

論文内容の要旨

論文題目 Application of phosphoinositide-binding domains for the detection and quantification of specific phosphoinositides.

(ホスホイノシチド結合ドメインを用いたホスホイノシチドの検出と応用)

氏名 古谷 昌広

哺乳類には 7 種類のホスホイノシチドが存在し、様々な細胞の機能において重要な役割を持つことが知られている。例えば、**dynamin** は PH ドメインを介して **PtdIns(4,5)P₂** と結合することで細胞形質膜から出芽中のクラスリン被覆膜の根元にリング状に絡み付く。この作用によりクラスリン被覆膜が形質膜からねじりとられる。PLC $\delta 1$ も同様に PH ドメインを介して **PtdIns(4,5)P₂** と結合することで、**PtdIns(4,5)P₂** を効率よく分解することが分かっている。また、インスリンなどの増殖刺激によって産生される **PtdIns(3,4,5)P₃** は Akt を活性化し増殖、抗アポトーシスなどの指令を出す他、Rac の GEF である Tiam1 や P-REX を活性化することで細胞運動を制御しているとされる。細胞内のホスホイノシチド量は代謝酵素によって厳しく管理されているため、代謝酵素の変異により各種ホスホイノシチド量のバランスが崩れると重大な疾患を引き起こすことが知ら

れている。例えば、PtdIns(3,4,5)P₃の3位のリン酸基を脱リン酸化する酵素である PTEN の変異は乳癌、悪性脳腫瘍などの癌を引き起こし PtdIns(3,4,5)P₃の5位のリン酸基を脱リン酸化する酵素である SHIP1 や SHIP2 の変異はそれぞれ急性骨髄白血病や糖尿病を引き起こすことが報告されている。しかし、これらの知見は分子生物学の発展とともに代謝酵素の研究から得られたもので、実際のホスホイノシチド量はほとんど研究されていない。なぜなら、細胞内に含まれているこれらのホスホイノシチドは余りにも微量なため、現在のところ個々のホスホイノシチドを別々に、高感度に検出する方法は確立されていないからである。

ホスホイノシチドは低分子であるため良好な抗体を得るのが困難なため細胞内のホスホイノシチドの局在は不明であった。しかし、PH ドメインをはじめ、ホスホイノシチドに特異的に結合するドメインが発見されることでこの問題は解決される。現在では 10 種類ほどのドメインが特定のホスホイノシチドに特異的に結合することが明らかになっている。EEA1 や Hrs の FYVE finger や SNX3 の PX ドメインは PtdIns(3)P、FAPP1 や CERT の PH ドメインは PtdIns(4)P、myotublalin の GRAM ドメインは PtdIns(3,5)P₂、PLC δ1 の PH ドメインは PtdIns(4,5)P₂、TAPP1 や TAPP2 の PH ドメインは PtdIns(3,4)P₂、GRP1 や ARNO の PH ドメインは PtdIns(3,4,5)P₃ を特異的に認識する。

本研究ではホスホイノシチドの生理的機能の解析を詳細におこなうため、個々のホスホイノシチドを特異的かつ高感度に認識するホスホイノシチド結合ドメインをプローブとして用いてそれぞれのホスホイノシチドを検出し定量する方法の確立を目的として以下の研究を行った。

Dot-blot 法と ELISA 法の 2 つの方法を用いて検討したところ、PtdIns(3)P に対するプローブとして Hrs の FYVE finger、PtdIns(4)P—FAPP1 の PH ドメイン、PtdIns(4,5)P₂—PLC δ1 の PH ドメイン、PtdIns(3,4)P₂—TAPP1 の PH ドメイン、PtdIns(3,4,5)P₃—GRP1 の PH ドメインを選択した。また、プローブの感度を高めるため Hrs や、FAPP1、TAPP1 はドメインを直列に 2 つ繋いだコンストラクトを作成した。

まず、ELISA 法に基づいた酵素活性の測定方法を確立した。ELISA プレートを C16 (塩化パルミトイル) で前コートし、ホスホイノシチドを含むリポソームを反応させることで均一にホスホイノシチドを ELISA プレートへ固相化することができた。この固相化法を用いて p110α と PTEN の活性測定を行った。また PtdIns 3-kinase の阻害剤である wortmannin や LY294002 を用いて p110α の活性阻害実験を行った。その結果、従来の放射性同位体を用いる方法や無機リン発色法と比べて本方法はより簡便で高感度であり、阻害剤の濃度依存的な p110α 活性のシグモイド曲線が得られた。このことから、本実験法は阻害剤の high-throughput なスクリーニングに適しており、阻害効果をも適切に評価できると考えられる。さらに、B16 細胞とより転移性の高い株である B16F10 細胞の細胞抽出液中のホスファチジルイノシトールキナーゼ、または、フォスファターゼ活性の測定を行ったところ、B16F10 において優位に PtdIns 3-kinase と PtdIns 4-kinase 活性が向上していることが分かった。また、TLC ブロット法によって B16F10 細胞の方が B16 細胞よりも PtdIns(3,4,5)P₃ を多く含んでいることも明らかになった。これらのことから B16F10 細胞では PtdIns 3-kinase が活性化さ

れていて PtdIns(3,4,5)P₃ の産生を促進し、その結果、転移能を獲得したと推測される。

次に、細胞内のホスホイノシチド量を定量するため、TLC ブロット(薄層クロマトグラフィ)法を確立した。細胞から抽出した脂質を TLC 展開し PVDF 膜に脂質を転写した後、ホスホイノシチド結合ドメインを用いて個々のホスホイノシチドを検出する方法である。インスリン刺激により PtdIns(3,4,5)P₃ は 30 秒でピークに達しその後、5 分以内に素早く代謝される一方、PtdIns(3,4)P₂ は 30 秒から 1 分にかけてピークに達し、徐々に分解される結果となった。また、PtdIns(4,5)P₂ は刺激 1 分間、減少するがその後増加することが分かった。wortmannin または LY294002 処理後にインスリン刺激をした細胞から脂質を抽出しそれぞれのホスホイノシチドを調べると PtdIns(4,5)P₂ 量に変化はなかったが、PtdIns(3,4,5)P₃、PtdIns(3,4)P₂ の産生は抑制されていた。これらの結果から、インスリン刺激により PtdIns 3-kinase が活性化され PtdIns(3,4,5)P₃、PtdIns(3,4)P₂ を産生することと wortmannin または LY294002 が *in vivo* で PtdIns 3-kinase 活性を抑制することを示している。さらに、PTEN の機能を欠損している glioblastoma 3 種類に含まれる PtdIns(3,4,5)P₃ 量には違いがあり p110 α の発現量にも依存していなかった。この結果は PtdIns(3,4,5)P₃ 量が単に代謝酵素の発現に反映されるのではなく、複雑な調節を受けていることを示しており、実際に PtdIns(3,4,5)P₃ を測定することの重要性を示している。

これらの方法はホスホイノシチドを簡便かつ、高感度に定量できるためホスホイノシチド代謝異常によって引き起こされる癌や糖尿病といった疾患の診断や創薬研究に応用できると考えられる。