

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2016～2019  
課題番号：16K08585  
研究課題名(和文)リン脂質を介した新しい小胞体ストレス応答メカニズムの解明

研究課題名(英文) Regulation of ER stress response by phospholipids

## 研究代表者

伊集院 壮 (IJUIN, TAKESHI)

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：00361626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：決定する役割を担う。しかし、小胞体にはPIP2やPIP3は微量にしか存在しておらず、その役割は不明であった。本研究では、ホスホイノシタイドホスファターゼであるINPP5KとSAC1ML1が小胞体の大きさをコントロールしており、これらの過剰発現は小胞体の縮退を、遺伝子欠損では小胞体の膨張を引き起こしていた。小胞体ストレスに依存して小胞体は膨張し恒常性を維持している。INPP5KとSAC1は小胞体の形態を変えることにより、小胞体ストレスに対する恒常性維持に寄与していることが明らかとなった。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内異常タンパク質の蓄積や、カルシウム代謝異常はリソソーム病や神経筋疾患で多く認められ、小胞体ストレス応答や小胞体形態の制御機構は数多く研究されてきた。今回、ホスホイノシタイドが直接的にこれらの現象を制御していること、さらにINPP5KとSAC1ML1の遺伝子欠損や活性低下が小胞体機能恒常性維持に異常を引き起こすことから、これらの酵素が上記の重要な疾患の治療ターゲットになることが期待される。さらに、小胞体膜形態変化におけるホスホイノシタイドの役割を明らかにしたことは、加齢に伴う骨格筋機能低下におけるカルシウム代謝異常の回復にホスホイノシタイド代謝酵素が利用できる可能性も示唆している。

研究成果の概要(英文)：Phospholipids, especially phosphoinositides, have roles in the formation of membrane curvature of plasma membrane and intracellular organelles. However, little is known about the role of phosphoinositides and the phosphoinositide turnover in the endoplasmic reticulum (ER), because of their very low quantities. Here, I found that two phosphoinositide phosphatases, INPP5K and SAC1ML1, which hydrolyzes PIP2 to generate PI, have roles in ER membrane swelling upon excess ER stress. Overexpression of these phosphatases resulted in ER shrinkage, while knockdown of them induced ER swelling. Taken together, INPP5K and SAC1ML1 regulate ER stress response via controlling ER structure and thus result in maintaining ER homeostasis.

研究分野：細胞生物学

キーワード：小胞体 小胞体ストレス ホスホイノシタイド INPP5K SAC1ML1

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

哺乳細胞の中で小胞体は細胞内外の環境にตอบสนองして、タンパク質や脂質合成を行う細胞内小器官である。小胞体の重要な機能はである分泌タンパク質の立体構造形成は GRP94 や GRP78 などの小胞体シャペロンといわれる一群の分子シャペロンによって担われている。分泌タンパク質を多く産生すると分子シャペロンが不足するため、小胞体ストレス応答によってこれらの遺伝子の転写誘導が起こる。この転写誘導機構を小胞体ストレス応答(Unfolded protein response, UPR)と呼ぶ。老化などによって小胞体ストレス応答の機能が低下すると小胞体シャペロンが不足し、構造の異常な分泌タンパク質が蓄積して凝集体を形成する。このようなタンパク質の凝集体の蓄積は小胞体ストレスとなるが、神経細胞は小胞体ストレスに脆弱であるために細胞死を誘導し、その結果アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患を引き起こす。一方、がん細胞や糖尿病における脂肪細胞などは、小胞体ストレス応答の機能を著しく上げて、細胞死から身を守っている。その結果、がん細胞は増殖を続けたり、浸潤転移能を獲得したりして、どんどん病型を悪化させるように働く。このような状態では、小胞体もその機能を動かし続ける状態となるが、そのために小胞体そのものの形を変えその面積を大きくする。具体的には微小管系やアクチン細胞骨格系にそって小胞体膜を伸長させ、タンパク質の修復・膜の原料となる脂質合成の活性化など細胞の恒常性を保つのに必要な現象が活性化させる。しかしながらこのような環境に応じて小胞体の形態変化を起こすメカニズムとその結果起こる現象のメカニズムは明らかになっていない。従って本研究は様々な疾患の予防・診断・治療に役立つと考えられる。特に、がんの悪性化・糖尿病におけるインスリン抵抗性の誘導・アルツハイマー病などの神経変性疾患における異常タンパク質の蓄積と関連する小胞体ストレス応答(小胞体の量的調節機構)の分子機構の解明は強く期待されている。

### 2. 研究の目的

私は、小胞体に局在するリン脂質代謝酵素の機能に着目して研究を行ってきた。しかしながら、小胞体自体でのホスホイノシチドやスフィンゴリン脂質などリン酸化脂質の役割はほとんど示されていない。私は小胞体シャペロンである GRP78 との結合を介して小胞体に局在するホスホイノシチドホスファターゼ INPP5K が細胞膜上のホスファチジルイノシトール3リン酸(PIP3)を脱リン酸化して PI3 キナーゼシグナルを抑制していることを明らかにした。さらに、最近 INPP5K が小胞体ストレスによる、転写因子 XBP1 の活性化に依存して発現を上昇させ、その結果骨格筋でのインスリンシグナルを抑制していることを明らかにした。また、SAC1 や S1P lyase など他の小胞体に局在するリン脂質代謝酵素が小胞体ストレス応答に依存して発現と局在を変化させていた。しかし、小胞体ストレス応答や小胞体構造のダイナミックな変化は、本来細胞の恒常性を維持するために行われるはずである。リン脂質による小胞体ダイナミクスおよび小胞体恒常性維持機構については明らかになっていない。本研究では、小胞体ストレス依存的な細胞内でのリン脂質代謝を時空間的に明らかにし、脂質合成・脂質輸送・カルシウム動態など小胞体と他のコンパートメント間で起こる現象に着目し、リン脂質が細胞のホメオスタシスに与える影響を検討する。

### 3. 研究の方法

ER-PM junction や ERGIC は小胞体が他の膜器官と接触する部分であるが、この部分で多くの物

質移動や情報伝達が行われている。本研究では、小胞体におけるリン脂質代謝を詳細に検討する。特に、小胞体ストレス応答時における ER-PM junction でのリン脂質代謝を時間的・空間的に検証する。また、小胞体に局在するリン脂質代謝酵素の小胞体上での動態を詳細に検討し、新しい小胞体ストレスセンサーとなるリン脂質代謝酵素の同定を行う。同定したリン脂質代謝酵素のがん細胞や骨格筋細胞でのノックダウン系を確立することによって、細胞内小器官でのリン脂質の新しい機能、特に細胞の恒常性に関わる機能を明らかにする。最終的に、この酵素への阻害剤ががん悪性化の抑制・がん幹細胞への細胞死誘導など新しいがん治療に応用できる可能性を検証する。

#### ER-PM junction など小胞体における局所的なイノシトールリン脂質の局在の検討

悪性度の高いがん細胞や、インスリン抵抗性を示す骨格筋細胞では、小胞体ストレス依存的に小胞体自身が形を変え、ER-PM junction を発達させていることが知られている。ストア作動性カルシウム流入のコンポーネントである STIM1 はこの部分に集積し、STIM1 puncta を形成している。ここでは様々な乳がん細胞および骨格筋細胞に、PI(3)P, PI(4)P, PI(3,4)P2, PI(4,5)P2, PIP3, S1P などの特異的に結合するリン酸化脂質プローブ、GFP 融合 2 XFYVE, FAPP1 PH, TAPP1 PH, PLC $\beta$ 1 PH, S1P FRET probe を発現させ、小胞体ストレス(タプシガルギンや飽和脂肪酸)によるリン脂質の局在を共焦点レーザー顕微鏡や全反射型顕微鏡を使用して観察する。STIM1 を同時に発現させ、STIM1 と共局在を示すリン酸化脂質の同定を行う。

#### 小胞体の形態を変化させ、小胞体ストレス依存的に局在を変化させるリン脂質代謝酵素の同定

脂質代謝の中心である小胞体には多くのリン脂質代謝酵素が局在することが知られている。その中で S1P lyase, SAC1, INPP5K は小胞体に局在し、その活性部位を細胞質側に向けているリン脂質代謝酵素である。これらの分子に着目し、GFP や mCherry などの蛍光をつけたこれらの分子の発現コンストラクトを作製し、乳がん細胞や骨格筋細胞における小胞体ストレス依存的な細胞内局在の変化を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察する。

#### リン脂質代謝酵素による小胞体ストレス応答制御と小胞体恒常性維持機能制御

で示された ER-PM junction に局在する脂質を基質とするリン脂質が、得られた中でこの脂質を基質とするリン脂質ホスファターゼによる変動を検討する。Hela 細胞においてリン脂質ホスファターゼを過剰発現させたり、ノックダウンしたりすることによって、PI(4,5)P2 や PI(4)P の ER-PM junction での小胞体ストレス依存的な量的な変化を時間経過とともに検討する。また、リン脂質代謝酵素の不活性型変異体を発現させ、これらの脂質量の相対的な変化を GFP 融合脂質結合ドメインの蛍光強度を基に定量的に測定し、野生型を発現させた場合と比較検討する。さらに、これらの細胞における小胞体ストレス応答を XBP1 や GRP78 mRNA の発現を指標に real time PCR で測定したり、store-operated calcium entry を Fluo3 で蛍光標識し、その蛍光強度で測定したりする。

#### リン脂質による小胞体形態制御が小胞体ストレスの軽減に及ぼす影響の検討

リン脂質、特にホスホイノシチドは細胞膜曲率や膜の硬さを決定する因子であることが近年明らかとなっている。小胞体は非常に細かいネットワークを形成する複雑な膜構造を形成しており、しかも細胞骨格を介してダイナミックな動態を示す。しかし、小胞体形態を制御するリン脂

質に関してはほとんどわかっていない。ここまでで確立したリン脂質代謝酵素のノックダウンの系を用いて、リボソームタンパクや calreticulin など小胞体シャペロンの局在を基に、小胞体形態変化の検証を行う。小胞体 tubule の消失が起こるものを探索し、この酵素に関して ER-PM junction 形成異常が起こるか検討を行う。

#### 4 . 研究成果

##### **小胞体ストレス依存的に小胞体上で PIP2 から PI への分解が起こる**

異常タンパク質の発現やストア依存性カルシウム流入による小胞体ストレスの増加に伴って、小胞体膜からの小胞の出芽が起こるが、この小胞は異常タンパク質と小胞体タンパク質を多く含んでいた。この小胞は PI(4)P を多く含んでおり PIP2 も一部含まれていた。

##### **INPP5K と SAC1ML1 による小胞体形態の変化**

INPP5K は PI(4,5)P<sub>2</sub> を脱リン酸化して PI(4)P を産生し、SAC1ML1 は PI(4)P を脱リン酸化して PI を産生するホスファターゼである。これらの酵素は共に小胞体に局在が認められるが、小胞体ストレス依存的に ER-PM junction に局在していた。また、二つの酵素を同時に過剰発現させた場合、顕著な小胞体の縮退が認められ、ER-PM junction が減少していた。これは両方の酵素活性依存的な現象であった。一方、INPP5K と SAC1ML1 のノックダウンを同時に行うと小胞体の膨張が認められた。このことから INPP5K と SAC1ML1 は協調的に小胞体形態制御に寄与していると考えられる。

##### **INPP5K と SAC1ML1 は小胞体ストレス応答をコントロールしている。**

小胞体ストレスは異常タンパク質の蓄積や小胞体カルシウムの枯渇によって誘導される。タブシガルギンによる小胞体ストレス依存的な XBP1s や GRP78 mRNA の転写は INPP5K や SAC1ML1 のノックダウンによって顕著に増加していた。これらの酵素が小胞体ストレス応答を制御していることを示唆している。また、XBP1 の発現抑制によって INPP5K ノックダウンによる小胞体膨張は抑制されたことから、これらの酵素は小胞体ストレス応答依存的な小胞体形態調節を行っていると考えられる。

##### **INPP5K と SAC1ML1 の適切な発現は小胞体恒常性維持に必要であると考えられる。**

INPP5K と SAC1ML1 のノックダウンは恒常的な小胞体ストレス応答の亢進を引き起こす。これらの細胞は小胞体の縮退を起こしているため、ER-PM junction を形成できず小胞体ストレス依存的なカルシウム流入を行うことができない。一方で、INPP5K と SAC1ML1 のノックダウンも ER-PM junction の増加に伴う恒常的なカルシウム流入の亢進によって小胞体恒常性維持の異常が起こる。従って、INPP5K と SAC1ML1 の適切な発現と局在が小胞体の形態と機能維持に不可欠であると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Takeshi Ijuin	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Phosphoinositide phosphatases in cancer cell dynamics-Beyond PI3K and PTEN.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 seminars in cancer biology	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.semcancer.2019.03.003.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Badawy SMM, Okada T, Kajimoto T, Hirase M, Matovelo SA, Nakamura S, Yoshida D, Ijuin T, Nakamura SI.	4. 巻 293(21)
2. 論文標題 Extracellular $\alpha$ -synuclein drives sphingosine 1-phosphate receptor subtype 1 out of lipid rafts, leading to impaired inhibitory G-protein signaling.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem.	6. 最初と最後の頁 8208-8216
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA118.001986	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Badawy SMM, Okada T, Kajimoto T, Hirase M, Matovelo SA, Nakamura S, Yoshida D, Ijuin T, Nakamura SI.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Extracellular $\alpha$ -synuclein drives sphingosine 1-phosphate receptor subtype 1 out of lipid rafts, leading to impaired inhibitory G protein signaling.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA118.001986	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kajimoto T, Mohamed NNI, Badawy SMM, Matovelo SA, Hirase M, Nakamura S, Yoshida D, Okada T, Ijuin T, Nakamura SI.	4. 巻 293
2. 論文標題 Involvement of G $\alpha$ subunits of Gi protein coupled with S1P receptor on multivesicular endosomes in F-actin formation and cargo sorting into exosomes.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 245-253
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.M117.80873	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Badawy SMM, Okada T, Kajimoto T, Ijuin T, Nakamura SI.	4. 巻 7
2. 論文標題 DHHC5-mediated palmitoylation of S1P receptor subtype 1 determines G-protein coupling	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16552
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-16457-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fukumoto M, Ijuin T, Takenawa T.	4. 巻 108
2. 論文標題 PI(3,4)P2 plays critical roles in the regulation of focal adhesion dynamics of MDA-MB-231 breast cancer cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 941-951
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13215	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 伊集院 壮、竹内 由紀子、下野 洋平、福本 末記、徳田 恵美、竹縄 忠臣	4. 巻 107
2. 論文標題 Regulation of CD44 expression and focal adhesion by Golgi phosphatidylinositol 4-phosphate in breast cancer.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 cancer science	6. 最初と最後の頁 981-990
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1111/cas.12968	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 福本 末記、伊集院 壮、竹縄 忠臣	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 PI(3,4)P2 plays critical roles in the regulation of focal adhesion dynamics of MDA-MB-231 breast cancer cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 cancer science	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13215	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 伊集院 壮、竹縄 忠臣
2. 発表標題 先天性筋ジストロフィー原因遺伝子SKIPはPIP2の脱リン酸化を介して骨格筋での小胞体ストレス応答を制御する
3. 学会等名 第60回日本脂質生化学会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Takeshi Ijuin, Tadaomi Takenawa
2. 発表標題 Altered PI(4)P generation by mutations in INPP5K, a phosphoinositide phosphatase, gene identified in individual exhibiting congenital muscular dystrophy
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 伊集院 壮
2. 発表標題 "ホスホイノシタイドホスファターゼINPP5Kによる小胞体ストレス依存的なカルシウム動態制御
3. 学会等名 第4回日本筋学会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Takeshi IJUIN
2. 発表標題 Roles of Phosphoinositide 5-Phosphatase SHIP2 in focal adhesion turnover depend on cancer cell types
3. 学会等名 13th Workshop on Frontiers in Phosphatase Research (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 伊集院 壮、福本 未記、竹縄 忠臣
2. 発表標題 PI(3,4)P2 plays critical roles in the regulation of focal adhesion dynamics of MDA-MB-231 breast cancer cells
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊集院 壮、福本 未記、竹縄 忠臣
2. 発表標題 ホスホイノシチドホスファターゼSHIP2によるPI(3,4)P2産生を介したMDA-MB-231転移性乳がん細胞のfocal adhesion形成と浸潤能の制御
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊集院 壮、福本 未記、竹縄 忠臣
2. 発表標題 PI(3,4)P2は乳がん細胞のfocal adhesionダイナミクスと細胞運動を制御する
3. 学会等名 日本脂質生化学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊集院 壮、竹縄 忠臣
2. 発表標題 SKIPは小胞体ストレスと病態をつなぐ分子である
3. 学会等名 日本脂質生化学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 伊集院 壮、竹縄 忠臣
2. 発表標題 ホスホイノシチドホスファターゼSKIPは小胞体ストレス応答とPI3キナーゼシグナルをつなぐ因子である
3. 学会等名 日本細胞生物学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 伊集院 壮、竹縄 忠臣
2. 発表標題 SKIPは小胞体ストレスとPI3キナーゼシグナルをつなぐ分子である
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 伊集院 壮、竹縄 忠臣
2. 発表標題 SKIP links ER stress with phosphoinositide turnover
3. 学会等名 International Conference of Protein Phosphatase (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----