

平成22年 5月24日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20770108

研究課題名 (和文) 内耳有毛細胞におけるホスホリパーゼ C δ 3 の機能解析研究課題名 (英文) Functional analysis of phospholipase C δ 3 in inner hair cells

研究代表者

山口 英樹 (YAMAGUCHI HIDEKI)

東京薬科大学・生命科学部・講師

研究者番号：10345035

研究成果の概要 (和文)：本研究では細胞膜脂質代謝酵素であるホスホリパーゼ C δ 3 とその結合タンパク質として同定したモータータンパク質ミオシン VI について機能解析を行った。その結果、両タンパク質がマウス内耳有毛細胞において共発現すること、培養細胞の細胞膜において共局在することを明らかにした。さらにミオシン VI が機能することが知られるエンドサイトーシスや微絨毛形成にホスホリパーゼ C δ 3 が関与することが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：In this study, we performed functional analyses of phospholipase C δ 3, an enzyme involved in phosphoinositide metabolism, and its binding protein Myosin VI, a motor protein involved in molecular transport. As a result, we revealed that these proteins are coexpressed in the inner hair cells in mice and colocalized on the plasma membrane in cultured cells. Furthermore, we found that phospholipase C δ 3 regulates several cellular processes which depends on Myosin VI function, such as endocytosis and microvilli formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：細胞情報伝達機構、イノシトールリン脂質代謝、ホスホリパーゼ C、ミオシン、内耳有毛細胞、エンドサイトーシス、微絨毛形成

1. 研究開始当初の背景

PLC は PIP₂ を加水分解し、IP₃ と DAG という二つのセカンドメッセンジャーを産生する重要な細胞内シグナル伝達分子である。申請者が所属する研究室では、 δ 型 PLC の個体

レベルでの機能を明らかにしてきた。 δ 型 PLC には δ 1、 δ 3、 δ 4 の 3 種のアイソザイムが存在するが、PLC δ 1KO マウスが表皮角化細胞の増殖分化異常により顕著な体毛減少を示すこと 2、PLC δ 4KO マウスは精子先

体反応異常による雄性不妊を示すことを明らかにした。しかし、PLC δ 3 KO マウスには見かけ上顕著な表現型が観察されないことから、PLC δ 3 アイソザイムの機能は未だ不明である。そこで申請者らは、PLC δ 3 の機能解析を目的として酵母 two-hybrid スクリーニング法を行い、PLC δ 3 の結合タンパク質としてミオシン VI を同定した。

2. 研究の目的

ミオシン VI はアクチンモータータンパク質であり、エンドサイトーシスに関わることが明らかになっている。個体レベルにおいては、内耳蝸牛器官の有毛細胞に多く存在し、Snell's Waltzer 難聴マウスの原因遺伝子として知られている。内耳有毛細胞は機械的な音のシグナルを不動毛で感知する感覚上皮細胞である。ミオシン VI はこの不動毛の構造維持に不可欠であることが報告されている。興味深いことに、ミオシン VI のエンドサイトーシス小胞への局在やダイマー化は PLC の基質である PIP2 との結合により制御される。また、内耳有毛細胞の不動毛には PIP2 が豊富に存在し、聴覚神経の機能に必須であることが報告されている。これらの事実から、PLC δ 3 は PIP2 代謝を介してミオシン VI の機能を制御し、聴覚の機能において重要な役割を担っている可能性が高い。そこで本研究では、(1) PLC δ 3 とミオシン VI の結合様式、(2) PLC δ 3 による MyosinVI の機能制御、(3) 内耳有毛細胞及びマウス聴覚における PLC δ 3 の機能を、明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

PLC δ 3 とミオシン VI の詳細な結合様式、PLC δ 3 によるミオシン VI の機能制御、マウス聴覚における PLC δ 3 の役割を明らかにすることを目的として実験を行った。平成 20 年度は主に *in vitro* で分子レベル、細胞レベルの解析を行い、平成 21 年度には主に野生型及び PLC δ 3 KO マウスを用いた個体レベルでの解析を行った。

分子生物学的手法を用いて、PLC δ 3 とミオシン VI の詳細な結合様式の検討を行った。具体的には、両タンパク質の結合部位を決定することにより、機能との関連性を明らかにした。さらに、細胞生物学的手法により、培養細胞内での両タンパク質の局在や機能の解析を行った。

分子レベル、細胞レベルでの解析結果をさらに発展させるために、マウス個体レベルでの解析を行った。具体的には、野生型マウス内耳有毛細胞における PLC δ 3 の局在、発生や加齢に伴う発現パターンの変化を分子生物学、生化学的、組織学的に解析した。また、PLC δ 3 KO マウス内耳有毛細胞における

ミオシン VI の局在、不動毛の形態変化を組織学的に観察した。さらには、PLC δ 3 KO マウスの聴覚機能を野生型マウスと比較し、PLC δ 3 の聴覚における役割を検討した。

4. 研究成果

(1) PLC δ 3 及びミオシン VI の組織発現分布をウェスタンブロッティング法により確認した結果、多くの組織において両者が共発現していることが分かった。そこで両タンパク質が多く存在するマウス網膜ライセートを用いて免疫沈降を行った結果、内在性の両タンパク質が結合していることが明らかになった。また欠失変異体を用いた解析から、ミオシン VI の尾部と PLC δ 3 の C2 ドメイン及び PH ドメインがその結合に必要である事を明らかにした。

(2) PLC δ 3 の HeLa 細胞内での局在を検討した結果、細胞膜に多く存在し、一部ミオシン VI との共局在が確認された (図 1)。さらに、PLC δ 3 はエンドサイトーシス小胞に局在することが明らかになった。RNAi による PLC δ 3 の発現抑制を行ったところ、細胞膜上の LDL 受容体の減少や、クラスリン小胞によるエンドサイトーシスの低下などが観察された。また、大腸がん細胞においては、PLC δ 3 の発現抑制により微絨毛の形成に異常が見られた (図 2)。以上の結果から、PLC δ 3 はミオシン VI と共に、細胞内小胞輸送やエンドサイトーシス、微絨毛形成に関与することが示唆された。

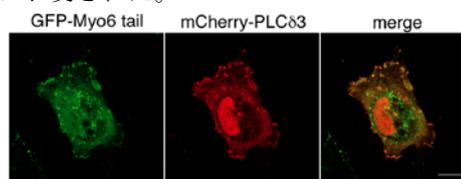


図 1 : HeLa 細胞における PLC δ 3 とミオシン VI の局在

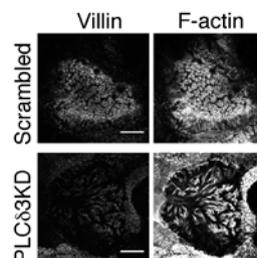


図 2 : PLC δ 3 の発現抑制による微絨毛形成阻害

(3) ミオシン VI が豊富に存在するマウス内耳蝸牛器官の凍結切片を用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行ったところ、ミオシン VI、PLC δ 3 mRNA 共に有毛細胞に局限して発現していた (図 3)。PLC δ 3 のノックアウトマウスの内耳組織切片をミオシン VI の

抗体を用いた免疫染色により解析した結果、内耳におけるミオシンVIの局在や内耳有毛細胞の不動毛の構造に大きな変化が認められなかった。また野生型及びPLC δ 3 KOマウスの聴覚機能を電気生理学的手法により比較したが大きな変化は認められなかった。現在加齢性の難聴発生におけるPLC δ 3の役割を解析するために、週齢を経たマウスを用いた解析も行っている。

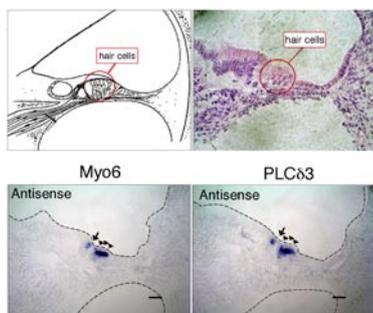


図3：内耳有毛細胞におけるミオシンVIとPLC δ 3 mRNAの発現

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9件)

(1) H. Yamaguchi †, S. Yoshida, E. Muroi, M. Kawamura, Z. Kouchi, Y. Nakamura, R. Sakai, and K. Fukami: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and PIP5-kinase I α are required for invadopodia formation in human breast cancer cells. *Cancer Sci.* 101: 1632-1638 (2010) † Corresponding author 査読有

(2) K. Kanemaru, M. Nakahara, Y. Nakamura, Y. Hashiguchi, Z. Kouchi, H. Yamaguchi, N. Oshima, H. Kiyonari, and K. Fukami: Phospholipase C- η 2 is highly expressed in the habenula and retina. *Gene Expr. Patterns* 10: 119-126 (2010) 査読有

(3) H. Yamaguchi †, Y. Takeo, S. Yoshida, Z. Kouchi, Y. Nakamura, and K. Fukami: Lipid rafts and caveolin-1 are required for invadopodia formation and extracellular matrix degradation by human breast cancer cells. *Cancer Res.* 69: 8594-8602 (2009) † Corresponding author 査読有

(4) M. Oser, H. Yamaguchi, C. C. Mader, M. Arias, V. DesMarais, J. van Rheenen, A. J. Koleske, and J. Condeelis: Cortactin regulates cofilin and N-WASP activities to control the stages of invadopodium assembly and maturation. *J. Cell Biol.*

186: 571-587 (2009) 査読有

(5) V. DesMarais, H. Yamaguchi, M. Oser, L. Soon, G. Mouneimne, C. Sarmiento, R. Eddy, and J. Condeelis: N-WASP and cortactin are involved in invadopodium-dependent chemotaxis to EGF in breast tumor cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* 66: 303-316 (2009) 査読有

(6) U. Philippar, E. T. Roussos, M. Oser, H. Yamaguchi, H. D. Kim, S. Giampieri, S. Giampieri, Y. Wang, S. Goswami, J. B. Wyckoff, D. A. Lauffenburger, E. Sahai, J. S. Condeelis, and F. B. Gertler: A Mena invasion isoform potentiates EGF-induced carcinoma cell invasion and metastasis. *Dev. Cell* 15: 813-828 (2008) 査読有

(7) C. Sarmiento, W. Wang, A. Dovas, H. Yamaguchi, M. Sidani, M. El-Sibai, V. DesMarais, H. A. Holman, S. Kitchen, J. M. Backer, A. Alberts, and J. Condeelis: WASP family members and Formin proteins coordinate regulation of cell protrusions in carcinoma cells. *J. Cell Biol.* 180: 1219-1232 (2008) 査読有

(8) W. Abou-Kheir, B. Issac, H. Yamaguchi, and D. Cox: Membrane targeting of WAVE2 is not sufficient for WAVE2 dependent actin polymerization: a role for IRSp53 in mediating the interaction between Rac and WAVE2. *J. Cell Sci.* 121: 379-390 (2008) 査読有

(9) Y. Nakamura, M. Ichinohe, M. Hirata, H. Matsuura, T. Fujiwara, T. Igarashi, M. Nakahara, H. Yamaguchi, S. Yasugi, T. Takenawa, and K. Fukami: Phospholipase C- δ 1 is an essential molecule downstream of Foxn1, the gene responsible for the nude mutation, in normal hair development. *FASEB J.* 22: 841-849 (2008) 査読有

[学会発表] (計2件)

(1) 櫻井和之、平田真之、中村由和、河内全、山口英樹、深見希代子: Phospholipase C δ 3はmyosin VIと結合し内耳有毛細胞において共発現する 第60回日本細胞生物学会(横浜)(2008年6月29日)

(2) 櫻井和之、平田真之、石井里佳、中村由和、河内全、山口英樹、深見希代子: Myosin VIの膜輸送機能におけるホスホリパーゼC δ 3の関与 BMB2008(神戸)(2008年12月12日)

[その他]

ホームページ等

<http://www.ls.toyaku.ac.jp/~genome/Site/Top.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 英樹 (YAMAGUCHI HIDEKI)

東京薬科大学・生命科学部・講師

研究者番号：10345035

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：