

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440020

研究課題名(和文) 生体内 PI3P 脱リン酸化酵素の同定および生理的意義の解明

研究課題名(英文) The identification of intact PI3P phosphatase and physiological role

研究代表者

江口 賢史 (EGUCHI, SATOSHI)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70457117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ホスホイノシタイドは様々なリン酸化酵素や脱リン酸化酵素により代謝され様々な疾患に与ることが明らかになっている。その1種であるPI3Pは栄養シグナル伝達、小胞輸送に与える重要なPIsであるが、個体における生理機能については不明な点が多い。我々はPI3P、PI(3,5)P2脱リン酸化酵素群であるMTMRsノックアウトマウスと質量分析計を用いて、酵素の生体内基質同定および生理機能の解析を行った。その結果、MTMRsの欠損は癌や心肥大を惹起させることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Phosphoinositide generated by various phosphoinositide kinase and phosphatase have different physiological functions. PI3P and PI(3,5)P2 is important for nutrient signaling and vesicular trafficking, however, its physiological function remains unclear. Therefore, I generated knockout mice of MTMRs which dephosphorylates PI3P and PI(3,5)P2 in vitro. Analysis of these knockout mice revealed that deficiency of MTMRs caused lung cancer and cardiac hypertrophy.

研究分野：生化学

キーワード：イノシトールリン脂質 脱リン酸化酵素

1. 研究開始当初の背景

イノシトールリン脂質 (PIs) 代謝酵素 :

PIs は、ジアシルグリセロールと親水性のイノシトール環から構成されている。このイノシトール環の 3,4,5 位の水酸基は様々なリン酸化酵素や、脱リン酸化酵素の働きによって、可逆的なリン酸化の修飾をうけて、8 種類の PIs が細胞膜に生成される。PIs の相互変換には 18 の反応が知られているが、それらの反応を触媒するキナーゼは 19 種類、脱リン酸化酵素は 29 種類にもおよぶ。同じ反応を触媒するアイソザイムが多数存在するが、個々のアイソザイムの遺伝子異常によって様々な異なる疾患が引き起こされるというこれまでの研究結果から、各代謝酵素が生体内でそれぞれ特有の生理的役割を担う事が考えられている (Sasaki, T. *et al.*, *Prog. lipid Res.* 48, 3, 2009)。申請者も代謝酵素の生理機能の解析に携わり、その成果を発信してきた (Takasuga, S. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 2013; Morishita, H. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 288, 2013; Sasaki, J. *et al.*, *Nature* 465, 2010; Inoue, T. *et al.*, *Cancer Res.* 68, 2008)。

PI3P : PI3P は酵母において、オートファジーに必須の分子であることが見出されてから注目されている重要な PIs 分子種である。PI3P を含むイノシトールリン脂質の代謝については、酵母と比べて哺乳動物では一層複雑で、代謝酵素も下流で機能する分子も一層数を増していることが知られている。哺乳類細胞においても PI3P はオートファジーに必須であり、栄養シグナル伝達、小胞輸送に関与する重要な PIs である (Backer JM, *Biochem. J.* 410, 1, 2008) が、個体における生理機能については不明な点が多い。

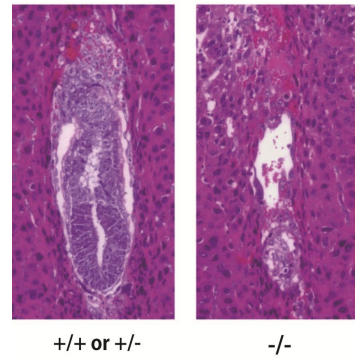
PI3P 産生酵素と分解酵素 : PI3P の動態および生体内機能を理解するためには、産生酵素および分解酵素の両面から細胞内機能や生理的役割を明らかにすることが重要である。申請者が研究に着手した当時、哺乳類個体における PI3P 産生酵素および分解酵素の生理的・病態生理的役割は不明であった。生理機能が不明な遺伝子/タンパク質の研究に最も有用な方法の一つは、遺伝子欠損マウスの樹立と表現型解析である。そこで、申請者は PI3P 産生酵素である mPIK3C3 欠損マウスを独自に作製し、その表現型解析によって mPIK3C3 の生理機能を明らかにしてきた。mPIK3C3 遺伝子の全身性ホモ欠損マウスは早期胎生致死であ

り (図 1: 未発表データ)、個体発生に必須の因子である

ことを見出した。さらに、様々な細胞種特異的遺伝子欠損マウスを作製し解析を行った結果、T 細胞では自己免

疫疾患や Th17 細胞の分化亢進による全身性炎症が惹起され、最終的に間質性肺炎で死亡すること、心筋細胞ではオートファジー阻害やタンパク質蓄積が起因となり心不全により死亡すること (Kimura, H., Eguchi, S., *et al.*, *JCI insight* e89462, 2017)、眼の水晶体ではエンドサイトーシス経路の破綻により、先天性白内障や小眼症を引き起こすこと (Morishita, H. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 288, 2013) 等を明らかにしてきた。一方で、PI3P 分解酵素の生理機能については未だに不明な点が非常に多い。何故なら PI3P 分解酵素は驚くべきことに 11 種類も存在する事が予想されているからである (図 2)。加えて、それぞれの分解酵素は異なった疾患との関連が示唆されていることから、それぞれが独自の細胞内機能制御を担っている可能性が高い。例えば MTMR2 欠損はニューロパチーによりシャルコーマリートゥース病を呈する事が明らかにされている (Bonnick, S. *et al.*, *Hum. Mol. Genet.* 2005)。また、MTMR1 は筋緊張性ジストロフィー患者においてタンパク質減少及び変異が (Santoro, M. *et al.*, *Exp. Mol. Pathol.* 89, 2010)、genome wide association study から MTMR3 は炎症性腸疾患の一つであるクローン病と、MTMR4 は筋萎縮症や乳頭状甲状腺癌への関与が報告されている。申請者らはこれらの分解酵素の生理的意義を明らかにするために PI3P 分解酵素のノックアウトマウスをすでに樹立している。これらのマウス線維芽細胞 (MEF) を用いた根源的な細胞応答の解析とマウス個体を用いた疾患に対する生体高次機能の解析を併せて進め、PI3P 分解酵素の生理機能を解明していく。

図 1 早期胎生致死 (E6.5)



2. 研究の目的

ホスファチジルイノシトール 3 リン酸

(PI3P)はオートファジー、栄養シグナル伝達、小胞輸送などに関与する重要なイノシトールリン脂質分子種であり、個体でのPI3P産生酵素の欠損は自己免疫疾患、心肥大、先天性白内障など、多岐にわたる重篤な疾患を引き起こす。一方、PI3P脱リン酸化(分解)酵素は試験管内の活性から11種類も存在する事が予想されているが、個体における生理的意義はおろか、細胞内で実際にPI3P脱リン酸化活性があるのかすらほとんど明らかになっていない。申請者は細胞内活性が不明な10種類のPI3P分解酵素の遺伝子改変マウスを独自に樹立した。本研究では独自のツールを用いて、未だに不明なPI3P分解酵素群の生理機能を探ることで各酵素の生理的意義及びPI3Pの機能の多様性を明らかにする。

3. 研究の方法

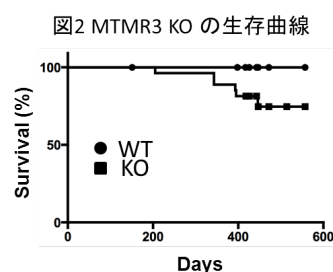
本研究ではMEFと全身性遺伝子欠損マウス、胎生致死のマウスは細胞種特異的遺伝子欠損マウスを利用した解析を進める。生化学的解析により細胞内で生理的に機能するPI3P脱リン酸化酵素の同定や、高速液体クロマトグラフ質量分析計を用いたPI3P量の解析などに加え、MEFを用いた増殖やオートファジー制御等の根源的な細胞応答の解析を行う。さらに、遺伝学的手法によりマウス個体を用いた生体高次機能や筋組織・免疫組織・癌等の疾患への関与の解析を併せて進め、PI3P分解酵素の生理機能を解明していく。

4. 研究成果

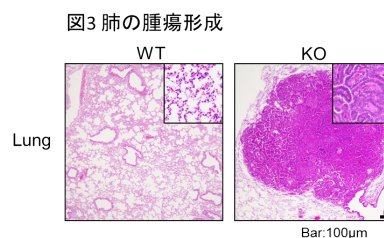
これまでMTMRsは*in vitro*での脱リン酸化活性測定から基質が推測されてきた。細胞内における真の基質を同定するには細胞を放射性同位体でラベルして解析する必要があるが、培養細胞レベルでは可能であってもマウス個体ではこれまで解析する事が出来なかった。さらに微量なPIPs測定は検出感度が足りないという問題があった。そこで、質量分析計を用いた解析方法の樹立が世界で進められているが、感度が低く、またリン酸化異性体を区別することが出来ていなかった。我々は質量分析計を用いた新たなPIPs測定法の確立を目指し、それぞれのPIPsを区別し高感度で検出する系を確立することに成功し、特許を申請した。この方法の樹立によりマウス個体および細胞内基質の同定することが可能になった。細胞にそれぞれの酵素を過剰発現させた株

を解析すると、これまで*in vitro*で報告されていた基質とは異なり、PI3Pを基質にしない酵素も存在した。またPI3Pを脱リン酸化出来るような細胞状態であってもPI(3,5)P2はどの分子も脱リン酸化していなかった。つまり定常状態ではPI3Pを脱リン酸化するが、PI(3,5)P2を脱リン酸化するには特定の条件が必要なのか、あるいは*in vitro*では脱リン酸化することが可能ではあるが、細胞内(*in vivo*)では基質としない可能性が考えられる。どちらが正しいのかは現在、細胞に様々な刺激を行い、PI(3,5)P2を脱リン酸化しうる条件を探索しており、これから明らかにしていきたいと考えている。これらの結果はこれまで知られていなかった知見であり、今後のMTMRs解析に重要な情報となる事が予想される。

ノックアウトマウスの個体解析については順次進めている。MTMRsのノックアウトマウスはすべて正常に産まれてくる。しかし、MTMR3およびMTMR4については自然発症的に病態を示すことが明らかになってきた。MTMR3はgenome wide association studyから炎症性腸疾患の一つであるクローン病との関連が示唆されているが、ノックアウトマウスではクローン病の病態を今のところ示していない。しかしながら、コントロール群と比べて生存曲線に違いが認められる(図2)ことから、他の臓



器を解析したところ、自然発症的に肺に腫瘍形成が認められた(図3)。ただし、解析までに要する期間が長いことから、他の発がんマウスや他のMTMRsノックアウトマウスと掛け



合わせることで発症期間を短く出来るかを試みている

ところである。自然発症的に肺がんを呈するノックアウトマウスは珍しく、病態の発症機序をさらに深く掘り下げることで医学に貢献できればと考えている。

MTMR4はMTMR3とアミノ酸配列の相同性がかなり高い事が知られている分子で

あるが、病態は異なっており非常に興味深い。この分子も genome wide association study から筋萎縮症や乳頭状甲状腺癌への関与が報告されているが、いずれの病態も今のところ示していない。一方で、筋萎縮症ではないが、このマウスは心肥大を呈する。我々は PI3P を分解するこの酵素とは逆の働きをする PI3P 産生酵素である Vps34 筋特異的ノックアウトマウスを解析し、心肥大を呈して死亡することを報告しているが、筋組織、特に心筋においては PI3P 量が減っても増えても心肥大が引き起こされることから心臓筋組織において PI3P が極めて重要な役割を担っていることが考えられる。PI3P 量の調節という面では真逆の機能を有しているが、ノックアウトマウスでは心肥大という共通の症状を呈する原因については今後の解析で明らかにしていきたい。

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)

Kofuji S, Kimura H, Nakanishi H, Nanjo H, Takasuga S, Lie H, Eguchi S, Nakamura R, Itoh R, Ueno N, Asanuma K, Huang M, Koizumi A, Habuchi T, Yamazaki M, Suzuki A, Sasaki J, Sasaki T. INPP4B is a PtdIns(3,4,5)P3 phosphatase that can act as a tumor suppressor. *Cancer Discovery*, 査読有り、5、730-739、2015

Danno S, Kobouchi K, Mehruba M, Abe M, Natume R, Sakimura K, Eguchi S, Oka M, Hirashima M, Yasuda H, Mukai H. PKN2 is essential for mouse embryonic development and proliferation of mouse fibroblasts. *Genes to cells*, 査読有り、22、220-236、2017

Kimura H, Eguchi S, Sasaki J, Kuba K, Nakanishi H, Takasuga S, Yamazaki M, Goto A, Watanabe H, Itoh H, Imai Y, Suzuki A, Mizushima N, Sasaki T. Vps34 regulates myofibril proteostasis to prevent hypertrophic cardiomyopathy. *JCI insight*, 査読有り、12、e89462、2017

[学会発表](計5件)

江口賢史、木村洋貴、佐々木純子、佐々木雄彦 T細胞におけるホスホイノシタイド代謝酵素 PIK3C3 の生理的役割、第87回

日本生化学会大会、2014

木村洋貴、江口賢史、久場敬司、今井由美、高須賀俊輔、伊藤怜悦、中村亮太郎、中西広樹、石川将己、佐々木純子、山崎正和、佐々木雄彦 心肥大におけるホスホイノシタイド代謝酵素 Vps34 のタンパク質分解機構の役割、第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会合同大会、2015

中西広樹、江口賢史、石川将己、鈴木聡、佐々木純子、佐々木雄彦 ホスホイノシタイドの新しい解析方法、第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会合同大会、2015

團野紗莉、崎村健司、江口賢史、Mona Mehruba、窪内康二、向井秀幸 タンパク質リン酸化酵素 PKN2 はマウスの初期発生に必須である。第39回日本分子生物学会年会、2016

Sasaki T, Nakanishi H, Eguchi S, Ishikawa M, Suzuki A, Sasaki J. A method for studying quality of phosphoinositides. 第39回日本分子生物学会年会、2016

[図書](計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計2件)

名称：新規リン脂質およびその利用
発明者：江口賢史、佐々木雄彦、中西広樹、石川将己、上野紀子、佐々木純子
権利者：秋田大学、ALTe
種類：特許
番号：2016-144177
出願年月日：2016年7月22日
国内外の別：国内

名称：ホスホイノシタイド分離測定法の開発
発明者：中西広樹、佐々木雄彦、江口賢史、佐々木純子、中西貴代
権利者：秋田大学、ALTe
種類：特許
番号：2017-51354
出願年月日：2017年3月16日
国内外の別：国内

○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

6．研究組織

(1)研究代表者

江口 賢史 (Eguchi Satoshi)
秋田大学医学系研究科・助教
研究者番号：70457117

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

佐々木 雄彦 (Sasaki Takehiko)
秋田大学医学系研究科・教授
研究者番号：50333365

堀江 泰夫 (Horie Yasuo)
秋田大学医学系研究科・講師
研究者番号：30282164

(4)研究協力者

()