

高次脳機能構築における脂質シグナル分子産生酵素の機能とシグナル伝達機構の解析

著者	金保 安則
著者別名	KANAHO Yasunori
発行年	2006-05
URL	http://hdl.handle.net/2241/00144477

高次脳機能構築における脂質シグナル分子産生酵素の
機能とシグナル伝達機構の解析

(課題番号：16370091)

平成16年度～平成17年度科学研究補助金(基盤研究B)

研究成果報告書

平成18年5月

研究代表者：金保 安則

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授

寄贈
金保安則氏

<はしがき>

本研究では、様々な細胞内シグナル伝達系や細胞機能に重要な役割を果たすことが示されている脂質シグナル分子産生酵素、ホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼ(PIP5K)とホスホリパーゼD2(PLD2)について、ジーンターゲット法を利用して個体レベルでの生命現象、特に高次脳機能構築における重要性を明らかにし、個体レベルでの生理機能に直接関連するこれらの分子の機能とシグナル伝達機構を細胞レベルと *in vitro* 実験系で解明することを目的として解析を進めてきた。その結果、細胞レベルで、神経細胞におけるこれらの分子の新たな機能が明らかとなり、多くの研究成果をあげることができた。得られた研究成果のほとんどを、原著論文として学術雑誌に発表しており、それらを本研究報告書に記載した。

研究組織

研究代表者：金保 安則（筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授）

研究分担者：前浜 朝彦（東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・研究員）

研究分担者：横関 健昭（筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師）

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 16 年度	8,100	0	8,100
平成 17 年度	7,400	0	7,400
平成 年度			
平成 年度			
平成 年度			
総計	15,500	0	15,500

研究発表

(1) 学会誌等

1. Y. Zhang, G. Du, Y. Kanaho, M.A. Frohman, and S.E. Tsirka: Increased expression of two phospholipase D isoforms during experimentally induced hippocampal mossy fiber outgrowth. *Glia* **46**, 74-83, 2004
2. T. Maehama, N. Kosaka, F. Okahara, K. Takeuchi, M. Umeda, J.E. Dixon, Y. Kanaho: Suppression of a phosphatidylinositol 3-kinase signal by a specific spliced variant of Drosophila PTEN. *FEBS Lett.* **565**, 43-47, 2004
3. H. Watanabe, T. Yokozeki, M. Yamazaki, H. Miyazaki, T. Sasaki, T. Maehama, K. Itoh, M.A. Frohman, and Y. Kanaho: Essential role of phospholipase D2 activation downstream of ERK MAP kinase in the signaling pathway of NGF-stimulated neurite outgrowth in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 37870-37877, 2004
4. F. Okahara, H. Ikawa, Y. Kanaho, and T. Maehama: Regulation of PTEN phosphorylation and stability by a tumor suppressor candidate protein. *J. Biol. Chem.* **279**, 45300-45303, 2004
5. C. Kojima, A. Hashimoto, I. Yabuta, M. Hirose, S. Hashimoto, Y. Kanaho, H. Sumimoto, T. Ikegami, and H. Sabe: Regulation of Bin1 SH3 domain binding by phosphoinositides. *EMBO J.* **23**, 4413-4422, 2004
6. K. Itoh, M. Watanabe, K. Yoshikawa, Y. Kanaho, L.J. Berliner, and H. Fujii: Magnetic resonance and biochemical studies during pentylentetrazole-kindling development -the relationship between NO, nNOS and seizures. *Neurosci.* **129**, 757-766, 2004
7. F. Okahara, K. Itoh, M. Ebihara, M. Kobayashi, H. Maruyama, Y. Kanaho, and T. Maehama: Production of research-grade antibody by in vivo electroporation of DNA encoding target protein. *Anal. Biochem.* **336**, 138-140, 2005
8. Y. Zhang, Y. Kanaho, M.A. Frohman, and S.E. Tsirka: Phospholipase D1-promoted release of tissue plasminogen activator facilitates neurite outgrowth. *J. Neurosci.* **25**, 1797-1805, 2005
9. 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, M.A. Frohman, K. Tanaka, J.M. Penninger, H. Yonekawa, A. Suzuki, and Y. Kanaho: Regulation of anaphylactic responses by phosphatidylinositol phosphate kinase type I α . *J. Exp. Med.* **201**, 859-870, 2005
10. K. Emoto, H. Inadome, Y. Kanaho, S. Narumiya, and M. Umeda: Local change in phospholipid composition at the cleavage furrow is essential for completion of cytokinesis.

J. Biol. Chem. **280**, 37901-37907, 2005

11. H. Miyazaki, M. Yamazaki, H. Watanabe, T. Maehama, T. Yokozeki, and Y. Kanaho: The small GTPase ADP-ribosylation factor 6 negatively regulates dendritic spine formation. *FEBS Lett.* **579**, 6834-6837, 2005
12. W. Su, P. Chardin, M. Yamazaki, Y. Kanaho, and G. Du: RhoA-mediated phospholipase D1 signaling is not required for the formation of stress fibers and focal adhesions. *Cell Signal.* **18**, 469-478, 2006

(2) 口頭発表

1. Y. Kanaho: Regulation of neurite remodeling by PIP5-kinase. The 3rd Japanese Biochemical Society Biofrontier Symposium: New Aspect of Phospholipid Biology 2004, 2004. 5.10-12, Kamakura (Japan).
2. M. Yamazaki, H. Miyazaki, H. Watanabe, and Y. Kanaho: Involvement of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in axonal outgrowth and chemorepulsion of DRG neurons. The 3rd Japanese Biochemical Society Biofrontier Symposium: New Aspect of Phospholipid Biology 2004, 2004. 5.10-12, Kamakura (Japan)
3. 前浜朝彦、岡原史明、金保安則 : PICT-1 による癌抑制遺伝子産物 PTEN のリン酸化およびターンオーバーの制御. 第3回生命科学研究会, 2004. 6.25-26, 仙台
4. 横関健昭、金保安則、C. Bonnerot : マウスB細胞抗原受容体を介したシグナル伝達における Syk チロシンキナーゼの役割の解析. 第3回生命科学研究会, 2004. 6.25-26, 仙台
5. C. Arikawa, H. Watanabe, T. Yokozeki, and Y. Kanaho: Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration is attributable to the PLD-catalyzed phosphatidylethanol production. The 3rd Korea-Japan Conference on Cellular Signaling for Young Scientists. 2004. 7.13-15, POSTECH (Korea)
6. F. Okahara, K. Itoh, Y. Kanaho, and T. Maehama: A candidate tumor suppressor PTEN-binding protein. The 3rd Korea-Japan Conference on Cellular Signaling for Young Scientists. 2004. 7.13-15, POSTECH (Korea)
7. Y. Kanaho: Regulation of neurite remodeling by phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase. FASEB Summer Research Conferences on Phospholipases. 2004. 7.17-22, Atlanta (USA) (Invited)
8. 金保安則 : PIP5-kinase による神経細胞の形態制御. 平成16年度東工大 BIO-LIPID 研究会, 2004. 10.1-2, 箱根
9. H. Miyazaki, M. Yamazaki, H. Watanabe, and Y. Kanaho: ARF6 regulates spine

- morphogenesis via activation of PIP5K β . 第 77 回日本生化学会大会 (ワークショップ), 2004. 10.15, 横浜
10. H. Miyazaki, M. Yamazaki, H. Watanabe, and Y. Kanaho: ARF6 regulates spine morphogenesis via activation of PIP5K β . 第 77 回日本生化学会大会, 2004. 10.15, 横浜
 11. C. Arikawa, H. Watanabe, T. Yokozeki and Y. Kanaho: Accumulation of phosphatidylethanol produced by PLD is responsible for ethanol-induced apoptotic neurodegeneration. 第 77 回日本生化学会大会, 2004. 10.15, 横浜
 12. T. Maehama, F. Okahara, and Y. Kanaho: A candidate tumor suppressor regulates PTEN phosphorylation and turnover. 第 77 回日本生化学会大会, 2004. 10.15, 横浜
 13. F. Okahara, K. Itoh, Y. Kanaho, and T. Maehama: A convenient method for antibody production: application of in vivo DNA electroporation. 第 77 回日本生化学会大会, 2004. 10.15, 横浜
 14. 金保安則: Bio-lipid 産生酵素による新規な蛋白質翻訳後修飾と蛋白質運命の解析. 平成 16 年度特定領域研究「蛋白質の一生」, 2004. 10.26-29, 宮崎
 15. 金保安則: 脳・神経の発達とアルコール. 都民講演会, 2004. 11.29, 東京
 16. 金保安則、横関健昭: PIP5 キナーゼと神経突起リモデリング. 第 45 回日本脂質生化学会, 2005. 6.1-2, 金沢
 17. 金保安則、有川千尋、横関健昭、渡邊寛: エタノール誘起性神経細胞死におけるホスホリパーゼ D の関与の解析. 第 4 回生命科学研究会, 2005. 6.24-25, 群馬
 18. A. Nakano, M. Yamazaki, T. Yokozeki, and Y. Kanaho: The interaction of AP-2 adaptor complex with phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase and regulation of synaptic vesicle endocytosis. The 4th Japan-Korea Conference on Cellular Signaling for Young Scientists. 2005. 7.12-13, Fukuoka (Japan)
 19. T. Yokozeki, A. Hara, H. Watanabe, and Y. Kanaho: Knockdown of PLD2 expression by RNA interference inhibits PDGF-induced membrane ruffle formation in NIH-3T3 cells. The 4th Japan-Korea Conference on Cellular Signaling for Young Scientists. 2005. 7.12-13, Fukuoka (Japan)
 20. A. Hara, H. Watanabe, T. Yokozeki, and Y. Kanaho: Knockdown of PLD2 expression by RNA interference inhibits PDGF-induced membrane ruffle formation in NIH-3T3 cells. 第 78 回日本生化学会大会, 2005. 10.19-22, 神戸
 21. A. Nakano, M. Yamazaki, T. Unoki, T. Hongu, C. Murata, R. Taguchi, T. Yokozeki, and Y. Kanaho: Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase γ 661 directly interacts with AP-2 adaptor complex in neurons, which may be involved in synaptic vesicle endocytosis. 第 78 回日本生化学会大会, 2005. 10.19-22, 神戸

22. T. Suzuki, Y. Kanai, T. Hara, J. Sasaki, T. Sasaki, M. Kohara, T. Yokozeki, T. Maehama, and Y. Kanaho: ARF6 is required for hepatic cord formation and liver development. 第78回日本生化学会大会, 2005. 10.19-22, 神戸
23. 岡原史明、村上誠、金保安則、前濱朝彦: 癌抑制遺伝子産物 PTEN の制御因子 PICT-1 による発癌制御機構の解析. 第28回日本分子生物学会年会, 2005, 12. 7-10, 福岡
24. 鈴木輝彦、金井克晃、原孝彦、佐々木純子、佐々木雄彦、小原道法、前濱朝彦、横関健昭、金保安則: 肝細胞索形成・肝発生における ARF6 の機能. 第28回日本分子生物学会年会, 2005, 12. 7-10, 福岡
25. T. Maehama, F. Okahara, M. Murakami, and Y. Kanaho: Critical Role of a Tumor Suppressor Candidate PICT-1 in Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate Signals and Tumorigenic Transformation. International Symposium of Kobe University 21st Century COE program on Signal Transduction, In Memory of Prof. Yasutomi Nishizuka, 2006. 02-9-11, Kobe (Japan)
26. 金保安則: ARF6 による樹状突起スパイン形成の制御機構. 特定領域研究「細胞情報ネットワークを統合する G 蛋白質シグナル研究の新展開」, 2006. 2.10-11, 茨城県稲敷郡
27. Y. Kanaho: Activation mechanisms and physiological functions of PIP5K. 4th Tokyo Tech Bio-Lipid Forum –Lipid Signaling and Membrane Traffic- Join Symposium Tokyo Tech and IMCB, 2006. 3.24. Yokohama

(3) 出版物

1. 金保安則、渡邊寛: ホスホリパーゼ D の活性測定法. *生化学実験法 細胞内シグナル伝達研究法* (福井泰久 編), pp. 115-122, 学会出版センター (2004)
2. 金保安則: ホスホリパーゼ D の活性測定法. *生物薬科学実験講座 情報伝達物質 [II] シグナル伝達系と細胞機能* (石橋貞彦、市川厚、堅田利明 編), pp 388-402 広川書店 (2005)
3. 金保安則、佐々木純子、佐々木雄彦、宮崎秀幸、中野亜希子、横関健昭、山崎正和: ホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼと細胞膜ダイナミクス. *実験医学* **23**, 925-932, 2005
4. 金保安則、佐々木純子、佐々木雄彦、山崎正和: ホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼのアイソザイム特異的な生理機能. *細胞工学* **24**, 386-391, 2005
5. 金保安則、中野亜希子、横関健昭: ホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼの活性化機構と生理機能. *生化学* (印刷中)

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

工業所有権の名称、発明者名、権利者名、工業所有権の種類、番号、出願年月日、取得年月日等
該当なし

研究成果

本研究では、様々な細胞内シグナル伝達系や細胞機能に重要な役割を果たすことが示されている二種類の脂質性シグナル分子産生酵素、ホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼ(PIP5K)とホスホリパーゼD2 (PLD2) について、ジーンターゲットイング法を利用した個体レベルでの生理機能、特に高次脳機能構築における重要性を明らかにすることを最終目的としている。また、個体レベルでのこれらの脂質性シグナル分子産生酵素の生理機能を推察するために、細胞レベルでの機能解析も行った。その結果、細胞レベルで、神経細胞におけるこれらの分子の新たな機能が明らかとなり、多くの研究成果をあげることができた。また、個体レベルにおいても PIP5K α の生理機能について新たな知見を得ている。それらの要約を以下に記載した。

【要約】

PIP5K は、ホスファチジルイノシトール 4-リン酸のイノシトール環 5 位をリン酸化して、様々なシグナル伝達系や細胞機能に関与しているホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 (PIP₂) を産生する脂質キナーゼである。ほ乳類 PIP5K については、これまでに α 、 β 、および γ の三種類のアイソザイムと γ 635 と γ 661、 γ 687 の三種類のスプライシングバリエーションが同定されている。これまでの研究から、PIP5K は低分子量Gタンパク質の Rho ファミリーGTPase や ARF によって活性化されること、および PIP5K は細胞形態制御やエンドサイトーシス、エキソサイトーシスなどの細胞膜のダイナミクスが関与する細胞機能に重要な役割を果たしていることが示されている。しかしながら、これらの各 PIP5K アイソザイムに固有の活性調節機構や生理機能については不明な点が多い。また、個体レベルでの生命現象における個々の PIP5K アイソザイムの役割の解明についても、緊急課題として残されている。

一方、PLD は、細胞膜構成リン脂質のホスファチジルコリンを加水分解してコリンとホスファチジン酸を産生するリン脂質分解酵素である。これまでから、PLD は、ホルモンや神経伝達物質、増殖因子などの種々のアゴニストによる細胞刺激により活性化されることが明らかにされている。ほ乳類 PLD として、現在までに PLD1 と PLD2 の二種類の PLD アイソザイムが同定されており、PLD1 には PLD1a と PLD1b のスプライシングバリエーションが存在する。PLD1 は *in vitro* において PIP₂ の存在下でプロテインキナーゼ C や低分子量Gタンパク質の ARF や RhoA、Rac1、Cdc42 により活性化されて、細胞内小胞輸送や分泌反応に重要な役割を果たしていることが示唆されている。一方、PLD2 については、*in vitro* では PIP₂ 存在下で恒常的に活性化され、タンパク質性の活性化因子は同定されていない。また、PLD2 の生理機能についてもほとんど解明されていないのが

現状である。

このような状況下、細胞レベルおよび個体レベルで各 PIP5K と PLD アイソザイムの生理機能を解析し、(1) 神経成長因子 (NGF) 刺激したクロム親和性細胞腫 PC12 細胞において、PLD2 は extracellular signal-regulated kinase (ERK) の下流で活性化されて神経突起の伸長に重要な役割を果たすこと、(2) PIP5K β は海馬神経細胞のスパイン形成を負に制御すること、(3) PIP5K α は、アレルギー反応を負に制御していること、および (4) PIP5K γ 661 は AP-2 adaptor complex と特異的に相互作用して、海馬神経細胞におけるシナプス小胞のエンドサイトーシスを誘起することを明らかにした。

(1) PLD2 は ERK MAP キナーゼの下流で機能して NGF 刺激依存的な PC12 細胞の神経突起伸長を促進する

PC12 細胞において、NGF 依存的な神経突起の伸長には MAP キナーゼの一つである ERK の活性化が必須であることが知られている。野生型 PLD2 あるいは活性欠失型 PLD2 を誘導発現した PC12 細胞における ERK の活性化を解析したところ、いずれの PLD2 を誘導発現させても ERK の活性化は影響されなかった。しかしながら興味深いことに、ERK の上流シグナル分子である MAP kinase-ERK kinase (MEK) の特異的阻害剤 PD98059 で野生型 PLD2 を誘導発現した PC12 細胞を処理すると、NGF 刺激依存的な神経突起伸長と PLD 活性化がともに抑制された。さらに、活性型 MEK の過剰発現により形成される神経突起は野生型 PLD2 の共発現により促進されること、および野生型 PLD2 活性は活性型 MEK により活性化されることが明らかとなった。これらの結果から、PLD2 は ERK の下流で機能して NGF 刺激依存的な神経突起を促進するものと結論づけられる。

(2) PIP5K β は海馬神経細胞のスパイン形成を負に制御する

我々は以前に、PIP5K は細胞形態形成に重要な役割を果たすことを示唆した。この知見から、PIP5K が記憶・学習に重要である海馬神経細胞のスパイン形成に関与していることを想定してその解析を行った。マウス海馬の内在性 PIP5K β は、スパインマーカー蛋白質である PSD95 と同一の画分に分画され、マウスの発生過程における PIP5K β の発現パターンは PSD95 の発現パターンと類似していた。これらの結果は、PIP5K β がスパインにおいて機能している可能性を示唆している。さらに我々は、マウス海馬神経細胞に野生型 PIP5K β を過剰発現させると、スパイン数が顕著に減少し、活性欠失型 PIP5K β を過剰発現させるとスパイン数は増大することを見出した。これらの結果から、PIP5K β はスパイン形成を負に制御していることが示唆された。

(3) PIP5K α は、アレルギー反応を負に制御している

個体レベルでの生命現象における個々の PIP5K アイソザイム特有の機能を解析するために、PIP5K α のノックアウトマウスを作製し、それを解析した。その結果、PIP5K $\alpha^{-/-}$ マウスから調製した骨髄由来肥満細胞において、抗原刺激によるヒスタミン遊離が顕著に亢進していることが明らかとなった。さらに、PIP5K $\alpha^{-/-}$ マウスにおいては、抗原刺激による局所アレルギーおよび全身性アレルギーともに亢進していることも明らかとなった。これらの結果から、PIP5K α は抗原刺激による肥満細胞の過剰なヒスタミン遊離を抑制することにより、アレルギー反応を負に制御していることが示唆される。

(4) PIP5K γ 661 は AP-2 複合体と相互作用して、海馬神経細胞におけるシナプス小胞のエンドサイトーシスに重要な役割を果たす

我々は、三種の PIP5K アイソザイムの α 、 β 、 γ と二種類の PIP5K γ スプライシングバリエーションの PIP5K γ 635 と PIP5K γ 661 のうち、PIP5K γ 661 が AP-2 複合体と特異的に相互作用するという、非常に新規で興味深い知見を得た。これらの分子が相互作用する領域を解析した結果、PIP5K γ 661 に特有の C 末端 26 アミノ酸残基領域に AP-2 複合体の β 2 サブユニットの Ear ドメインが結合することが明らかとなった。さらに、この PIP5K γ 661 の AP-2 複合体との相互作用は、PIP5K γ 661 の C 末端 26 アミノ酸残基に存在する Ser 645 の Cdk5 によりリン酸化されると阻害され、その脱リン酸化により促進されることが *in vitro* の解析から明らかとなった。初代培養海馬神経細胞を 45 mM KCl で脱分極刺激すると、内在性 PIP5K γ 661 は脱リン酸化されて AP-2 との相互作用が亢進した。さらに、AP-2 と相互作用する PIP5K γ 661 の C 末端領域を海馬神経細胞に強制発現させると、脱分極刺激によるシナプト小胞のエンドサイトーシスが顕著に阻害された。これらの結果から、海馬神経細胞において、脱分極刺激に伴い PIP5K γ 661 は脱リン酸化されて AP-2 と相互作用し、シナプト小胞のエンドサイトーシスを誘起することが示唆される。

本研究テーマに関するおもな発表論文を以下に掲載した。