

平成 30 年 9 月 11 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07042

研究課題名(和文)細胞膜PI4P制御機構とその生理的役割の解明

研究課題名(英文)PI4P production and its physiological role at the plasma membrane

研究代表者

中津 史(Nakatsu, Fubito)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：50360607

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：イノシトールリン脂質PI4Pは、細胞膜に豊富に存在するが、その合成機構や生理機能の詳細は明らかではなかった。そこで培養細胞を用いて詳細に解析したところ、PI4P合成酵素であるPI4KIIIは、種々の細胞においてTMEM150A等と複合体を形成して細胞膜に局在することが明らかになった。また、細胞膜PI4Pは、オキシステロール結合タンパク質ファミリーORP5およびORP8を細胞膜にリクルートし、小胞体細胞膜接触部位形成を制御する機能を有することが判明した。

研究成果の概要(英文)：Phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P), a phosphoinositide enriched in the plasma membrane, has been shown to serve as a precursor for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. However, its own role at the plasma membrane has been poorly understood. We found that PI4KIII, the kinase responsible for the production of PI4P at the plasma membrane, forms a complex with TMEM150A, and localizes at the plasma membrane in many types of cells. Furthermore, PI4P produced by the PI4KIII complex recruits ORP5 and ORP8, members of the oxysterol-binding protein-related protein family, at the contact sites between the plasma membrane and endoplasmic reticulum.

研究分野：細胞生物学

キーワード：イノシトールリン脂質

1. 研究開始当初の背景

脂質は、細胞膜やオルガネラ膜を形成する役割の他に、シグナル伝達、細胞内輸送、代謝やエネルギー合成など、様々な細胞生理機能を担っている。なかでも、リン脂質の1つであるイノシトールリン脂質は、細胞における存在量は微量であるにもかかわらず、細胞の生存に必須の役割を果たす。イノシトールリン脂質の特徴は、イノシトール環の3位、4位、及び5位が可逆的にリン酸化・脱リン酸化を受け、組み合わせにより7種のイノシトールリン脂質が自在に作られることにある。細胞膜においては、Phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P)-Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2)-phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP3)の一連の代謝が、酵素群の働きにより制御されており、特に PIP2 及び PIP3 は、シグナル伝達やエンドサイトーシス等に必須の役割を担うことから、様々な知見が得られている(引用文献①)。しかし一方で、その前駆体であるPI4Pについては、PIP2と同様に重要であるにもかかわらず、不明な点が多い。酵母をもちいた先行研究から、細胞膜におけるPI4Pの新規合成は、*stt4* によって制御されることがわかっていた。また、*stt4* は複合体を形成して細胞膜に局在し、細胞膜のPI4P合成を担うことも判明していた。しかしながら、哺乳動物細胞におけるPI4P合成機構について、その詳細は未解明であった。そこで私達は、*stt4* の哺乳動物相同遺伝子である Phosphatidylinositol 4-kinase III α (PI4KIII α)の分子細胞生物学的解析を行い、これまでNCBIのデータベースに登録されているPI4KIII α の開始コドンは誤りであり、実際にはN末端側59アミノ酸が欠落していたこと、そして新たに同定した全長PI4KIII α は新規分子EFR3AもしくはEFR3B及びTTC7AもしくはTTC7Bと複合体(PI4KIII α -EFR3-TTC7)を形成することで、細胞膜に局在することを見いだした(引用文献②)。さらに、タモキシフェン誘導型のPI4KIII α ノックアウトマウスを作成し、このノックアウトマウスから樹立したPI4KIII α ノックアウト線維芽細胞では、細胞膜PI4Pが合成されない結果、細胞膜のアイデンティティが確立されず、種々の細胞膜機能が損なわれることがわかった。これらの結果から、PI4KIII α は、細胞膜PI4P産生および細胞膜機能に必須の役割を担っていることが明らかになった(引用文献②)。

2. 研究の目的

上述の研究から様々な新知見が得られたが、同時にさらなる多くの疑問点が生じた。中でも重要なのは、①PI4P複合体形成機構である。EFR3A/BとTTC7A/B以外に複合体形成分子は存在するのか？それらは細胞内で複合体を形成し、細胞膜に局在するのか？また、②細胞膜PI4Pの生理機能の詳細は依然不明である。PI4PがPIP2の前駆体であることは周知の事実であるが、PI4Pは単にPIP2の前駆体としての機

能しか持っていないのか？PI4P自身はどのような機能を有しているのか？そこで本研究では、細胞膜PI4Pの産生制御メカニズムと生理機能の解明を目指し、PI4KIII α 複合体局在制御と、それにより産生されるPI4Pの生理機能について解析した。

3. 研究の方法

PI4KIII α 複合体の局在を詳細に調べるために、PI4KIII α 、EFR3A、EFR3B、TTC7A、TTC7B およびTMEM150Aを発現するプラスミドは、ヒトもしくはマウス由来のcDNAを用いてそれぞれ作成した。また、培養細胞としては、株化細胞として、HeLa細胞、COS7細胞、NG108-15細胞及びPC12細胞を用いた。初代培養細胞としては、マウス線維芽細胞を用いた。マウス線維芽細胞は、定法にしたがって胎児マウスから脳と造血系組織を除いた後にトリプシン消化を行ったのちに、培養ディッシュに付着して増殖した細胞を用いた。

脂質の調整およびリン脂質の定量は以下のように行った。まず、培養細胞をPBSで洗浄したのちに、メタノールおよび塩酸を含むバッファーで処理して、スクレーパーにより細胞抽出液を回収した。これをエッペンチューブに移し、クロロホルムを加えてからボルテックスにより攪拌して遠心分離することで脂質を抽出した。脂質を含む溶液を窒素ガスにより蒸発させて抽出した脂質を乾燥させたのち、脱アシル化処理を行った。これを脱イオン水に溶解し、イオンクロマトグラフィーによって陰イオンカラムを用いて解析した。

4. 研究成果

(1)PI4KIII α は、EFR3A/BおよびTTC7A/Bとともに複合体を形成することが判明している。しかしながら、酵母による先行研究から細胞膜に局在する複数回膜貫通型タンパク質sfk1が*stt4*を細胞膜にリクルートすることが報告されていた。そこで私たちは、sfk1の動物細胞相同遺伝子を探索し、TMEM150分子群がその候補となることを見いだした。そしてそのうちTMEM150AがPI4KIII α 複合体の新たなコンポーネントの一つであることを見いだした。そこで、PI4KIII α 、EFR3A/B および TTC7A/B に加えて、TMEM150Aを培養細胞株(HeLa細胞、COS7細胞、NG108-15細胞及びPC12細胞)に発現させてその局在を詳細に調べたところ、TMEM150AはPI4KIII α とともに細胞膜に局在すること明らかとなった。また、マウス線維芽細胞においてPI4KIII α 複合体の局在を調べたところ、TMEM150AはやはりPI4KIII α とともに細胞膜に局在した。したがって、TMEM150Aは、広範の組織において発現し、TMEM150AはPI4KIII α とともに複合体を形成することが明らかとなった。

(2)PI4Pの生理機能を調べるため、先に樹立したタモキシフェン誘導型PI4KIII α ノック

アウト線維芽細胞に、タモキシフェンを 36 時間添加して PI4KIII α 欠損を誘導した。コントロールとしては、DMSO のみを添加した。培養開始1週間後に、コントロール細胞およびノックアウト細胞をそれぞれ回収し、生化学的に脂質を抽出して、最終的には脱アシル化したグリセロリン脂質を調整した。これをイオンクロマトグラフィーにて陰イオン交換カラムを用いて解析したところ、PI4P の顕著な減少が確認された。

一方、オキシステロール結合タンパク質ファミリーは、脂質結合ドメインを有し、脂質の輸送・代謝を制御すると考えられている。ORP5 および ORP8 は、膜貫通領域を持ち、小胞体に局在しつつ他のオルガネラ膜に結合する可能性が示唆されていた。そこで、オキシステロール結合タンパク質 ORP5 および ORP8 の局在を、GFP-ORP5 および GFP-ORP8 を一過性に発現させて調べたところ、コントロール線維芽細胞においては、ORP5 および ORP8 は小胞体—細胞膜接触部位に局在した。しかしながら、PI4KIII α ノックアウト線維芽細胞では、その小胞体—細胞膜接触部位局在が消失した。このことから、細胞膜 PI4P は ORP5 および ORP8 を小胞体—細胞膜接触部位にリクルートする機能を有することが明らかになった。

<引用文献>

- ① DiPaolo G, De Camilli P.: Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* 2006 443(7112):651-7.
 - ② Nakatsu F*, Baskin JM*, Chung J, Tanner LB, Lee SY, Pirruccello M, Hao M, Ingolia NT, Wenk MR, De Camilli P.: PtdIns4P synthesis by PI4KIII α at the plasma membrane and its impact on plasma membrane identity. *J. Cell Biol.* 2012 Dec 10;199(6):1003-16 (*equal contribution)
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 9 件)
- ① Nozumi M, Nakatsu F, Katoh K and Igarashi M.: Coordinated Movement of Vesicles and Actin Bundles During Nerve Growth Revealed by Superresolution Microscopy. *Cell Rep.* 18, pp. 2203-2216, doi: 10.1016/j.celrep.2017.02.008. 2017、査読有
 - ② 中津 史: ホスファチジルイノシトール 4-リン酸による細胞機能の制御 *領域融合レビュー* 5, e008, 2016、査読有
 - ③ 中津 史. イノシトールリン脂質による細胞内脂質ホメオスタシス制御機構 *新潟医学会雑誌* 130(6) 327-332、2016 (査読有り)
 - ④ Xiong D, Xiao S, Guo S, Lin Q, Nakatsu F and Wu M.: Frequency and Amplitude Control of Cortical Oscillations by Sequential Phosphoinositide Waves. *Nat. Chem. Biol.* 12, pp. 159-166, doi: 10.1038/nchembio.2000.2016、査読有
 - ⑤ 中津 史、Olof Idevall-Hagren: 脂質 オプトジェネティクス～光による脂質の操作～ *実験医学* 33, pp. 3089-3092, 2015
 - ⑥ Nakatsu F.: A phosphoinositide code for primary cilia. *Dev Cell* 34, pp. 379-380, doi: 10.1016/j.devcel.2015.08.008. 2015、査読有
 - ⑦ Chung J, Torta F, Masai K, Lucast L, Czapla H, Tanner LB, Narayanaswamy P, Wenk MR, *Nakatsu F and *De Camilli P.: PI4P/phosphatidylserine countertransport at ORP5 and ORP8-mediated ER-plasma membrane contacts. *Science* 349, pp. 428-32, 2015 (*corresponding author) doi: 10.1126/science.aab1370. 査読有
 - ⑧ Zou Y, Stagi M, Wang X, Yigitkanli K, Siegel CS, Nakatsu F, Cafferty W and Strittmatter SM.: Gene Silencing Screen for Mammalian Axon Regeneration Identifies Inpp5f (Sac2) as an Endogenous Suppressor of Repair after Spinal Cord Injury. *J. Neurosci.* 35, pp. 10429-10439, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1718-15.2015. 2015、査読有
 - ⑨ Nakatsu F, Messa M, Nandez R, Czapla H, Zou Y, Strittmatter SM and De Camilli P.: Sac2/INPP5F is an inositol 4-phosphatase that functions in the endocytic pathway. *J. Cell Biol.* 209, pp. 85-95, doi: 10.1083/jcb.201409064. 2015、査読有
- [学会発表] (計 13 件)
- ① 中津 史: パーキンソン病関連遺伝子 INPP5F による神経細胞内・膜輸送制御機構の解明、新潟医学会特別講演、新潟大学有壬会館、11/18、2017
 - ② 中津 史: イノシトールリン脂質による

細胞機能制御：生体膜ダイナミクスから脂質交換輸送まで、第 58 回新潟生化学懇話会、新潟大学図書館ライブラリーホール（新潟）、6/24、2017

- ③ 中津 史：イノシトールリン脂質・PI4P による細胞機能制御、シンポジウム、第 59 回日本脂質生化学会、京都大学百周年時計台記念館（京都）、6/15～6/16、2017
- ④ 中津 史：膜接触部位を介した脂質交換輸送による細胞内脂質クオリティ制御、シンポジウム、第 69 回日本細胞生物学会大会、仙台国際センター（仙台）、6/13～6/15、2017
- ⑤ Fubito Nakatsu, Jeeyun Chung and Pietro De Camilli.: Countertransport of PI4P and phosphatidylserine at ER-plasma membrane contact sites, 第 57 回新潟生化学懇話会、新潟大学医歯学総合病院 新潟医療人育成センター（新潟）、6/25、2016
- ⑥ 河寄 麻実、小林大記、野住素広、玉田篤史、武内恒成、崎村健司、仁科博史、中津史、五十嵐道弘：リン酸化プロテオミクスで同定された、神経成長関連分子群の責任キナーゼの解析、第 68 回日本細胞生物学会大会、京都テルサ（京都）、6/15～6/17、2016
- ⑦ 中津 史：小胞体—細胞膜接触部位における P14 P とホスファチジルセリンの交換輸送機構、第 68 回日本細胞生物学会大会、京都テルサ（京都）、6/15～6/17、2016
- ⑧ 中津 史：Membrane identity and lipid homeostasis controlled by PI4P at the plasma membrane、BMB2015（第 38 回日本分子生物学学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会）、神戸国際会議場、神戸国際展示場（神戸）、12/1～4、2015
- ⑨ 中津 史：イノシトールリン脂質による細胞内脂質ホメオスタシス制御機構、新潟医学会特別講演、新潟大学有壬会館（新潟）、11/21、2015
- ⑩ 岡田 正康、河寄 麻実、武内 恒成、玉田 篤史、中津 史、五十嵐 道弘：Anti-phospho-GAP-43 pSer96 antibody as a novel molecular marker for axonal growth and regeneration、第 58 回日本神経化学学会、大宮ソニックシティ（埼玉）、9/11～13、2015

⑪ Fubito Nakatsu, Mirko Messa, Ramiro Nandez, Heather Czapla, Yixiao Zou, Stephen M Strittmatter and Pietro De Camilli.: Sac2/INPP5F is an inositol 4-phosphatase that functions in the endocytic pathway, Gordon Research Conference “Molecular Membrane Biology”, Proctor Academy (New Hampshire, USA), 7/12～7/17, 2015

⑫ 中津 史、デカミリ ピエトロ：初期エンドサイトーシス経路の新たな制御機構：イノシトールリン脂質酵素群によるチームエフォート、シンポジウム、第 67 回日本細胞生物学会大会、タワーホール船堀（東京）、6/30～7/2、2015

⑬ 中津 史、Pietro De Camilli.: イノシトールリン脂質酵素群による新たなエンドサイトーシス制御機構、平成 27 年度日本生化学会関東支部例会（第 56 回新潟生化学懇話会共催）、新潟日報メディアシップ（新潟）、6/20、2015

〔図書〕（計 1 件）

① 中津 史、大野博司：タンパク質の輸送選別にはたらく AP 複合体 DOJIN BIOSCIENCE シリーズ「メンブレントラフィック」、化学同人 pp. 98-113, 2016

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

<http://www.med.niigata-u.ac.jp/bc2/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中津 史 (NAKATSU, Fubito)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号：50360607