

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月1日現在

機関番号：15401
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22590065
 研究課題名（和文） 貪食におけるイノシトールリン脂質の時空間的役割—RNA 干渉を併用したイメージング
 研究課題名（英文） Spatiotemporal regulation of phagocytosis by phosphoinositides; fluorescent microscopic analysis with shRNA knock down cells
 研究代表者
 樋木 薫 (HAZEKI KAORU)
 広島大学・大学院医歯薬学保健学研究院・准教授
 研究者番号：50146007

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。種々のイノシトールリン脂質を特異的に可視化する蛍光タンパク質をこれらの細胞に導入し、マクロファージが異物を取りこみ、除去していく過程におけるイノシトールリン脂質の挙動をタイムラプスイメージングで観察した。食胞上でイノシトールリン脂質生成消失を担う酵素を決定した。本研究の成果は自己貪食や細胞内輸送に敷衍しうる。

研究成果の概要（英文）：

A series of cells lacking phosphoinositide-metabolizing enzymes was prepared from Raw264.7 macrophages. The cells were transfected with fluorescent probes, which bind to specific phosphoinositides. The life spans of various phosphoinositides on phagosome during phagocytosis in these cells were monitored by time-pulse imaging. Thus the enzymes responsible for the life spans of the phosphoinositides were determined. The results will contribute to clarify the mechanism involved in autophagy and intracellular trafficking.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生理科学

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、shRNA、マクロファージ、貪食、ファゴソーム、タイムラプスイメージング

1. 研究開始当初の背景

食に伴うダイナミックな物質輸送には細胞骨格の再構成が必須であり、多様なイノシトールリン脂質が入れ替わるのには細胞骨格を適切に動かすためと考えられる。イノシトールリン脂質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、それぞれが異なるシグナル分子をリクルートすることにある。7 種類の誘導体、それぞれの量的調節を可能とする酵素は、試験管内の検討に基づいて考えると多経路かつ多種類に及び、どれが主流であるかの判定は難しい。イノシトールリン脂質代謝酵素には胚生致死となる分子も多いことがこの判定をさらに困難にしている。本研究ではこの点を **shRNA** で解決し、細胞内輸送における小胞上でのイノシトールリン脂質の交代のタイムラプスを見ることで、食におけるイノシトールリン脂質代謝酵素ネットワークの全貌を理解することを企画した。

2. 研究の目的

食作用は最も基本的な自然免疫である。食細胞は病原微生物を抗体や補体等の受容体または **TLR** で認識して取り込む。取り込まれた異物はリソソームで壊され、場合によっては抗原として提示されて獲得免疫を導く。さらに **LDL** や自己のアポトーシス細胞も食作用する。食作用の進行は開始から終わりまでおよそ全ての過程で様々なイノシトールリン脂質が関与している。しかし、イノシトールリン脂質関連の酵素は早期胚性致死故にノックアウトできない分子が多い。我々は、種々のイノシトールリン脂質と特異的に結合する蛍光プローブを生細胞に導入し、タイムラプスイメージングを行っている。ここに **RNA** 干渉を併用することで、食作用におけるイノシトールリン脂質合成、代謝酵素とその生成物の役割を解明することが本研究の目的である。

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' - CCC (X)₁₉ TTC A A G A G A (Y)₁₉ 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)₁₉ T C T C

T T G A A (X)₁₉ 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)₁₉は標的配列を、(Y)₁₉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) 各欠損細胞の食作用の定量的評価
抗体被覆赤血球、補体成分C3b被覆ゼイモザン、IgG-被覆ラテックスビーズ等の粒子と、可溶性分子としてRhodamine-CpG (TLRリガンド)、FITC-デキストラン、Lucifer Yellowの取り込みを定量する。

3) 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、細胞がオプソニン化された赤血球を食作用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ション法またはNEON™ electroporation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。

1. クラスI型PI3K

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

2. クラスII型PI3K

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

3. クラスIII型PI3K

VPS34: 5' -GCAAACCTCTCCATATAGA-3'
p150: 5' -CCATGACTTTGAGTATGAT-3'
5' -GAAGGACTTCATGATGAAA-3'

4. PI5K

PIKfyve³: 5' -GATGATAGATTCATTCTGA-3'
5' -GATGTAATCCTCTGTATCT-3'
VAC14⁴²: 5' -CTCTTAAAGGACATTGTGA-3'
5' -GTCCTGAACTGTCACCTTA-3'

5. PI5Pase

SHIP1: 5' -GGAATGAAATGCTTGAAGA-3'
5' -CAAGTTCTACAGCCACAAA-3'
SHIP2: 5' -GATCCTGAACTACATTAGT-3'
5' -GAATGGATTAGCATTGATA-3'

Inpp5e:

5' -GACCGAGAATTGACTTGA-3'
5' -GCATCGTGTCTCAGATCAA-3'

SKIP:

5' -GACTGGATCGGACTATAACA-3'
5' -GCGTCACATTAATGACTAT-3'

SYNJ2:

5' -GTATTGATCTTACTTACGA-3'
5' -GCTAGAAGTGAATAAGTA-3'

Sac3:

5' -GAAGTTGATGGTGAAGAAA-3'
5' -CGGTGAACTTCTGGATATA-3'

6. PI4Pase

Sac1

5' -GAAATGAGTCTCTTAGAAA-3'
5' -GTGGGATGATCAGATATAT-3'

7. PI(3,4)P2-4Pase

Inpp4a:

5' -GTCACTCAGCCACTTCGA-3'
5' -GAGATACGTCTTACAAGA-3'

8. PI3Pase

MTMR2:

5' -CGCTGACTGTCACAAGTTA-3'
5' -GCTGGAGAATAACAAAGAT-3'

PTEN:

5' -GAACAATATTGATGATGTA-3'
5' -GTATAGAGCGTGCAGATAA-3'

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 のうち、Inpp4b の発現は認められなかった。p150, VAC14 はそれぞれ VPS34, PIKfyve の制御因子である。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。

Inpp5e 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。

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) 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 の欠損によつては顕著な寿命延長は観察できなかった。従つて、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{alpha} 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 処理によつ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。従つて 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. Hazeki K, NigoriKawa K, Takaba Y, Segawa T, Nukuda A, Masuda A, Ishikawa Y, Takasuga S and Hazeki O. Essential roles of PIKfyve and

PTEN on phagosomal phosphatidylinositol 3-phosphate dynamics. FEBS lett. 586, 4010-4015, 2012 (査読あり)

2. NigoriKawa K, Hazeki K, Kumazawa T, Itoh Y, Hoshi M and Hazeki O. Class-IA phosphoinositide 3-kinase p110β triggers GPCR-induced superoxide production in p110γ-deficient murine neutrophils. J Pharmacol Sci. 120, 270-279, 2012 (査読あり)
4. Hazeki K, Kametani Y, Murakami H, Uehara M, Ishikawa Y, NigoriKawa K, Takasuga S, Sasaki T, Seya T, Matsumoto M, Hazeki O. Phosphoinositide 3-kinaseγ controls the intracellular localization of CpG to limit DNA-PKcs-dependent IL-10 production in macrophages. PLoS One, 2011, 6 (10):e26836 (査読あり)
3. 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 (査読あり、JB論文賞受賞)

[学会発表] (計 11 件)

1. 温田晃子、榎木薫、濁川清美、益田彩加、榎木修; 食胞のホスファチジルイノシトール 3-リン酸は主にPTENとPIKfyveによつて除去される; 日本生化学会大会; 2012年12月15日(福岡)
2. 瀬川智裕、榎木薫、濁川清美、林美里、三宅美喜子、榎木修; マクロファージによる感作赤血球の貪食におけるイノシトールリン脂質脱リン酸化酵素の役割の違い; 日本生化学会大会; 2012年12月15日(福岡)
3. 岡崎智子、濁川清美、榎木薫、郭瑩、榎木修; マスト細胞の機能制御におけるクラス 2 型PI3Kの役割; 第51回日本薬学会中国四国支部学術大会; 2012年11月11日(松江)
4. 上原政文、榎木薫、濁川清美、榎木修; PIKfyve による非メチル化 CpG の局在調節を介した TLR9 シグナルの制御; 第51回日本薬学会中国四国支部学術大会; 2012年11月11日(松江)
5. 上原政文、榎木薫、濁川清美、榎木修; PI3K γ による非メチル化 CpG の細胞内局在と IL10 産生の制御; 第 50 回日本薬学会中国四国支部学術大会; 2011年11月14日(高松)
6. 石川由紀、高場雄貴、榎木薫、濁川清美、榎木修; マクロファージの貪食機能に対する PI3K サブタイプ特異的阻害薬の作用; 第 50 回日本薬学会中国四国支部学術大会; 2011年11月14日(高松)
7. 榎木修、榎木薫; イノシトールリン脂質代謝酵素のノックダウンが食胞の PtdIns(3)P レベルに及ぼす影響; 第10回生命科学研究会; 2011年6月24日(高崎)

8. 熊澤崇, 濁川清美, 櫛木薫, 櫛木修; 好中球の活性酸素産生制御におけるクラスIA型PI3Kの役割; 第52回日本生化学会中国・四国支部例会; 2011年5月14日 (広島)
9. 石川由紀, 高場雄貴, 櫛木薫, 濁川清美, 櫛木修; マクロファージの食胞におけるPI(3)Pの動態; 第52回日本生化学会中国・四国支部例会; 2011年5月14日 (広島)
10. 熊澤崇, 濁川清美, 櫛木薫, 櫛木修; 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51回日本生化学会中国・四国支部例会; 2010年5月15日 (山口)
11. 高場雄貴, 櫛木薫, 櫛木修; 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51回日本生化学会中国・四国支部例会; 2010年5月15日 (山口)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

櫛木 薫 (HAZEKI KAORU)

広島大学・大学院医歯薬学保健学研究院・准教授

研究者番号: 50146007

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし