

機関番号：12102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21770132

研究課題名（和文）脂質性シグナル伝達に関わる PIP5K のアイソザイム固有の活性制御・生理機能の解析

研究課題名（英文）Isozyme-specific activation and its physiological function of PIP5K, an enzyme involved in lipid-signaling.

研究代表者

船越 祐司（FUNAKOSHI YUJI）

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・助教

研究者番号：30415286

研究成果の概要（和文）：リン脂質キナーゼ PIP5K は、PIP2 の産生を介して多様な生理機能を発揮する。PIP5K には $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ の三つのアイソザイムが存在する。先に研究代表者の属する研究室では PIP5K の活性化因子として低分子量 G タンパク質 Arf6 を同定しているが、本研究では各アイソザイム特異的な Arf6 による活性化を検討し、PIP5K $\gamma$ に固有の N 末領域が分子内マスクングにより Arf6 による活性化を調節するというユニークな制御機構を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The phospholipid kinase PIP5K plays important roles in a wide variety of cellular functions through its product PIP2, the pleiotropic lipid messenger. To date, three mammalian PIP5K isozymes,  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  have been identified. Previously, we have identified the small GTPase Arf6 as the direct activator of PIP5K. In the present study, we examined isozyme-specific activation of PIP5K by Arf6 and demonstrated that the activation of PIP5K $\gamma$  by Arf6 is regulated through the N-terminal mediated 'intra-molecular masking' of PIP5K $\gamma$ .

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：シグナル伝達、リン脂質、G タンパク質、アイソザイム

## 1. 研究開始当初の背景

細胞膜構成成分のリン脂質とその代謝産物は、細胞内シグナル分子として多くの細胞応答において重要な役割を果たしている。このような“脂質性シグナル伝達系”は生体に必須の機構であり、その破綻は様々な疾患へとつながる。細胞膜に微量に存在するホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 (PIP2) も脂質性シグナル分子の一つであり、細胞骨格再構築、小胞輸送など多種多様な機能を担っている。この PIP2 の多機能性とその制御

には、PIP2 の産生が刺激や状況に応じて組織特異的に、また細胞内局所において厳密に調節されることが必要となる。これはすなわち、産生酵素であるホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼ (PIP5K) が時間的・空間的に異なる活性制御を受けていることを意味するものである。哺乳類 PIP5K には $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ のアイソザイムと $\gamma$ 635、 $\gamma$ 661、 $\gamma$ 687 のスプライシングバリエーションが存在する（図 1 参照）。生体はこれらアイソザイムを適宜使い分けることで、PIP2 の多様な機能を制御して

いると推定される。しかしながら、その分子メカニズム、細胞生理機能・個体レベルでの使い分けは不明な部分が多く、この点を明らかにすることがPIP5Kの生理機能の全貌解明、さらには分子多様性の意義の理解へとつながるものと期待される。

先に研究代表者の所属する研究室では、PIP5Kの活性化因子の探索を行い、直接の活性化因子として低分子量Gタンパク質Arf6を同定した。さらに、両者を介するシグナル伝達系が、細胞運動に必須の構造体であるラッフル膜の形成を制御することを明らかにした(Honda et al., *Cell* 99, 521-532, 1999)。その後も、Arf6がPIP5Kを介して細胞膜エンドサイトーシスを制御することが報告されるなど、Arf6はPIP5Kの活性化を介して多様な生理機能を果たしていると推定される。しかしながら、活性化の分子機構、PIP5Kアイソザイム間での制御機構や生理機能の違いは不明であり、この点の解明が課題として残されている。

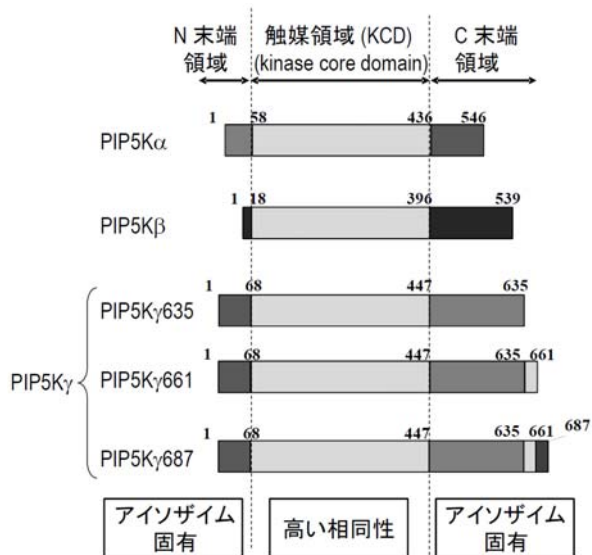


図1 PIP5Kアイソザイムとその一次構造

## 2. 研究の目的

上記のように、PIP5Kには、複数のアイソザイムが存在し、それぞれが時間的・空間的に異なる活性制御を受けることにより、PIP2の産生を介して多様な生理機能を発揮すると考えられる。本研究では、当研究室において活性化因子として同定したArf6を中心に、各PIP5Kアイソザイム固有の活性調節機構を解明し、PIP2を介した多様な生命現象の制御機構を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) PIP5K活性の測定

Flag-tagを付加した各PIP5Kアイソザイム、Arf6をHEK293T細胞に発現させ抗Flag抗体

により精製した。精製したタンパク質、ホスファチジルイノシトール4-リン酸、ホスファチジン酸、GTP・S、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ をバッファー中で混合し、37°Cにて20分間インキュベートした。反応液より脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィーにより分離し、生成したPIP2を測定した。

### (2) マウス脳細胞質画分の調整

マウスの脳をバッファー中に浸し、DIGITAL HOMOGENIZERで破碎後、100,000gで30分遠心し得られた上清を細胞質画分とした。

## 4. 研究成果

### (1) Arf6は*in vitro*においてPIP5K $\alpha$ , $\beta$ を活性化するが、PIP5K $\gamma$ は活性化しない。

当研究室では、PIP5K $\beta$ の直接の活性化因子としてArf6を同定していることから、他のPIP5K $\alpha$ ,  $\gamma$ についてArf6による活性化を検討した。HEK293T細胞に各PIP5KアイソザイムあるいはArf6を発現させ、精製したタンパク質を用いて*in vitro*再構成系にて各PIP5KアイソザイムのArf6による活性化を測定した。その結果、PIP5K $\alpha$ ,  $\beta$ はArf6によって顕著に活性化されたものの、PIP5K $\gamma$ は活性化されなかった。この結果より、各PIP5KアイソザイムはArf6によって異なる活性調節を受けることが示唆された。

### (2) PIP5K $\gamma$ は自身のN末端領域によってArf6による活性化を抑制している。

PIP5Kは一次構造上、アイソザイム間で高度に保存された触媒領域(KCD)と各アイソザイムに固有のN末端、C末端領域から構成される(図1)。この特徴的な構造から、アイソザイム間の活性化の違いは、各アイソザイム固有のN末端、C末端領域によると予想された。そこで、両領域を欠損したKCD領域断片のArf6による活性化を測定した。その結果、すべてのアイソザイムのKCD断片はArf6によって顕著に活性化された。さらに、PIP5K $\gamma$ のN末端領域欠損変異体およびC末端領域欠損変異体の活性化を検討したところ、N末端領域欠損変異体のみArf6によって活性化された。これらの結果から、PIP5K $\gamma$ においては自身のN末端領域がArf6による活性化を阻害していることが示唆された。そこで、PIP5K $\gamma$ のN末端領域の断片を作製し、PIP5K $\gamma$ のKCD領域断片あるいはN末端領域欠損変異体のArf6による活性化への影響を検討した。その結果、いずれの変異体もN末端領域断片の添加により、Arf6による活性化が抑制された。以上により、PIP5K $\gamma$ のN末端領域はArf6による活性化を抑制していることが明らかとなった。

さらに、精製したPIP5K $\gamma$ の各種変異体と

Arf6 との物理的な相互作用を *in vitro* において検討したところ、PIP5K $\gamma$  の KCD 領域および N 末端欠損変異体と Arf6 との結合は認められたものの、全長および C 末端欠損変異体との結合はみられなかった。以上の結果から、PIP5K $\gamma$  の N 末端領域は、Arf6 の KCD 領域への結合を阻害することにより Arf6 による活性化を抑制していると考えられ、図 2 のような‘分子内マスキング’による活性制御機構が想定される。

(3) PIP5K $\gamma$  は脳細胞質中で Arf6 によって活性化される。

上記のように、PIP5K $\gamma$  は *in vitro* において Arf6 による活性化が N 末端領域により阻害されていることが明らかとなった。しかしながら、Arf6 が PIP5K $\gamma$  を介してシナプス小胞の放出・取り込みに関与することが報告されるなど (Aikawa et al., *J. Cell. Biol.* 162, 647-659, 2003; Krauss et al., *J. Cell. Biol.* 162, 113-124, 2003)、Arf6 は PIP5K $\gamma$  を介して生理的な機能を果たしていることが示唆される。このような知見から、ある特定の条件のもとでは、PIP5K $\gamma$  は Arf6 により活性化され、機能を果たしていると考えられた。PIP5K $\gamma$  は脳に高発現していること (Ishihara et al., *J. Biol. Chem.* 273, 8741-8748, 1998)、PIP5K $\gamma$  のノックアウトマウスはシナプス伝達に障害がみられること (Di Paolo et al., *Nature* 431, 415-422, 2004)、神経様細胞においてシナプス小胞の放出・取り込みに関与することから、マウス脳細胞質を用いて、PIP5K $\gamma$  の Arf6 による活性化を検討した。その結果、脳細胞質内在性の PIP5K $\gamma$  および脳細胞質に添加したリコンビナント PIP5K $\gamma$  はいずれも Arf6 によって活性化されることが示唆された。この結果は、*in vitro* において PIP5K $\gamma$  が Arf6 単独では活性化されなかった結果と対照的であり、脳細胞質中に Arf6 と協調して PIP5K $\gamma$  の活性化を制御する因子が存在することが示唆される。

以上より、我々は以下のような PIP5K $\gamma$  アイソザイム特異的な活性制御機構モデルを提唱する (図 2)。PIP5K $\gamma$  は、固有の N 末端領域が KCD 中の Arf6 結合領域をマスクした‘Close’型とそれが解除された‘Open’型の可逆的な二つの構造を持っており、刺激等の何らかの条件下において、抑制を解除する因子 (図 2 中 opener) が作用することにより Arf6 による活性化を受けるというモデルである。今後はこの解除因子の同定と活性制御機構の詳細、および本制御機構の生理的意義を明らかにしていく予定である。

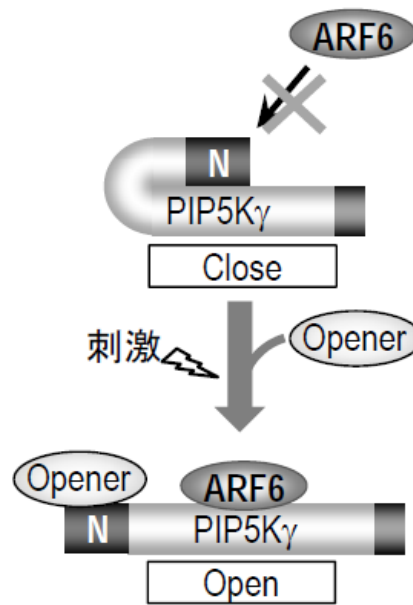


図 2 PIP5K $\gamma$  の Arf6 による活性化モデル

## 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 7 件)

- ① Hosoda N., Funakoshi Y.\*, Hirasawa M., Yamagishi R., Asano Y., Miyagawa R., Ogami K., Tsujimoto M., Hoshino S. Anti-proliferative protein Tob negatively regulates CPEB3 target by recruiting Caf1 deadenylase. *EMBO J.*, 30, 1311-1323, 2011 (\*equal contribution) 査読有
- ② Funakoshi Y., Hasegawa H., Kanaho Y. Regulation of PIP5K Activity by Arf6 and Its Physiological Significance. *J. Cell. Physiology*, 226, 888-895, 2011 査読無
- ③ Akiyama M., Zhou M., Sugimoto R., Hongu T., Furuya M., Funakoshi Y., Kato M., Hasegawa H., Kanaho Y. Tissue- and Development-Dependent Expression of the Small GTPase Arf6 in Mice. *Developmental Dynamics*, 239, 3416-3435, 2010 査読有
- ④ Suzuki A., Arikawa C., Kuwahara Y., Itoh K., Watanabe M., Watanabe H., Suzuki T., Funakoshi Y., Hasegawa H., Kanaho Y. The Scaffold Protein JIP3 Functions as a Downstream Effector of the Small GTPase ARF6 to Regulate Neurite Morphogenesis of Cortical Neurons. *FEBS Letters*, 584, 2801-2806, 2010 査読有
- ⑤ Funakoshi Y., Hasegawa H., Kanaho Y. Activation mechanisms of PIP5K isozymes by the small GTPase ARF6. *Advances in Enzyme Regulation*, 50, 72-80, 2010 査読無

- ⑥金保安則、本宮綱記、鈴木輝彦、船越祐司、長谷川潤：多彩な生理機能をもつ低分子量 G 蛋白質 Arf6、*細胞 The CELL*, 42, 100-103, 2010 査読無
- ⑦Kanaho Y., Funakoshi Y., Hasegawa H. Phospholipase D signalling and its involvement in neurite outgrowth. *Biochim. Biophys. Acta.* 1791, 898-904, 2009 査読無

[学会発表] (計 20 件)

- ① Yuji Funakoshi, et al., Activation mechanisms of PIP5K isozymes by ARF6. 第 62 回日本細胞生物学会大会、2010 年 5 月 19 日、大阪国際会議場 (大阪)
- ②Yuji Funakoshi, et al., Novel activation mechanism of PIP5KC by the small GTPase ARF6. The 6<sup>th</sup> Japan-Korea Conference on Cellular Signaling for Young Scientists, 2009, 2009 年 11 月 24 日、ハウステンボス (長崎)
- ③Yuji Funakoshi, et al., Novel activation mechanism of PIP5Ky by the small GTPase ARF6. University of Tsukuba and SKKU Joint Symposium in Biological Sciences, 2009 年 11 月 20 日、Samsung Academic Information Center Auditorium (韓国)
- ④船越祐司、他、低分子量 G 蛋白質 ARF6 によるホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼ (PIP5K) の活性制御機構の解析、第 8 回生命科学研究会、2009 年 6 月 26 日 有馬グランドホテル (有馬温泉)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: Arf6 遺伝子機能喪失動物及びその利用法

発明者: 金保安則、本宮綱記、長谷川潤、船越祐司

権利者: 筑波大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-050431

出願年月日: 2010 年 3 月 8 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/biochem/kanaholab/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

船越 祐司 (FUNAKOSHI YUJI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・助教