

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590078

研究課題名(和文) イノシトールリン脂質脱リン酸化酵素欠損細胞を用いた小胞輸送系の解析

研究課題名(英文) Vesicle trafficking in phosphoinositide phosphatase-knockdown cells

研究代表者

櫛木 修 (Hazeki, Osamu)

広島大学・医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：80142751

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000 円、(間接経費) 1,230,000 円

研究成果の概要(和文)：RAW264.7 細胞を親株とし、特定のイノシトールリン脂質ホスファターゼを標的とする shRNA を安定に発現する一群の細胞株を作成した。標的とした酵素は、3 位ホスファターゼ 8 種類、4 位ホスファターゼ 1 種類、5 位ホスファターゼ 6 種類である。各酵素につき、shRNA の標的配列が異なる 2 種類の欠損細胞を作成し、細胞の貪食能、食胞が形成される時期及び成熟する時期のイノシトールリン脂質 (PtdIns(3,4,5)P₃, PtdIns(3,4)P₂, PtdIns(3)P) の動態変化を比較解析し、各酵素の貪食機能における固有の役割を解明した。

研究成果の概要(英文)：A series of RAW264.7 macrophages was cloned that stably express the shRNA targeting the specific one of the phosphoinositide phosphatase isozymes. The targeted enzymes were eight 3'-phosphatases (PTEN, Synaptojanin2, Sac1, Sac3, MTM1, MTMR2, MTMR9, MTMR14), one 4'-phosphatase (Inpp4a), and six 5'-phosphatases (SHIP1, SHIP2, Inpp5e, SKIP, OCRL, Inpp5b). Two lines of cells that express shRNA with different targeting sequence were prepared for each isozyme. The knockdown cells were examined for their ability to engulf IgG-opsonized particles. The amount and localization of phosphoinositide derivatives, PtdIns(3,4,5)P₃, PtdIns(3,4)P₂, and PtdIns(3)P, during the phagosome formation and maturation were also monitored. The results suggested several specific functions of the phosphatase isozymes.

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：phosphoinositide 3'-phosphatase 4'-phosphatase 5'-phosphatase RAW264.7 macrophages shRNA phagocytosis

1. 研究開始当初の背景

イノシトールリン脂質は、他のリン脂質に比較して量的に少なく代謝回転が速いなどの理由から、細胞膜の単なる構築材料として以上の機能をもつことが古くから指摘されていた。イノシトールリン脂質のひとつの特徴は、イノシトール環の3 / 4 / 5位のいずれか、あるいは複数の箇所にリン酸が結合した7種の誘導体が生理的に存在し、その量的調節を可能とする多数の代謝酵素群が存在することである。これらの中には試験管内では同一の反応を触媒するものも多し。一方で、近年の研究の成果は、イノシトールリン脂質キナーゼの各アイソザイムが細胞レベルではそれぞれ特異的な機能をもつことを明らかにしていた。興味深いことに、イノシトールリン脂質の脱リン酸化酵素はキナーゼを上回る多様性をもつ。しかし、個々の脱リン酸化酵素の生理的な機能分担に関する知識はほとんど得られていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、RAW264.7細胞を親株とし、個々のイノシトールリン脂質脱リン酸化酵素を欠損した一群の細胞株を作成し、食食機能及び食胞上のイノシトールリン脂質の動態に及ぼす欠損の影響を評価することで、食胞の成熟過程における各酵素の固有の機能を解析した。また、すでに作成済みのイノシトールリン脂質キナーゼの各アイソザイムの欠損細胞の機能を併せて解析することで、食作用の過程を制御するイノシトールリン脂質代謝酵素ネットワークの全貌を理解することを目指した。

3. 研究の方法

1) イノシトールリン脂質代謝酵素欠損細胞株の作成

欠損細胞の作成手順および保存方法は下記のとおりである。

1. RAW264.7細胞における標的酵素のmRNAの発現と塩基配列を確認する

2. 経験則に基づき、1遺伝子に対して3種類の標的配列を決定する

3. ひとつの標的配列に対して1組2本のオリゴヌクレオチド(5'-CCC(X)₁₀TTCAA GAGA(Y)₁₀TTTTTGGAAA-3'及び5'-CTAGTTTCCAAAAA(Y)₁₀TCTCTTTGAA(X)₁₀GGGTGCA-3')を合成し、pH1-DsRベクターのPst-XbaIサイトに組み込む。なお、ここで(X)₁₀は標的配列を、(Y)₁₀は相補配列を示している

4. 上記ベクターをエレクトロポレーションでRAW264.7細胞に導入する。

5. pH1-DsRベクターが導入された細胞をDs-Redの蛍光を指標として2段階でクローニングし10-20クローン程度を取得する。

6. えられたクローンについて、標的蛋白質に対する特異的抗体およびRT-PCR法によって発現抑制を確認し、90%以上の消失が見られた細胞クローンを複数取得する。

7. 以上の手順でえられる酵素欠損細胞クローンは、shRNAベクターをトランスフェクトした細胞であり、樹立株ではない。発現抑制を認めたクローンについては、継代数の浅い時期に充分数のストックを作成し、液体窒素中で凍結保存する

2) 細胞内のイノシトールリン脂質の動態の解析

作成した代謝酵素欠損細胞に、特定のイノシトールリン脂質と特異的に結合するタンパク質ドメインと蛍光タンパク質との融合タンパク質を一過的に発現させ、細胞がオプソニン化された赤血球を貪食しているときの蛍光色素の動態を顕微鏡下において観察した。特異的結合ドメインとしてはPtdIns(3,4)P₂及びPtdIns(3,4,5)P₃と結合するAkt-PH、PtdIns(3,4,5)P₃と特異的に結合するMyoX-PH、PtdIns(3,4)P₂と特異的に結合するTAPP1-PH(tandem)、PtdIns(3)Pと特異的に結合するEEA1-FYVE(tandem)を利用した。また、同時に2種類のリン脂質の動態を測定することが可能なようにeGFPとの融合タンパク質、およびmRFPとの融合タンパク質の双方を作成した。細胞への導入はリポフェクタミンとプラス試薬を用いたリポフェクション法により行った。蛍光の動態観察にはCFI Plan Apo VC60xH油浸レンズを装着したキーエンスBZ-9000顕微鏡を使用し、BZ-II解析システムによってデータ解析を行った。

4. 研究成果

1) 作成したイノシトールリン脂質脱リン酸化酵素欠損細胞株

RAW264.7細胞を親株とし、以下の酵素のmRNA発現が90%以上低下した細胞株を作成した。標的配列が異なるshRNAを用いることにより、1酵素につき2種類の欠損細胞を作成した。標的とした酵素の分類及び作成の際に用いたshRNAの標的配列は下記のとおりである。SHIP2(1)、Inpp5b(1)については1種のshRNAのみでは抑制が不十分だったため2種のshRNAを同時に発現させることで欠損細胞を作成した。

1.PI 5-Pase

SHIP1:

- (1) 5'-GGAATGAAATGCTTGAAGA-3'
- (2) 5'-CAAGTCTACAGCCACAAA-3'

SHIP2:

- (1) 5'-GATCCTGAACTACATTAGT-3',
5'-GAATGGATTAGCATTGATA-3'
- (2) 5'-GGTCTTCCTTCGATTTAGT-3'

Inpp5e:

- (1) 5'-GACCGAGAATTGTACTTGA-3'
- (2) 5'-GCATCGTGTCTCAGATCAA-3'

SKIP:

- (1) 5'-GACTGGATCGGACTATACA-3'
- (2) 5'-GCGTCACATTAATGACTAT-3'

OCRL:

- (1) 5'-GACATCTGTGCAAGAATGA-3'
 (2) 5'-GGATAAACCTGCTTATTCA-3'
 Inpp5b:
 (1) 5'-CCGAGTCCTTCACGATTCA-3',
 5'-GCCTTCTTCTTTCACGATA-3'

2.PI 3-Pase

- PTEN:
 (1) 5'-GAACAATATTGATGATGTA-3'
 (2) 5'-GTATAGAGCGTGCAGATAA-3'

Synaptojanin2:

- (1) 5'-GCAACATCCAACATACAAA-3'
 (2) 5'-GTATTGATCTTACTTACGA-3'

Sac1:

- (1) 5'-GAAATGAGTCTCTTAGAAA-3'
 (2) 5'-GTGGGATGATCAGATATAT-3'

Sac3:

- (1) 5'-GAAGTTGATGGTGAAGAAA-3'
 (2) 5'-CGGTGAACCTCTCGATATA-3'

MTM1:

- (1) 5'-CTGCATCAGCATCTAAGTA-3'
 (2) 5'-GGAGTCTACTCATTGGTTA-3'

MTMR2:

- (1) 5'-CGCTGACTGTCACAAGTTA-3'
 (2) 5'-GCTGGAGAATAACAAAGAT-3'

MTMR9:

- (1) 5'-GCATATGAGGAAATGGTTA-3'

MTMR14:

- (1) 5'-GTGAATTCTTCAAGGAATA-3'
 (2) 5'-GCATGTTGAGACACAAAGA-3'

3.PI 4-Pase

Inpp4a:

- (1) 5'-GAGATACGTCCTTACAAGA-3'
 (2) 5'-GTCACCTCAGCCACTTCGA-3'

SHIP1, SHIP2, Inpp5e, PTEN についてはタンパク質レベルで70%以上の低下を観察している。これ以外の欠損細胞は、特異的抗体が入手できなかったためタンパク質レベルでの発現変化は検討していない。

SHIP1, SHIP2 及び PTEN についてはRBL2H3細胞を親株とした欠損細胞も作成した。得られた細胞は、液体窒素中に凍結保存している。

2) RAW264.7 細胞の貪食機能に及ぼす PI 代謝酵素欠損の影響

RAW264.7細胞によるオプソニン化粒子の取り込みは PI3K の非選択的阻害薬であるワトマニンによって強く抑制される。この薬物の標的となることが知られる PI リン酸化酵素のうち、p110 の欠損細胞ではオプソニン化された赤血球やザイモザン粒子の取り込みがほぼ消失しており、貪食制御における p110 の特異的役割を指摘することができる。PI 脱リン酸化酵素の中では 3-Pase である PTEN 及び 5-Pase である Inpp5e の欠損がオプソニン化粒子の顕著な取込み増大をひきおこした。5-Pase の中で SHIP1, SHIP2 の欠損も取込みを増大させたが、その程度は比較的軽微なものであった。SKIP, OCRL, Inpp5b の欠損は貪食量には影響しなかった。以上の結

果から、試験管レベルではいずれも PI 5-Pase 活性を示す Inpp5e, SHIP1, SHIP2 の3者が細胞レベルでの貪食制御においては、互いに補完しえない機能を持つことが示唆される。

3) 食胞の PtdIns(3,4,5)P₃ 及び PtdIns(3)P の動態に及ぼす Inpp5e の特異な役割

RAW264.7 細胞にオプソニン化された粒子を貪食させると、食胞の形成と成熟の過程において次のような変化が認められる。

1. 粒子を包み込むように伸びていく細胞膜上では顕著な PtdIns(3,4,5)P₃ の蓄積がおり、これは粒子が細胞内部に取込まれ食胞の形成が終了すると消失する。この全過程に要する時間は約4分である。

2. 消失する PtdIns(3,4,5)P₃ と入れ替わるように、食胞膜上に PtdIns(3)P の蓄積がおり、これもやがて消失する。この PtdIns(3)P の寿命は約8分である。

PTEN 欠損細胞、Inpp5e 欠損細胞においては食胞上での PtdIns(3,4,5)P₃ の寿命が顕著に延長していた。従って、貪食開始初期に p110

によって産生される PtdIns(3,4,5)P₃ は、PTEN によって PtdIns(4,5)P₂ に代謝される一方、Inpp5e によって PtdIns(3,4)P₂ にも代謝されているものと考えられた。

Inpp5e 欠損細胞においては食胞成熟過程で蓄積する PtdIns(3)P の量が顕著に低下していた。この原因のひとつは Inpp5e によって産生された PtdIns(3,4)P₂ が、さらに PI 4-Pase によって PtdIns(3)P に変換されるという代謝経路(間接的 PtdIns(3)P 産生経路)が失われるためと考えられる。しかし、観察された PtdIns(3)P 量の低下は、この機構から予測されるものよりもはるかに大きいものであった。食胞上の PtdIns(3)P は主に Vps34 (PtdIns 3-kinase) によって供給されることが知られている(直接的 PtdIns(3)P 産生経路)。また、Vps34 は低分子量 GTP 結合タンパク質のひとつである Rab5b によって活性化されることが報告されている。Inpp5e 欠損細胞においては、Rab5b の食胞への動員が大きく損なわれていた。従って、食胞における Inpp5e の新規の特異的機能として Rab5b による Vps34 活性化を介して PtdIns(3)P 産生を誘導し、食胞の成熟を促すという能力を指摘できる。

4) 食胞の PtdIns(3)P の動態に及ぼす Inpp4a, PTEN, Sac3 の役割

4-Pase のひとつである Inpp4a の欠損細胞では、軽微ではあるが PtdIns(3,4)P₂ の蓄積増加と貪食量の増大が観察された。この変化は PtdIns(3)P の蓄積低下を伴うことから、形成初期の食胞において p110 と Inpp5e によって産生される PtdIns(3,4)P₂ の一部は Inpp4a によって PtdIns(3)P に代謝されているものと考えられる。

PTEN (3-Pase) 欠損細胞では、食胞に蓄積した PtdIns(3)P の消失時間の顕著な延長が

おこる。また PIKfyve の欠損細胞でも同様の消失遅延が観察される。従って、食胞の PtdIns(3)P は主に PTEN によって PtdIns に代謝されるが、一部は PIKfyve によって PtdIns(3,5)P₂ に代謝されるものと考えられる。Sac3 には PtdIns(3,5)P₂ を加水分解し PtdIns(3)P を再生する能力(5-Pase 活性)が知られている。また、Sac3 は PIKfyve の活性を上昇させることも知られている。Sac3 欠損細胞においては、PIKfyve 欠損細胞と同様に、PtdIns(3)P 消失時間の延長が認められた。細胞レベルでは PIKfyve 活性に対する効果が表現形として現れたものと思われる。

5) 貪食される粒子のオプソニン化状態が食胞の PtdIns (3,4)P₂ の動態に及ぼす影響

RAW264.7 細胞に IgG でオプソナイズした赤血球を貪食させた場合、食胞形成初期に蓄積する PtdIns (3,4)P₂ は数分以内に消失し PtdIns(3)P が蓄積し始める。一方、ゼイモザン粒子を貪食させた場合には、PtdIns (3,4)P₂ の消失には 20 分以上の時間が必要となる。そこで、ゼイモザン粒子をあらかじめ IgG でオプソニン化したところ、PtdIns (3,4)P₂ の消失速度の顕著な亢進が見られた。このオプソニン化の効果は、抑制性 IgG 受容体 (Fc RII) の発現を shRNA で抑制した細胞では認められなかった。Fc RII と直接結合することが知られている SHIP1, SHIP2 の欠損細胞においては、Fc RII による PtdIns (3,4)P₂ の消失促進が認められない。従って、Fc RII には、促進性 IgG 受容体からのシグナルを抑制するという機能とは別に、貪食時に形成された食胞の成熟を促すという機能があり、この新規の機能の発現には SHIP1, SHIP2 が必要なものと考えられた。

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. Hazeki K, Uehara M, Nigorikawa K, Hazeki Q; PIKfyve regulates the endosomal localization of CpG oligodeoxynucleotides to elicit TLR9-dependent cellular responses; PLoS One 8, e73894, 2013 (査読有)
2. Hazeki K, Nigorikawa K, Takaba Y, Segawa T, Nukuda A, Masuda A, Ishikawa Y, Kubota K, Takasuga S, Hazeki Q; Essential roles of PIKfyve and PTEN on phagosomal phosphatidylinositol 3-phosphate dynamics; FEBS Lett 586, 4010-4015, 2012 (査読有)
3. Nigorikawa K, Hazeki K, Kumazawa T, Itoh Y, Hoshi M, Hazeki Q; Class-IA phosphoinositide 3-kinase p110 triggers GPCR-induced superoxide production in p110-deficient murine neutrophils; J Pharmacol Sci 120, 270-279, 2012 (査読有)

4. Hazeki K, Kametani Y, Murakami H, Uehara M, Ishikawa Y, Nigorikawa K, Takasuga S, Sasaki T, Seya T, Matsumoto M, Hazeki Q; Phosphoinositide 3-kinase controls the intracellular localization of CpG to limit DNA-PKcs-dependent IL-10 production in macrophages; PLoS ONE 6, e26836, 2011 (査読有)

[学会発表](計 9 件)

1. 温田晃子、樋木薫、濁川清美、樋木修; マクロファージの食胞におけるイノシトールリン脂質の挙動は貪食を受けた粒子のオプソニン化によって変化する; 2013年10月26日; 第52回日本薬学会中国四国支部学術大会(松山)
2. 瀬川智裕、樋木薫、濁川清美、樋木修; イノシトールリン脂質 5 位脱リン酸化酵素 Inpp5e はマクロファージの Fc 受容体を介した貪食を抑制的に制御する; 2013年10月26日; 第52回日本薬学会中国四国支部学術大会(松山)
3. 三宅美喜子、濁川清美、樋木薫、瀬川智裕、温田晃子、大森弓緒、樋木修; イノシトールリン脂質 4 位脱リン酸化酵素 Inpp4a はマクロファージの機能を抑制的に制御する; 2013年10月26日; 第52回日本薬学会中国四国支部学術大会(松山)
4. 温田晃子、樋木薫、濁川清美、益田彩加、樋木修; 食胞のホスファチジルイノシトール 3-リン酸は主にPTENとPIKfyveによって除去される; 第85回日本生化学会大会; 2012年12月15日(福岡)
5. 瀬川智裕、樋木薫、濁川清美、林美里、三宅美喜子、樋木修; マクロファージによる感作赤血球の貪食におけるイノシトールリン脂質脱リン酸化酵素の役割の違い; 第85回日本生化学会大会; 2012年12月15日(福岡)
6. 岡崎智子、濁川清美、樋木薫、郭瑩、樋木修; マスト細胞の機能制御におけるクラス 2 型PI3Kの役割; 第51回日本薬学会中国四国支部学術大会; 2012年11月11日(松江)
7. 上原政文、樋木薫、濁川清美、樋木修; PIKfyve による非メチル化 CpG の局在調節を介した TLR9 シグナルの制御; 第51回日本薬学会中国四国支部学術大会; 2012年11月10日(松江)
8. 石川由紀、樋木薫、濁川清美、樋木修; マクロファージの貪食機能に対する PI3K サブタイプ特異的阻害薬の作用; 第50回日本薬学会中国四国支部学術大会; 2011年11月13日(高松)
9. 上原政文、樋木薫、濁川清美、樋木修; PI3K による非メチル化 CpG の細胞内局在と IL 10 産生の制御; 第50回日本薬学会中国四国支部学術大会; 2011年11月13日(高松)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

櫛木 修 (HAZEKI OSAMU)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究科・教授

研究者番号：80142751

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし