

令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07260

研究課題名(和文) II型PI3キナーゼによるメンブレントラフィック制御を介した心臓・血管の機能調節

研究課題名(英文) Regulation of cardiac and vascular function via membrane trafficking mediated by class II PI3K

研究代表者

安藝 翔 (Aki, Sho)

東京大学・先端科学技術研究センター・特任助教

研究者番号：80767210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：心筋特異的PI3KIIs DK0マウスはミトコンドリア異常を示し、心機能不全を呈した。また培養細胞を用いたPI3KIIs KDはミトコンドリアの過剰な断片化を誘導し、PI3KIIsにより代謝されたPI(3,4)P2がミトコンドリア外膜に作用することで、ミトコンドリア融合が開始されることを見出した。さらに、PI3KIIs KD細胞では、PI(4)Pの蓄積が過剰なミトコンドリアの分裂と断片化を促進し、断片化ミトコンドリアの機能低下、及び活性酸素の蓄積が起こることから、PI3KIIs KD細胞で観察されたミトコンドリアの過剰な断片化は、重大なミトコンドリア機能異常をきたす事が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリアは「エネルギー産生を担う均質なオルガネラ」という古典的概念から「代謝コミュニケーションにより高次機能を制御するオルガネラ」へと変貌してきた。ミトコンドリアの融合と分裂(ミトコンドリアダイナミクス)のバランスは、ミトコンドリアの形態・機能を維持する生命現象の根幹とも言えるイベントであるが、未だメカニズムの十分な解明には至っていない。本研究成果から、PI(3,4)P2が未解明であったミトコンドリア融合機構を担うPIPs代謝物であることが明らかとなったに留まらず、代謝物により制御されるオルガネラ恒常性維持機構という新たな視点から、細胞生理学・病態生理学に新たなフレームワークを与える。

研究成果の概要(英文)：Cardiac-specific PI3KII double knockout (DK0) mice showed mitochondrial abnormalities and cardiac dysfunction. Furthermore, PI3KII knockdown (KD) induced excessive mitochondrial fragmentation, and it was found that PI(3,4)P2 metabolized by PI3KII acts on the outer mitochondrial membrane to initiate mitochondrial fusion. Furthermore, in PI3KII KD cells, the accumulation of PI(4)P promoted excessive division and fragmentation of mitochondria, leading to impaired mitochondrial function and the accumulation of reactive oxygen species. These findings suggest that the excessive mitochondrial fragmentation observed in PI3KII KD cells can cause severe mitochondrial functional abnormalities.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ホスホイノシタイド ミトコンドリア ミトコンドリア融合

1. 研究開始当初の背景

膜動現象の作動には形質膜や細胞内小胞器膜の適所におけるグリセロリン脂質ホスホイノシタイド (PIPs)の産生と分解が必要である。PIPs 代謝の中心を担う PI3-キナーゼ(PI3K)は、生存に必須の脂質リン酸化酵素であり、癌、免疫、代謝の分野で活発に研究が展開されており、創薬研究の重要標的分子ともなっている。

申請者らは、PI3K のクラス II α 型酵素(PI3K-C2 α) が、受容体エンドサイトーシスとその後の細胞内受容体シグナリングに必須であることを報告してきた(*Nature Med* 2012, *J Biol Chem* 2013, 2015, *Mol Biol Cell* 2020)。PI3K-C2 α ホモノックアウト(KO)マウスが胎生致死であるのに対し、構造が近縁で酵素産物が同一の類縁酵素 PI3K-C2 β のホモ KO マウスは正常であることから、両酵素には独自機能・重複機能両者の存在が示唆される。PI3K-C2 α 、及び PI3K-C2 β (PI3KII s)の心筋特異的二重 KO(DKO)マウスは、新生仔は約半数が心不全により生後 1 ~ 2 日以内に死亡(未発表)した。

2. 研究の目的

本研究課題では、PI3KII s DKO マウスの表現系解析と、生理機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

①PI3KII s DKO マウスの表現系解析

Nkx2.5-Cre マウスを用い、PI3K-C2 α 、PI3K-C2 β 遺伝子を心筋特異的に欠損させ、PI3K-C2 α 及び PI3K-C2 β の心筋における役割を明らかにする。

- 心臓リモデリング：生後 1 週間までにおこる心臓・大血管の構造変化(動脈管閉鎖、右室肥大の退縮と左室壁の発達)を組織学的に解析する。個々の心筋細胞サイズ(鍍銀染色)、心筋のアポトーシス(Tunel 染色)を評価した。
- 心エコー、心電図など：高解像度小動物用エコーイメージングシステム(Vevo2100)を用いて心室径、心室自由壁、中隔壁厚心筋収縮能を計測する。心電図により心臓興奮伝導の異常の有無を検討した。
- 心筋細胞の微細形態：電子顕微鏡、蛍光免疫染色による形態学的評価。
- 心筋細胞の収縮能評価：単離心筋を用いて、生細胞イメージング法により心筋細胞の収縮能を評価した。

②培養細胞を用いた PI3KII s の生理機能解析

上記 DKO マウスの解析から、ミトコンドリア形態の異常が示唆された。そこで培養細胞を用いて、PI3KII s のミトコンドリア形態における役割を評価した。

- ミトコンドリアにおける PIPs 局在の検討：PIPs 特異的プローブを用いて、7 種から構成される PIPs のミトコンドリアにおける局在を検討した。
- PI3KII s 産生物 PI(3,4)P $_2$ のミトコンドリアにおける機能の検討：超解像ライブイメージングを用いて、PI(3,4)P $_2$ のミトコンドリアにおける機能を解析した。
- PI3KII s のミトコンドリア活性における機能の検討：PI3KII s ノックダウン(KD)細胞を用いて、ミトコンドリア膜電位、活性酸素、酸化的リン酸化を評価した。

4. 研究成果

4-1. PI3KII s DKO マウスの表現系解析

Nkx2.5-Cre マウスを用い、PI3K-C2 α 、PI3K-C2 β を心筋特異的に欠損させ、心筋特異的 PI3KII s 二重 KO マウスを作成した。DKO マウスの表現系を解析したところ、新生仔は約半数生後 1 ~ 2 日以内に死亡し、高解像度小動物用エコーイメージングシステムを用いた心エコー像から、C2 α /C2 β -cmDKO マウスは生後直後に心不全を呈している事が明らかとなった(図 1)。

C2 α /C2 β -cmDKO マウスの心臓及び単離心筋を、電子顕微鏡、Ca $^{2+}$ チャネル(DHPR α)抗体で T 管や筋小胞体の形態、筋フィラメント抗体、ミトコンドリア抗体を用いた免疫染色法により評価したところ、C2 α /C2 β -cmDKO マウスでは異常なミトコンドリアの蓄積と心筋の筋節構造の崩壊が観察された。

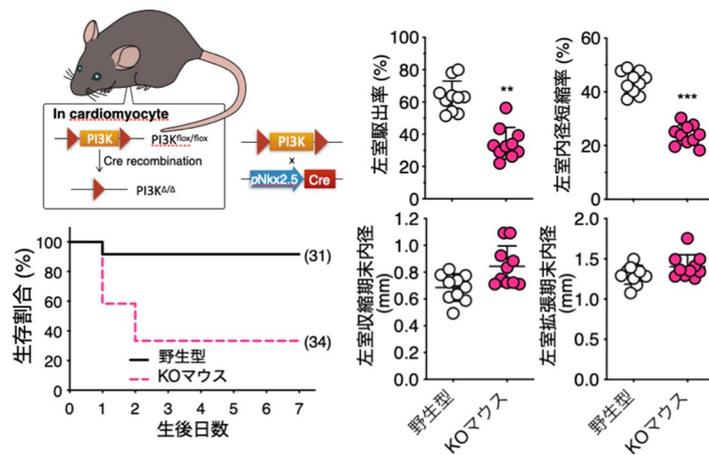


図1. 心筋特異的KOマウスは心不全を呈し生後1~2日以内に死亡する

4-2. 培養細胞を用いた PI3KIIs の生理機能解析

上記DKO マウスはミトコンドリア形態の異常を示した。培養細胞を用いた PI3KIIs KD はミトコンドリアの過剰な断片化を誘導し、PI3KIIs 産物である PI(3,4)P₂ がミトコンドリア形態制御を調節していることが示唆された。そこで申請者は各種 PIPs 特異的プローブイメージングと超解像オルガネライメージング

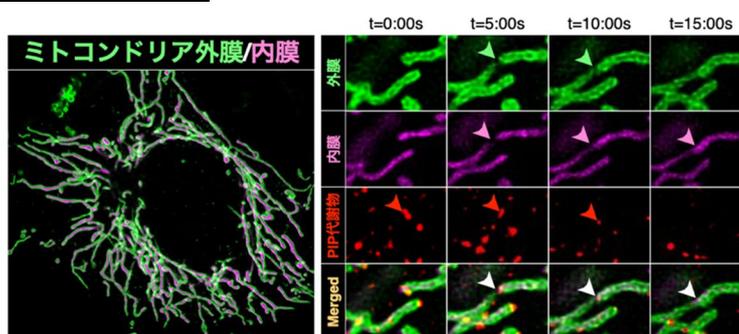


図2. PI(3,4)P₂がミトコンドリア外膜に作用することでミトコンドリア融合が開始される

を融合した、独自の超解像ミトコンドリアライブイメージング系を用いて、これまでにない空間・時間分解能を持ったイメージングを実現し、PI3KIIs により代謝された PI(3,4)P₂ がミトコンドリア外膜に作用することで、ミトコンドリア融合が開始されることを見出している（未発表データ：図2）。また、PI3KIIs KD 細胞では、PI(4)P の蓄積が過剰なミトコンドリアの分裂と断片化を促進し、断片化ミトコンドリアの機能低下、及び活性酸素の蓄積が起こることから（未発表データ：図4）、PI3KIIs KD 細胞で観察されたミトコンドリアの過剰な断片化は、重大なミトコンドリア機能異常をきたす事が示唆された。

ミトコンドリアは「エネルギー産生を担う均質なオルガネラ」という古典的概念から「代謝コミュニケーションにより高次機能を制御するオルガネラ」へと変貌してきた。がんや生活習慣病などの疾患や老化の進行には、ミトコンドリアの形態・機能維持や他の細胞小器官(オルガネラ)との代謝物を介した相互作用(オルガネラコミュニケーション)が重要な役割を果たすことが知られている（Cell 2010, Nature 2015）。ミトコンドリアの融合と分裂(ミトコンドリアダイナミクス)のバランスは、ミトコンドリアの形態・機能を維持する生命現象の根幹とも言えるイベントであるが、未だメカニズムの十分な解明には至っていない。本研究結果から、PI(3,4)P₂ が未解明であったミトコンドリア融合機構を担う PIPs 代謝物であることが明らかとなったに留まらず、代謝物により制御されるオルガネラ恒常性維持機構という新たな視点から、細胞生理学・病態生理学に新たなフレームワークを与える。

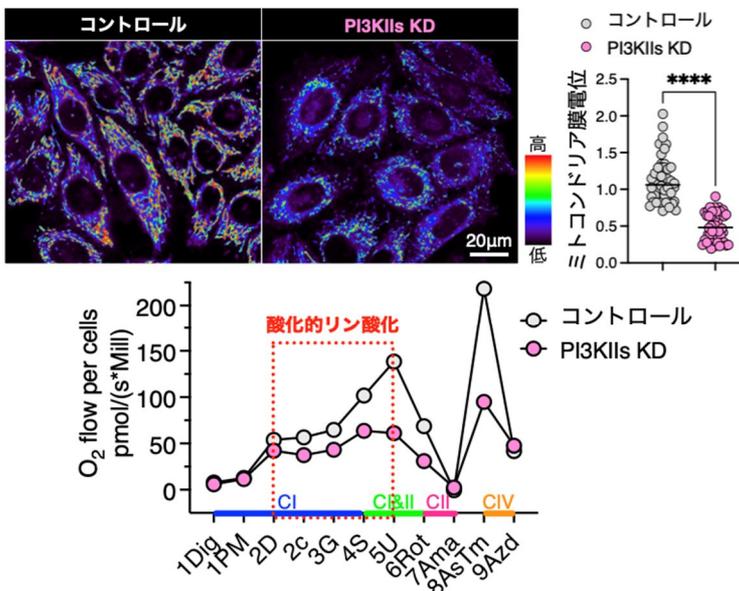


図3. 二重ノックダウン細胞ではミトコンドリア機能(膜電位)が低下する

の形態・機能を維持する生命現象の根幹とも言えるイベントであるが、未だメカニズムの十分な解明には至っていない。本研究結果から、PI(3,4)P₂ が未解明であったミトコンドリア融合機構を担う PIPs 代謝物であることが明らかとなったに留まらず、代謝物により制御されるオルガネラ恒常性維持機構という新たな視点から、細胞生理学・病態生理学に新たなフレームワークを与える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shimizu Shota, Yoshioka Kazuaki, Aki Sho, Takuwa Yoh	4. 巻 11
2. 論文標題 Class II phosphatidylinositol 3-kinase-C2 is essential for Notch signaling by regulating the endocytosis of -secretase in endothelial cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-84548-4	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 Yamatsugu Kenzo, Katoh Hiroto, Yamashita Takefumi, Takahashi Kazuki, Aki Sho, Tatsumi Toshifumi, Kaneko Yudai, Kawamura Takeshi, Miura Mai, Ishii Masazumi, Ohkubo Kei, Osawa Tsuyoshi, Kodama Tatsuhiko, Ishikawa Shumpei, Kanai Motomu, Sugiyama Akira	4. 巻 192
2. 論文標題 Antibody mimetic drug conjugate manufactured by high-yield Escherichia coli expression and non-covalent binding system	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Protein Expression and Purification	6. 最初と最後の頁 106043 ~ 106043
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pep.2021.106043	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 Shimizu Shota, Yoshioka Kazuaki, Aki Sho, Takuwa Yoh	4. 巻 11
2. 論文標題 Class II phosphatidylinositol 3-kinase-C2 is essential for Notch signaling by regulating the endocytosis of -secretase in endothelial cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 84548-4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-84548-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Islam Shahidul, Yoshioka Kazuaki, Aki Sho, Ishimaru Kazuhiro, Yamada Hiroki, Takuwa Noriko, Takuwa Yoh	4. 巻 70
2. 論文標題 Class II phosphatidylinositol 3-kinase and isoforms are required for vascular smooth muscle Rho activation, contraction and blood pressure regulation in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physiological Sciences	6. 最初と最後の頁 00745-2
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12576-020-00745-2	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 Aki Sho, Yoshioka Kazuaki, Takuwa Noriko, Takuwa Yoh	4. 巻 31
2. 論文標題 TGF receptor endocytosis and Smad signaling require synaptojanin1, PI3K γ , and INPP4B-mediated phosphoinositide conversions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Biology of the Cell	6. 最初と最後の頁 360 ~ 372
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1091/mbc.E19-11-0662	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 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Sho Aki
2. 発表標題 Sequential phosphoinositide conversion is required for TGF β -induced receptor endocytosis for angiogenesis.
3. 学会等名 第80回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sho Aki
2. 発表標題 The mechanism of mitochondrial dynamics regulation via PPI
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会. (ワークショップ: 生命科学の根幹に迫るミトコンドリアダイナミクスの世界) (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sho Aki
2. 発表標題 PPIを介したミトコンドリアダイナミクス制御の新機構
3. 学会等名 第99回日本生理学会年会 (第12回 入澤宏・彩記念若手研究奨励賞日本生理学会奨励賞) (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安藝 翔
2. 発表標題 TGF /Smadシグナリングを制御するホスホイノシタイドカスケード
3. 学会等名 金沢大学「機能脂質シンポジウム」 "生命機能と疾患を制御する機能脂質,, (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安藝 翔
2. 発表標題 血管新生因子TGF /Smadシグナリングを制御するホスホイノシタイドカスケード
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会. (シンポジウム: Angiology evolving into new research fields) (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安藝 翔
2. 発表標題 連続するホスホイノシタイド代謝がTGF 受容体エンドサイトーシス及びSmad2/3 活性化に必須である
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021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
---------	---------