

Functional role of phosphatidylinositol-3-phosphatase MTMR in endothelial cells

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/39646

【要約】

修士課程優秀論文

イノシトールリン脂質脱リン酸化酵素 (MTMR) の
血管内皮における機能的役割

Functional role of phosphatidylinositol-3-phosphatase MTMR in endothelial cells

金沢大学大学院医薬保健学総合研究科 血管分子生理学研究分野
(第一生理学)

九 田 裕 一

はじめに

脂質リン酸化酵素であるホスファチジルチジルイノシトール (PI) 3-キナーゼ (PI3K) は哺乳類において、3つのクラス (I, II 及び III), 8つのアイソフォームが存在し、その酵素活性産物であるPI-3リン酸 (PI(3)P), PI(3,4)P₂及びPI(3,4,5)P₃を介して多岐に渡る生理活性を發揮する¹⁾。これまでのPI3K研究は、クラスI型酵素、クラスIII型酵素の機能の研究が中心であり、クラスII型PI3Kの生理機能はほとんど不明であった (図1)。当研究室では、クラスII型のα型酵素PI3K-C2αの動物個体における機能を解明する目的でPI3K-C2α遺伝子欠損マウス (全身型KOマウス) を作製・解析し、PI3K-C2αが血管形成において必須であることを発見した²⁾。また、内皮特異的PI3K-C2α・コンディショナルKOマウスも全身型KOマウスと同様の表現型を呈し、血管形成不全により胎生致死であったことから、血管内皮のPI3K-C2αが血管形成に必要であることが判明した。細胞レベルでは、PI3K-C2αは血管内皮においてエンドソームを中心とした小胞の輸送を調節することによって、アドヘレンス接合への細胞間接着分子VE-カドヘリンの経小胞輸送、細胞表面受容体VEGF受容体などのチロシンキナーゼ型受容体、スフィンゴシン-1-リン酸 (sphingosine-1-phosphate, S1P) 受容体などのGタンパク質共役型受容体 (の内在化、それに引き続く低分子量Gタンパク質Rho及びRacの活性化を含む小胞膜上での受容体シグナリングに必要であった^{2,3)}。インビボにおけるPI3K-C2αの主要な産物はPI(3)P及びPI(3,4)P₂と考えられている^{4,5)} (図1)。産生されたPI(3)P, PI(3,4)P₂は複数の脂質ホスファターゼの働きによって脱リン酸化を受けてPIとなることから、細胞内の

PI(3)P, PI(3,4)P₂のレベルはPI3K-C2α活性とともに脂質ホスファターゼ活性によっても調節をうける。

PI(3)Pのイノシトール環3位に特異的な脱リン酸化活性を持つ脂質ホスファターゼにはphosphatase and tensin homolog (PTEN), transmembrane phosphoinositide 3-phosphatase and tensin (PTIP), inositol poly-phosphate 4-phosphatase (INPP4), myotubularin (MTM) ファミリー等が知られている。その内、MTMファミリーにはMTM1及びmyotubularin-related protein (MTMR) 1~14が同定されており、これらはPI(3)P, PI(3,5)P₂のイノシトール環3位のリン酸基を特異的に脱リン酸化する脂質ホスファターゼ・ファミリーである。現在、MTMファミリーの一部のメンバーは遺伝性運動感覚性ニューロパチー Charcot-Marie-Tooth病 (CMT病) の原因遺伝子であることが明らかにされているが、血管内皮におけるMTMファミリーの機能は全く不明である。

そこで、血管形成促進因子S1Pに対する内皮細胞遊走能、VE-カドヘリンのアドヘレンス接合部位への集積、及びチューブ様構造形成におよぼすsiRNAによるMTMRノックダウンの効果を検討することにより、内皮細胞血管新生機能におけるMTMRの役割を検討した。

結 果

血管内皮細胞におけるsiRNA法を用いたPI3K-C2α及びMTMR発現のノックダウンによる細胞内PI(3)Pの変化

ヒト臍帯静脈内皮細胞HUVECにおいてPI3K-C2α及びMTMRのノックダウンの細胞内PI(3)Pレベルとその局在に及ぼす効果を検討するために、特異的にPI(3)Pに結合するGFP-2xFYVEを発現させ、GFP蛍光のライブイメージング観察を行った。コントロール細胞siRNA (scrambled control siRNA (si-SC) 処理) では、細胞辺縁部に、様々なサイズのPI(3)P豊富なエンドソームと考えられる小胞が多数観察された。また、核周囲にGFP-2xFYVEタンパク質凝縮物と考えられる構造が観察された。PI3K-C2α特異的siRNA (si-C2α) によりPI3K-C2αをノックダウン細胞では細胞辺縁部のGFP陽性小胞が減少し、核周囲にGFP-2xFYVEタンパク質凝縮物が観察された。一方、si-MTMRノックダウン細胞ではGFP蛍光陽性小胞が増加し、小胞のサイズも増大していた。si-C2αとsi-MTMRを二重導入した細胞では、si-C2α単独導入細胞と比較して、細胞辺縁部の大きな小胞が増加した。細胞遊走に及ぼすMTMRノックダウンの影響

ボイデンチャンバーの下槽に化学遊走因子S1Pが存在すると、S1Pの濃度依存的にコントロールHUVECは下槽に遊走した。コントロールHUVECの最大遊走反応は100 nM S1P存在下で観察され、300 nM以上では遊走はむしろ低下し、化学遊走に特徴的なベル型の容量反応曲線を示した。PI3K-C2αノックダウン細胞も同様にベル型の容

PI3キナーゼ (PI3K) による3'リン酸化-PI(ホスホイ
ノシチド)の産生

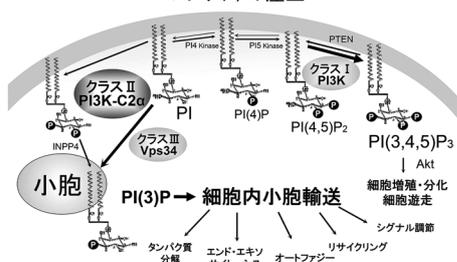


図1. クラスI型PI3Kは細胞膜において、PI(3,4)P₂を基質にPI(3,4,5)P₃を産生し、細胞内セリン/スレオニン・リン酸化酵素Aktを介して、様々な細胞内シグナリングを調節する。クラスIII型PI3KであるVps34は、オートファゴソーム上でPI(3)Pを産生し、オートファジーを制御する。一方、クラスII型PI3Kはクラスリン小胞、エンドソーム、トランス-ゴルジネットワークにおいてPI(3)P産生に寄与し、細胞内小胞輸送を調節する。

量反応曲線を示したが、最大反応は当研究室のこれまでの報告²³⁾と一致してsi-SC群に比べかなり低下していた。興味深いことに、MTMRノックダウン細胞は逆に最大反応の著しい亢進を示した。これに対してPI3K-C2 α 及びMTMR二重ノックダウン細胞では、遊走が抑制された。

VE-カドヘリン局在化に及ぼすMTMRノックダウンの影響
コントロールHUVECでは、VE-カドヘリンのアドヘレンス接合への集積が観察された。PI3K-C2 α ノックダウン細胞及びMTMRノックダウン細胞において、VE-カドヘリンの集積が減弱し、アドヘレンス接合が障害された結果、細胞間に多くの間隙が形成された。興味深いことに、MTMRノックダウン細胞では細胞内部に局在するVE-カドヘリンが増加していた。PI3K-C2 α 及びMTMR二重ノックダウン細胞では、各単独ノックダウン細胞で観察されたVE-カドヘリンの細胞間接着部位への集積の異常が回復する傾向にあった。

チューブ様構造形成に及ぼすMTMRノックダウンの影響
コントロールHUVECをマトリゲル上に播種しEBM2培地中で培養すると、活発にチューブ様構造を形成した。PI3K-C2 α ノックダウン細胞のチューブ様構造形成はコントロール群に比べて有意に抑制された。一方、MTMRノックダウン細胞では、コントロール細胞と比べチューブ様構造形成が軽度に抑制される傾向があった。MTMRとPI3K-C2 α の二重ノックダウンHUVECではチューブ様構造形成はPI3K-C2 α 単独ノックダウン細胞に比較して顕著に抑制された。

考 察

エンドソームをはじめとする細胞内小器官膜のPI(3)Pは、PI(3)P結合ドメインであるFYVE領域やPX領域を有するEEA1等のタンパク質をエンドソーム膜にリクルートすることにより、低分子Gタンパク質Rabファミリーとともにメンブレントラフィッキングを調節する。PI(3)Pは、メンブレントラフィッキングの制御を介して細胞の恒常性維持に重要な役割を果たすと言える。本研究は、血管内皮においてPI(3)Pの分解を担う脂質ホスファターゼとしてMTMRが重要であることを示す。ヒト由来血管内皮の初代培養細胞モデルであるHUVECにおいて、MTMRのみノックダウンするとPI(3)Pを豊富に含む小胞数が顕著に増加し、S1Pによる細胞遊走亢進などPI3K-C2 α ノックダウンとは全く逆のあるいは大きく異なる効果が観察された。また、VE-カドヘリンの細胞間接着部位への集積については、PI3K-C2 α ノックダウンで見られたVE-カドヘリン集積障害がMTMRノックダウンにより改善された。これらの結果は、MTMRノックダウンは細胞内PI(3)Pレベルを増加させることによってメンブレントラフィック機能を変化させ、その結果、遊走、増殖応答の亢進、またVE-カドヘリン集積についてはPI3K-C2 α ノックダウンによって引き起こされる異常の是正をもたらしたと考えられる。

一方、メンブレントラフィッキングが正常に進行するためには、PI(3)Pの産生・分解の両方が特定の細胞内局所で適切なタイミングで起こることが重要であることも考えられる。(図2)。

結 語

PI3K-C2 α 酵素によって産生されるPI(3)Pは血管内皮においてエンドソーム輸送の調節を介して血管新生と血管障壁機能をコントロールしている。しかし、内皮細胞小胞膜のPI(3)Pを分解する脂質ホスファターゼの実態は不明であった。本研究では、PI(3)P特異的ホスファターゼMTMRが内皮細胞エンドソームに発現していることを見出した。RNA干渉法によるMTMRノックダウンは、細胞内小胞の増加と巨大化を引き起こした。MTMRノックダウンは、PI3K-C2 α ノックダウンの効果とは異なり、

PI3K-C2 α -MTMR系によるPI(3)Pレベル調節は内皮細胞の血管新生機能に必須である

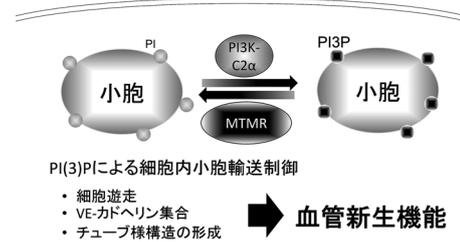


図2. 細胞内小胞上でPI3K-C2 α による産生されるPI(3)Pは、脱リン酸化酵素MTMRにより調節を受ける。このPI3K-C2 α -MTMR系によるPI(3)Pレベル調節は、メンブレントラフィッキング制御に関与することにより、内皮細胞の遊走、細胞間接着およびチューブ様構造等の形態形成に重要な役割を果たす。

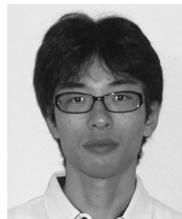
血管新生因子スフィンゴシン-1-リン酸による細胞遊走の著しい亢進を引き起こした。一方、VEカドヘリンの細胞間接着部位への集積やマトリゲル上でのチューブ様構造形成に対しては、MTMRノックダウンはPI3K-C2 α ノックダウンと同様に抑制作用を及ぼした。これらの結果は、MTMRはエンドソームのPI(3)Pレベルを調節する脱リン酸化酵素であり、PI3K-C2 α とともに小胞運動の調節に関与していること、そしてこの機能を介して内皮細胞の遊走、細胞間接着および形態形成に重要な役割を果たすことを強く示唆した。

謝 辞

本研究を行うにあたり、御懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました医学部血管分子生理学講座 多久和陽教授に心より厚く御礼申し上げます。また、数々の御指導、御協力を頂いた吉岡和晃 助教、ビスワス・クンタル 博士研究員、大学院生 安芸翔さん、医学類学生 毛利公美さんに深く感謝致します。また、ご指導をいただいた岡本安雄 准教授に感謝いたします。最後に、研究生生活を常に支え、励ましてくれた血管分子生理学分野の皆様へ心より感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Bart Vanhaesebroeck, Julie Guillermet-Guibert, Mariona Graupera, Benoit Bilanges et al. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signaling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2010;11, 329-341
- 2) Yoshioka K, Yoshida K, Cui H et al. Endothelial PI3K-C2 α , a class II PI3K, has an essential role in angiogenesis and vascular barrier function. *Nat Med.* 2012; 18:1560-1569.
- 3) Biswas K, Yoshioka K, Takuwa Y et al. Essential role of class II phosphatidylinositol-3-kinase-C2 α in sphingosine 1-phosphate receptor-1-mediated signaling and migration in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 2013; 25:2325-39.
- 4) Marco Falasca, William E. Hughes, Veronica Dominguez, Gianluca Sala, Florentia Fostira, Michelle Q. Fang, Rosanna Cazzoli, Peter R. Shepherd, David E. James, Tania Maffucci et al. The Role of Phosphoinositide 3-Kinase C2 α in Insulin Signaling. *J. Biol. Chem.* 2007 282: 28226-28236.
- 5) York Posor, Marielle Eichhorn-Gruenig, Dmytro Puchkov, Johannes Schoneberg, Alexander Ullrich et al. Spatiotemporal control of endocytosis by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Nature.* 2013; 499: 233-237



Profile

2008年3月 帝京科学大学生命環境学部バイオサイエンス学科 卒業
2014年3月 金沢大学大学院医薬保健総合研究科 修士課程修了
2014年4月 金沢医科大学医学研究科博士課程在籍中
金沢医科大学生理学II 助教