に結合した脂肪酸となる。そこで本研究では、L-PIPase と P-PIPase の機能の差異を、PI(3,4)P<sub>2</sub> の脂肪酸組成の違いに求めて詳解することを目指した。また本研究では、イノシトールリン脂質のグリセロール骨格特異的にアラキドン酸を導入する LPIAT (lyso phosphatidylinositol acyltransferase) の遺伝子欠損マウスを用い、LPIAT の欠損によるイノシトールリン脂質の脂肪酸組成の変化と生理機能の関係を解析した。

## 2. 研究の目的

本研究では、細胞種特異的 L-PIPase と P-PIPase の欠損マウスを作製し、L-PIPase と P-PIPase の生体における役割分担を明確にする。そして、PI(3,4)P<sub>2</sub> の分子種を検出する新たな測定方法の開発を試み、L-PIPase と P-PIPase の欠損細胞で蓄積する PI(3,4)P<sub>2</sub> 分子種を見出す。さらに、LPIAT の遺伝子欠損マウスを解析し、イノシトールリン脂質の脂肪酸組成の変化と生理機能の関連を解明する。

## 3. 研究の方法

### ① L-PIPase に特異的な生理機能の解析

ホスファターゼ活性中心を含むエクソンを挟む形で loxP 配列を挿入した L-PIPase<sup>flox/flox</sup> (flox: flanked by LoxP) マウスと P-PIPase<sup>flox/flox</sup> マウスを作製した。そして、神経特異的に L-PIPase または P-PIPase を欠損するマウスを作製し、比較した。また、L-PIPase の抗神経細胞死作用の病態生理的意義を探求する目的で、マウスでの脳虚血モデルを用いた解析を行った。

### ② P-PIPase に特異的な生理機能の解析

最近、様々なヒト癌において高頻度に、

P-PIPase のヘテロ接合性の消失 (LOH) が発見され、P-PIPase は新たな癌抑制遺伝子である可能性が示されている。そこで前立腺特異的 P-PIPase<sup>flox/flox</sup> マウスおよび L-PIPase<sup>flox/flox</sup> マウスを作製し、発癌に関して解析した。

### ③ PI(3,4)P<sub>2</sub> 脂肪酸組成の質量分析方法の確立

ホスファチジルイノシトールリン酸 (PIP<sub>2</sub>) の構造異性体が細胞膜脂質に占める割合は 1% 前後である。ほとんどが PI(4,5)P<sub>2</sub> であり、PI(3,4)P<sub>2</sub> レベルは静止状態の細胞で PI(4,5)P<sub>2</sub> の 1/100、細胞膜受容体刺激時でも 1/10 に満たない。そこで、イノシトールリン脂質を高純度に調製する方法やマスマスペクトルで区別ができない同一のフラグメントイオンを生成する PI(4,5)P<sub>2</sub> と PI(3,5)P<sub>2</sub> を、予め試料から除去する方法を検討した。

### ④ LPIAT 欠損マウスを用いた解析

生体での解析を可能とするために、LPIAT<sup>flox/flox</sup> マウスを樹立した。LPIAT 欠損マウスの骨髄より肥満細胞を調製し、リン脂質の脂肪酸組成と細胞機能 (脱顆粒反応と細胞死) について解析した。

## 4. 研究成果

### ① L-PIPase に特異的な生理機能の解析

神経細胞特異的 L-PIPase 欠損マウスは全例において、中枢神経細胞の脱落を伴う著明な不随意運動を呈し、全身性欠損マウスの表現型を再現した。一方、P-PIPase 欠損マウスは正常であった。

脳卒中、脳梗塞の後遺症による機能予後不良の主因は、虚血性神経細胞死であり、これには NMDA 型グルタミン酸受容体の過度の活性化と細胞内カルシウム濃度の上昇が関与している。L-PIPase は、カルシウムで活性化されるカルパインにより切断を受けるため、虚血による神経細胞死に関与することが予想された。実際に、総頸動脈結紮モデルにおいて、L-PIPase は分解された (図 1)。ま

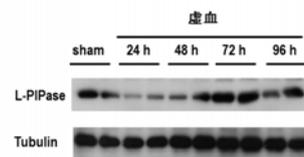


図1 脳虚血によるL-PIPaseの分解

た、L-PIPase タンパク質の発現が半減している L-PIPase ヘテロ欠損マウスでは、脳虚血による神経変性に高感受性であった(図2)。以上の結果から、神経細胞死には L-PIPase のみが寄与すること、虚血性神経疾患における神経細胞死に L-PIPase の分解が深く関与することを見出した。

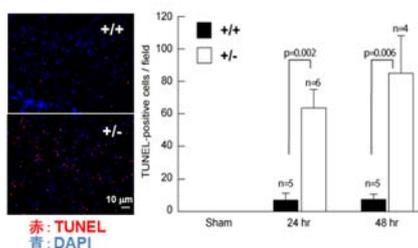


図2 脳虚血による神経細胞死

#### ② P-PIPase に特異的な生理機能の解析

予想に反し、前立腺特異的 P-PIPase 欠損マウスは発癌しなかった。そこで種々の発癌モデルマウスとの交配を進めたところ、P-PIPase ホモ、PTEN ヘテロ二重欠損マウスにおいて、肺へ転移性の甲状腺癌が頻発することを見出した。

#### ③ PI(3,4)P<sub>2</sub> 脂肪酸組成の質量分析方法の確立

陰イオン交換カラムによる PIs の濃縮やリン酸基のメチル化により、高感度な PIs 検出系を確立することに成功した。PI(4,5)P<sub>2</sub> と PI(3,5)P<sub>2</sub> を、試料から予め除去する方法は確立できていないが、PI(4,5)P<sub>2</sub>、PI(3,4)P<sub>2</sub>、PI(3,5)P<sub>2</sub> の標準品を識別する方法は確立できつつある。

L-PIPase と P-PIPase のリコンビナントタンパク質を調製し、種々のアシル基を有する4種類の PI(3,4)P<sub>2</sub> を基質として、脱リン酸化活性測定を行った。その結果、L-PIPase と P-PIPase では、PI(3,4)P<sub>2</sub> 分子種による活性の相違が認められ、L-PIPase と P-PIPase の遺伝子欠損マウスの表現型の差異が、蓄積する PI(3,4)P<sub>2</sub> 分子種の違いに起因する可能性が示唆された。上記開発中の測定系が構築でき次第、L-PIPase と P-PIPase の欠損マウスにおいて蓄積する PI(3,4)P<sub>2</sub> 分子種を見出したい。

#### ④ LPIAT 欠損マウスを用いた解析

LPIAT 欠損マスト細胞では、アラキドン酸を含む PI 分子種は半減したが、その他のリン脂質の分子種の変動は認められなかった。また、LPIAT 欠損マスト細胞では、抗原特異的な脱顆粒反応やサイトカイン除去による

細胞死が亢進した。以上の結果から、LPIAT はマスト細胞において、PI 特異的にアラキドン酸を導入する酵素であり、PI 分子種とマスト細胞機能は深く関与することを明らかにすることができた。

#### 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 33 件)

① Kobayashi, N., Ueki, K. et al (21 名中 17 番目) Blockade of class IB phosphoinositide-3 kinase ameliorates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 5753-5758, 2011, 査読有, DOI: 10.1073/pnas.1016430108

② Uchida, Y., Hasegawa, J. et al (22 名中 4 番目) Intracellular phosphatidylserine is essential for retrograde membrane traffic through endosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 15846-15851, 2011, 査読有, DOI: 10.1073/pnas.1109101108

③ Fujioka, Y., Tsuda, M. et al (7 名中 4 番目) The Ras-PI3K signaling pathway is involved in clathrin-independent endocytosis and the internalization of influenza viruses. *PLoS One*, **6**, e16324, 2011, 査読有, DOI: 10.1371/journal.pone.0016324

④ Kinoshita, N., Horie, Y. et al (11 名中 8 番目) Epimorphin protects hepatocytes from oxidative stress by inhibiting mitochondrial injury. *J. Gastroenterol Hepatol.* **26**, 201-206, 2011, 査読有, DOI: 10.1111/j.1440-1746.2010.06327.x

⑤ Hazeki, K., Kametani, Y. et al, (11 名中 7 番目) Phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  controls the intracellular localization of CpG to limit DNA-PKcs-dependent IL-10 production in macrophages. *PLoS One*, **6**, e26836, 2011, 査読有, DOI: 10.1371/journal.pone.0026836

⑥ Sasaki, J., Kofuji, S. et al (20 名中 1 番目, 2 番目, 9 番目, 10 番目) The PI(3,4)P<sub>2</sub> phosphatase INPP4A is a

suppressor of excitotoxic Neuronal Death. *Nature* **465**, 497-501, 2010, 査読有, DOI: 10.1038/nature09023

⑦ Imae, R., Inoue, T. et al (8名中2番目) Intracellular PLA1 and acyltransferase, which are involved in *C. elegans* stem cell divisions, determine the sn-1 fatty acyl chain of phosphatidylinositol. *Mol. Biol. Cell*, **21**, 3114-3124, 2010, 査読有, DOI: 10.1091/mbc.E10-03-0195

⑧ Volpicelli-Daley, L., A., Lucast, L. et al (9名中5番目) Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinases and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis in the brain. *J. Biol. Chem.* **285**, 28708-14, 2010, 査読有, DOI: 10.1074/jbc.M110.132191

⑨ Ariyama, H., Kono, N. et al (5名中4番目) Decrease in membrane phospholipid unsaturation induces unfolded protein response. *J. Biol. Chem.*, **285**, 22027-22035, 2010, 査読有, DOI: 10.1074/jbc.M110.126870

⑩ Kobuna, H., Inoue, T. et al (7名中2番目) Multivesicular body formation requires OSBP-related proteins and cholesterol. *PLoS Genetics*, **6**, e1001055, 2010, 査読有, DOI: 10.1371/journal.pgen.1001055

⑪ Shibata, M., Yoshimura, K. et al (11名中6番目) LC3, a microtubule-associated protein1A/B light chain3, is involved in cytoplasmic lipid droplet formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **393**, 274-279, 2010, 査読有, DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.01.121

⑫ Kage-Nakadai, E., Kobuna, H. et al (7名中5番目) Two very long chain fatty acid acyl-CoA synthetase genes, *acs-20* and *acs-22*, have roles in the cuticle surface barrier in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE*, **5**, e8857, 2010, 査読有, DOI: 10.1371/journal.pone.0008857

⑬ Anezaki, Y., Ohshima, S. et al (14名中10番目) Sex difference in the liver of hepatocyte-specific Pten-deficient mice: A model of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatol. Res.* **39**, 609-618 2009, 査読有, DOI: 10.1111/j.1872-034X.2009.00494.x

⑭ Ishii, H., Horie, Y. et al (14名中10番目) Eicosapentaenoic acid ameliorates steatohepatitis and hepatocellular carcinoma in hepatocyte-specific Pten-deficient mice. *J. Hepatol.* **50**, 562-571, 2009, 査読有, DOI: 10.1016/j.jhep.2008.10.031,

⑮ Sasaki, T., Takasuga, S., Sasaki, J., Kofuji, S., Eguchi, S., Yamazaki, M. & Suzuki, A. Mammalian phosphoinositide kinases and phosphatases. *Prog. Lipid Res.* **48**, 307-343, 2009, 査読無, DOI: 10.1016/j.plipres.2009.06.001,

⑯ Nishikimi, A., Fukuhara, H. et al (16名中5番目) Sequential regulation of DOCK2 dynamics by two phospholipids during neutrophil chemotaxis. *Science* **324**, 384-387, 2009, 査読有, DOI: 10.1126/science.1170179

⑰ Maekawa, M., Inoue, T. et al (7名中2番目) Functional analysis of GS28, an intra-Golgi SNARE, in *C. elegans*. *Genes to Cells*, **14**, 1003-1013, 2009, 査読有, DOI: 10.1111/j.1365-2443.2009.01325.x

⑱ Kawai, H., Tanji, T. et al (13名中6番目) Normal formation of a subset of intestinal granules in *Caenorhabditis elegans* requires ABC transporters HAF-4 and HAF-9, which are highly homologous to human lysosomal peptide transporter TAPL (TAP-like). *Mol. Biol. Cell*, **20**, 2979-2990, 2009, 査読有, DOI: 10.1091/mbc.E08-09-0912

⑲ Takahashi, K., Yoshina, S. et al (9名中5番目) Nematode homologue of PQBP1, a mental retardation causative gene, is involved in lipid metabolism. *PLoS ONE*, **4**, e4104, 2009, 査読有, DOI: 10.1371/journal.pone.0004104

[学会発表] (計 83 件)

① 佐々木純子, 「The lipid phosphatase INPP4A prevents striatal neurons from excitotoxic death.」BMB2010, 2010年12月8日, 神戸

② 井上貴雄, 「Identification of enzymes involved in fatty acid remodeling of phosphatidylinositol」BMB2010, 2010年12月8日, 神戸

③ 井上貴雄, 「リン脂質アシルトランスフェラーゼの包括的解析」第82回日本生化学会大会, 2009年10月24日, 神戸

〔図書〕(計9件)

① 佐々木純子、浅沼研、佐々木雄彦、ホスファチジルイノシトール 3,4-二リン酸脱リン酸化酵素INPP4Aは、興奮毒性による神経細胞死の抑制因子である、2010、細胞工学 29 (9)、912-913、学研メディカル秀潤社

② 佐々木純子、小藤智史、佐々木雄彦、ホスホイノシタイドホスファターゼの異常と病態、2010、実験医学 28 (20)、3358-3363、羊土社

③ 井上 貴雄、新井 洋由、ホスファチシルイノシトールの脂肪酸組成を規定する酵素群の同定、2010、実験医学 28 (20)、3306-3313、羊土社

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.akita-u.ac.jp/~bisei/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐々木 純子 (SASAKI JUNKO)

秋田大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：30333371

### (2) 研究分担者

井上 貴雄 (INOUE TAKAO)

国立医薬品食品衛生研究所・主任研究官

研究者番号：50361605

### (3) 連携研究者

田口 良 (TAGUCHI RYO)

中部大学・生命健康科学部・教授

研究者番号：20080210

小藤 智史 (KOFUJI SATOSHI)

秋田大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00508153

高須賀 俊輔 (TAKASUGA SHUNSUKE)

秋田大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90375262

江口 賢史 (EGUCHI SATOSHI)

秋田大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70457117