

機関番号：11401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790262

研究課題名 (和文) リン脂質代謝酵素による炎症性サイトカインのプロセッシングと分泌の制御

研究課題名 (英文) Regulation of inflammatory cytokine processing by a phospholipid-metabolizing enzyme.

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) : L-PIPase (leucine-rich phosphoinositide phosphatase) は生体膜を構成する、機能未知の微量リン脂質分解酵素である。我々は、L-PIPase の結合分子として、分子 X を見出した。本研究では、L-PIPase と分子 X との相互作用解析を行い、炎症性サイトカインのプロセッシングにおけるリン脂質代謝の関与について解析を行った。

研究成果の概要 (英文) : L-PIPase (leucine-rich phosphoinositide phosphatase) is a phospholipid-metabolizing enzyme. We found a protein X as a binding partner of L-PIPase. We investigated the participation of L-PIPase in inflammatory cytokine processing through the interaction of L-PIPase with protein X.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医科学一般

キーワード：リン脂質、細胞・組織、遺伝子改変動物

1. 研究開始当初の背景

ホスファチジルイノシトールの 3、4、5 位水酸基が可逆的なリン酸化を受ける結果、イノシトールリン脂質 (PIs) と総称される一群のリン脂質が生じ、形質膜やエンドソーム膜に存在する。リン酸化部位の組み合わせによって 7 種類に分類されるイノシトールリ

ン脂質のうち、ホスファチジルイノシトール 3,4,5-三リン酸 [PI(3,4,5)P3] については精力的な研究が進み、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 3,4,5-三リン酸 [PI(3,4)P2] は、これまでの研究では PI(3,4,5)P3 の単なる分解産物であると捉えられてきた。

哺乳類には leucine-rich phosphoinositide phosphatase (L-PIPase) と proline-rich PIPase (P-PIPase) という二種類の PI (3, 4) P2 分解酵素が存在する。申請者は両分子の遺伝子欠損マウスを作製し、PI (3, 4) P2 代謝が生体調節において重要な役割を果たすことを見出している。両分子の結合タンパク質の探索を行ったところ、L-PIPase に結合する分子として分子 X を見出した。

分子 X は当初、酵母の動原体形成に関わる分子として見出されたが、近年、植物の自然免疫の中核を成す抵抗性タンパク質の活性調節分子として注目を集めている。さらに哺乳類においても、自然免疫の中心的役割を果たす細胞内パターン認識受容体の一種である NALP3 に分子 X は結合し、活性化を促進することが報告された。

そこで本研究では、L-PIPase によるインフラマソームの制御について、解析を進めた。

2. 研究の目的

L-PIPase と分子 X との相互作用解析を通して、これまで全く知られていなかった“インシトールリン脂質代謝による NALP3 インフラマソームの制御”を解明する。

3. 研究の方法

(1) L-PIPase と分子 X との相互作用について、共免疫沈降法および蛍光免疫細胞染色法により解析した。各々の欠失変異体を用いて、相互作用部位を特定した。また、L-PIPase、分子 X、NALP3 の三者複合体形成について、共免疫沈降法により解析した。

(2) L-PIPase によるインフラマソーム活性制御の生体での意義を明らかにするために、NALP3 欠損マウスや ASC 欠損マウスの解析で用いられている尿酸塩結晶 (MSU) による腹膜炎モデルを行った。MSU を腹腔内投与し、集積する好中球数をフローサイトメトリーにて測定した。

(3) L-PIPase による NALP3 活性制御を細胞レベルで明らかにするために、L-PIPase 欠損マクロファージを用いた解析を行った。骨髄由来マクロファージを lipopolysaccharide (LPS) で前処理し、NALP3 を活性化する MSU で刺激した。そして、培養上清中に分泌された IL-1 β を ELISA にて検出した。

4. 研究成果

(1) L-PIPase と分子 X は共免疫沈降すること、そして細胞内において共局在することを見出した。また、欠失変異体を用いた解析から、L-PIPase の N 末付近と、分子 X の中央部で相互作用することを見出した。分子 X は NALP3 と結合することが報告されていることから、L-PIPase、分子 X、NALP3 は三者複合体を形成するか否か解析したところ、これら三者は複合体を形成しないこと、しかしながら、NALP3 と L-PIPase は直接結合しないことを見出した。これらの結果から、L-PIPase は分子 X との結合を介して、NALP3 の活性制御に関与する可能性が示唆された。

(2) L-PIPase 欠損マウスに MSU を腹腔内投与すると、コントロールに比べ、集積する好中球数が障害されていることを見出した (図 1)。この結果から、生体において、L-PIPase は NALP3 インフラマソームの活性制御に関与することが示唆された。

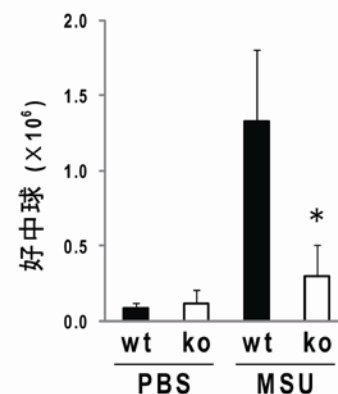
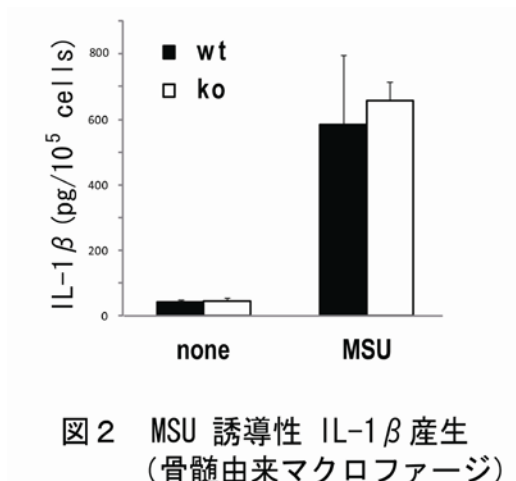


図 1 MSU 誘導性好中球浸潤

*; p<0.05 vs wt (MSU)

(3) L-PIPase 欠損マウスの骨髄由来マクロファージを MSU で刺激したところ、IL-1 β の産生はコントロール細胞と比較し差は認められず、in vivo の結果を支持できるものではなかった (図 2)。今後、これらの差異がなぜ生じるのか、その原因について解析を進める必要があると考えている。



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 6 件)

① Fujioka, Y., Tsuda, M., Hattori, T., Sasaki, J., Sasaki, T., Miyazaki, T. & Ohba, Y.: 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

② 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., Davis, M., Mitchell, C., Yamazaki, M., Hirai, H., Takenawa, T., Suzuki, A. & Sasaki, T.: The PI(3,4)P2 phosphatase INPP4A is a suppressor of excitotoxic Neuronal Death. *Nature* **465**, 497-501, 2010, 査読有

③ Volpicelli-Daley, L., A., Lucast, L., Gong, L., W., Liu, L., Sasaki, J., Sasaki, T., Abrams, C., S., Kanaho, Y. & DeCamilli, P.: Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinases and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis in the brain. *J. Biol. Chem.* **285**, 28708-14, 2010, 査読有

④ Anezaki, Y., Ohshima, S., Ishii, H., Kinoshita, N., Dohmen, T., Kataoka, E., Sato, W., Iizuka, M., Goto, T., Sasaki, J., Sasaki, T., Suzuki, A., Ohnishi, H. &

Horie, Y.: 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

⑤ Ishii, H., Horie, Y., Ohshima, S., Anezaki, Y., Kinoshita, N., Dohmen, T., Kataoka, E., Sato, W., Goto, T., Sasaki, J., Sasaki, T., Watanabe, S., Suzuki, A. & Ohnishi, H.: Eicosapentaenoic acid ameliorates steatohepatitis and hepatocellular carcinoma in hepatocyte-specific Pten-deficient mice. *J. Hepatol.* **50**, 562-571, 2009, 査読有

⑥ 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

[学会発表] (計 1 件)

① 佐々木 純子, The lipid phosphatase INPP4A prevents striatal neurons from excitotoxic death., BMB2010, 2010年12月8日, ポートピアホテル (兵庫県)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[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)
秋田大学医学系研究科・講師
研究者番号：30333371

(2) 研究分担者：該当なし
()

研究者番号：

(3) 連携研究者：該当なし
()

研究者番号：