

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：24701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2021

課題番号：19K23712

研究課題名（和文）細胞内小胞輸送におけるイノシトールリン脂質の包括的解析

研究課題名（英文）Comprehensive analysis of roles of phosphoinositides in intracellular vesicular trafficking

研究代表者

馬場 崇 (Baba, Takashi)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：90609992

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：細胞は細胞外マトリクスやホルモンなどの分泌タンパク質を細胞内小胞輸送により細胞外に運び出す。本研究では生物発光共鳴エネルギー移動（BRET）を利用した定量解析を主要な手法として小胞輸送の脂質における役割の解析を試みた。初期エンドソームと後期エンドソームにはそれぞれPI3PとPI4Pが豊富であるが両脂質の関係性を解析した。また、細胞膜受容体のエンドサイトーシスにおけるPIP5Kの役割について新たな知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イノシトールリン脂質は脂質二重膜を構成するリン脂質の中でも比較的マイナーな脂質であるが、エフェクタータンパク質の膜へのリクルートや自身がシグナル因子として働くことで重要な役割を担う。BRETを用いたエンドソーム膜の定量的手法は世界的に見ても行われた例は少なく、今後のエンドソームにおけるイノシトールリン脂質代謝経路解明に貢献できると考えている。また、PIP5Kに関しては新たな知見が得られたことから、3種のPIP5Kの独自性の解明に繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Intracellular vesicular trafficking mediates transportation of extracellular matrix and secreted proteins outside cells. In this study, it has been attempted to explore a role of phospholipids in vesicular trafficking mainly using bioluminescence resonance energy transfer. We found that the relationship between PI3P on early endosomes and PI4P on late endosomes as well as a pivotal role of PIP5K in endocytosis of a transmembrane receptor.

研究分野：細胞生物学

キーワード：イノシトールリン脂質 BRET エンドソーム

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

膜タンパク質のオルガネラへの局在化や細胞外マトリクスやホルモン等の分泌は小胞輸送によって担われる。これまで、さまざまな被覆小胞が単離され、小胞形成に必要なタンパク質群の機能解析は詳細に行われてきた。一方で、小胞形成に同様に重要である脂質膜に関する解析は遅れていた。これは脂質成分を特定の小区画において迅速かつ定量的に測定することが困難であったことが大きな要因として考えられる。

最近、生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET) の原理を応用し、エンドソーム膜のイノシトールリン脂質を高感度にライブモニタリングする手法が開発された。この方法によって、はじめてダイナミックなリン脂質変化を秒単位で定量することが可能となった。さらに FKBP12 (FK506-binding protein) と FRB (FKBP-Rapamycin binding) ドメインのラパマイシン依存的な二量体化を応用し、標的膜の脂質組成を迅速に変化させる系を利用した。これにより、従来行われてきた脂質代謝酵素や脂質輸送タンパク質の発現抑制による機能解析と比べて、各オルガネラにおける脂質変化を迅速にもたらすことができ、代償性機構による間接的影響を受けずに直接的な脂質の機能を解析することが可能となった。以上の系を利用することによって、後期エンドソームにおける PI4P (Phosphatidylinositol 4-phosphate) と PI(4,5)P<sub>2</sub> (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) の量の調節が、Rab7 の活性化と PLEKHM1 (Pleckstrin homology domain-containing family member 1) の局在を変化させオートファゴソームとリソソームの融合を制御することを新たに見出した (Baba, T. et al. 2019, EMBO J)。

### 2. 研究の目的

イノシトールリン脂質は様々な小胞の形成過程において重要であることが知られているが、詳細は完全には解明されていない。そこで、上述した BRET を用いた検出系および標的膜の脂質組成をダイナミックに変化させる系を様々なオルガネラへ応用させることで、小胞輸送におけるイノシトールリン脂質の役割を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞培養とプラスミドと siRNA のトランスフェクション

実験には HEK293 細胞を使用し、培地は Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) にウシ胎児血清 10%、100 U/ml ペニシリン・100 µg/ml ストレプトマイシン になるよう添加したものを使用した。プラスミドのトランスフェクションには Lipofectamine 2000 を用い、導入して翌日後に解析を行った。siRNA は Oligofectamine を使用し、導入後 72 時間後に解析を行った。

#### (2) BRET によるイノシトールリン脂質測定

BRET による定量解析は標的膜区画に局在するタンパク質とイノシトールリン脂質結合ドメインに対してそれぞれルシフェラーゼと Venus タグを結合させたプラスミドを細胞内に発現させ行われる (図 1)。本研究では、Luciferase-FYVE domain (PI3P (Phosphatidylinositol 3-phosphate) センサー)-Venus-Rab5 (初期エンドソームマーカー) または Luciferase-tandem P4M (PI4P センサー)-Venus-Rab7 (後期エンドソーム) の配列を含むプラスミドを用いた。

HEK293 細胞を 96 ウェルプレートに播種した翌日にプラスミドを導入した。さらにその翌日に改変した Krebs-Ringer buffer (120 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.7 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM HEPES (pH 7.3), 10 mM Glucose) に置換し、coelenterazine を加え、マイクロプレートリーダーで ~1 分ごとにルシフェラーゼの発光と Venus の蛍光波長の強度を測定し解析した。

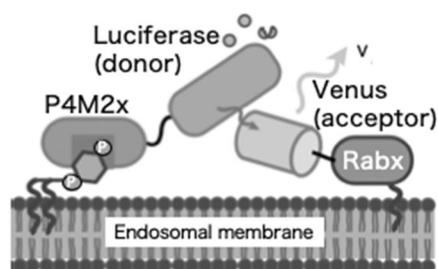


図 1 生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET) を用いたイノシトールリン脂質量法の例

### 4. 研究成果

#### (1) 初期エンドソームの PI3P が後期エンドソームの PI4P に与える影響

以前初期エンドソームと後期エンドソームの PI3P の定量的解析を目的に FYVE ドメイン (PI3P) と Rab5 または Rab7 を用いた BRET センサーを作製した。エンドソームの PI3P 産生酵

素 Vps34 の阻害剤を用いた実験から、これらの BRET センサーは Rab5 または Rab7 陽性エンドソームの PI3P を検出可能であることを確認した(図 2)。また、同様の方法でエンドソームの PI4P センサーも得られている(Baba, T. et al. 2019, EMBO J)。

これらのセンサーを用いて、初期エンドソームの PI3P を減少させたときの後期エンドソームの PI4P 量、及び後期エンドソームの PI4P を減少させた時の PI3P 量を調べた。Vps34 の阻害剤である VPS34-IN1 (Bago, R. et al. 2014, Biochem J.) を添加すると、初期エンドソームの PI3P が減少する。この時の PI4P 量を測定するとわずかであるが減少していることが分かった。反対に PI4P の減少は初期エンドソームの PI3P に影響は与えない。これらの結果は初期エンドソームから後期エンドソームへの成熟に伴い PI3P から PI4P に変化することを示唆している。

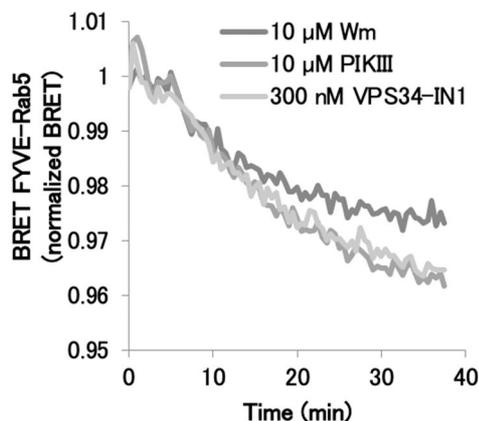


図2 PI3K阻害剤を用いたBRETによる初期エンドソームのPI3P検出の確認

### (2) 3種のPIP5KのGPCRのエンドサイトーシスにおける役割

GPCR はリガンドが結合すると細胞内にエンドサイトーシスされ、脱感作が起こる。このステップにおける3種のPIP5Kの関与をアンジオテンジン受容体のリガンド刺激に伴うエンドサイトーシスを測定することにより調べた。それぞれのPIP5KのsiRNAを用いて発現抑制後、アンジオテンジンによりリガンド刺激を行いエンドサイトーシスを誘発した。3種のPIP5K(Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase)のうち1つの発現抑制はエンドサイトーシスを早めることが分かった。

### (3) 考察と今後の展望

本研究ではエンドソームという細胞内の比較的小さな膜区画において初期エンドソームのPI3Pと後期エンドソームのPI4Pとの関係性を定量的に示した。エンドソームのイノシトールリン脂質はPI(4,5)P<sub>2</sub>やPI(3,5)P<sub>2</sub>なども局在しており、これらは様々なイノシトールリン脂質のフォスファターゼやキナーゼにより量的制御を受けている(Balla, T. 2013, Physiol Rev)。今後はエンドソームのリン脂質制御機構をBRETに加え顕微鏡による局在解析により明らかにできればと考えている。

アンジオテンジン受容体はPIP5Kの1つにより負の制御を受けている可能性を示した。PIP5Kの産生物であるPI(4,5)P<sub>2</sub>は様々なアダプタータンパク質をリクルートすることでクラスリン依存的エンドサイトーシスを制御している(Poster Y. et al. 2015, BBA)。3種のPIP5Kの1つのみがこのステップに抑制的に関与することは酵素自身が特有の機能を保持している可能性を示唆する。

### <引用文献>

Baba T, Toth DJ, Sengupta N, Kim YJ, Balla T. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate controls Rab7 and PLEKHM1 membrane cycling during autophagosome-lysosome fusion. EMBO J. 2019 Apr 15;38(8):e100312.

Bago R, Malik N, Munson MJ, Prescott AR, Davies P, Sommer E, Shpiro N, Ward R, Cross D, Ganley IG, Alessi DR. Characterization of VPS34-IN1, a selective inhibitor of Vps34, reveals that the phosphatidylinositol 3-phosphate-binding SGK3 protein kinase is a downstream target of class III phosphoinositide 3-kinase. Biochem J. 2014 Nov 1;463(3):413-27.

Balla T. Phosphoinositides: tiny lipids with giant impact on cell regulation. Physiol Rev. 2013 Jul;93(3):1019-137.

Posor Y, Eichhorn-Grünig M, Haucke V. Phosphoinositides in endocytosis. Biochim Biophys Acta. 2015 Jun;1851(6):794-804.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Baba Takashi, Alvarez-Prats Alejandro, Kim Yeun Ju, Abebe Daniel, Wilson Steve, Aldworth Zane, Stopfer Mark A., Heuser John, Balla Tamas	4. 巻 117
2. 論文標題 Myelination of peripheral nerves is controlled by PI4KB through regulation of Schwann cell Golgi function	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 28102 ~ 28113
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2007432117	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 Baba Takashi, Balla Tamas	4. 巻 168
2. 論文標題 Emerging roles of phosphatidylinositol 4-phosphate and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate as regulators of multiple steps in autophagy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 329 ~ 336
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvaa089	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 馬場崇, Toth, D.J., Sengpta, N., Kim, Y.J., Balla, T.
2. 発表標題 後期エンドソームにおけるPI(4,5)P2は低分子量GTPaseであるRab7を制御する。
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------