

研究課題別評価

1 研究課題名: 疾病の発症、進行におけるリン脂質因子の生体内動態解析

2 研究者氏名: 佐々木 雄彦

3 研究の狙い:

リン脂質の一種であるホスファチジルイノシトールは、細胞内情報伝達において重要な役割を果たす。そのイノシトール環水酸基がリン酸化を受けることで、ホスホイノシチドと総称される 7 種類の代謝産物が派生する。これらは固有の機能を有する生理活性脂質であることが、主に試験管レベル、培養細胞レベルの研究から明らかになっている。本研究では、ホスホイノシチド代謝酵素欠損マウスの表現型解析によってホスホイノシチド代謝系の病態生理的な役割を明らかにするとともに、生体内でのホスホイノシチド動態解析を可能とするトランスジェニックマウスを開発する。これらのマウスを用いて、ホスホイノシチド代謝酵素欠損とがん、免疫疾患、アレルギー等の病態との関連を提示し、病態発生の根底となる細胞機能異常の発現機構をリン脂質動態の側面から解明することを目指す。

4 研究成果:

(1) ホスホイノシチド代謝酵素欠損マウスを新規に 4 系統作製し、その表現型を解析した。

その中の一つがホスファチジルイノシトール 4,5 - ニリン酸[PI(4,5)P₂]の主要な産生酵素である phosphatidylinositol phosphate kinase I alpha (PIPKI I) の欠損マウスである。予想に反して、PIPKI I

ホモ欠損マウスは野生型マウスと比べて、より重篤な全身性および局所性(皮膚)アナフィラキシー反応を呈した。骨髄由来マスト細胞を IgE で感作し、対応する抗原によって Fc γ RI を刺激したところ、ヒスタミン含有小胞の放出(脱顆粒)、サイトカイン産生の顕著な亢進が認められた。生化学的な解析の結果、PLC や PI3K の基質としてセカンドメッセンジャーの前駆体となる PI(4,5)P₂ の供給は他の PIPKI アイソザイムにより代償されうるが、PIPKI I はアクチン重合を制御する PI(4,5)P₂ の産生に必須であることが明らかになった。また、PIPKI I が IgE 受容体である Fc γ RI の細胞膜ラフトへの移行を負に制御することにより、Fc γ RI を介した細胞応答を総じて抑制することを見出した。これらの知見は、動物個体における PIPKI I の生理機能を明らかにした初めてのものである。即ち、PIPKI I は Fc γ RI を介したマスト細胞の脱顆粒やサイトカイン産生を阻害することで、アレルギー抑制因子として機能することが明らかとなった。さらに、他のホスホイノシチドと比較して大量に存在し、細胞膜受容体刺激に伴う顕著な増加が見られない PI(4,5)P₂ が、如何にしてセカンドメッセンジャー様の役割を果たすかという長年の疑問に関する答えとして、機能的に重複しない PI(4,5)P₂ のコンパートメント化を個々の PIPKI アイソザイムが実現しているというアイデアを提示することができた。

この他 3 系統の代謝酵素遺伝子欠損マウスの解析結果は未発表であり詳細は省略するが、著明な不随意運動、細胞内オートファゴソーム様腔胞の蓄積などの興味深い新規の知見を得た。

(2) ホスホイノシチド可視化マウスの開発と応用

個々のホスホイノシチドに特異的な結合能を有する脂質結合モジュールと GFP との融合タンパク質(ホスホイノシチド可視化プローブ)を全身性に発現するトランスジェニックマウス(ホスホイノシチド可視化マウス)の作製を試みた。これまでに 4 種類のホスホイノシチドを特異的に検出できる 5 系統のホスホイノシチド可視化マウスの樹立に成功した。これまで不可能であった in vivo(臓器・組織を構成する状態にある細胞)でのホスホイノシチド動態の解析が、これらのマウスを用いれば可能となることを示した。また、ホスホイノシチド可視化プローブの導入が困難な初代培養細胞として好中球を用いて、走化性因子依存性の細胞運動(遊走)の素過程におけるホスホイノシチド

の生理機能の解析を行った。PI(3,4,5)P₃ は先導端に、PI(4,5)P₂ は後端膜に局在することを見出した。そして、PI(3,4,5)P₃ 局在化が細胞極性の発生に重要であることを遺伝学的に証明した。PI(3,4,5)P₃ 局在の規定には、phosphoinositide 3-kinase (PI3K) と共に PI(3,4,5)P₃ 脱リン酸化酵素が必須であることを、これらのホスホイノシチド代謝酵素欠損マウスと PI(3,4,5)P₃ 可視化マウスの交配によって証明した。また、脱リン酸化酵素の欠損による PI(3,4,5)P₃ 依存性遊走制御機構の破綻は、PI(3,4,5)P₃ 非依存性の遊走制御機構の破綻をも導くことなどから、二つの機構は最終的に共通の標的を先導端へとリクルートする役割を担うことが示された。また、PI(4,5)P₂ は後端膜の退縮に重要であることを示す知見を得た。これらの知見は新たな解析ツールであるホスホイノシチド可視化マウスの開発によって、哺乳類細胞の遊走制御におけるホスホイノシチドの役割に関する長年の疑問を解いたものである。解析が進んでいる細胞性粘菌の遊走制御機構との共通点と差異を明らかにすることができた。

5 自己評価:

当初の研究計画の中心であったホスホイノシチド可視化マウスを含め、本研究によって9系統の遺伝子改変マウスを作出することができたが、その解析や応用は不十分であった。しかしながら得られた知見は、従来のホスホイノシチド研究から派生したいくつかの大きな疑問に答えを与えるものであった。また、基礎医学研究としては、免疫疾患、がん、神経疾患等の病態発生機序の理解を深めるものであった。本研究で得られたツールと知見は、ホスホイノシチド代謝異常と病態発生機序に関して研究を進める上で、今後の大きな糧となるものであると考えている。

6 研究総括の見解:

ホスホイノシチド代謝酵素欠損マウス、ホスホイノシチド可視化マウスの作成を行い、その解析から、PI(4,5)P₂をはじめとするホスホイノシチドの機能、役割りに関して新しい知見を得たことは、免疫疾患、がん、神経疾患等の発生、病態の理解に大きく貢献するものであり、さきがけ研究の成果として高く評価できる。今後の研究で、ホスホイノシチド代謝異常と各種疾病の発生ならびに病態との関連が明らかにされてゆくことを期待したい。

7 主な論文等:

論文

1. J. Sasaki^{*}, T. Sasaki[#], M. Yamazaki, K. Matsuoka, C. Taya, H. Shitara, S. Takasuga, M. Nishio, K. Mizuno, T. Wada, H. Miyazaki, H. Watanabe, R. Iizuka, S. Kubo, S. Murata, T. Chiba, T. Maehama, K. Hamada, H. Kishimoto, M. Frohman, K. Tanaka, J. Penninger, H. Yonekawa, A. Suzuki & Y. Kanaho[#]: Regulation of anaphylactic responses by phosphatidylinositol phosphate kinase type I . *J. Exp. Med.* (in press); (top^{*} and corresponding authors[#])
2. T. Wada, N. Joza, M. Cheng, T. Sasaki, I. Kozieradzki, K. Bachmaier, T. Katada, M. Schreiber, E. Wagner, H. Nishina & J. Penninger: MKK7 couples stress signaling to G2/M cell cycle progression and cellular senescence. *Nat. Cell Biol.* 4: 1016-1022 (2004)
3. Y. Horie, A. Suzuki, E. Kataoka, T. Sasaki, K. Hamada, J. Sasaki, K. Mizuno, G. Hasegawa, H. Kishimoto, M. Iizuka, M. Naito, K. Enomoto, S. Watanabe, T. Mak & T. Nakano: Hepatocyte-specific Pten deficiency results in steatohepatitis and hepatocellular carcinomas. *J. Clin. Invest.* 113: 1774-1783 (2004)
4. A. Suzuki, T. Kaisho, M. Ohishi, M. Tsukio-Yamaguchi, T. Tsubata, P. A. Koni, T. Sasaki, T. Mak & T. Nakano: Critical roles of Pten in B cell homeostasis and immunoglobulin class switch

recombination. *J. Exp. Med.* 197: 657-667 (2003)

5. M. Woo, R. Hakem, C. Furlonger, A. Hakem, G. Duncan, T. Sasaki, D. Bouchard, L. Lu, G. Wu, C. Paige & T. Mak: Caspase-3 regulates cell cycle in B cells: a consequence of substrate specificity. *Nat. Immunol.* 4: 1016-1022 (2003)
6. C. Krawczyk, A. Olivera-dos-Santos, T. Sasaki, E. Griffiths, P. Ohashi, S. Snapper, F. Alt & J. Penninger: Vav1 controls integrin clustering and MHC/peptide-specific cell adhesion to antigen-presenting cells. *Immunity* 16: 331-343 (2002)
7. M. Crackower, G. Oudit, I. Kozieradzki, R. Sarao, T. Sasaki, E. Hirsch, A. Suzuki, T. Shioi, J. Sasaki, R. Sah, H. Cheng, V. Rybin, G. Lembo, L. Fratta, A. Oliveira-dos-Santos, J. Benovic, R. Kahn¹, S. Izumo, S. Steinberg, M. Wymann, P. Backx, and J. Penninger: Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathway. *Cell* 110: 737-749 (2002)

特許

1. 特願 2004-244482 イノシトールリン脂質可視化プローブ遺伝子導入モデル動物。