

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390067

研究課題名(和文) イノシトールリン脂質の分子種と生理機能に関する研究

研究課題名(英文) Molecular Species of phosphoinositides and their functions

研究代表者

佐々木 純子 (Sasaki, Junko)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30333371

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：イノシトールリン脂質(PIs)はホスファチジルイノシトールの3, 4, 5位水酸基が可逆的なリン酸化を受ける結果生じる一群のリン脂質であり、多彩な細胞機能を制御する。本研究では質量分析を用いた新たなイノシトールリン脂質解析技術の開発を通して、細胞内にはアシル基組成の異なるPIs分子種が多数存在することを見出した。PIs代謝酵素過剰発現細胞や遺伝子改変マウスを用いた解析を行い、PIs分子種が異なる生理作用を持つ可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：We established the sensitive method for measuring phosphoinositides (PIs) by mass spectrometry, and found that various PIs molecular species were exist in cells. Through the analyses of the cells with overexpression or knockout of PIs metabolizing enzymes, it was suggested that each PIs species might have different cellular functions.

研究分野：脂質生化学

キーワード：細胞内シグナル伝達 イノシトールリン脂質

1. 研究開始当初の背景

ホスファチジルイノシトール (PI) の 3, 4, 5 位水酸基が可逆的なリン酸化を受ける結果、イノシトールリン脂質 (PIs) と総称される一群のリン脂質が生じ、細胞膜に存在する。リン酸化部位の組み合わせによって 8 種類に分類される PIs は、個々に特有に結合する分子の局在や活性を制御し、多彩な細胞機能の制御を司る。この制御機構の異常は、癌、神経変性、炎症などの病態の発現につながる事が知られている。イノシトール環の 3, 4, 5 位水酸基がすべてリン酸化された PIP3 の生理機能については特に研究が進み、細胞内シグナル伝達で重要な役割を担うことが明らかになっている。

哺乳動物においては PIP3 の産生酵素は 4 つの遺伝子に、分解酵素は 12 の遺伝子にコードされている。即ち、PIP3 変換反応を触媒する複数の酵素が生体には備わっている。にもかかわらず、これまでに作製・解析してきた約 10 系統の PIP3 代謝酵素欠損マウスは、それぞれに、顕著な異常表現型を示す。このことは、PIP3 代謝酵素が個々に特異な機能を発揮することを示しているが、その背景にあるメカニズムは不明である。

2. 研究の目的

本研究では、PIP3 をアシル基の観点から細分してとらえ、多種類であることを明示する。そのために脂肪酸組成を含めた PIP3 の解析技術を開発する。そして PIP3 代謝酵素過剰発現細胞や遺伝子改変マウスを利用して、リン酸化パターンが同一であっても脂肪酸組成の違いによって、PIP3 が異なる生理作用を持ちうることを示す。

3. 研究の方法

- ① PIP3 分子種解析方法の確立
- ② PIP3 代謝酵素過剰発現細胞における PIP3 分子種の動態解析
- ③ SHIP1 または PTEN 欠損細胞の機能と PIP3 分子種
- ④ リコンビナントタンパク質を用いた脱リン酸化活性測定

4. 研究成果

- ① リン脂質に含まれる脂肪酸の解析には、質量分析計が有用である。しかし、細胞内レベルが極めて低く、リン酸基を多く含みイオン化しにくい PIP3 については、他のリン脂質に適用される既報の方法では検出できず、

新たな方法を開発する必要があった。そこで PIP3 画分を固相抽出法により濃縮し、さらに水酸基をメチル化することで、イオン化効率の向上を図った。また、三連四重極型質量分析計を用いた選択反応モニタリング法を確立し、fmol レベルで検出可能な測定系を構築することに成功した。この手法を用いて種々の細胞における PIP3 分子種解析を行ったところ、アシル基組成の異なる PIP3 分子種が多数存在するを見出した。

- ② 薬剤誘導性に PIP3 産生酵素 (PI3K α , PI3K β , PI3K γ , PI3K δ) または PIP3 分解酵素 (PTEN, SHIP1) を過剰発現する細胞を作製し、①で確立した測定系を用いて解析した。その結果、PIP3 産生酵素の発現細胞間では蓄積する PIP3 分子種に大きな差は認められなかったが、PTEN と SHIP1 の過剰発現細胞では減少する PIP3 分子種に差が認められた。
- ③ 上記の過剰発現細胞で認められた違いが、PTEN または SHIP1 欠損細胞においても認められた。特に SHIP1 に関しては、アシル転移酵素欠損マウスとの交配により、部分的ではあるが表現型が回復したことから、PIP3 分子種が生理的意義を持つと考えられた。
- ④ 上記の解析において見出された違いが、PTEN や SHIP1 の脱リン酸化活性に依存することを明らかにするために、*in vitro* の脱リン酸化活性測定を行った。従来の方法では、複数の PIP3 分子種を同一の試験管内で解析することはできない。そこで①の手法を用いて、複数の PIP3 分子種の分解と反応生成物を同時に検出できる新たな測定系を構築した。その結果、ある条件下においては両者が異なる活性を示すことが確認できた。以上の解析から、アシル基の違いによる PIP3 分子種は異なる生理作用を持ちうる事が示唆された。

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 18 件)

- ① Neely, G.G., Rao, S., Costigan, M., Mair, N., Racz, I., Milinkeviciute, G., Meixner, A.,

- Nayanala, S., Griffin, R.S., Belfer, I., Dai, F., Smith, S., Diatchenko, L., Marengo, S., Haubner, B.J., Novatchkova, M., Gibson, D., Maixner, W., Pospisilik, J.A., Hirsch, E., Whishaw, I.Q., Zimmer, A., Gupta, V., [Sasaki, J.](#), Kanaho, Y., Sasaki, T., Kress, M., Woolf, C.J., and Penninger, J.M. Construction of a global pain systems network highlights phospholipid signaling as a regulator of heat nociception. *PLoS Genet.* 8, e1003071 (2012). 査読有
- ② Takasuga, S., Horie, Y., [Sasaki, J.](#), Sun-Wada, G.H., Kawamura, N., Iizuka, R., Mizuno, K., Eguchi, S., Kofuji, S., Kimura, H., Yamazaki, M., Horie, C., Odanaga, E., Sato, Y., Chida, S., Kontani, K., Harada, A., Katada, T., Suzuki, A., Wada, Y., Ohnishi, H., and Sasaki, T. Critical roles of type III phosphatidylinositol phosphate kinase in murine embryonic visceral endoderm and adult intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 110, 1726-1731 (2013). 査読有
- ③ Lee, H.C., Inoue, T., [Sasaki, J.](#), Kubo, T., Matsuda, S., Nakasaki, Y., Hattori, M., Tanaka, F., Udagawa, O., Kono, N., Itoh, T., Ogiso, H., Taguchi, R., Arita, M., Sasaki, T., and Arai, H. LPIAT1 regulates arachidonic acid content in phosphatidylinositol and is required for cortical lamination in mice. *Mol. Biol. Cell* 23, 4689-4700 (2013). 査読有
- ④ Fujioka, Y., Tsuda, M., Nanbo, A., Hattori, T., [Sasaki, J.](#), Sasaki, T., Miyazaki, T., and Ohba, Y. A Ca(2+)-dependent signaling circuit regulates influenza A virus internalization and infection. *Nat. Commun.* 4, 2763-2768 (2013). 査読有
- ⑤ Morishita, H., Eguchi, S., Kimura, H., [Sasaki, J.](#), Sakamaki, Y., Robinson, M. L., Sasaki, T., and Mizushima, N. Deletion of autophagy-related 5 (Atg5) and Pik3c3 genes in the lens causes cataract independent of programmed organelle degradation. *J. Biol. Chem.* 288, 11436-11447 (2013). 査読有
- ⑥ Tajima, Y., Ishikawa, M., Maekawa, K., Murayama, M., Senoo, Y., Nishimaki-Mogami, T., [Nakanishi, H.](#), Ikeda, K., Arita, M., Taguchi, R., Okuno, A., Mikawa, R., Niida, S., Takikawa, O., and Saito Y. Lipidomic analysis of brain tissues and plasma in a mouse model expressing mutated human amyloid precursor protein/tau for Alzheimer's disease. *Lipids Health Dis.* 12, 68-81 (2013). 査読有
- ⑦ Miki, Y., Yamamoto, K., Taketomi, Y., Sato, H., Shimo, K., Kobayashi, T., Ishikawa, Y., Ishii, T., [Nakanishi, H.](#), Ikeda, K., Taguchi, R., Kabashima, K., Arita, M., Arai, H., Lambeau, G., Bollinger, J.M., Hara, S., Gelb, M.H., and Murakami, M. Lymphoid tissue phospholipase A2 group IID resolves contact hypersensitivity by driving antiinflammatory lipid mediators. *J. Exp. Med.* 210, 1217-1234 (2013). 査読有
- ⑧ Hama, K., Nagai, T., Nishizawa, C., Ikeda, K., Morita, M., Satoh, N., [Nakanishi, H.](#), Imanaka, T., Shimozawa, N., Taguchi, R., Inoue, K., and Yokoyama, K. Molecular species of phospholipids with very long chain fatty acids in skin fibroblasts of Zellweger syndrome. *Lipids* 48, 1253-1267 (2013). 査読有
- ⑨ Ayukawa, T., Akiyama, M., Mummery-Widmer, J.L., Stoeger, T., [Sasaki, J.](#), Knoblich, J.A., Senoo, H., Sasaki, T., and Yamazaki, M. Dachshous-Dependent Asymmetric Localization of Spiny-Legs Determines Planar Cell Polarity Orientation in Drosophila. *Cell Rep.* 8, 610-621 (2014). 査読有

- ⑩ Baba, T., Kashiwagi, Y., Arimitsu, N., Kogure, T., Edo, A., Maruyama, T., Nakao, K., Nakanishi, H., Kinoshita, M., Frohman, M.A., Yamamoto, A., Tani, K. Phosphatidic acid (PA)-preferring phospholipase A1 regulates mitochondrial dynamics. *J. Biol. Chem.* 289, 11497-11511 (2014). 査読有
- ⑪ Abe, Y., Honsho, M., Nakanishi, H., Taguchi, R., and Fujiki, Y. Very-long-chain polyunsaturated fatty acids accumulate in phosphatidylcholine of fibroblasts from patients with Zellweger syndrome and acyl-CoA oxidase1 deficiency. *Biochim. Biophys. Acta.* 1841, 610-619 (2014). 査読有
- ⑫ Ip, L.R., Poulgiannis, G., Viciano, F.C., Sasaki, J., Kofuji, S., Spanswick, V.J., Hochhauser, D., Hartley, J.A., Sasaki, T., and Gewinner, C.A. Loss of INPP4B causes a DNA repair defect through loss of BRCA1, ATM and ATR and can be targeted with PARP inhibitor treatment. *Oncotarget* 6, 10548-10562 (2015). 査読有
- ⑬ Kofuji, S., Kimura, H., Nakanishi, H., Nanjo, H., Takasuga, S., Liu, H., Eguchi, S., Nakamura, R., Itoh, R., Ueno, N., Asanuma, K., Huang, M., Koizumi, A., Habuchi, T., Yamazaki, M., Suzuki, A., Sasaki, J., and Sasaki, T. INPP4B is a PtdIns(3,4,5)P3 phosphatase that can act as a tumor suppressor. *Cancer Discov.* in press (2015). 査読有
- ⑭ Chew, C.L., Lunardi, A., Gulluni, F., Ruan, D.T., Chen, M., Salmena, L., Nishino, M., Papa, A., Ng, C., Fung, J., Clohessy, J.G., Sasaki, J., Sasaki, T., Bronson, R.T., Hirsch, E., and Pandolfi, P.P. In vivo role of INPP4B in tumor and metastasis suppression through regulation of PI3K/AKT signaling at endosomes. *Cancer Discov.* in press (2015). 査読有
- ⑮ 佐々木純子, 佐々木雄彦：マクロファージの活性化と慢性炎症 別冊BIO Clinica 2, 116-121 (2013). 査読無
- ⑯ 中西広樹：酸性リゾリン脂質を量る 実験医学別冊, 77-82 (2013). 査読無
- ⑰ 中西広樹：脂質量分析の高感度化 遺伝子MOOK 24, 118-123 (2013). 査読無
- ⑱ 中西広樹：リポドミクスの分析技術と将来展望 オレオサイエンス誌 8, 321-327 (2014). 査読無
- [学会発表] (計 10 件)
- ① 佐々木純子, マクロファージの活性化と慢性炎症, 千里ライフサイエンスセミナー, 2012年7月27日, 大阪
- ② Junko Sasaki, Macrophage activation by phosphoinositides., *Frontiers in Immunology & Inflammation: From Molecules to Disease*, 2013年2月12日, 東京
- ③ 中西広樹, 酸化関連脂質代謝物の高感度分析法の開発と応用, 第55回日本脂質生化学会, 2013年6月6日, 宮城
- ④ 佐々木純子, イノシトールリン脂質によるマクロファージの活性化, 第1回 Academy of Aging and Cardiovascular-Diabetes Research, 2013年6月8日, 東京
- ⑤ 高須賀俊輔, 浅沼研, 木村洋貴, 高須賀緑, 中西広樹, 佐々木純子, 山崎正和, 妹尾春樹, 佐々木雄彦, ホスファチジルグリセロールリン酸 (PGP) ホスファターゼの生理機能, 第86回日本生化学会大会, 2013年9月11日, 神奈川
- ⑥ 佐々木 雄彦, 高須賀 俊輔, 佐々木 純子, 鈴木 聡, Dual specificity phosphatases acting on acidic phospholipids, 第86回日本生化学会大会, 2013年9月12日, 神奈

- 川
- ⑦ 佐々木純子, 中西広樹, 高須賀俊輔, 佐々木雄彦, イノシトールリン脂質によるマクロファージの活性化と寿命制御, 第86回日本生化学会大会, 2013年9月13日, 神奈川
 - ⑧ 佐々木純子, 質量分析法によるホスホイノシタイドの解析, 「修飾シグナル病」第3回公開シンポジウム シグナル伝達解析技術と数理モデルの最先端, 2014年1月25日, 東京
 - ⑨ Junko Sasaki, Satoshi Kofuji, Takahiro Kimura, Shunsuke Takasuga, Hiroki Nakanishi, Takehiko Sasaki, The novel mechanism of tumor suppression by INPP4B, 2nd International Symposium on Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling 2015年1月24日, 東京
 - ⑩ Hirotaka Kimura, Satoshi Eguchi, Junko Sasaki, Takehiko Sasaki, The class III PI3K and phosphatidylinositol 3-phosphate ensure structural and functional integrity of cardiomyocytes,, 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会, 第92回日本生理学会大会, 2015年3月22日, 東京

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:

取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.med.akita-u.ac.jp/~bisei/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
佐々木 純子 (SASAKI JUNKO)
秋田大学大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 30333371

(2) 研究分担者
()

研究者番号:

(3) 連携研究者
中西 広樹 (NAKANISHI HIROKI)
秋田大学大学生体情報研究センター・助教
研究者番号: 10466740