

平成21年5月1日現在

研究種目：学術創成研究費

研究期間：2006～2010

課題番号：18GS0312

研究課題名（和文） ホスホイノシタイドによるシグナルの時空間制御

研究課題名（英文） Spatial and temporal regulation of signalling molecules
by phosphoinositides

研究代表者

竹縄 忠臣 (TAKENAWA TADAOMI)

神戸大学・大学院医学研究科・特命教授

研究者番号：40101315

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：ホスホイノシタイド、脂質結合蛋白質、リン脂質

1. 研究計画の概要

哺乳動物には7種のホスホイノシタイドが存在し、IP3やジアシルグリセロールといった2次メッセンジャーの産生脂質としての役割以外に、そのものが細胞内情報伝達や膜輸送、細胞骨格制御など様々な機能制御に関与していることが分かってきた。またこれらの脂質代謝の乱れが癌や糖尿病を始めとする、様々な疾病の原因になることも分かり、ホスホイノシタイドの重要性がますます認識されている、増殖、分化、発生といった生命の基本現象へのホスホイノシタイドの関与やその代謝の乱れが癌、糖尿病などの疾病に至る機序を明らかにするには、「微量かつ簡便なホスホイノシタイド検出法の開発」と言う、革新的な技術の開発が必要である。本研究では個々のホスホイノシタイドに特異的かつ高親和的に結合するドメインを利用した、①「全く新しい考えに基づくホスホイノシタイドの微量定量、検出法を確立する」。この方法を応用し、様々な細胞刺激や疾病に伴うホスホイノシタイドの変化を明らかにする。更に、②「新たなホスホイノシタイド結合ドメインを探索しその生理機能を明らかにする」。PI(3,4,5)P3はAkt/PKBやG蛋白質など数多くの重要な蛋白質の機能制御に関わっている。PI(3,4,5)P3の量的、局所的制御機構を明らかにするため③「PI(3,4,5)P3ホスファターゼのSKIPやPTENがどのようなコンパートメントのPI(3,4,5)P3を特異的に分解し、シグナルの局在化を行っているのかを明らかにする」。④これらの代謝酵素のノックアウトマウスを作成して、糖代謝、脂質代謝、癌発生への影響を調べる。

2. 研究の進捗状況

①革新的なホスホイノシタイドの検出法の確立：ホスホイノシタイドは微量にしか存在しないため、その定量はアイソトープを用いた方法がとられ扱いが煩雑であった。我々が目指した新しい微量定量、微量検出法はホスホイノシタイドに特異的に結合するドメインをプローブにして、定量、検出するという方法である。Q-dotをプローブに結合させ、同時に3種のホスホイノシタイドを可視化できた。さらにドットプロットにより6cmシャーレー一枚の細胞から3種の脂質を同時に定量できた。

②ホスホイノシタイド結合蛋白質の網羅的解析：脳からのホスホイノシタイドを含む脂質で作ったリポソームに結合する蛋白質を質量分析装置、LS-MS-MSで解析した。全部で400以上に及ぶ蛋白質が同定され、大部分が従来報告されている脂質結合ドメインを持つもの、細胞骨格調節蛋白質やGTP結合蛋白質調節蛋白質であったが、結合活性が報告されていない蛋白質もあった。これらの蛋白質の中から興味深い蛋白質としてCoronin1A, PIR125, mDia, Trim2とEB2を選択し、脂質のこれらの蛋白質の機能制御について調べた。

③SKIPによるPI(3,4,5)P3の局所的、時間的制御：我々はSKIPがPI(3,4,5)P3 5-ホスファターゼであることを見つけ、その性質を調べてきた。その過程でSKIPのKOマウスは胎生致死であったので、ヘテロマウスを作成し個体での機能を調べた。SKIPの発現減少はインス

リン感受性を増し、高脂肪食肥満を抑制した。更には筋肉でのAkt/PKBの活性化が亢進しグルコースの取り込みも増していた。更に詳しく作用機序をC2C12細胞を用いて調べた。SKIPは刺激が無いときは小胞体に存在し、インスリンシグナルが活性化されると、Glut4と共に膜へ移行し、その部位のPI(3,4,5)P3を分解し、インスリンシグナルを負に制御した。④脂質結合ドメイン発現マウスやイノシトールリン脂質代謝酵素のノックアウトマウスの作成と個体での機能:PI(3,4,5)P3結合ドメインを発現する”PI(3,4,5)P3可視化マウス”を活用して、immunological synapse、phagocytic cup、NKT細胞-樹状細胞接触点など、細胞機能を直接司る特定の膜局所におけるPI(3,4,5)P3動態を解明し、その生物学的な意義を明らかにした。本研究で、酵素遺伝子を全身性あるいは組織特異的に欠損するマウス、酵素活性欠失変異体ノックインマウスなど24系統を独自に作出した。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している

計画通りに研究は進み、本プロジェクトのコア技術である微量検出、定量に関してはほぼ予定を終了した。あとはまとめていく実験が残っているだけである。

4. 今後の研究の推進方策

このまま進めていって問題ないと思われる。

5. 代表的な研究成果

(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 26 件)

- ①. Ijuin, T., Yu, Y.E., Mizutani, K., Pao, A., Tateya, S., Tamori, Y., Bradley, A., and Takenawa, T., Increased insulin action in SKIP heterozygous knockout mice. Mol. Cell Biol. 28, 5184-5195 (2008) 査読有り
- ②. Oikawa T, Itoh T, Takenawa T., Sequential signals toward podosome formation in NIH-src cells. J. Cell Biol. 182, 157-169 (2008) 査読有り
- ③. Shimada A., Niwa H., Tsujita K., Suetsugu S., Nitta K., Hanawa-Suetsugu K., Azkasaka R., Nishino Y., Toyama M., Chen, L., Sugano S., Shirouzu, M., Nagayama, K., *Takenawa T., and *Yokoyama S. (Correspondent author), Curved EFC/F-Bar domain dimmers are joined end to end into a filament for membrane invagination in endocytosis, Cell 129, 761-772 (2007)

- ④. Takenawa T. and Suetsugu S., The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 8, 37-48 (2007) 査読有り

[学会発表] (計 15 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]