

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18988

研究課題名(和文)クラスII型PI3キナーゼによる受容体エンドサイトーシスと小胞シグナリングの制御

研究課題名(英文)Class II PI3K regulate receptor endocytosis and endosomal signaling

研究代表者

安藝 翔 (Aki, Sho)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：80767210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：当研究室では、PI合成律速酵素PI3キナーゼII型 酵素(PI3K-C2) KOマウスが血管形成障害による胎生致死であり、主としてPI(3,4)P<sub>2</sub>を産生してVEGF、TGF $\beta$ やS1Pなど血管形成因子受容体のエンドサイトーシスとその後の細胞内小胞での受容体シグナリングに必要であることを報告している。本研究ではPI特異的結合蛍光プローブを用いてリアルタイム単一細胞イメージング法により観察し、TGF $\beta$ 刺激により惹起される形質膜上で起こるPI代謝経路及びPI代謝を調節する代謝酵素を同定した。これらの結果から、PI3K-C2を中心とした受容体エンドサイトーシスの全貌が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The phosphatidylinositol (PtdIns) 3-kinase (PI3K) family, which comprises three classes, regulates diverse cellular processes. In contrast to the well characterized class I and class III PI3Ks, physiological roles of class II PI3Ks were not well understood. We have recently demonstrated that class II isoform (PI3K-C2) plays crucial roles in angiogenesis, by analyzing PI3K-C2 KO mice. PI3K-C2 which generates PI(3)P and PI(3,4)P<sub>2</sub>, plays crucial roles in angiogenesis. PI3K-C2 was found to be required for endocytosis and signaling of the receptor tyrosine kinase vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2, the G protein-coupled receptor sphingosine-1-phosphate receptor-1 and serine/threonine kinase receptor TGF $\beta$  receptor. This study show that not only PI3K-C2 but also specific PI 5-phosphatase and PI 4-phosphatase required for receptor endocytosis via phosphoinositides metabolism.

研究分野：生理学

キーワード：PI3K ホスホイノシタイド エンドサイトーシス 血管新生

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類細胞では、ホルモン等の開口分泌と細胞外シグナルの受容、細胞の生存・分化、さらには細胞の形態や極性の形成・維持に、早期及び後期エンドソーム、リサイクリング・エンドソーム、トランスゴルジ網(TGN)から成るポストゴルジ・タンパク質輸送ネットワークやリソソーム、オートファゴソームからなる小胞を介する物質分解系が密接に関わっている。各種のイノシトールリン脂質(ホスホイノシタイド)はRabファミリー低分子量Gタンパク質とともに、小胞の形成、輸送、融合の各過程を促進し、細胞内小胞輸送系を制御する。イノシトール環3位にリン酸基を有する3'リン酸化ホスホイノシタイド、ホスファチジルイノシトール(PI)-3-リン酸(PI(3)P)、PI(3,4)P<sub>2</sub>、PI(3,5)P<sub>2</sub>、PI(3,4,5)P<sub>3</sub>はPI3-キナーゼ(PI3K)によりリン酸化されて生成し、PI(4)PやPI(4,5)P<sub>2</sub>などとともに小胞輸送の各プロセス特異的な調節機能を果たす。

PI3Kは3つのクラス(I, II及びIII)が存在し、主にPI(3,4,5)P<sub>3</sub>を産生するクラスIは受容体に共役して活性化され細胞増殖や遊走をひきおこし、PI(3)Pを産生するクラスIIIはリソソームへの小胞選別やオートファジー機能に関わる。一方、クラスII PI3Kの機能はこれまで不明であったが、研究代表者の属するグループは3種のクラスII PI3Kアイソフォームの中で血管及び上皮を含む様々な組織に発現するPI3K-C2α(C2α)が血管形成に必須であることをノックアウト(KO)マウスの解析によって明らかにした(Yoshioka et al. *Nature Med.* 2012)。さらに、血管内皮細胞(EC)特異的コンディショナルKOマウスも血管形成により胎生致死であったことから、ECのC2αが血管の形成に必要であることが明らかになった。C2α KOマウス由来のECやC2α ノックダウン(KD) ECでは、受容体をはじめとする細胞膜タンパクのエンドサイトーシス(内在化)が障害されており、特に主要な血管形成因子であるVEGFの受容体VEGFR2、脂質メディエータS1Pの1型受容体(S1P1)やTGFβ受容体(TGFβR)のエンドサイトーシスが強く抑制されていた。興味深いことに、エンドサイトーシスが障害された結果、ERKやAktの活性化は正常に保たれる一方、VEGFR2においてはエンドソーム上で起こる低分子量Gタンパク質Rhoの活性化、S1P1ではRacの活性化が選択的に抑制された(Biswas et al. *J Biol Chem.* 2013)。一方、TGFβRの主要シグナル経路である転写因子Smadリン酸化は、正常ECでは内在化されたTGFβ受容体が局在するエンドソーム上で観察され、C2α KOあるいはKDによりこれが完全に抑制された(Aki et al. *J Biol Chem.* 2015)。以上の結果は、1) ECにおいては血管形成に重要な役割を担う3種の受容体、

VEGFR2、S1P1、TGFβRはいずれも内在化後に局在するエンドソーム上でシグナルを産生すること、すなわち受容体エンドサイトーシスは従来考えられてきた受容体脱感作のプロセスである他に、ある種の受容体の小胞シグナリングに必要なプロセスであること、2) C2αは受容体エンドサイトーシスに関与し、その結果小胞シグナリングにも必要である。このように、クラスII C2αはクラスIやIII PI3Kと異なる独自の機能をはたすことを明らかにした。しかしながら、i) C2αが関与しエンドサイトーシスを制御する一連のホスホイノシタイド依存性機構の全貌、ii) C2αと構造上類似性のかなり高いクラスII酵素C2βの血管機能調節における役割分担については、未解明である。

## 2. 研究の目的

本研究では、以下の2点の解明を目標とした。

### 2-1. ECにおける受容体エンドサイトーシスを制御するホスホイノシタイド依存性機構の全貌の解明

受容体エンドサイトーシスは、形質膜のクラスリンで被覆された小窩(coated pit)の形成を以て開始し、くびれた小窩がダイナミンの作用で切断されてクラスリン被覆小胞となり早期エンドソームに移行する。coated pit形成が開始する形質膜部位の主要なホスホイノシタイドはPI(4,5)P<sub>2</sub>であるが、クラスリン被覆小胞では主要ホスホイノシタイドはPI(3)Pである。このエンドサイトーシスの過程で起こるホスホイノシタイド代謝を司るC2αを初めとする脂質キナーゼ及び脂質ホスファターゼを同定し、エンドサイトーシスの進行に伴って各酵素の作用で起こるホスホイノシタイド代謝の全貌を解明する。

### 2-2. KOマウス表現型の解析

血管内皮細胞及び平滑筋はともにC2αとC2βを発現している。両酵素のアミノ酸配列の相同性は高く、産生するホスホイノシタイドは同一と考えられる。全身性C2α KOマウスと異なり、全身性C2β KOマウスは正常に生まれ異常が見られない。これは、C2β欠損による異常のC2αによる補完によるかもしれない。しかしながら、平滑筋(SM)特異的なコンディショナルKOマウス(smKOマウス)を作成したところ、C2α-smKO、C2β-smKOの単独KOはいずれも異常が認められなかったが、C2αとC2βの二重KOマウス(C2α/C2β-smDKO)は子宮内で死亡することを予備実験により見いだしており、C2αとC2βには何らかの機能分担が存在すると想定される。そこで、C2α/C2β-smDKOマウスなどを用いて、血管細胞におけるC2α及びC2βの機能分担を動物個体レベルで解明する。

### 3. 研究の方法

#### 3-1. 受容体エンドサイトーシス及びその後のエンドソームシグナリングに關与するホスホイノシタイド代謝経路の解明

PI(3)P、PI(3,4)P<sub>2</sub>、PI(4,5)P<sub>2</sub>、PI(4)Pの各ホスホイノシタイドに結合するタンパクドメイン(GFPもしくはRFP蛍光タンパクとの融合分子)FYVE、TAPP1、PH(PLCδ)、P4M-SidMの発現ベクターをECに遺伝子導入し、蛍光共焦点顕微鏡下のリアルタイム単一細胞イメージング法により、TGFβ刺激時の各ホスホイノシタイドレベルの変化と変化を示す細胞内部位を觀察した。

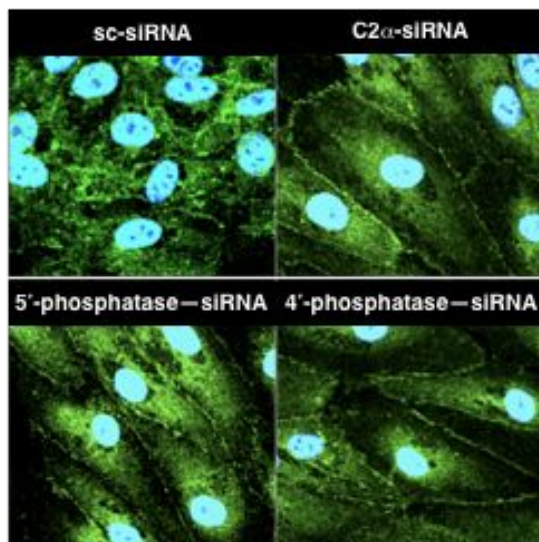
#### 3-2. C2α/C2β-smKO マウス表現系の解析

SM22-Cre マウスを用い、PI3K-C2α、PI3K-C2βを平滑筋特異的に欠損させ、解剖学的所見(免疫染色など)や生化学的解析(WB法など)を元に、マウス個体レベルでのPI3K-C2α、PI3K-C2βの生理的役割を解析した。

### 4. 研究成果

#### 4-1. 受容体エンドサイトーシス及びその後のエンドソームシグナリングに關与するホスホイノシタイド代謝酵素の同定

TGFβ刺激時の各ホスホイノシタイドレベルの変化を各ホスホイノシタイドに特異的に結合する蛍光プローブを用いてリアルタイム単一細胞イメージング法により觀察した。また、TGFβ受容体の免疫染色像(図1)による評価から、TGFβシグナル伝達経路に



**図1. TGFβ刺激による受容体エンドサイトーシス免疫染色像**

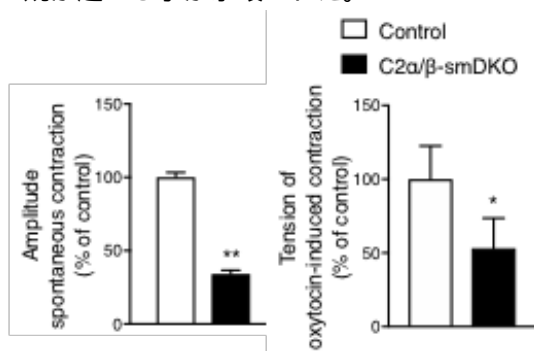
コントロール細胞(sc-siRNA)においてTGFβ刺激に惹起される受容体エンドサイトーシスが、PI3K-C2α-siRNA、5'-phosphatase-siRNA、4'-phosphatase-siRNA導入内皮細胞で減弱する

おける受容体エンドサイトーシス及びその後のエンドソームシグナリングを調節するホスホイノシタイド代謝酵素を同定した。

内皮細胞を用いた解析により、TGFβ刺激により惹起されるエンドサイトーシスは、PI3K-C2αにより産生されるPI(3,4)P<sub>2</sub>のみならず、5'-ホスファターゼ及び4'-ホスファターゼによるホスホイノシタイド代謝が必須である事を明らかにした。

#### 4-2. C2α/C2β-smKO マウスの作出及び表現系の解析

SM22-Cre マウスを用い、PI3K-C2α、PI3K-C2βを平滑筋特異的に欠損させ、平滑筋特異的C2α、C2β二重KOマウス(C2α/C2β-smDKO)を作出した。C2α/C2β-smDKOマウスの表現系を解析したところ、母親マウスがSM22-Creトランスジーンを有する場合にのみ、分娩異常により産仔数が少なかった(胎児数には異常がなく分娩異常)。また、C2α/C2β-smDKO母親マウスの子宮平滑筋を単離し、収縮能を觀察したところ、自発収縮、オキシトシン誘発収縮が有意に低下しており(図2)、クラスII型PI3K-C2α及びPI3K-C2βが子宮平滑筋収縮機構を調節することで正常な分娩が起こる事が示唆された。



**図2. 摘出子宮筋の自発収縮、オキシトシン誘発収縮**

妊娠20日目のマウスより子宮平滑筋を摘出し、自発収縮及びオキシトシン誘発収縮を觀察したところ、平滑筋特異的C2α、C2β二重KOマウス(C2α/C2β-smDKOマウス)において自発収縮、オキシトシン誘発収縮が有意に低下する

本研究課題では、受容体内在化に關与する脂質代謝酵素と細胞膜局所の脂質産物レベルを明らかにする事で、受容体内在化を制御する一連のホスホイノシタイド代謝の全貌を見出した。また、また、PI3K-C2αと構造上類似性のかなり高いクラスII酵素PI3K-C2βの機能を、平滑筋特異的C2α、C2β二重KOマウスを用いて解析することにより、周産期の生命維持・適応機構を制御する、新規なII型PI3Kの役割をメンブレン・トラフィックの観点から解明する道筋ができたことは、本研究課題の成果である。

### 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. Sarker Kabir Azadul, **Sho Aki**, Yoshioka Kazuaki, Kuno Koji, Okamoto Yasuo, Aung Thuzar Khin, Pham Quynh Hoa, Islam Shahidul, Takuwa Noriko, Takuwa Yoh. Indispensable role of  $\alpha$  and  $\beta$  isoforms of class II PI3K in the uterine smooth muscle contraction during labor. *J Physiol Sci.* **査読なし** 68 : S76, 2018
2. Aung Thuzar Khin, Yoshioka Kazuaki, Aki Sho, Pham Quynh Hoa, Sarker Kabir Azadul, Islam Shahidul, Ishimaru Kazuhiro, Takuwa Noriko, Takuwa Yoh. Class II phosphoinositide 3-kinase isoforms PI3K-C2 $\alpha$  and PI3K-C2 $\beta$  play essential roles in pinocytosis in vascular endothelial cells. *J Physiol Sci.* **査読なし** 68 : S76, 2018
3. Pham Quynh Hoa, Yoshioka Kazuaki, Azadul Sarker Kabir, Aung Thuzar Khin, Islam Shahidul, **Aki Sho**, Ishimaru Kazuhiro, Takuwa Noriko, Takuwa Yoh. Myotubularin-related protein 4 (MTMR4), a phosphoinositide 3'-phosphatase, regulates endolysosome integrity and autophagy flux in human lung alveolar epithelial A549 cells. *J Physiol Sci.* **査読なし** 68 : S83, 2018
4. Okumura K, Yoshida K, Yoshioka K, **Aki S**, Yoneda N, Inoue D, Kitao A, Ogi T, Kozaka K, Minami T, Koda W, Kobayashi S, Takuwa Y, Gabata T. Photoacoustic imaging of tumour vascular permeability with indocyanine green in a mouse model. *Eur Radiol Exp.* **査読あり** 2018;2(1):5. doi: 10.1186/s41747-018-0036-7.
5. **Sho Aki**, Kazuaki Yoshioka, Yasuo Okamoto, Noriko Takuwa, Yoh Takuwa. Phosphatidylinositol 3-kinase class II  $\alpha$  isoform PI3K-C2 $\alpha$  is required for transforming growth factor  $\beta$ -induced receptor endocytosis and

endosomal signaling in endothelial cells. *J Physiol Sci.* **査読なし** 66 : S41, 2016

(学会発表) (計 10 件)

1. Sarker Kabir Azadul, **Sho Aki**, Yoshioka Kazuaki, Kuno Koji, Okamoto Yasuo, Aung Thuzar Khin, Pham Quynh Hoa, Islam Shahidul, Takuwa Noriko, Takuwa Yoh. Indispensable role of  $\alpha$  and  $\beta$  isoforms of class II PI3K in the uterine smooth muscle contraction during labor. 第 95 回日本生理学会大会 2018 年 3 月 28-30 日 サポートホール高松 (香川) (口頭)
2. Aung Thuzar Khin, Yoshioka Kazuaki, **Aki Sho**, Pham Quynh Hoa, Sarker Kabir Azadul, Islam Shahidul, Ishimaru Kazuhiro, Takuwa Noriko, Takuwa Yoh. Class II phosphoinositide 3-kinase isoforms PI3K-C2 $\alpha$  and PI3K-C2 $\beta$  play essential roles in pinocytosis in vascular endothelial cells. 第 95 回日本生理学会大会 2018 年 3 月 28-30 日 サポートホール高松 (香川) (口頭)
3. Pham Quynh Hoa, Yoshioka Kazuaki, Azadul Sarker Kabir, Aung Thuzar Khin, Islam Shahidul, **Aki Sho**, Ishimaru Kazuhiro, Takuwa Noriko, Takuwa Yoh. Myotubularin-related protein 4 (MTMR4), a phosphoinositide 3'-phosphatase, regulates endolysosome integrity and autophagy flux in human lung alveolar epithelial A549 cells. 第 95 回日本生理学会大会 2018 年 3 月 28-30 日 サポートホール高松 (香川) (口頭)
4. **Sho Aki**. 脂質リン酸化酵素 II 型 PI3 キナーゼによる血管機能制御の新機構 第 4 回血管生物若手研究会 2018 年 3 月 2-3 日 熊本大学薬学部宮村記念館 (熊本) (口頭)

5. Aung Thuzar Khin, **Aki Sho**, Yoshioka Kazuaki, Pham Quynh Hoa, Sarker Kabir Azadul, Islam Shahidul, Noriko, Takuwa Yoh. Phosphatidylinositol 3-kinase Class II isoforms, PI3K-C2 $\alpha$  and PI3K-C2 $\beta$  are necessary for Pinocytosis in Endothelial Cells. 第 94 回日本生理学会大会 2018 年 3 月 28-30 日 アクトシティ浜松 (静岡) (ポスター発表)

6. **Sho Aki**. 脂質リン酸化酵素 II 型 PI3 キナーゼによる血管機能制御の新機構 第 3 回血管生物若手研究会 2017 年 3 月 3-4 日 淡路夢舞台国際会議場 (兵庫) (口頭)

7. **Sho Aki**, Kazuaki Yoshioka, Yasuo Okamoto, Noriko Takuwa, Pham Hoa Quynh, MD Azadul Kabir Sarker, Khin Thuzar Aung, Islam Shahidul, Yoh Takuwa. Phosphatidylinositol 3-kinase class II  $\alpha$  isoform PI3K-C2 $\alpha$  is required for transforming growth factor  $\beta$ -induced receptor endocytosis and endosomal signaling in endothelial cells. 第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日 パシフィコ横浜 (神奈川県) (ポスター発表)

8. **Sho Aki**, Kazuaki Yoshioka, Yasuo Okamoto, Noriko Takuwa, Yoh Takuwa. Phosphatidylinositol 3-kinase class II  $\alpha$  isoform PI3K-C2 $\alpha$  is required for transforming growth factor  $\beta$ -induced receptor endocytosis and endosomal signaling in endothelial cells. 第 2 回春期特別日本血管生物医学会シンポジウム 2016 年 6 月 3 日-12 月 2 日 大阪大学微生物病研究所 谷口記念講堂 (大阪) (シンポジウム)

9. **Sho Aki**, Kazuaki Yoshioka, Yasuo Okamoto, Noriko Takuwa, Yoh Takuwa. Phosphatidylinositol 3-kinase class II  $\alpha$  isoform

PI3K-C2 $\alpha$  is required for transforming growth factor  $\beta$ -induced receptor endocytosis and endosomal signaling in endothelial cells. 第 93 回日本生理学会大会 2016 年 3 月 22-24 日 札幌コンベンションセンター (北海道) (シンポジウム:血管形成と分化を制御するシグナル機構)

10. **Sho Aki** Phosphatidylinositol 3-kinase class II  $\alpha$  isoform PI3K-C2 $\alpha$  is required for transforming growth factor  $\beta$ -induced receptor endocytosis and endosomal signaling in endothelial cells. 第 2 回血管生物若手研究会 2016 年 3 月 4-5 日 東北大学加齢医学研究所スマートエージング国際共同研究センター国際会議室 (宮城) (口頭)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 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 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  
なし  
6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
安藝 翔 (Aki, Sho)  
金沢大学 医学系 助教  
研究者番号: 80767210

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者  
( )

研究者番号:

(4)研究協力者  
Sarker Kabir Azadul  
Aung Thuzar Khin