

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月22日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790055

研究課題名（和文） 微量イノシトールリン脂質による髄鞘形成、および糖代謝機構の解析

研究課題名（英文） Regulation of Myelination and Glucose Metabolism by Phosphoinositides.

研究代表者

高須賀 俊輔（TAKASUGA SHUNSUKE）

秋田大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90375262

研究成果の概要（和文）：

ホスファチジルイノシトール3, 5-二リン酸の唯一の合成酵素であるホスファチジルイノシトール3リン酸5-キナーゼ（PIP3KIII）の細胞種特異的な遺伝子欠損マウスを作製し、髄鞘形成および、筋肉における糖代謝の制御機構を解析した。その結果、中枢神経系のオリゴデンドロサイトでの PIP3KIII の重要性を見出した。また、筋肉では PIP3KIII がインスリンによる糖代謝亢進作用を負に制御するという新知見を得た。

研究成果の概要（英文）：

We made tissue-specific phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase (PIP3KIII) knockout mice for analyses of myelination in central nervous system and glucose metabolism in muscle. We indicated that essential roles of PIP3KIII in oligodendrocytes. And we also found that PIP3KIII is a negative regulator of insulin signaling in skeletal muscle.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：脂質、脳神経疾患、糖尿病

1. 研究開始当初の背景

イノシトールリン脂質は、様々な細胞機能を制御する脂質セカンドメッセンジャーである。研究代表者は、その中でも最後に発見され、細胞内にごく微量しか存在しないイノシトールリン脂質、ホスファチジルイノシトール 3,5-ニリン酸に着目した研究を進めてきた。

研究代表者は本研究課題以前に、ホスファチジルイノシトール 3,5-ニリン酸の唯一の合成酵素であるホスファチジルイノシトール 3リン酸 5-キナーゼ (PIP3KIII) の遺伝子欠損マウスを独自に作製、解析することで、中枢神経系においてホスファチジルイノシトール 3,5-ニリン酸および PIP3KIII が非常に重要な生理的役割を担うことを見出していた。本研究課題では、それを発展させる形で髄鞘形成における PIP3KIII の役割について詳細な解析を行うことにした。さらに骨格筋においても PIP3KIII が糖代謝に関与するという予備的知見を得ていた。髄鞘形成、および糖代謝の制御機構については、不明な点が多く残されており、PIP3KIII および、その産物であるホスファチジルイノシトール 3,5-ニリン酸の果たす役割を明らかにすることは非常に有用な情報をもたらすものと期待された。

2. 研究の目的

主として、新たに作製した PIP3KIII 遺伝子欠損マウスを用いた解析を行うことで、髄鞘形成および、糖代謝制御機構における PIP3KIII および、その産物であるホスファチジルイノシトール 3,5-ニリン酸の役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究課題では、マウスの中枢神経系における PIP3KIII およびホスファチジルイノシトール 3,5-ニリン酸の髄鞘形成における役割を明らかにするために、細胞種特異的な遺伝子欠損マウスを作製し、解析を行った。PIP3KIII の遺伝子を欠損させることで、その産物であるホスファチジルイノシトール 3,5-ニリン酸 (図中では PI(3,5)P₂ と記した) が細胞内で大幅に減少することが期待される (図 1)。

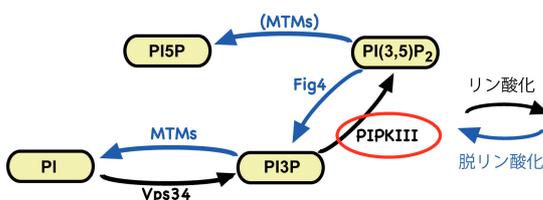


図 1. PIP3KIII の触媒するイノシトールリン脂質代謝経路

これまでに Nestin-Cre トランスジェニックマウスとの交配により、中枢神経前駆細胞

における遺伝子欠損を導くことで、神経細胞およびグリア細胞 (アストロサイトおよびオリゴデンドロサイト) の全ての細胞種で PIP3KIII を欠損するマウスを作製した。本マウスで観察された表現型 (成熟前の死亡および、振戦を伴う顕著な髄鞘形成不全) が、神経細胞およびグリア細胞のいずれか、もしくは両方における遺伝子欠損に起因するのかわかりやすくするために、新たに 2 つの遺伝子欠損マウスを作製した。具体的には、神経細胞特異的な遺伝子欠損を導くために Emx1-Cre トランスジェニックマウスを、グリア細胞、特にオリゴデンドロサイト特異的な遺伝子欠損を導くために MBP-Cre トランスジェニックマウスをそれぞれ、PIP3KIII flox マウスと交配することで、各細胞種特異的な遺伝子欠損マウスを作製した (図 2)。

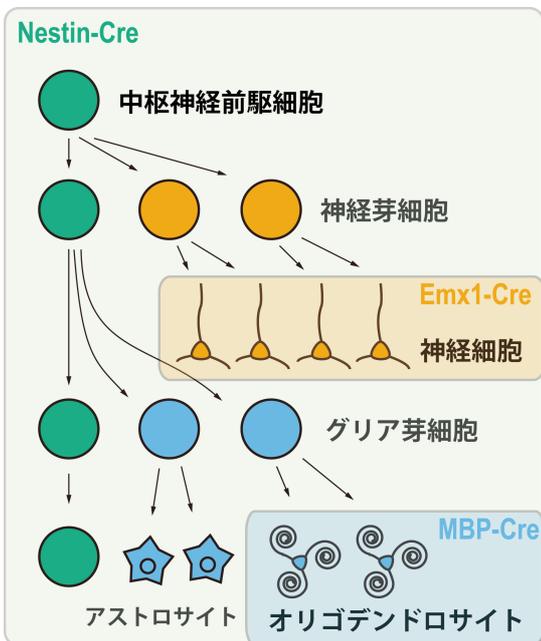


図 2 神経細胞種特異的な Cre の発現誘導

同様に糖代謝機構の解析においては、Mck-Cre トランスジェニックマウスと PIP3KIII flox マウスを交配することで、骨格筋・心筋細胞特異的な遺伝子欠損マウスを作製し、解析に利用した。筋肉様培養細胞株の系としては、筋芽細胞株 C2C12 細胞を所定の培養条件におくことで筋管様に分化させた細胞を利用した。

4. 研究成果

中枢神経系における解析では、オリゴデンドロサイトにおける PIP3KIII の発現が髄鞘形成に必須であるという知見を得た。これまで、末梢神経系においては髄鞘形成を担うシュワン細胞の MTMR2 (ホスファチジルイノシトール 3,5-ニリン酸の脱リン酸化酵素) の重要

性が示されていたが、中枢神経系の髄鞘形成に関して、ホスファチジルイノシトール 3, 5-ニリン酸の役割を示唆するのは本知見が初めてのものである。

糖代謝制御機構の解析においては、PIP3III がインスリンシグナリングの負の制御因子であることを見出した。これは研究代表者が独自に作成した PIP3III 遺伝子改変マウスを用いることで初めて明らかになったものである。これまでに、培養細胞において PIP3III 阻害剤を用いた研究により、PIP3III がインスリンシグナリングを正に制御することが示唆されていたが、実際には *in vivo* では PIP3III が全く逆の役割を有するという非常に興味深い結果であった。

これら 2つの研究成果の詳細について、以下に示す。

中枢神経系における検討においては、PIP3III flox マウスと Emx1-Cre トランスジェニックマウスとの交配により、大脳組織全体で大幅な PIP3III 発現量の低下が認められ（データ省略）、神経細胞特異的な遺伝子欠損が導かれていることが確認出来た。しかしながら、神経細胞特異的に PIP3III 遺伝子を欠損させた場合には、個体レベルで大きな異常は認められず、中枢神経系全体で PIP3III 遺伝子を欠損させた場合（成熟前の死亡および、振戦を伴う顕著な髄鞘形成不全）とは大きく異なる結果となった（表 1）。他方、PIP3III flox マウスと MBP-Cre トランスジェニックマウスとの交配により、オリゴデンドロサイト特異的な遺伝子欠損を導いた場合には、大脳組織全体での PIP3III 発現量の低下（データ省略）に加え、加齢に伴う両側性の下肢痙性麻痺の発症が全例で認められた（表 1）。この表現型は、ヒトの遺伝性痙性対麻痺に非常に良く似た病態であり、興味深いものであった。ヒトの遺伝性痙性対麻痺の原因遺伝子は数多く同定されているが、その一部は髄鞘を構成するタンパク質の機能欠失変異に基づくことが示されている。これらの結果から、中枢神経系全体で PIP3III 遺伝子を欠損させた場合に認められた髄鞘形成不全の表現型は、主としてグリア細胞（特にオリゴデンドロサイト）での PIP3III 遺伝子欠損に起因すると考えられた。PIP3III flox マウスと Nestin-Cre トランスジェニックマウスとの交配による中枢神経系全体での PIP3III 遺伝子欠損誘導時の顕著な髄鞘形成不全と、オリゴデンドロサイト特異的な PIP3III 遺伝子欠損に起因する下肢痙性麻痺の間には、その髄鞘形成機能の障害の程度に大きな差が認められる。その原因としては、神経細胞における PIP3III の機能も相乗的に髄鞘形成に関与していることや、MBP-Cre によるオリゴデンドロサイトでの遺伝子欠損誘導が不完全であることなどが考えられる。

交配マウス	標的細胞種	主な表現型
Nestin-Cre	中枢神経系全般	振戦 成熟前の死亡 髄鞘形成不全
Emx1-Cre	神経細胞	異常無し
MBP-Cre	グリア細胞 (オリゴデンドロサイト)	加齢に伴う 下肢痙性麻痺

表 1 各 PIP3III 遺伝子欠損マウスの表現型

PIP3III による糖代謝制御機構の解析においては、骨格筋・心筋細胞特異的な PIP3III 遺伝子欠損マウスを作製し、解析を行った。すでに PIP3III 阻害剤を用いた培養細胞レベルでの解析において、PIP3III の機能を阻害することでインスリンシグナリングが阻害されるという報告があったことから、当初、骨格筋で PIP3III の機能を阻害することで、個体レベルではインスリン作用の抑制により、血糖値が上昇し糖尿病様の表現型を示すことが期待された。しかし本マウスでは予想に反して、自由摂食時の血糖値が有意に低いという予想外の表現型を示した。そこで、糖代謝制御について詳細な検討を行うため、糖負荷試験を実施した。その結果、糖負荷による血糖上昇は有意に抑制され（図 3）、インスリン作用が増強されていると考えられた。

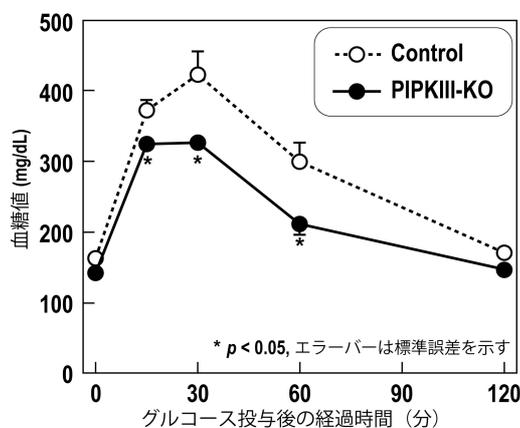


図 3. 筋肉特異的 PIP3III 欠損マウスの耐糖能亢進

この時、血清中のインスリン濃度に大きな差は認められなかった（データ省略）。そこで、インスリンシグナリングに対して、元来 PIP3III が抑制的な作用を持っており、その抑制が解除されることでインスリン作用が強まるという仮説を立て、培養筋肉様細胞を用いた実験系により証明を試みた。しかしながら、培養細胞レベルでは、(RNA 干渉法および PIP3III 阻害剤を利用した) PIP3III の機能阻害によって、インスリン受容体、およびインスリン受容体基質 1 (IRS-1) のリン酸化、プロテインキナーゼ B (PKB/Akt) の活性

化などのインスリンシグナリングへの影響は全く認められなかった。PIPKIII とインスリンシグナリングの間の分子機構については、*in vivo* での更に詳細な解析が必要だと考えられる。

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 4 件)

① Kurokawa T, Takasuga S, Sakata S, Yamaguchi S, Horie S, Homma KJ, Sasaki T & Okamura Y

3' phosphatase activity toward PI(3,4)P₂ by voltage-sensing phosphatase, VSP.

Proc Natl Acad Sci U S A in press (2012)

② Hazeki K, Kametani Y, Murakami H, Uehara M, Ishikawa Y, Nigorikawa K, Takasuga S, Sasaki T, Seya T, Matsumoto M, Hazeki O.

Phosphoinositide 3-kinase γ controls the intracellular localization of CpG to limit DNA-PKcs-dependent IL-10 production in macrophages.

PLoS One. **6**, e26836 (2011)

doi:10.1371/journal.pone.0026836.g009

③ Sasaki J, Kofuji S, Itoh R, Momiyama T, Takayama K, Murakami H, Chida S, Tsuya Y, Takasuga S, Eguchi S, Asanuma K, Horie Y, Miura K, Davies EM, Mitchell C, Yamazaki M, Hirai H, Takenawa T, Suzuki A, Sasaki T.

The PtdIns(3,4)P₂ phosphatase INPP4A is a suppressor of excitotoxic neuronal death.

Nature **465**, 497-501 (2010)

doi:10.1038/nature09023

④ Hiramine Y, Emoto H, Takasuga S, Hiramatsu R.

Novel acyl-coenzyme A:monoacylglycerol acyltransferase plays an important role in hepatic triacylglycerol secretion.

J. Lipid Res. **51**, 1424-1431 (2010)

doi:10.1194/jlr.M002584

[学会発表] (計 1 件)

① Takasuga S, Sasaki J, Suzuki A, Sasaki T.

Physiological function of phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate *in vivo*

第 62 回日本細胞生物学会大会

2010 年 5 月 19 日 大阪国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高須賀 俊輔 (TAKASUGA SHUNSUKE)

秋田大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90375262

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：