

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2011～2015

課題番号：23227005

研究課題名(和文)ホスホイノシタイドによる細胞ダイナミズムの制御

研究課題名(英文)Regulation of cell dynamism by phosphoinositides

研究代表者

竹縄 忠臣 (Takenawa, Tadaomi)

神戸大学・バイオシグナル研究センター・講師

研究者番号：40101315

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 154,900,000円

研究成果の概要(和文)：ホスホイノシタイドは生命の根幹に関わる様々な機能を調節する重要な膜脂質である。ホスホイノシタイド結合タンパク質FBP17, PSTPIP2, SH3YL1とARAP1はいずれも、膜の曲率を認識して結合し、膜のかん入、膜ベジクル化などの膜変形を生じた。PI(3,4,5)P3 5-ホスファターゼ、SKIPは小胞体でGRP78と結合しているが、インスリン刺激を受け膜へ移動しPak1と結合し受容体近くで産生されるPI(3,4,5)P3を時空間特異的に分解、インスリンシグナルを負に制御した。ゴルジ体のSac1 PI4P 4-ホスファターゼはPI4P量を調節して細胞接着を制御し、がん細胞の転移に関与した。

研究成果の概要(英文)：Phosphoinositides act as crucial lipids to regulate versatile functions in life. Phosphoinositide-binding proteins, FBP17, PSTPIP2, SH3YL1 and ARAP1 recognize and bind membrane curvature, resulting in membrane deformation, such as coated pits and vesiculation of membrane. PI(3,4,5)P3 5-phosphatase SKIP binds GRP78 in endoplasmic reticulum under resting condition. But in response to insulin, it moves to membranes where it associates with Pak1 and hydrolyses PI(3,4,5)P3 spatio-temporally around insulin receptors. Sac1 PI4P 4-phosphatase controls the PI4P concentration in Golgi, which is involved in cell adhesion and tumor metastasis. Thus, decrease in PI4P in Golgi prevents the invasion and metastasis of cancer cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ホスホイノシタイド 膜の形 インスリンシグナル がん細胞転移

1. 研究開始当初の背景

細胞はホルモンや増殖因子などの外界刺激を受けて、増殖、分化、運動へと向うシグナルを細胞内へ発信する。基本的には「リン脂質を2重層とする細胞膜基本構造に様々なタンパク質が相互作用する事により、細胞膜上でシグナルが発生」する。細胞膜の成分の中でも強い負の電荷を持つイノシトールリン脂質類(ホスホイノシタイド)はその中心的役割を果たし、IP3 やジアシルグリセロールといった2次メッセンジャーの産生脂質として働き、それ以外にも、脂質そのものが細胞内情報伝達や膜輸送、細胞骨格制御など様々な機能制御に関与していることが分かってきた。またこれらの脂質代謝の乱れはがんや糖尿病を始めとする、様々な疾病の原因になることも分かり、ホスホイノシタイドの重要性がますます認識されている。

申請者らはホスホイノシタイドが2次メッセンジャー産生以外に様々なタンパク質やアクチン調節タンパク質の活性を修飾し細胞骨格、細胞運動を制御している事を明らかにしてきた。

一方、細胞はダイナミックに形を変え外側向きの突起、(糸状仮足や葉状仮足など)を形成し、運動を亢進したり、内側向きの突起(陥入構造)を形成し、細胞内膜輸送を行なう。即ち、細胞は膜を変形させ、様々な膜の微細形態を作るが、申請者らはある種のホスホイノシタイド結合ドメインに膜変形作用があることを発見し、それらが多量体フィラメントを形成し、細胞膜を螺旋状に包み込み、チューブ状に変形させ、内向き外向きの突起を形成するとともにN-WASPやWAVEタンパク質と結合して突起構造を作る事を証明した。これらホスホイノシタイド結合ドメインによるダイナミックな細胞機能制御の解明を通して細胞骨格再編や細胞膜の形作りの基本概念の確立に深く寄与してきた。

2. 研究の目的

細胞の微細構造構築に関わる新たなホスホイノシタイド結合タンパク質の解明とその作用機序の解明

膜変形とアクチン重合の機能的連携で微細な膜構造が出来ることまでは分かって来たが、実際の生命現象(運動、物質取り込み、接着など)や、がんなどの病態において具体的にどのような分子がこれらの役割を担っているか、についてはその作用機序も含めて全くわかっていない。

微細な膜構造構築の制御は、個々のホスホイノシタイドが特異的に、細胞質に存在するタンパク質を膜に集めシグナル複合体を形

成したり、細胞内小器官で特異的に結合タンパク質に結合して機能を制御する。これらの機能を引き起こすトリガーは「脂質-タンパク質相互作用が起こす細胞膜ダイナミクス」である。

個々のホスホイノシタイドは時空間特異的に合成、分解が制御され、厳密に特定の時間、特定の部位でその結合タンパク質と接触することで、特異的な機能を発揮する。よって、ホスホイノシタイドの部位特異的な存在や量の厳密な制御は結合タンパク質の機能発現に必須である。しかし今までホスホイノシタイドの時空間制御機序についてはほとんど分かっていない。様々な生命現象(運動、物質取り込み、接着など)において具体的にどのような結合タンパク質がこれらの役割を担っているか、その作用機序も含めて全くわかっていない。ホスホイノシタイドの細胞ダイナミクス制御を明らかにするには、更なるホスホイノシタイド結合タンパク質の同定と作用機序の解明、どのようにホスホイノシタイドの時空間制御がされているのか明らかにする必要がある。またホスホイノシタイド代謝異常によって生じるがん等の重篤な疾病の治療を考える上でも極めて重要な研究である。その重要性や革新性から考えて緊急に取り組む必要が有る。

申請者らはすでにホスホイノシタイドの機能多様性を明らかにするため、PI(4,5)P2を含むリポソームに結合するタンパク質をラット脳の可溶性及び膜可溶化画分を用い、網羅的に質量分析装置で探索した。その結果、全部で400に及ぶ蛋白質が同定され、大部分が従来報告されているPHドメインやPXドメインなどの脂質結合ドメインを持つタンパク質、細胞骨格調節蛋白質やGTP結合蛋白質調節蛋白質であったが、PIR121/Sra, PSTPIP1/2, mDia, SH3YL1, Trim2やEB2など脂質結合活性が報告されていない蛋白質も数多くあった。これらのタンパク質の中で脂質結合活性が強く、膜変形作用を持ち、興味深い機能を持つ事が予想されるタンパク質についてホスホイノシタイドによる膜微細構造構築の機序を明らかにする。

時空間特異的なホスホイノシタイドの調節

特定の部位へのホスホイノシタイドの局在やその量の制御はホスホイノシタイドホスファターゼによって行われている。

しかしどのような酵素によって如何に制御されているのかは不明である。よって局所的ホスホイノシタイドが如何して制御されているかの解明する。具体的にはインスリンシグナル特異的に活性化されシグナルを負に制御するPI(3,4,5)P3ホスファターゼであるSKIPが如何にしてインスリンシグナルを負に制御しているのか、また高脂肪食や糖尿

病状態など小胞体ストレスがかかると SKIP の発現が上昇し、インスリン抵抗性になる機序についても明らかにする。また Golgi に存在する PI4P ホスファターゼである Sac1 が如何にして細胞接着や浸潤を制御しているのかを明らかにする。

3. 研究の方法

分子生物学的手法によって PSTPIP2 や SH3YL1 や FBP17 など膜変形作用分子をノックダウンさせたり、GFP タグを付加させた変異体を導入したりして、細胞内局在の変化、細胞骨格の変化、ドーサルラッフル形成やエンドサイトーシスへの影響を、細胞生物学的に調べる。

PI(3,4,5)P3 5-phosphatase である SKIP の機能についてはインスリンシグナルに特化して、シグナル伝達系の変化や膜への移行機序について調べる。PI4P 4-phosphatase Sac1 は Golgi の PI4P レベルを調節して細胞接着や浸潤を制御していると考えられるので、Golgi の PI4P レベルを Sac1 や PI4P キナーゼのノックダウンで増減させ、細胞接着や浸潤への影響を見る。

4. 研究成果

(1) 細胞の微細構造構築に関わるホスホイノシタイド結合タンパク質の探索とその作用機序の解明

PSTPIP2, SH3YL1 と ARAP1 に絞って実験を進めた。

PSTPIP2 はマクロファージに特異的に発現している F-BAR ドメインを有するタンパク質であるがその生理的意義は不明であった。辻田はまず最初に PSTPIP2 がポドソーム形成を指標としてマクロファージの活性化に如何に作用をしているかを調べ、PSTPIP2 がポドソーム形成に抑制的に働く事を見つけた。ほとんどの F-BAR タンパク質は F-BAR ドメインの他に SH3 ドメインを有するが、PSTPIP2 は SH3 ドメインを欠損し、F-BAR タンパク質に対してドミナントネガティブ的に働いている事を突き止めた。FBP17 などの F-BAR ドメインを有するタンパク質を過剰発現させると、マクロファージで異常に多くのポドソームが形成され、PSTPIP2 の発現は逆にポドソーム形成を抑制した。更に、PSTPIP2 のノックダウン細胞ではポドソーム形成が著明となり、PSTPIP2 がポドソーム形成を抑制していることを明らかにした。またポドソーム膜での FBP17 の self-assembly はアクチンの重合を開始し、PSTPIP2 の assembly は逆にアクチン重合を抑制した。作用機序として PSTPIP2 の F-BAR ドメインが膜脂質に結合し、他のタンパク質の持つ F-BAR ドメインの脂質が結合できないようにする事で起っていた。これらの結果は PSTPIP2 の変異で自己炎症性疾患が生じるという報告の原因を解明した

と言え、膜変形活性を持つホスホイノシタイド結合タンパク質の異常によって病気が生じるということを知った点注目値する。

SH3YL1 は SYLF ドメインと我々が名付けた新たな脂質結合ドメインを有し、PI(3,4,5)P3 と結合し、ドーサルラッフル(マクロピノサイトーシス)に局在した。SYLF ドメインにはホスホイノシタイド含有リポソームを小さな断片化する膜変形活性を有し、SYLF ドメイン中の両親媒性ヘリックスがその活性に必要な事を明らかにした。更に SH3YL1 が SHIP2 という PI(3,4,5)P3 5-ホスファターゼと結合し、PI(3,4,5)P3 を PI(3,4)P2 に変換する活性がドーサルラッフル形成に必須であり、その部位に PI(3,4)P2 結合能を持つ PH ドメインを有する TAPP1 がリクルートされる事が重要であることも明らかにした。この結果から SYLF ドメインの脂質結合活性と両親媒性のヘリックスが膜の変形に必要であり、更に SHIP2 がリクルートされて PI(3,4)P2 が生じることがドーサルラッフル形成に必須である事を示した。

SH3YL1 によるドーサルラッフル構造形成におけるホスホイノシタイドの役割について調べたが、ARAP1 という ArfGAP が PH ドメインで PI(3,4,5)P3 に結合し Arf1 や Arf5 を制御してドーサルラッフル(マクロピノサイトーシス)のサイズを規定している事を見つけた。興味ある事に ARAP1 を発現させるとドーサルラッフルのリングのサイズが大きくなり、反対にノックダウンするとリングが小さくなった。また ARAP1 の基質である Arf1 や Arf5 のドミナントネガティブ体を発現させるとサイズが大きくなり、ARAP1 の下流で Arf1 と Arf5 の二つの Arf がリングの大きさを決定していることを示した。これにより SH3YL 及び ARAP1-Arf1/5 のシグナルが新たな膜構造を構築し、ドーサルラッフルの形が決められるという分子機序を初めて示す事が出来た。

(2) 時空間特異的なホスホイノシタイドの調節によるホスホイノシタイド結合タンパク質の局在制御 機序の解明

SKIP によるインスリンシグナルの空間的制御

インスリン情報伝達特異的にシグナルを負に制御する PI(3,4,5)P3 5-ホスファターゼ、SKIP が何故インスリンシグナル特異的に PI(3,4,5)P3 の時空間制御を行なえるのかを調べた。その結果、無刺激時には SKIP は小胞体中で GRP78 と結合し、活性の無い状態に保たれているが、インスリン刺激を受けると細胞膜へと移動し、GRP78 と離れて Pak1 と結合する。その結果インスリン受容体近くで産生される PI(3,4,5)P3 を時空間特異的に分解できるので、他のホスファターゼと異なり、インスリンシグナルを特異的に制御出来る。さらに、SKIP は GRP78 と SKICH ドメインを介

して直接結合し、この結合はSKIPがERに局在するのに必須であることを証明した。SKIPは筋肉で高く発現しているため、筋肉での糖代謝、エネルギーに重要な役割を果たしている。実際にSKIPをノックダウンした筋培養細胞ではインスリンシグナルで重要なキナーゼ、Akt2のリン酸化が増強しSKIPの発現は逆にAkt2のリン酸化を抑制した。興味深い事に小胞体ストレスを与えるような高脂肪食投与やob/obマウスの筋肉に於いて、SKIPやGRP78の発現が上昇していた。C2C12細胞に小胞体ストレスを与えるツニカマイシンなどの試薬でSKIPやGRP78の発現が著明に上昇し、インスリン刺激によるAkt2のリン酸化が著明に阻害された。更に、小胞体ストレスを与えた状態でのインスリン刺激によるAkt2のリン酸化の阻害がSKIPのノックダウンで回復した。これらの事実は小胞体ストレスによって起る骨格筋のインスリン抵抗性が一部SKIPの発現に起因する事を示し、SKIPの阻害剤の開発が全く新しい機序に基づく2型の糖尿病薬の開発につながる可能性を示唆した。

Sac1による細胞接着及び浸潤制御

ホスホイノシタイドホスファターゼの中で細胞間接着に関与しているホスファターゼを見つけるべく、23種のホスファターゼのノックダウンを行い接着に対する影響をMCF-7細胞で見た。すでに接着抑制作用が確認されているPTENやINPPなどと異なり、ゴルジ体に存在するSac1 PI4P 4-ホスファターゼのノックダウンにより、MCF-7細胞の細胞間接着が弛み(EMT様現象)、運動能、浸潤能が上昇した。Sac1ノックダウン細胞ではゴルジ体のPI4P量が上昇していた。逆にPI4Pを減少させるPI4KIIIβのノックダウンではCadherin-11の細胞間接着部位での局在が増し、浸潤能も低下した。次にTGFβとTNFαで刺激してEMTを起こした際のPI4P量をFapp1PHドメインを用いて測定した。EMTによりGolgi体のPI4Pがほぼ2倍に上昇したが、細胞膜のPI4P量は変化しなかった。また他の乳がん細胞のゴルジ体でのPI4P量を計ったところ、浸潤、転移能の高いMDA-MB-231細胞やHs578t細胞のゴルジ体のPI4P量は著明に高かった。次にゴルジ体でのPI4Pのターゲットを探し、GOLPH3を見つけた。GOLPH3はPI4P結合タンパク質で、その活性はPI4Pに依存し、下流にあるsrcなどのタンパク質の細胞膜への移動を行ない、EMT/METの制御に関わっていると考えられた。PI4Pに結合できないGOLPH3の発現ではEMT様変化は起らず、細胞運動や浸潤も促進しなかった。実際、野生型GOLPH3はがん細胞の転移を促進するが、PI4Pが結合できないGOLPH3を発現させたがん細胞は転移しなかった。以上の知見から一見細胞膜の接着に関係ないと思われるようなゴルジ体のPI4Pの変化が細胞膜の接着を調節している事を明

らかに出来た。また乳がん細胞の多くの症例でSac1の減少やPI4KIIIβの上昇が認められていることより、これらをターゲットに新たながんの浸潤転移を抑制するような薬剤の開発が可能かもしれない。これらの結果は非常にインパクトが高く、臨床への応用性も高いと思われる。

(3) FBP17は細胞先端端において膜張力を認識し、アクチン重合の調節を行う

近年、細胞運動の際の先端端の形成において、細胞膜の張力が阻害的なシグナルとしてはたらき、その極性の形成に必須であることが報告されている。しかしながら、細胞膜の張力を認識するタンパク質が不明なため、この物理的なシグナルがどのようにアクチンの重合活性を制御するのかは明らかではなかった。本プロジェクトで細胞膜変形活性をもつFBP17が細胞膜の張力センサーとしてはたらき、先端端の形成を制御していることを明らかにした。細胞膜の張力を人工的に上昇させると、この極性の形成は亢進した。逆に、細胞膜の張力を低下させるとFBP17は細胞の全体にわたり重合し、このターンオーバーおよび極性の形成は瞬時に阻害された。これらの結果から、細胞膜の張力はFBP17の重合を阻害することにより極性の形成を制御していると考えられた。さらに、この極性の形成において、FBP17それ自体によるN-WASPを介したアクチンの重合活性が必須であることが明らかにされた。FBP17-N-WASP-Arp2/3複合体を介したアクチンの重合は細胞膜を押すことにより張力を発生させる。つまり、FBP17の重合と細胞膜の張力によるフィードバック制御が先端端における極性の形成に重要であると考えられた。これらの結果より細胞が遊走中にその先端部でいかにしてアクチン重合を制御し、張力を調節しているかを証明した。

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 35 件)

Tsujita K, Takenawa T, Itoh T. Feedback regulation between plasma membrane tension and membrane-bending proteins organizes cell polarity during leading edge formation. Nat Cell Biol. 査読有 17, 2015, 749-758.

Ijuin T, Hosooka T, Takenawa T. Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate Phosphatase SKIP Links Endoplasmic Reticulum Stress in Skeletal Muscle to Insulin Resistance. Mol Cell Biol. 査読有 36, 2015, 108-118.

Suetugu S., Kurisu S., Takenawa T.

Dynamic shaping of cellular membranes by phospholipids and membrane-deforming proteins. *Physiol. Rev.* 査読有 94, 2014, 1210-1248.

Tsujita K., Kondo A., Kurisu S., Hasegawa, J., Itoh, T., Takenawa, T. Antagonistic regulation of F-BAR protein assemblies controls actin polymerization during podosome formation. *J. Cell Sci.* 査読有 126, 2013, 2267-2278.

Ijuin T., Takenawa T. Regulation of insulin signaling by the PIP3 phosphatase SKIP through the scaffolding function of Pak1. *Mol. Cell Biol.* 査読有 32, 2012 3579-3584.

〔学会発表〕(計 26 件)

Itoh, T., Tsujita, K. F-BAR domain proteins and actin cytoskeleton. UCSD-KU meeting “Comprehensive Understanding of the Roles of Lipids in the Life Sciences”. 2015. 12. 6. ラホヤ、アメリカ

Itoh, T., Tsujita, K. Role of membrane-bending proteins in cell polarity formation. 2015 ASCB Annual Meeting. 2015. 12.12. サンディエゴ, アメリカ

伊集院 壮、竹縄 忠臣. 細胞表面に存在する分子シャペロン GRP78 による PI3 キナーゼシグナル制御機構. 第 67 回日本細胞生物学会. 2015.6.30 パシフィコ横浜 神奈川県

〔その他〕

ホームページ等

伊藤研究室

<http://www.research.kobe-u.ac.jp/brce-itoh/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

竹縄 忠臣 (TAKENAWA Tadaomi)

神戸大学・バイオシグナル研究センター・
非常勤講師

研究者番号：40101315

(2)研究分担者

伊藤 俊樹 (ITOH Toshiki)

神戸大学・バイオシグナル研究センター・
教授

研究者番号：30313092

(3)連携研究者

伊集院 壮 (IJUIN Takeshi)

神戸大学大学院医学研究科・助教

研究者番号：00361626

辻田和也 (TSUJITA Kazuya)

神戸大学・バイオシグナル研究センター・
講師

研究者番号：10457054

徳田 恵美 (TOKUDA Emi)

神戸大学・大学院医学研究科・特任助教
研究者番号：30598952

長谷川純矢 (HASEGAWA Junya)

大阪大学・大学院生命機能研究科・助教
研究者番号：00533788
(H23-26 年)

入野康宏 (IRINO Yasuhiro)

神戸大学・大学院医学研究科・特任助教
研究者番号：10415565