

平成21年 5月25日現在

研究種目：若手研究（A）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18689003
 研究課題名（和文） ホスファチジルイノシトール二リン酸代謝系の生理的、病態生理的意義に関する研究
 研究課題名（英文） Physiological roles of phosphatidylinositol bisphosphates

研究代表者
 佐々木 雄彦 （ SASAKI TAKEHIKO ）
 秋田大学・医学部・教授
 研究者番号：50333365

研究成果の概要：イノシトールリン脂質の中でも特に、イノシトール環水酸基に二ヶ所のリン酸化を受けたホスファチジルイノシトール二リン酸に着目した解析を行った。PI(3,4)P2 と PI(3,5)P2 の代謝を司る酵素のいくつかは、胚発生に必須であることを見出した。また、臓器、組織特異的に酵素を欠損する遺伝子改変マウスを用いた表現型解析によって、PI(3,4)P2 が、神経系、免疫系、また発癌に関わること、さらに、PI(3,5)P2 の生成、分解を触媒する酵素が、上皮細胞、神経細胞において果たす役割を新たに見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	8,800,000	2,640,000	11,440,000
2007年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2008年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
年度			
年度			
総計	21,100,000	6,330,000	27,430,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：細胞生物学

1. 研究開始当初の背景

(1)イノシトールリン脂質 (PIs) は生体膜構成成分であるのみならず、細胞内シグナル分子として機能する。申請者は、PIs 代謝の生理的、病態生理的意義を包括的に理解することを目指した研究を進めてきた。PIs の中でも特に、イノシトール環水酸基に二ヶ所のリン酸化を受けたホスファチジルイノシトール二リン酸 (PIP2) に着目した解析を本研究で行うこととした。申請者は開始当初、PIP2 代謝酵素欠損マウスを新規に4系統樹立し、これらが後述のような著明な異常表現型を

呈することを発見していた。これらの新規知見は一部を除いて未公表であり、独自の知見に基づいた先進的な研究を、本研究においてさらに展開できることを期待していた。

(2)ホスファチジルイノシトールのイノシトール環が、その3、4、5位水酸基に可逆的なリン酸化を受ける結果、8種類のPIsが生成される。PIsは長らく、セカンドメッセンジャーの前駆体として認識されていた。しかし、がん遺伝子産物と会合する脂質キナーゼとして phosphoinositide 3-kinase (PI3K)が発見され、この酵素により生成される

PI(3,4,5)P3 (PIP3) が、分解されること無く、自身で直接、多様な標的分子を制御することが示された。現在、PIs の中でその生理機能が最もよく理解されているのは、この PIP3 である。申請者は、PIP3 の代謝酵素である PI3K α 、PTEN、SHIP1、SHIP2 などの欠損マウスを作製・解析し、発がん、免疫不全、糖代謝異常、骨代謝異常、自己免疫などの病態における PIP3 代謝の重要性をこれまでに報告してきた [Science 287: 1040-1046, 2000, Sasaki, T.ら (1 番目 15 名中) : Function of PI3K α in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration.、Genes Dev. 19:2054-65, 2005, Hamada, K. Sasaki, T.ら (2 番目 17 名中) The PTEN/PI3K pathway governs normal vascular development and tumor angiogenesis.、Genes Dev. 13:786-791, 1999, Liu, Q. Sasaki, T.ら (2 番目 7 名中) SHIP is a negative regulator of growth factor receptor-mediated PKB/Akt activity and myeloid cell survival.、Cell 110: 737-749, 2002, Crackower, M. Sasaki, T.ら (5 番目 22 名中) : Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathway.、Nature 409: 92-97, 2001, Clement, S. Sasaki, T.ら (7 番目 15 名中) : The lipid phosphatase SHIP2 controls insulin sensitivity.]。

(3)生化学的、細胞生物学的な研究により、PIP3 以外の PIs、特に PIP2 (PI(3,4)P2 と PI(3,5)P2 と PI(4,5)P2) も固有の標的分子を直接制御し、シグナリング分子として機能することが示されている。このことから、PIP3 代謝の場合と同様に PIP2 の代謝異常が、様々な細胞機能異常や病態の原因となることが推察される。しかしながら、ヒトをはじめとする動物個体における PIP2 の役割は殆ど理解されていなかった。本研究で、PI(3,4)P2 と PI(3,5)P2 に特に焦点を絞り、その生理的、病態生理的な役割についての研究を進める。これら PIs の個体内での機能に関しては全く報告されておらず、新規かつ独創性の高い研究成果を期待できる。

2. 研究の目的

PIP2 の生成や分解を担う酵素 (PIP2 代謝酵素) の生理機能を紐解くとともに、ヒト疾患・病態の理解を深め、国民の健康に資する知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1)PI(3,4)P2 分解酵素には leucine-rich phosphoinositide phosphatase (L-PIPase) と proline-rich PIPase (P-PIPase)が存在する。これらの遺伝子欠損マウスを作製し、動

物個体における両分子の生理機能を解析する。

(2) PI3P5K は哺乳動物に存在する唯一の PI(3,5)P2 産生酵素である。本研究では、PI3P5K 欠損マウスを作製し、これを利用して、個体での生理機能を解析する。

4. 研究成果

(1)L-PIPase 欠損マウスは全例において、ジスキネジア、ジストニア、舞踏病様の不随意運動を呈し、生後間もなく死亡するという予想外かつ興味深い知見を得た。この独自のツールを利用して、不随意運動発現の分子機構を解析した。その結果、L-PIPase は後シナプス肥厚部に存在し、神経伝達を不に抑制する機能を持つことを見出した。PI(3,4)P2 代謝という全く新しい観点からの中枢神経細胞死と不随意運動発現機構のさらなる解析は、難治性神経疾患の病態成立機序の理解に繋がり、国民の健康に資するものと期待できる。

(2) P-PIPase 欠損マウスを作製し、解析した。L-PIPase とは異なり、神経系の異常は確認されなかった。一方、この酵素は、心臓、甲状腺等において重要な機能を果たすことを見出した。今後のさらなる解析は、これらの臓器・組織に関わる疾患の病態成立機序の理解に繋がり、国民の健康に資するものと期待できる。

(3)PI3P5K 欠損細胞において、著明な細胞内小胞の巨大化と貯留 (空胞化) が認められた。また、PI3P5K がマウス初期発生に必須であることを見出した。さらに、神経、腸管等において重要な機能を果たすことを見出した。今後のさらなる解析は、これらの臓器・組織に関わる疾患の病態成立機序の理解に繋がり、国民の健康に資するものと期待できる。

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 24 件)

①Nishikimi, A., Fukuhara, H., Su, W., Hongu, T., Takasuga, S., Mihara, H., Cao, Q., Sanematsu, F., Kanai, M., Hasegawa, H., Tanaka, Y., Shibasaki, M., Kanaho, Y., Sasaki, T., Frohman, M. A., Fukui Y. (2009) Sequential Regulation of DOCK2 Dynamics by Two Phospholipids during Neutrophil Chemotaxis. *Science*, 324, 384-387、査読有り

②Mogi C, Tobo M, Tomura H, Murata N, He XD, Sato K, Kimura T, Ishizuka T, Sasaki T., Sato T, Kihara Y, Ishii S, Harada A, & Okajima F. (2009) Involvement of proton-sensing TDAG8 in extracellular acidification-induced inhibition of

proinflammatory cytokine production in peritoneal macrophages. *J. Immunol.* **182**, 3243-3251、査読有り

③Takeda, M., Ito, W., Tanabe, M., Ueki, S., Kato, H., Kihara, J., Tanigai, T., Chiba, T., Yamaguchi, K., Kayaba, H., Imai, Y., Okuyama, K., Ohno, I., Sasaki, T. & Chihara, J. (2009) Allergic airway hyperresponsiveness, inflammation, and remodeling do not develop in phosphoinositide 3-kinase γ -deficient mice. *J Allergy Clin Immunol.* **123**, 805-812、査読有り

④Wang, Y., Chen, X., Lian, L., Tang, T., Stalker, T., Sasaki, T., Brass, L., Choi, J., Hartwig, J. & Abrams, C. (2008) Loss of PIP5KI γ demonstrates that PIP5KI isoform-specific PIP2 synthesis is required for IP3 formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 14064-14069、査読有り

⑤ Iwasaki, H., Murata, Y., Kim, Y., Hossain, M., Worby, C., Dixon, J., McCormack, T., Sasaki, T. & Okamura, Y. (2008) A voltage-sensing phosphatase, Ci-VSP, which shares sequence identity with PTEN dephosphorylates phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 7970-7975、査読有り

⑥Nakasaka, M., Yoshioka, K., Miyamoto, Y., Sasaki, T., Yoshikawa, H. & Itoh, K. (2008) IGF-I secreted by osteoblasts acts as a potent chemotactic factor for osteoblast. *Bone* **43**, 869-879、査読有り

⑦Inoue-Narita, T., Hamada, K., Sasaki, T., Hatakeyama, S., Fujita, S., Kawahara, K., Sasaki, M., Kishimoto, H., Eguchi, S., Kojima, I., Beermann, F., Kimura, T., Osawa, M., Itami, S., Mak, T., Nakano, T., Manabe, M. & Suzuki, A. (2008) Pten deficiency in melanocytes results in resistance to hair graying and susceptibility to carcinogen-induced melanomagenesis. *Cancer Res.* **68**, 5760-5768、査読有り

⑧ Kuroda, S., Nishio, M., Sasaki, T., Horie, Y., Kawahara, K., Sasaki, M., Natsui, M., Matozaki, T., Tezuka, H., Ohteki, T., Forster, I., Mak, T., Nakano, T. & Suzuki, A. (2008) Effective clearance of intracellular Leishmania major in vivo requires Pten in macrophages. *Eur J. Immunol.* **38**, 1131-1140、査読有り

⑨ Garcon, F., Patton, D., Emery, J., Hirsch, E., Rottapel, R., Sasaki, T. & Okkenhaug, K. (2008) CD28 provides T cell costimulation and enhances PI3K activity

at the immune synapse independently of its capacity to interact with the p85/p110 heterodimer. *Blood*, **111**, 1464-1471、査読有り

⑩Wang, Y., Litvinov, R., Xinsheng, D., Bach, T., Lian, L., Petrich, B., Monkley, S., Critcheley, D., Sasaki, T., Birnbaum, M., Weisel, J., Hartwig, J. & Abrams, C. (2008) Loss of PIP5KI γ , unlike other PIP5KI isoforms, impairs the integrity of the membrane cytoskeleton in murine megakaryocytes. *J. Clin. Invest.*, **118**, 812-819、査読有り

⑪Tsukamoto, K., Hazeki, K., Hoshi, M., Nigorikawa, K., Inoue, N., Sasaki, T. & Hazeki, O. (2008) Critical roles of the p110 β subtype of phosphoinositide 3-kinase in lipopolysaccharide-induced Akt activation and negative regulation of nitrite production in RAW 264.7 cells. *J. Immunol.* **180**, 2054-2061、査読有り

⑫Kuwana, H., Terada, Y., Kobayashi, T., Okado, T., Penninger, J., Sasaki, J., Sasaki, T. & Sasaki, S. (2008) The phosphoinositide-3 kinase- γ - Akt pathway mediates renal tubular injury in cisplatin nephrotoxicity. *Kidney Int.*, **73**, 430-445、査読有り

⑬Horan K., Watanabe K., Kong A., Bailey C., Rasko J., Sasaki T. & Mitchell C. (2007) Regulation of Fc γ R-stimulated phagocytosis by the 72 kDa inositol polyphosphate 5-phosphatase. *Blood*, **110**, 4480-4491、査読有り

⑭Yanagi, S., Kishimoto, H., Kawahara, K., Sasaki, T., Sasaki, M., Nishio, M., Yajima, N., Hamada, K., Horie, Y., Kubo, H., Mak, T., Nakano, T., Nakazato, M. & Suzuki, A. (2007) Pten controls lung morphogenesis, bronchioalveolar stem cells, and onset of lung adenocarcinomas. *J. Clin. Invest.*, **117**, 2929-2940、査読有り

⑮Furutani Y., Matsuno H., Kawasaki M., Sasaki T., Mori K., Yoshihara Y. (2007) Interaction between telencepalin and ERM family proteins mediates dendritic filopodia formation. *J. Neurosci.* **27**, 8866-8876、査読有り

⑯Kishimoto H., Ohteki T., Yajima N., Kawahara K., Natsui M., Kawarasaki S., Hamada K., Horie Y., Kubo Y., Arase S., Taniguchi M., Vanhaesebroeck B., Mak T., Nakano T., Koyasu S., Sasaki T. & Suzuki A. (2007) The Pten/PI3K pathway governs the homeostasis of V \cdot 14 iNKT cells. *Blood*, **109**, 3316-3324、査読有り

⑰Ferguson J., Milne L., S. Kulkarni,

Sasaki T., Walker S., Andrews S., Crabbe T., Finan P., Jones G., Jackson S., Camps M., Rommel C., Wymann M., Hirsch E., Hawkins P. & Stephens L. (2007) PI(3)K γ has an important context-dependent role in chemokinesis. *Nature Cell Biol.* **9**, 86-91、査読有り

⑬Nishio, M., Watanabe, K., Sasaki, J., Taya, C., Takasuga, S., Iizuka, R., Balla T., Yamazaki M., Watanabe H., Itoh R., Kuroda S., Horie Y., Förster I., Mak T., Yonekawa H., Penninger J., Kanaho Y., Suzuki A. & Sasaki T. (2007) Control of cell polarity and motility by the PI(3,4,5)P₃ phosphatase SHIP1. *Nature Cell Biol.* **9**, 36-44、査読有り

⑭Kunisaki, Y., Nishikimi, A., Tanaka, Y., Takii, R., Noda, M., Inayoshi, A., Watanabe, K., Sasazuki, T., Sasaki, T. & Fukui, Y. (2006) DOCK2 is a Rac activator that regulates motility and polarity during neutrophil chemotaxis. *J. Cell Biol.* **174**, 647-652、査読有り

⑮Tsuruta, H., Kishimoto, H., Sasaki, T., Natsui, M., Shibata, Y., Tsuchiya, N., Horie, Y., Hamada, K., Yajima, N., Enomoto, K., Gordon, J., Mak, T., Nakano, T., Habuchi, T. & Suzuki, A. (2006) Hyperplasia and carcinomas in Pten-deficient mice and reduced PTEN protein in human bladder cancer patients. *Cancer Res.* **66**, 8389-8396、査読有り

⑯Suzuki, T., Kanai, Y., Hara, T., Sasaki, J., Sasaki, T., Kohara, M., Maehama, T., Taya, C., Shitara, H., Yonekawa, H., Frohman, M., Yokozeki, T. & Kanaho, Y. (2006) Crucial role of the small GTPase ARF6 in hepatic cord formation during liver development. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 6149-6156、査読有り

⑰Yogo, K., Mizutamari, M., Mishima, K., Takenouchi, H., Ishida-Kitagawa, N., Sasaki, T. & Takeya, T. (2006) Src homology 2 (SH2)-containing 5'-inositol phosphatase localizes to podosomes, and the SH2 domain is implicated in the attenuation of bone resorption in osteoclasts. *Endocrinology*, **147**, 3307-3317、査読有り

⑱Sato W, Horie Y, Kataoka E, Ohshima S, Dohmen T, Iizuka M, Sasaki J, Sasaki T, Hamada K, Kishimoto H, Suzuki A, Watanabe S. (2006) Hepatic gene expression in hepatocyte-specific Pten deficient mice showing steatohepatitis without ethanol challenge. *Hepatol. Res.* **34**, 256-265、査読有り

⑳Zhao, M., Song, B., Pu, J., Wada, T., Reid, B., Tai, G., Wang, F., Guo, A., Walczysko, P., Gu, Y., Sasaki, T., Suzuki, A., Forrester, J., Bourne, H., Devreotes, P., McCaig, C. & Penninger, J. (2006) Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase- γ and PTEN. *Nature*, **442**, 457-460、査読有り

[学会発表] (計9件)

①佐々木雄彦、In vivo Role of Inositol Polyphosphate Phosphatase 4A、Keystone Symposium "PI3-Kinase Signaling in Disease"、平成21年4月25日、Olympic Valley, CA, USA

②佐々木雄彦、神経細胞における L-PIPase の機能、第31回日本分子生物学会大会 第81回日本生化学会大会合同大会 BMB2008 シンポジウム「リン脂質シグナリングと生体膜のダイナミクス」平成20年12月12日 神戸

③佐々木雄彦、Regulation of neutrophil chemotaxis by cellular lipids、42nd Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation "Phagocyte biology: Molecular basis of innate immunity and chronic inflammation"、平成20年3月26日、Geneva, Switzerland

④佐々木雄彦、神経細胞における L-PIPase の機能、第30回日本分子生物学会大会 第80回日本生化学会大会合同大会「細胞制御のオーガナイザーとしてのホスファターゼスーパーファミリー」ワークショップ、平成19年12月12日 横浜

⑤佐々木雄彦、Roles of 3-phosphorylated phosphoinositides、第40回日本発生生物学会・第59回日本細胞生物学会合同大会、ミニシンポジウム、平成19年5月30日、福岡

⑥佐々木雄彦、イノシトールリン脂質代謝異常による細胞空胞化、日本分子生物学会2006フォーラム、メンブレントラフィックの奔流—分子から機能へ—、シンポジウム、平成18年12月6日、名古屋

⑦佐々木雄彦、Role of Phosphoinositide Phosphatase in Neutrophil Migration、Biochemical Society Focused Meeting、"3rd Focused Meeting on PI3K signalling and disease"、シンポジウム、平成18年11月7日、Bath, UK

⑧佐々木雄彦、Role of Phosphoinositide Phosphatase in Neutrophil Chemotaxis、The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress "New aspects of phosphoinositide signaling"、シンポジウム

ム、平成18年6月21日、京都
⑨佐々木雄彦、ホスホイノシタイドキナーゼ
／ホスファターゼのマウス個体における機
能、第48回日本脂質生化学会総会、シンポ
ジウム、平成18年6月8日、東京

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.akita-u.ac.jp/~bisei/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 雄彦 (SASAKI TAKEHIKO)

秋田大学・医学部・教授

研究者番号：50333365