

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861756

研究課題名(和文)新規分子が制御する血液凝固、血管修復メカニズムの解明研究

研究課題名(英文)The study of blood clotting and venous repair regulated by a novel protein

研究代表者

浅野 智志 (Asano, Satoshi)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・助教

研究者番号：30570535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：組織が損傷したとき、線維芽細胞は葉状仮足を形成し損傷部位へ移動し、その修復に貢献する。この仮足形成にはイノシトールリン脂質代謝[PI(4,5)P₂→PI(3,4,5)P₃]が関与することが分かっている。本研究では、イノシトールリン脂質結合性タンパク質として同定したPhospholipase C (PLC) related catalytically inactive protein (PRIP)が血小板由来増殖因子(PDGF)誘導性の細胞移動を制御していることを明らかにするとともに、その細胞移動調節メカニズムを示した。

研究成果の概要(英文)：To repair damaged tissues, fibroblasts form lamellipodia at its leading edge and migrate to the damaged tissues, resulting in contribution of wound healing. The lamellipodia formation is regulated by the metabolism of PI(4,5)P₂, an inositol phospholipid, into PI(3,4,5)P₃. In this study, we revealed a possible regulatory mechanism by phospholipase C-related catalytically inactive protein (PRIP), an inositol phospholipid-binding partner, in PDGF-induced cell migration.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞移動 PI3-kinase 細胞骨格 創傷治癒

1. 研究開始当初の背景

口腔領域の手術において、創傷治癒遅延は、患者への負担を増大させ、また術後感染へのリスクをも増大させる。まして、すでに何らかの疾患を持った患者、例えば、糖尿病患者の場合、これらのリスクがさらに増すため、術前の処置(血糖コントロール)が不可欠となっているのが現状である。そこで、本研究を通して、創傷治癒の分子基盤の一端を明らかにできれば、歯科領域が直面しているこうした疾患の新しい治療法開発に対して、基礎研究から多くの情報を発信することができる。

申請者が所属する教室では、イノシトールリン脂質結合性タンパク質として Phospholipase C (PLC)-related catalytically inactive protein (PRIP)を同定した(Kanematsu et al., J. Biol. Chem., 1992)。その後の解析により、PRIP と直接結合するタンパク質として、タンパク質脱リン酸化酵素 Protein Phosphatase 1 (Yoshimura et al., J. Biol. Chem., 2001)、GABA_A receptor-associated protein (GABARAP; Kanematsu et al., EBMO J., 2002)、GABA_A 受容体 サブユニット(Mizokami et al., J. Neurosci., 2007) などを見出した。また、最近我々は、PRIP 分子がインスリン顆粒輸送に関与することを発見し、その調節メカニズムの詳細を明らかにした(Asano et al., 2014)。そして、PRIP ノックアウトマウスを用いた予備的研究から、血管修復の亢進現象を見いだした(unpublished data)。

組織が損傷したとき、線維芽細胞は損傷部位から放出される血小板由来増殖因子(PDGF)に誘導され、葉状仮足を形成し損傷部位へ移動しその修復に貢献する。この仮足形成にはイノシトールリン脂質代謝[PI(4,5)P₂ PI(3,4,5)P₃]が関与することが分かっている。

そこで、本研究ではイノシトールリン脂質結合性タンパク質として同定した PRIP が仮足形成に関与し、細胞移動を調節しているものと考えた。

2. 研究の目的

新規分子 PRIP ノックアウトマウスで、出血時間が短縮されたことから(unpublished data) 同分子の血管修復への関与が示唆された。そこで、本研究では、PRIP 分子の線維芽細胞の増殖能や移動性への影響を明らかにし、PRIP の増殖因子誘導性シグナルの制御メカニズムを解明する。この血小板を介した血管修復は、炎症や唾液分泌とも密接に関係しているため、その成果が将来的には、歯肉炎や歯周炎に対する治療応用へのアプローチの一つに成るものと考えている。

3. 研究の方法

細胞の PDGF 誘導性の移動能はランダムマイグレーションアッセイとウンドヒーリングアッセイによって解析した。PRIP や PRIP のミュータントを発現させるためのプラスミドベクターはエレクトロポレーションによって PRIP ノックアウトマウス胎仔由来線維芽細胞(PRIP-KO MEF)に導入した。細胞膜 PI(4,5)P₂ の局在は PI(4,5)P₂ に特異的に結合するプローブである EGFP-PLCδ1-PH (緑色蛍光タンパク質 EGFP で標識したホスホリパーゼ C のプレックストリン相同ドメイン)を細胞に発現させることで可視化した。細胞膜 PI(3,4,5)P₃ の局在は PI(3,4,5)P₃ に特異的に結合するプローブである EGFP-Akt-PH (EGFP 標識 Akt の PH ドメイン)を細胞に発現させることで可視化した。Phosphoinositide 3-kinase (PI3K)の活性は PI3K Activity ELISA によって定量した。PI3K と PI(4,5)P₂ の結合は in vitro リポソーム共沈法によって調べた。PI3K と PDGF レセプター(PDGRF)間の結合は免疫沈降法によって確認した。

4. 研究成果

PRIP が、線維芽細胞移動の調節に関与するかどうかを確かめるため、PDGF 存在下における PRIP-KO MEF の移動能をランダムマイグレーションアッセイとウンドヒーリングアッセイによって調べた。野生型に比べ PRIP-KO MEF では、PDGF 誘導性の細胞移動が著しく亢進することがわかった。この移動性の亢進は PI3K の阻害剤 LY-294002 を処理することで野生型と同程度まで抑制された。また、野生型と PRIP-KO MEF の FBS 存在下での細胞増殖を比較したところ違いは見られなかった。これらの結果から、PRIP の細胞移動への関与の可能性が示唆され、さらに PRIP-KO MEF では PI3K 経路が活性化していることが予想された。

PRIP が細胞移動に関与することのさらなる知見を得るため、PRIP1 全長、あるいは PRIP1 の PH ドメイン (PRIP1-PH) PH ドメインの欠失ミュータント (PRIP1-ΔPH) や PI(4,5)P₂ と結合できない PRIP ミュータント (PRIP1-R134Q)を PRIP-KO MEF に発現させ、その移動能を評価した。PRIP 全長あるいは、PRIP1-PH を発現させると PRIP KO MEF の細胞移動が抑制され、一方で、PRIP1-ΔPH や PRIP1-R134Q を発現させた細胞ではその移動性が抑制されることはなかった。これらの結果は、細胞移動における PRIP の責任領域が PH ドメインであり、PRIP が細胞移動を抑制するには PI(4,5)P₂ との結合を必要とすることを示唆している。このような PRIP による細胞移動の抑制効果は、PRIP を発現している野生型 MEF にさらに PRIP1 を過剰発現させた場合においても観察された。

PI(4,5)P₂ は細胞膜の成分である。EGFP で標識した PRIP1 全長と各 PRIP ミュータントを PRIP-KO MEF に発現させ、これらの局在を確認したところ、細胞移動を抑制すること

ができた PRIP1 全長と PRIP1-PH は部分的に細胞膜に局在することがわかり、一方、PRIP1-ΔPH や PRIP1-R134Q はほとんど細胞膜に局在していなかった。この結果は、PRIP が細胞膜近傍で細胞移動調節に働いている可能性を示唆している。

細胞が移動する時、移動端では細胞膜ラッフルリングが起こる。PRIP-KO MEF では、野生型と比較して PDGF 刺激によって起こるラッフル膜の形成が亢進していることが分かった。このラッフル膜形成の亢進は、PRIP-KO MEF に PRIP1 を戻し発現させると野生型で観察された表現型へと回復した。

葉状仮足/ラッフル膜の形成には、細胞膜の PI(3,4,5)P₃ [PI(4,5)P₂ のリン酸化]が必要である。次に PRIP-KO MEF のイノシトールリン脂質代謝の変調を検討するために、細胞膜の PI(4,5)P₂ と PI(3,4,5)P₃ 量を調べた。野生型に比べて PRIP-KO MEF では PDGF 刺激によって、細胞膜 PI(4,5)P₂ 量はより顕著に減少し、一方、PI(3,4,5)P₃ は顕著に増加することが明らかとなった。これらの結果は、PRIP が細胞膜における PI(4,5)P₂ のリン酸化[PI(3,4,5)P₃ 合成]に抑制的に働き、その結果ラッフル膜の形成が阻害されることを示唆している。

PDGF 刺激依存的に活性化し、PI(4,5)P₂ をリン酸化[PI(3,4,5)P₃ を合成]するキナーゼは p110α を触媒サブユニットとしたクラス 1A の PI3K (ヘテロ 2 量体、触媒サブユニットと調節サブユニットからなる)である。そこで次に、PDGFR、調節サブユニット、p110α 間の相互作用を調べたところ、これらの相互作用は野生型と PRIP-KO MEF で違いはなかった。

PI3K の触媒サブユニットである p110α は PI(4,5)P₂ に結合し、これをリン酸化する。そこで次に in vitro PI(4,5)P₂ リポソーム共沈法を用いて p110α と PI(4,5)P₂ の結合を PRIP が阻害するのかどうかを検討した。リコンビナント p110α と調節サブユニット p85α を PI(4,5)P₂ リポソームと混ぜ合わせ、遠心によって沈降させたところ、これらの PI3K と PI(4,5)P₂ は共沈した。しかし、PRIP1-PH 存在下では、その濃度依存的に PI3K と PI(4,5)P₂ の結合は抑制された。またリコンビナント PI3Kα による PI(4,5)P₂ のリン酸化活性も PRIP1-PH の添加によって阻害されることがわかった。これらの結果は、PRIP が細胞膜における PI3K と PI(4,5)P₂ の結合をコントロールする分子であり、PI(3,4,5)P₃ 合成を調節し、ラッフル膜形成、細胞移動を制御していることを示唆している (Fig. 1)。

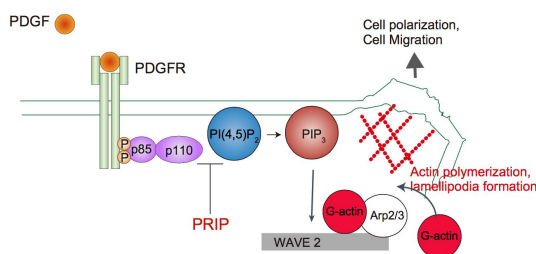


Fig. 1. PRIP の細胞移動における作用機序

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 3 件)

1. S. Asano, T. Nemoto, T. Kitayama, K. Harada, J. Zhang, K. Harada, I. Tanida, M. Hirata, and T. Kanematsu. (2014) Phospholipase C-related catalytically inactive protein (PRIP) controls KIF5B-mediated insulin secretion. *Biol Open*. 3:463-474. DOI: 10.1242/bio.20147591 査読有
2. T. Okumura, K. Harada, K. Oue, J. Zhang, S. Asano, M. Hayashiuchi, A. Mizokami, H. Tanaka, M. Irifune, N. Kamata, M. Hirata, and T. Kanematsu. (2014) Phospholipase C-Related Catalytically Inactive Protein (PRIP) regulates lipolysis in adipose tissue by modulating the phosphorylation of hormone-sensitive lipase. *PLoS One*. 9:e100559. DOI: 10.1371/journal.pone.0100559 査読有
3. K. Harada-Hada, K. Harada, F. Kato, J. Hisatsune, I. Tanida, M. Ogawa, S. Asano, M. Sugai, M. Hirata, and T. Kanematsu. (2014) Phospholipase C-related catalytically inactive protein participates in the autophagic elimination of staphylococcus aureus Infecting Mouse Embryonic Fibroblasts. *PLoS One*. 9: e98285. DOI: 10.1371/journal.pone.0098285 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

1. S. Asano, and T. Kanematsu. (2014) Regulation of cell migration by PRIP: PRIP regulates PDGF-induced PI(3,4,5)P₃ synthesis in the plasma membrane 第 37 回日本分子生物学会年会 (神奈川)
2. S. Asano, and T. Kanematsu. (2014) Regulation of cell migration by phospholipase C-related catalytically inactive protein. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会 (福岡)
3. S. Asano, and T. Kanematsu. (2013) Regulation of insulin secretion by phospholipase C-related catalytically inactive protein. 第 55 回歯科基礎医学会学術大会 (岡山)
4. S. Asano, and T. Kanematsu. (2013)

Phospholipase C-related catalytically inactive protein modulates insulin secretory vesicle movement. 5th Hiroshima Conference on Education and Science (Hiroshima)

5. S. Asano, and T. Kanematsu. (2013) Regulation of second phase of insulin secretion by phospholipase C-related catalytically inactive protein. 46th meeting of the Hiroshima University Dental Society (Hiroshima)
6. S. Asano, and T. Kanematsu. (2013) Novel mechanisms of insulin vesicle transport in the KIF5-mediated insulin secretion. The 8th Japan-Korea conference on cellular signalling for young scientists (Fukuoka)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6 . 研究組織

(1)研究代表者

浅野 智志 (Satoshi Asano)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・助教

研究者番号：30570535