

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：11401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659124

研究課題名(和文)ホスファチジルグリセロールリン酸結合タンパク質の探索

研究課題名(英文)Identification of phosphatidylglycerophosphate-binding proteins.

研究代表者

高須賀 俊輔 (TAKASUGA, SHUNSUKE)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90375262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：ホスファチジルグリセロールリン酸(PGP)は、カルジオリピンの前駆体として知られるミトコンドリアにあるグリセロリン脂質の一つである。我々は、このPGPの独自の生理機能の解明を目的にして、PGP結合タンパク質の同定を試みた。その結果、既知の脂質結合ドメインを有するミトコンドリアタンパク質は、いずれもPGPに結合しないことが明らかとなった。PGP結合タンパク質は新規のリン脂質結合ドメインを有している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Phosphatidylglycerophosphate (PGP) is a mitochondrial glycerophospholipid, known as a precursor of cardiolipin. We tried to identify PGP-binding proteins in mitochondria for elucidation of unique physiological functions of PGP. However, none of mitochondrial proteins containing known phospholipid binding domains binds PGP. Therefore, PGP-binding proteins might have a novel lipid-binding domain.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：細胞内シグナル伝達 リン脂質

1. 研究開始当初の背景

(1) ホスファチジルグリセロールリン酸 (PGP) は、カルジオリピン生合成経路における中間代謝産物として発見されたグリセロリン脂質である。PGP は細胞内では速やかに脱リン酸化され、通常の条件下では検出限界以下しか存在しない。カルジオリピンはミトコンドリアに多く含まれ、呼吸鎖の活性に重要である。故に、PGP もカルジオリピン前駆体として重要だと考えられているが、PGP 自身の生理活性を問う研究はこれまでに進展していなかった。

(2) PGP の分解酵素である PGP ホスファターゼは大腸菌で 3 遺伝子 (J. Bacteriol. **153**:722, (1983), J. Biol. Chem. **286**:5506, (2011))、酵母で 1 遺伝子 (EMBO J. **29**:1976, (2010)) が同定されていた。しかし、哺乳動物にはこれら遺伝子のホモログは存在せず、PGP ホスファターゼ遺伝子は未同定であった。その後 2011 年に、J. Dixon らのグループにより、これまで PI5P、リン酸化チロシンの脱リン酸化酵素として報告してきた PLIP/PTPMT1 が、PGP をも基質とすることを報告した。

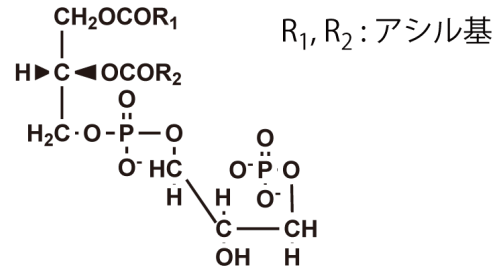
(3) 申請者は独自のスクリーニングにより、PLIP/PTPMT1 が PGP ホスファターゼであることを発見しており、この知見に基づき、遺伝子改変マウスを用いて PLIP/PTPMT1 の生理機能を明らかにする研究を進めていた。その結果、PGP には、カルジオリピン前駆体としてだけではなく、それ自身独自の生理機能が存在するという仮説を持つに至った。

2. 研究の目的

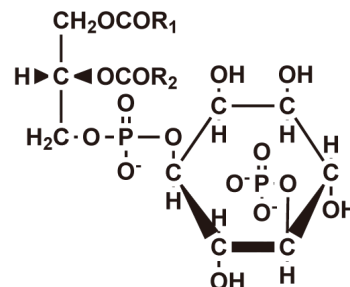
微量生理活性リン脂質の機能は、それぞれの脂質に特異的な結合タンパク質によって担われている例が一般的である。そこで、PGP 自身の独自の生理機能を明らかにするため、PGP に結合するタンパク質を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 本研究で対象とする PGP は、イノシトールリン脂質、中でもホスファチジルイノシトール 5 リン酸 (PI5P) および、ホスファチジルイノシトール 3 リン酸 (PI3P) に類似した構造を有するリン脂質である (図 1)。



ホスファチジルグリセロールリン酸 (PGP)



ホスファチジルイノシトール 5 リン酸 (PI5P)

図 1. PGP と PI5P の構造

さらに、タンパク質との相互作用においてイノシトールリン脂質と似たような挙動を示す一例として、PGP を脱リン酸化するホスファターゼである PLIP/PTPMT1 が、同時に PI5P も基質とし得ることが挙げられる。

(2) 種々のイノシトールリン脂質に特異的に結合するタンパク質を同定する研究は、これまでも精力的に行われてきており、多くの手法が確立されている。それらのうち、代表的なものを下記に示す。

標識リン脂質をプローブとした発現スクリーニング

(J. Biol. Chem. **274**:37893, (1999))

リン脂質誘導体を担体に固定したアフィニティクロマトグラフィー

(Nature **416**:759, (2002))

リン脂質リポソームに対するアフィニティを利用した遠心分離法

(J. Biol. Chem. **285**:6781, (2010))

これらの手法のうち、
については、そのまま PGP 結合タンパク質の同定に用いることが可能であると考えられる。

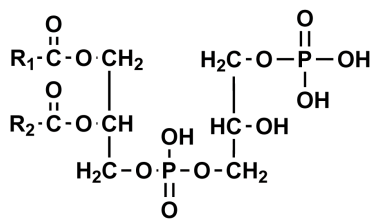
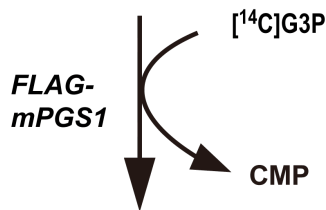
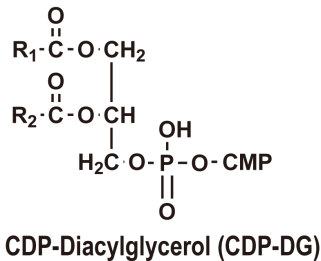
(3) 標識 PGP をプローブとした発現スクリーニングによる PGP 結合タンパク質の同定。具体的には、¹⁴C]グリセロール 3 リン酸と、CDP-ジアシルグリセロールを基質として、遺伝子組換えにより HeLa 細胞に発現させ、精製した PGS1 を用いて、生化学的に¹⁴C]PGP を作製

シプローブとして用いる。

(4) PGP を含むリポソームに対するアフィニティを利用した遠心分離法による PGP 結合タンパク質の同定。(3)と同様にして生化学的に作製した PGP を用いて、ホスファチジルセリンやホスファチジルコリンと混合リポソームを作製し、これらのリポソームに結合するタンパク質を質量分析により網羅的に解析する。

4. 研究成果

(1) $[^{14}\text{C}]$ グリセロール 3 リン酸と CDP-ジアシルグリセロールから生化学的に PGP を作製する方法を確立した。反応液に界面活性剤 (0.1% Triton X-100) を加えることが重要であることが明らかとなった。



$[^{14}\text{C}]$ Phosphatidylglycerophosphate (PGP)

図 2. 標識 PGP の生成反応

(2) 「3. (4)」の方法については、PGP の生成反応に用いた界面活性剤を、生成した PGP と分離することができず (互いの物性が似ているため) 生化学的に作製した PGP を用いて、実際にリポソームを作ることが出来なかった。そのため実施しなかった。

(3) 「3. (3)」の予備検討として、マウス肝ミクロソーム画分のタンパク質抽出物を用

いて、 $[^{14}\text{C}]$ PGP との結合能を評価する系を構築した。PGP をニトロセルロース膜もしくは、PVDF 膜に結合させ、そこへタンパク質をオーバーレイすることで結合を評価する系を確立した。

(4) ミトコンドリアに局在するタンパク質群のうち、既知のイノシトールリン脂質結合ドメイン (PH、ENTH、FYVE、GRAM、PX) を有するタンパク質について、組換えタンパク質を発現するベクターを構築し、発現ライブラリを作製した。これを用いて、(3)の系で PGP との結合能を評価した。しかしながら、有意な結合能を持つ分子は見いだせなかった。

(5) これらの検討の結果、研究期間内に PGP に結合するタンパク質を同定することは出来なかった。PGP 結合タンパク質は、既知のイノシトールリン脂質結合ドメインを有さず、新規の結合ドメインなどを介して、PGP と結合している可能性が示唆された。

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 5 件)

1: Takasuga S, Sasaki T.

Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate: metabolism and physiological functions.

J Biochem. (2013) 154:211-8.

doi: 10.1093/jb/mvt064.

2: Takasuga S, Horie Y, Sasaki J, Sun-Wada GH, Kawamura N, Iizuka R, Mizuno K, Eguchi S, Kofuji S, Kimura H, Yamazaki M, Horie C, Odanaga E, Sato Y, Chida S, Kontani K, Harada A, Katada T, Suzuki A, Wada Y, Ohnishi H, Sasaki T.

Critical roles of type III phosphatidylinositol phosphate kinase in murine embryonic visceral endoderm and adult intestine.

Proc Natl Acad Sci USA (2013) 110:1726-31.

doi: 10.1073/pnas.1213212110.

3: Hazeki K, Nigorikawa K, Takaba Y, Segawa T, Nukuda A, Masuda A, Ishikawa Y, Kubota K, Takasuga S, Hazeki O.

Essential roles of PIKfyve and PTEN on phagosomal phosphatidylinositol 3-phosphate dynamics.

FEBS Lett. (2012) 586:4010-5.
doi: 10.1016/j.febslet.2012.09.043.

4: Kawamura N, Sun-Wada GH, Aoyama M, Harada A, Takasuga S, Sasaki T, Wada Y.
Delivery of endosomes to lysosomes via microautophagy in the visceral endoderm of mouse embryos.

Nat Commun. (2012) 3:1071.
doi: 10.1038/ncomms2069.

5: Kurokawa T, Takasuga S, Sakata S, Yamaguchi S, Horie S, Homma KJ, Sasaki T, Okamura Y.

3' Phosphatase activity toward phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate [PI(3,4)P2] by voltage-sensing phosphatase (VSP).

Proc Natl Acad Sci USA. (2012) 109:10089-94.
doi: 10.1073/pnas.1203799109.

〔学会発表〕(計1件)

高須賀俊輔、浅沼研、木村洋貴、高須賀緑、中西広樹、佐々木純子、山崎正和、妹尾春樹、佐々木雄彦
「ホスファチジルグリセロールリン酸 (PGP) ホスファターゼの生理機能」
第86回日本生化学会大会
2013年9月11日 パシフィコ横浜(横浜市)

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者
高須賀 俊輔 (TAKASUGA SHUNSUKE)
秋田大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：90375262

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：