

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460059

研究課題名(和文)オリゴデンドロサイトにおけるホスファチジルイノシトール-3,5-ニリン酸の役割

研究課題名(英文) Physiological function of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate in oligodendrocytes

研究代表者

高須賀 俊輔 (Takasuga, Shunsuke)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90375262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ホスファチジルイノシトール3,5-ニリン酸(PI(3,5)P₂)の中樞神経系における生理機能を解明するため、唯一の合成酵素、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し、解析を行った。その結果、PI(3,5)P₂が中樞神経系において、髄鞘形成という極めて重要な生理機能を制御することが明らかとなった。さらに細胞系譜特異的な遺伝子欠損を導くことで、PIP3KIIIが神経細胞ではなく、グリア細胞の一つオリゴデンドロサイトにおいて重要な役割を持つことを見出した。

研究成果の概要(英文)：To elucidate physiological functions of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate (PI(3,5)P₂) in the central nervous system (CNS), we generated and analyzed CNS-specific type III phosphatidylinositol phosphate kinase (PIP3KIII)-deficient mice. These mutant mice showed the severe demyelination in the brain, which suggest that PI(3,5)P₂ regulates the myelination in CNS. Furthermore, the cell lineage-specific deletion of PIP3KIII gene revealed that PIP3KIII in oligodendrocytes but not neurons had essential roles for the myelination.

研究分野：細胞生物学

キーワード：イノシトールリン脂質

1. 研究開始当初の背景

イノシトールリン脂質は3つの水酸基のリン酸化状態により8種類が存在し、リン酸化・脱リン酸化酵素により相互に変換されることで、多様な生理機能を制御している(図1)。中でも最も遅れて発見されたホスファチジルイノシトール3,5-ニリン酸(PI(3,5)P2)は、酵母から哺乳動物に共通して細胞内小胞輸送の制御に参与している。特に酵母では高浸透圧などのストレス応答に重要なイノシトールリン脂質であることが分かっている。一方、多細胞生物ではPI(3,5)P2が個体発生に必須であることは示されていた(線虫: Mol. Biol. Cell 17, 3062, (2006), ショウジョウバエ: Mol. Biol. Cell 17, 3989, (2006))が、個体の高次機能における役割は依然不明な部分が多く残されていた。

申請者らはタイプIIIのホスファチジルイノシトール3-リン酸5-キナーゼ(PIPKIII)の遺伝子欠損マウスを作製・解析することで、この酵素が哺乳動物においても、PI(3,5)P2を産生する唯一の酵素であることを明らかとした。個体発生においては、着床後に初めて生じる上皮細胞である臍性内胚葉(胎盤が出来るまで胎児への栄養供給を担う)の機能不全により円筒胚期に致死となることを見出した。上皮細胞機能におけるPIPKIIIの重要性は、腸上皮細胞特異的なPIPKIII欠損マウスの表現型(クローン病に類似した激しい線維化を伴う炎症性腸疾患を呈す)によっても確認された(Takasuga S *et al.* Proc Natl Acad Sci USA 110, 1726, (2013))。

2. 研究の目的

これまでの研究で、PIPKIIIは単細胞では生存に必須では無いが、臍性内胚葉や腸上皮細胞などの極性を有する細胞において、生理的に重要な役割を持つことが明らかとなった。そこで、上皮細胞以外で極性を有する中枢神経系の細胞におけるPIPKIIIの役割を明らかにする目的で本研究を行った。

3. 研究の方法

中枢神経系前駆細胞での遺伝子欠損を導くNestin-Creマウスとの交配により、中枢神経特異的PIPKIII欠損マウスを作製した。

さらに中枢神経系において、細胞系譜特異

的な遺伝子欠損マウス(神経細胞: Emx1-Cre、オリゴデンドロサイト: MBP-Cre)を作製し、それぞれの細胞種での役割の解明を試みた。それぞれの細胞系譜と、各Creの発現により遺伝子欠損が誘導される細胞種を図1に示した。

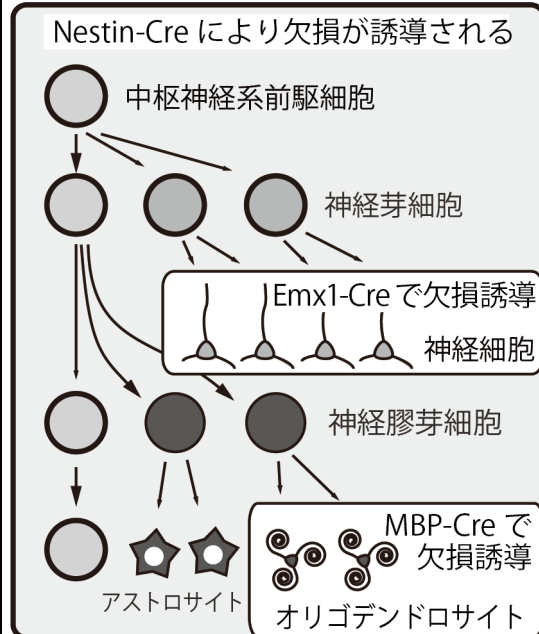


図1. 中枢神経系の発生系譜と各Creの発現

加えて、中枢神経系のミエリン形成に関するPI(3,5)P2ホスファターゼを同定する目的で、PI(3,5)P2ホスファターゼ遺伝子を欠損するマウスより、脳を摘出し髄鞘染色を行った。

また、細胞内PI(3,5)P2の局在を明らかにするために、各種のPI(3,5)P2結合タンパク質の脂質結合ドメインと緑色蛍光タンパク質(GFP)との融合タンパク質を作製し、培養細胞に遺伝子導入することで蛍光プローブとすることを試みた。

4. 研究成果

初めに、中枢神経系前駆細胞での遺伝子欠損を導くNestin-Creマウスとの交配により、中枢神経特異的PIPKIII欠損マウスを作製した。麻酔下で脳室内に³²P無機リン酸を投与することで、脳内のリン脂質を標識した後、リン脂質を抽出、脱アシル化して陰イオン交換カラムを用いたHPLCによりイノシトールリン脂質を分離・定量する方法を新たに開発し、脳内のイノシトールリン脂質を測定した。その結果、中枢神経特異的PIPKIII欠損マウスでは脳内のPI(3,5)P2がほとんど消失していた。PIPKIIIの基質となるPI3Pは有意に増加し、その他のイノシトールリン脂質は変化

していないことも確認できた。本マウスは生後2~3週齢で運動異常(振戦)を呈して、1ヶ月以内に全例が死亡した。脳組織染色・超微形態解析の結果、全脳における著しい空胞化と髄鞘(ミエリン)形成不全が示された。髄鞘は神経細胞表面からのシグナルに基づき、オリゴデンドロサイトが神経を取り巻く形で形成される。そこで細胞種特異的な遺伝子欠損(図1)を導くことで、いずれの細胞種におけるPIPKIII及びPI(3,5)P2が髄鞘形成に重要であるのかを次に検討した。その結果、Emx1-Creとの交配で作製した神経細胞特異的なPIPKIII遺伝子欠損マウスでは、顕著な異常は認められず、髄鞘形成にも全く影響は認められなかった。一方、MBP-Creとの交配により作製したオリゴデンドロサイト特異的なPIPKIII遺伝子欠損マウスでは、ミエリン形成が有意に低下していた。低下の程度は、Nestin-Creとの交配による中枢神経系特異的なPIPKIII遺伝子欠損マウスに比較して、かなり弱いものであったが、これはオリゴデンドロサイトにおけるMBP-Creの発現がモザイク状で限定的なものであったためと考えられる。オリゴデンドロサイト特異的なPIPKIII遺伝子欠損マウスは、加齢と共に3ヶ月齢頃より下肢痙性対麻痺の症状を呈するようになり、6ヶ月齢を超えところで、全例が致死となった。ヒトの痙性対麻痺の原因遺伝子の一つは、ミエリン構成タンパク質であり、ミエリン形成不全が痙性対麻痺の表現型の原因となっていることが強く示唆された。

PI(3,5)P2ホスファターゼ遺伝子欠損によりミエリン形成異常が起きるか否かを検証した。Fig4/Sac3に加えて、MTMR1、MTMR3、MTMR4、MTMR6、MTMR7について検証を行った。いずれのホスファターゼ遺伝子についても、単独の遺伝子欠損で髄鞘染色に大きな変化を起こすものは見出されなかった。単分子の遺伝子欠損では、他のホスファターゼにより機能的に代償されている可能性が示唆された。今後は、二重、三重のホスファターゼ遺伝子欠損マウスを用いた解析が必要となる。

PI(3,5)P2の蛍光プローブ作製については、新たに分泌タンパク質産生系として用いられることの多いピキア酵母(*P. pastoris*)のATG18(*PpATG18*)について、アミノ酸置換によりPI(3,5)P2選択性を高めた変異体を複数作製し検証を行ったが、満足な結果は得られなかった。また、他の研究グループよりPI(3,5)P2蛍光プローブとしての有用性が報告されたML1Nx2-EGFPについて、詳細にその

有用性を検証した結果、十分なPI(3,5)P2選択性を有しているとは考えにくいという結果が得られ、その旨を報告した(雑誌論文3)。

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5件)

1. Phosphoinositide phosphatase Sac3 regulates the cell surface expression of scavenger receptor A and formation of lipid droplets in macrophages.

Morioka S, Nigorikawa K, Hazeki K, Ohmura M, Sakamoto H, Matsumura T, Takasuga S, Hazeki O.

Exp Cell Res. 17,30300-2. (2017) 査読有
doi: 10.1016/j.yexcr.2017.05.022.

2. Vps34 regulates myofibril proteostasis to prevent hypertrophic cardiomyopathy.

Kimura H, Eguchi S, Sasaki J, Kuba K, Nakanishi H, Takasuga S, Yamazaki M, Goto A, Watanabe H, Itoh H, Imai Y, Suzuki A, Mizushima N, Sasaki T.

JCI Insight. 2, e89462 (2017) 査読有
doi: 10.1172/jci.insight.89462.

3. The ML1Nx2 Phosphatidylinositol 3,5-Bisphosphate Probe Shows Poor Selectivity in Cells.

Hammond GR, Takasuga S, Sasaki T, Balla T. PLoS One. 10, e0139957 (2015) 査読有
doi:10.1371/journal.pone.0139957.
eCollection 2015.

4. INPP4B Is a PtdIns(3,4,5)P3 Phosphatase That Can Act as a Tumor Suppressor.

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, Sasaki T.

Cancer Discov. 5, 730-9 (2015) 査読有
doi: 10.1158/2159-8290.CD-14-1329.

5. Inpp5e increases the Rab5 association and phosphatidylinositol 3-phosphate accumulation at the phagosome through an interaction with Rab20.

Segawa T, Hazeki K, Nigorikawa K, Morioka S, Guo Y, Takasuga S, Asanuma K, Hazeki O. Biochem J. 464, 365-75 (2014) 査読有 doi: 10.1042/BJ20140916.

〔学会発表〕(計 1 件)

高須賀俊輔、中西広樹、木村洋貴、佐々木純子、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69回細胞生物学会大会、2017年6月15日、
仙台国際センター (宮城県仙台市)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 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 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

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：

(4) 研究協力者
()