

機関番号：12102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21700339

研究課題名（和文） 脂質性シグナルによる神経回路網形成の分子機構

研究課題名（英文） Functional roles of Lipid signaling in the neuronal network formation

研究代表者

長谷川 潤 (HASEGAWA HIROSHI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・助教

研究者番号：10332230

研究成果の概要（和文）：1）ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸（PIP<sub>2</sub>）の合成酵素であるホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼ（PIP5K）の2つのアイソザイム PIP5K<sub>A</sub> および PIP5K<sub>B</sub> のノックアウトマウスを作製したところ、これらの酵素が精子形成に必須であることが分かった。また、2）エタノールアミンキナーゼ-1により合成されるホスファチジルエタノールアミンが、神経突起の伸長において重要な役割を担っていることが分かった。

研究成果の概要（英文）：1) We developed the knockout mice of two isozymes of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinases (PIP5K<sub>A</sub> and PIP5K<sub>B</sub>), which are phospholipid metabolizing enzymes to synthesize phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>). From the analyses of these knockout mice, we found that PIP5K<sub>A</sub> and PIP5K<sub>B</sub> are crucial for spermatogenesis. 2) We also found that phosphatidylethanolamine and its synthetic enzyme, ethanolamine kinase-1, play an important role in neurite elongation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：神経生物学

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：細胞内脂質、神経細胞、ホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼ、ホスファチジルエタノールアミン

## 1. 研究開始当初の背景

正確な神経回路網形成は動物の生存や外界への適応において非常に重要な役割を担っている。しかし、そのような正確な神経回路網形成の分子メカニズムには不明な点が多い。

近年の研究により、脂質性シグナルが神経回路網形成に重要な役割を担っていることが示唆されてきた。(1) ホスファチジルイ

ノシトール 4-リン酸 5-キナーゼ (PIP<sub>2</sub>) はホスホリパーゼ類や PI3K の基質であるほか、それ自身がアクチン細胞骨格や細胞膜蛋白質の調節を担うシグナル伝達分子としても機能する。このような多様な生理機能を持つ PIP<sub>2</sub> の神経回路網形成における役割はほとんど分かっていない。(2) また、現在注目を集めている別のシグナル伝達脂質としてホスファチジルエタノールアミン (PE) があ

る。PE は細胞膜の主要構成成分の一つであるが、細胞膜内層と外層のトランスポートを介して Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質の調節などを行うことが知られている。本分子に関しても、神経回路網形成における役割は全く分かっていない。

## 2. 研究の目的

(1) PIP<sub>2</sub>の主要合成酵素であるホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼ (PIP5K) の2つのアイソザイム PIP5K<sub>A</sub>および PIP5K<sub>B</sub>のノックアウトマウスを作製し、これらの酵素の生理機能、特に神経系における機能を明らかにする。

(2) 発生期神経細胞における PE および PE の主要合成酵素の一つであるエタノールアミンキナーゼ 1 (Eki-1) の細胞内局在を明らかにするとともに、これらの分子の神経突起伸長における役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) PIP5K<sub>A</sub>および PIP5K<sub>B</sub>のノックアウトマウスを作製し、解剖学的および行動学的解析を行う。

(2) 初代培養海馬神経細胞に Eki-1 の過剰発現を行い、神経細胞の形態を観察する。また、PE に特異的に結合する Ro09-0198 を用いて PE の細胞膜内局在を検討する。

## 4. 研究成果

(1) 我々は、PIP5K<sub>A</sub>と PIP5K<sub>B</sub>のノックアウトマウス (KO) および両者のダブル KO (D-KO) を作製した。これらのマウスは成体まで成長可能であり、外観に目立った異常は観察されなかった。しかし、交配実験の結果、PIP5K<sub>A</sub>および PIP5K<sub>B</sub>-KO の雄は生殖能力が減弱した低妊孕能であり、D-KO の雄は完全に不妊であることがわかった。野生型精巢の抗体染色により、PIP5K<sub>A</sub>、PIP5K<sub>B</sub>は共に Sertoli 細胞と伸長精子細胞に発現していることが分かった。D-KO 精巢切片所見から、D-KO においては伸長精子細胞数が少なく、その結果、精子数が減少していることが明らかとなった。一方、精祖細胞や精母細胞の数には異常は見られなかった。また、D-KO では Sertoli 細胞と伸長精子細胞の細胞間接着部位での F-actin の集積が低く、また精細管腔内に異常な F-actin の集積が見られたことから、PIP5K の欠損によりアクチン細胞骨格系が調節不全となり、伸長精子細胞が脱落していると考えられた。D-KO マウスの精子は中片部と尾部の形態に異常を呈するとともに、運動能力も減弱しており、体外受精が不可能であった。PIP5K<sub>A</sub>-KO の精子中片部

も同様の形態異常を示すが、その表現系は D-KO に比べれば軽微であった。一方、PIP5K<sub>B</sub>-KO の精子には顕著な異常は見られなかった。これらの結果から、PIP5K<sub>A</sub> および PIP5K<sub>B</sub>が精子形成に必須であることが明らかとなった。

一方、これらの KO マウスが痛覚および味覚に異常を持つかを行動学的に解析した。しかし、ホットプレートテスト、テールイマージョンテスト、酢酸ライジングテスト、味覚テスト (甘味および塩味) のいずれにおいても、コントロールの野生型マウスとの差は観察されなかった。

(2) マウス初代培養海馬神経細胞に Eki-1 を過剰発現させ、神経突起の長さを計測したところ、過剰発現細胞ではコントロール細胞に比べて、神経突起が有意に長いことが分かった。また、多くの場合、細胞膜脂質二重層の内層に存在する PE が、神経突起先端部では外層に露出していることが分かった。このような PE の細胞膜内局在を制御する分子を探索し、IV 型 ATPase のうち、ATP8、ATP9、ATP10 ファミリーの分子が発生期の神経細胞に多く発現していることを見出した。また、IV 型 ATPase の補因子である cdc50 ファミリー分子の発現も同時に確認した。今後、これらの分子の生理機能について研究を展開して行く予定である。

## 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 9 件)

1, da Silva S, Hasegawa H, Scott A, Zhou X, Wagner AK, Han BX, Wang F  
Proper formation of whisker barrettes requires periphery-derived Smad4-dependent TGFβ signaling  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 査読有, 2011, 108, 3395-3400

2, Akiyama M, Zhou M, Sugimoto R, Hongu T, Furuya M, Funakoshi Y, Kato M, Hasegawa H, Kanaho Y  
Tissue- and development-dependent expression of the small GTPase Arf6 in mice  
Dev. Dyn., 査読有, 2010, 239, 3416-3435

3, Funakoshi Y, Hasegawa H, Kanaho Y  
Regulation of PIP5K activity by Arf6 and its physiological significance  
J. Cell. Physiol., 査読有, 2010, 226, 888-895

4, Zhou X, Wang L, Hasegawa H, Amin P, Han BX, Kaneko S, He Y, Wang F  
Deletion of PIK3C3/Vps34 in sensory neurons causes rapid neurodegeneration by disrupting the endosomal but not the autophagic pathway  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 査読有, 2010, 107, 9424-9429

5, Hada K, Asahina M, Hasegawa H, Kanaho Y, Slack FJ, Niwa R  
The nuclear receptor gene nhr-25 plays multiple roles in the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene network to control the larva-to-adult transition  
Dev. Biol., 査読有, 2010, 344, 1100-1109

6, Suzuki A, Arikawa C, Kuwahara Y, Itoh K, Watanabe M, Watanabe H, Suzuki T, Funakoshi Y, Hasegawa H, Kanaho Y  
The scaffold protein JIP3 functions as a downstream effector of the small GTPase ARF6 to regulate neurite morphology of cortical neurons  
FEBS Lett., 査読有, 2010, 584, 2801-2806

7, Kanaho Y, Funakoshi Y, Hasegawa H  
Phospholipase D signalling and its involvement in neurite outgrowth.  
Biochem. Biophys. Acta, 査読有, 2009, 1791, 898-904

8, Rawlins EL, Okubo T, Xue Y, Brass DM, Auten RL, Hasegawa H, Wang F, Hogan BL  
The role of Scgb1a1+ Clara cells in the long-term maintenance and repair of lung airway, but not alveolar, epithelium  
Cell Stem Cell, 査読有, 2009, 4, 525-534

9, Nishikimi A, Fukuhara H, Su W, Hongu T, Takasuga S, Mihara H, Cao Q, Sanematsu F, Kanai M, Hasegawa H, Tanaka Y, Shibasaki M, Kanaho Y, Sasaki T, Frohman MA, Fukui Y  
Sequential Regulation of DOCK2 dynamics by two phospholipid during neutrophil  
Science, 査読有, 2009, 324, 384-387

[学会発表] (計24件)

1, 長谷川潤, 杉本里香, 山下美鈴, 野口純子, 岡田理沙, 鶴木隆光, 船越祐司, 馬場忠, 金保安則  
精子形成においてホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼは必須である  
日本薬学会 第131年会 2011

東日本大震災のため要旨発表のみ

2, 鶴木隆光, 松田信爾, 掛川渉, 船越祐司, 長谷川潤, 柚崎通介, 金保安則  
リン脂質キナーゼ PIP5KC661 と AP-2 複合体の結合はポストシナプス可塑性を制御する

BMB2010  
2010年12月7日  
神戸ポートアイランド

3, 本宮綱記, 福原茂朋, 望月直樹, 鈴木輝彦, 船越祐司, 長谷川潤, 金保安則  
低分子量 G 蛋白質 Arf6 による腫瘍血管形成制御

BMB2010  
2010年12月10日  
神戸ポートアイランド

4, 木下雅美, 本宮綱記, 周森, 秋山雅博, 船越祐司, 金保安則, 長谷川潤  
肺胞の機能維持における低分子量 Arf6 の役割

BMB2010  
2010年12月10日  
神戸ポートアイランド

5, 長谷川潤, 杉本里香, 山下美鈴, 野口純子, 岡田理沙, 鶴木隆光, 船越祐司, 馬場忠, 金保安則

ホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼ欠損マウスにおける精子形成不全  
第52回 日本脂質生化学会  
2010年6月15日  
森秋旅館 (群馬県渋川市)

6, 船越祐司, 樋口珠美, 佐藤隆信, 長谷川潤, 金保安則  
ARF6 による PIP5K アイソザイム活性制御機構の解析

第62回 日本細胞生物学会大会  
2010年5月19日  
大阪国際会議場

7, 佐藤隆信, 本宮綱記, 坂本めぐみ, 船越祐司, 長谷川潤, 金保安則

Phospholipase D はマウス好中球における活性酸素産生, 酵素放出には必須でない  
第62回 日本細胞生物学会大会

2010年5月21日  
大阪国際会議場

8, Funakoshi Y, Higuchi T, Sato T, Hasegawa H, Kanaho Y

Novel activation mechanism of PIP5Kc by the small GTPase ARF6  
The 5<sup>th</sup> Japan-Korea Conference in

Cellular Signaling for Young Scientists

平成 21 年 11 月 24 日  
ハウステンボス (長崎)

9, Okada R, Hasegawa H, Furuya Y, Funakoshi Y, Kanaho Y

The role of PIP5K in wound healing  
The 5<sup>th</sup> Japan-Korea Conference in Cellular Signaling for Young Scientists  
平成 21 年 11 月 25 日  
ハウステンボス (長崎)

10, Higuchi T, Sato T, Hasegawa H, Funakoshi Y, Kanaho Y

Isozyme specific activation of PIP5K by ARF6  
The 5<sup>th</sup> Japan-Korea Conference in Cellular Signaling for Young Scientists  
平成 21 年 11 月 25 日  
ハウステンボス (長崎)

11, Suzuki A, Arikawa C, Kuwahara Y, Funakoshi Y, Kanaho Y, Hasegawa H

Regulation of morphology by the small GTPase Arf6 is mediated by the interaction with a novel down stream effector, JIP3  
International Symposium on Cellular Signaling  
平成 21 年 11 月 18-19 日  
筑波大学

12, Hongu T, Funakoshi Y, Hasegawa H, Kanaho Y

Involvement of small GTPase Arf6 in angiogenesis  
International Symposium on Cellular Signaling  
平成 21 年 11 月 18-19 日  
筑波大学

13, 金保安則、樋口珠美、渡辺宏子、小林裕一、佐藤隆信、長谷川潤、船越祐司

ARF6 は PIP5K をアイソザイム依存的に活性化する  
第 82 回 日本生化学会大会  
平成 21 年 10 月 23 日  
神戸ポートアイランド

14, 長谷川潤、杉本里香、山下美鈴、野口純子、岡田理沙、鶴木隆光、船越祐司、馬場忠、金保安則

ホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼは精子形成に不可欠である  
第 82 回 日本生化学会大会  
平成 21 年 10 月 24 日  
神戸ポートアイランド

15, 周森、船越祐司、長谷川潤、金保安則  
低分子量 G 蛋白質 ARF6 による肝細胞遊走制御機構の解析

第 82 回 日本生化学会大会  
平成 21 年 10 月 24 日  
神戸ポートアイランド

16, 鈴木篤史、有川千尋、桑原裕二、船越祐司、長谷川潤、金保安則

低分子量 G 蛋白質 Arf6 による神経突起分枝制御機構  
第 82 回 日本生化学会大会  
平成 21 年 10 月 24 日  
神戸ポートアイランド

17, 本宮綱記、船越祐司、長谷川潤、金保安則

血管形成における低分子量 GTP 結合蛋白質 ARF6 の関与  
第 82 回 日本生化学会大会  
平成 21 年 10 月 24 日  
神戸ポートアイランド

18, 鈴木篤史、桑原裕二、船越祐司、長谷川潤、金保安則

シグナル伝達足場タンパク質 JIP3 は Arf6 の下流因子として神経細胞の形態形成を制御する  
平成 21 年度 特定領域「G 蛋白質シグナル」研究 班会議  
平成 21 年 9 月 10 日  
南房総富浦ロイヤルホテル

19, 長谷川潤、鈴木篤史、有川千尋、桑原裕二、船越祐司、金保安則

低分子量 G 蛋白質 Arf6 による神経突起の形態制御機構  
平成 21 年度 特定領域「G 蛋白質シグナル」研究 班会議  
平成 21 年 9 月 11 日  
南房総富浦ロイヤルホテル

20, 長谷川潤、杉本里香、山下美鈴、野口純子、岡田理沙、鶴木隆光、船越祐司、馬場忠、金保安則

ホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼ $\alpha$ 、 $\beta$ は精子形成に不可欠である  
第 6 回 日本病理学会カンファレンス  
平成 21 年 7 月 31 日-8 月 1 日  
つくば国際会議場

21, 本宮綱記、船越祐司、長谷川潤、金保安則

血管形成における低分子量 GTP 結合蛋白質 ARF6 の機能  
第 6 回 日本病理学会カンファレンス  
平成 21 年 7 月 31 日-8 月 1 日

つくば国際会議場

22, 長谷川潤、杉本里香、山下美鈴、野口純子、岡田理沙、鶴木隆光、船越祐司、馬場忠、金保安則

ホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼの精子形成への関与

第 61 回日本細胞生物学会大会

平成 21 年 6 月 5-6 日

名古屋国際会議場

23, 鶴木隆光、松田信爾、船越祐司、長谷川潤、柚崎通介、金保安則

リン脂質キナーゼ PIP5K $\gamma$ 661 と AP-2 複合体の結合はポストシナプス可塑性を制御する

第 61 回日本細胞生物学会大会

平成 21 年 6 月 6 日

名古屋国際会議場

24, 本宮綱記、長谷川潤、金保安則

血管形成における低分子量 GTP 結合蛋白質 ARF6 の関与

第 61 回日本細胞生物学会大会

平成 21 年 6 月 6 日

名古屋国際会議場

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

1,

名称: Arf6 遺伝子機能喪失動物及びその利用方法

発明者: 金保 安則、本宮綱記、長谷川潤、船越祐司

権利者: 筑波大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-050431

出願年月日: 平成 22 年 3 月 8 日

国内外の別: 国内

2,

名称: GTP 結合型 ARF6 タンパク質の測定方法及びその用途

発明者: 金保 安則、本宮綱記、周森、長谷川潤

権利者: 筑波大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-063109

出願年月日: 平成 22 年 3 月 18 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 潤 (HASEGAWA HIROSHI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・

助教

研究者番号: 10332230