

- (2003) *Biol. Reprod.*, 68, 1793–1800.
- 11) Sato, M. & Sato, K. (2011) *Science*, 334, 1141–1144.
 - 12) Al Rawi, S., Louvet-Vallee, S., Djeddi, A., Sachse, M., Culetto, E., Hajjar, C., Boyd, L., Legouis, R., & Galy, V. (2011) *Science*, 334, 1144–1147.
 - 13) Mizushima, N. & Komatsu, M. (2011) *Cell*, 147, 728–741.
 - 14) Zhou, Q., Li, H., & Xue, D. (2011) *Cell Res.*, 21, 1662–1669.
 - 15) Sato, M. & Sato, K. (2012) *Autophagy*, 8, 424–425.
 - 16) Tsukamoto, S., Kuma, A., Murakami, M., Kishi, C., Yamamoto, A., & Mizushima, N. (2008) *Science*, 321, 117–120.
 - 17) Nishimura, Y., Yoshinari, T., Naruse, K., Yamada, T., Sumi, K., Mitani, H., Higashiyama, T., & Kuroiwa, T. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 1382–1387.
 - 18) DeLuca, S.Z. & O'Farrell, P.H. (2012) *Dev. Cell*, 22, 660–668.
 - 19) Moriyama, Y. & Kawano, S. (2003) *Genetics*, 164, 963–975.
 - 20) Nakamura, S., Aoyama, H., & van Woesik, R. (2003) *Protoplasma*, 221, 205–210.
 - 21) Nishimura, Y., Shikanai, T., Nakamura, S., Kawai-Yamada, M., & Uchimiya, H. (2012) *Plant Cell*, 24, 2401–2414.
 - 22) 設楽浩志, 曹麗琴, 米川博通 (2010) 細胞工学, 29, 461–465.
 - 23) Sharpley, M.S., Marciniak, C., Eckel-Mahan, K., McManus, M., Crimi, M., Waymire, K., Lin, C.S., Masubuchi, S., Friend, N., Koike, M., Chalkia, D., Macgregor, G., Sassone-Corsi, P., & Wallace, D.C. (2012) *Cell*, 151, 333–343.

佐藤 美由紀, 佐藤 健

(群馬大学生体調節研究所細胞構造分野)

Mechanisms for maternal inheritance of mitochondrial DNA
Miyuki Sato and Ken Sato (Laboratory of Molecular Traffic
at the Institute for Molecular and Cellular Regulation,
Gunma University, 3–39–15 Showa-machi, Maebashi,
Gunma 371–8512, Japan)

哺乳動物個体から見るホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼの生理機能

1. はじめに

リン脂質は、細胞の膜構成成分であるだけでなく、細胞内の情報伝達でも重要な働きを担っている。膜リン脂質のうちホスファチジルイノシトールは親水性残基としてイノシトール環を持っており、環を構成する六つの炭素のうち三つの炭素に結合する水酸基が様々なパターンでリン酸化されることによって多様な分子種（ホスホイノシチド）を生じる。これらのホスホイノシチド分子種は、それぞれに特異的な結合タンパク質を介して情報を下流に伝達する。

イノシトール環の4位および5位の水酸基がリン酸化されているホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 (PI[4,5]P₂) は、細胞膜において最も多量に存在するホスホイノシチドであり、細胞内情報伝達と深く関わっている。PI[4,5]P₂ は、三量体 G タンパク質 Gq や増殖因子受容体により活性化されたホスホリパーゼ C (PLC) によって加水分解され、ジアシルグリセロールとイノシトール三リン酸 (IP₃) を生じる。また、ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3K) によりイノシトール環の3位がリン酸化されてホスファチジルイノシトール 3,4,5-三リン酸 (PI[3,4,5]P₃) へと代謝される。このような代謝を介した間接的な細胞機能の調節に加えて、PI[4,5]P₂ はそれ自体が様々なタンパク質と結合することにより、直接それらの機能を調節する。

PI[4,5]P₂ は、(A) PI[4]P のイノシトール環5位がリン酸化される経路、(B) PI[5]P のイノシトール環4位がリン酸化される経路、(C) PI[3,4,5]P₃ のイノシトール環3位が脱リン酸化される経路の計三つの経路により産生されるが、哺乳動物の細胞内ではこのうち(A)の経路の寄与が最も大きいと考えられている。この経路で PI[4]P のリン酸化を担う酵素がホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼ (ホスファチジルイノシトールキナーゼ I 型: PIP5K1) である (図 1A)。ホスファチジルイノシトールキナーゼ III 型 (PIP5K3) は PI[3]P のイノシトール環5位をリン酸化する酵素であり、PI[4]P に対する酵素活性は極めて低い。ホスファチジルイノシトールキナーゼ II 型 (PIP4K2) は、PI[5]P のイノシトール環4位のリン酸化を行うホスファチジルイノシトール 5-リン酸 4-キナーゼである。PIP4K2 のうち α サブタイプがホスファチジルイノシトール 5-キナーゼとして同定されたことから、過去の論文などでは PIP5K2 と標記されることがあるが、現在では PIP4K2 に統一されつつある。

哺乳動物の PIP5K1 には α , β , γ の3種類のサブタイプが存在する。これら PIP5K1 サブタイプの cDNA はヒトおよびマウスからほぼ同時期にクローニングされ、残念ながらマウスの β サブタイプがヒトの α サブタイプのオーソログ、マウスの α サブタイプがヒトの β サブタイプのオーソログとして登録された。この混乱を解消するために、現在では PIP5K1A (ヒトの α サブタイプとそのオーソログ)、PIP5K1B (ヒトの β サブタイプとそのオーソログ)、PIP5K1C (γ サブタイプ) と標記されることが多い (図 1B)。それぞれのサブタイプが持つ生理機能は、培養細胞レベルでは検討されてきたが、個体レベルでの生理機能は

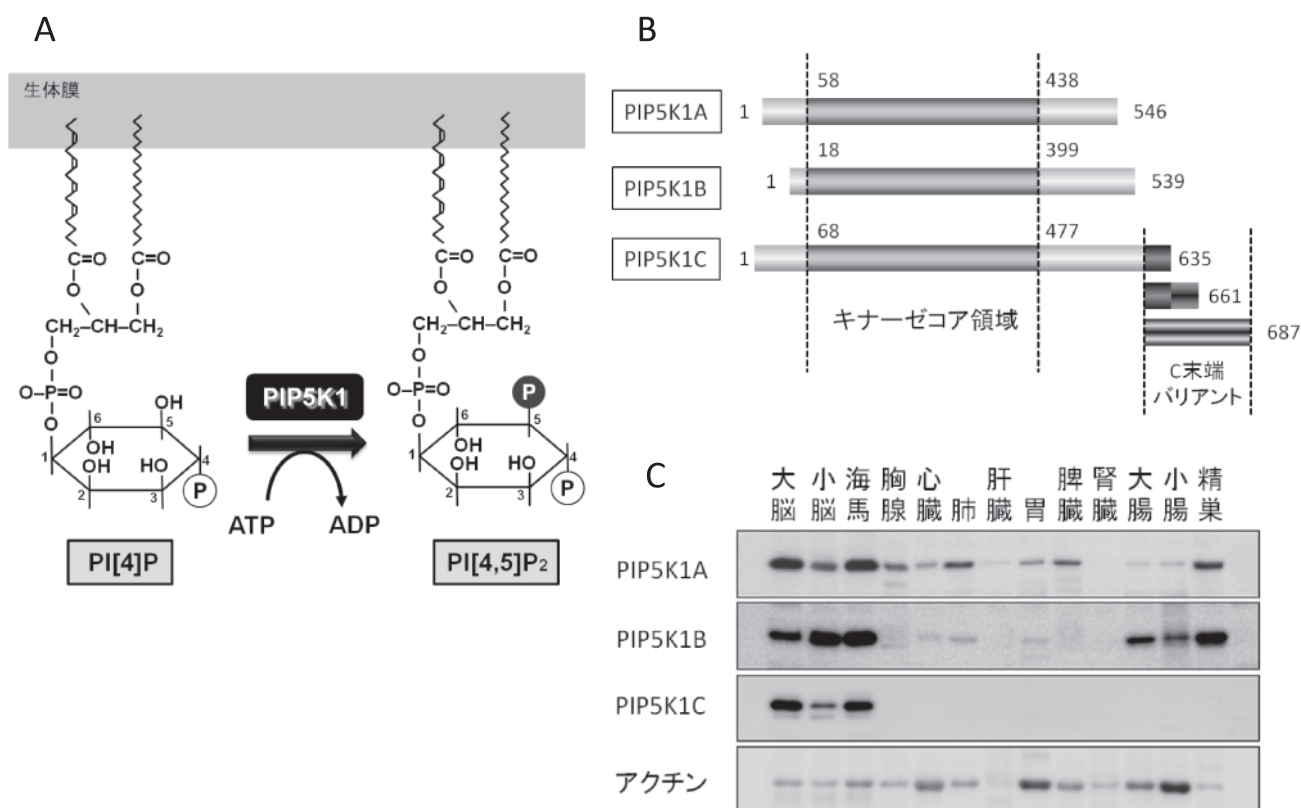


図1 PIP5K1の構造と発現

(A) PIP5K1によるPI[4,5]P₂の産生。

(B) PIP5K1タンパク質の構造。図にはマウスのタンパク質のアミノ酸番号を示す。分子中央部のキナーゼコア領域はサブタイプ間で80%以上の相同性を持つが、N末端領域とC末端領域はサブタイプ間で大きく異なる。PIP5K1Cには、mRNAの選択的スプライシングによる複数のアイソフォームが存在する。

(C) PIP5K1サブタイプのマウス組織における発現を、各サブタイプに特異的な抗体を用いたウェスタンブロットにより解析した。PIP5K1Cのバンドは2本検出され、低分子量側の薄いバンドが脱リン酸化型（活性型）であると考えられる。

長い間不明であった。近年になって、我々のグループを含めていくつかのグループがPIP5K1ノックアウト（KO）マウスを作製し、新たな知見が生まれてきた。本稿ではKOマウスの表現型解析を中心に、最近明らかになったPIP5K1サブタイプの生理機能について概説したい。

2. PIP5K1AとPIP5K1Bの生理機能

マウスのPIP5K1AとPIP5K1Bは全身に広く発現しているが、両者とも神経系と生殖系の臓器での発現が特に高い（図1C）¹⁾。細胞内では、PIP5K1Aが主に細胞質に、PIP5K1Bはエンドソームと思われる核周囲の点状の細胞内小器官に局在し、両者とも細胞外からの刺激に応じて細胞辺縁部のラフリング部位に移行する^{2,3)}。PIP5K1Aが核内に局在すると報告しているグループがあるが³⁾、我々の検討では核内の局在を見ることはできていない。

PIP5K1BのKOマウスは我々のグループが、PIP5K1AのKOマウスは我々のグループとペンシルバニア大学のAbramsらのグループが作製した。いずれのマウスにも外見上、行動上の異常は認められず、成体まで成長した。

A) 免疫反応における機能

PI3KやPLCによるPI[4,5]P₂の代謝は肥満細胞からの免疫反応メディエーターの放出に重要な役割を担っている。したがって、PI[4,5]P₂を産生するPIP5K1も肥満細胞からの免疫反応メディエーター放出、さらにそれらによるアナフィラキシー反応に関与している可能性が考えられた。そこで、PIP5K1B-KOマウスにおけるDNP-IgE刺激依存的なアナフィラキシー反応を検討したところ、野生型と比較してPIP5K1B-KOマウスで亢進しているという結果が得られた⁴⁾。PIP5K1B-KOマウス由来の肥満細胞を観察すると、細胞膜直下に存在するアクチン線維が少なく、

細胞内小胞が細胞膜と融合しやすい状態にあった。また $Fc\epsilon$ 受容体が脂質ラフトに集積しており、受容体による細胞内シグナル伝達の亢進が見られた。これらのことから、 $PIP5K1B$ は細胞骨格系の再構築や $Fc\epsilon$ 受容体のシグナルを負に制御することによりアレルギー反応の抑制に関与していると結論づけられる。

B) インスリン分泌における機能

インスリン分泌に対する $PIP5K1B$ の関与は、まずラット β 細胞由来の INS-1 細胞を用いた培養実験系で、次いで $PIP5K1B$ -KO マウスを用いた個体レベルの実験で示された^{5,6)}。いずれの実験においても、 $PIP5K1B$ の欠損はグルコース依存的なインスリン放出を亢進させた。このメカニズムとしては、上述の肥満細胞の場合と同様に、 $PIP5K1B$ が細胞膜直下のアクチン線維の維持に関わっており、 $PIP5K1B$ が欠損するとインスリンを含む細胞内小胞が細胞膜に融合しやすくなることが考えられる。

C) 血小板凝集における機能

トロンピンは血小板膜上のトロンピン受容体を活性化し、血小板凝集を促す。トロンピンによる血小板凝集には PLC による $PI[4,5]P_2$ の分解が必須であるが、同時に $PI[4,5]P_2$ の産生も亢進することが知られていた。そこで、 $PIP5K1A$ および $PIP5K1B$ の KO マウス由来の血小板をトロンピンで刺激したところ、 $PIP5K1A$ を欠損した血小板は野生型の血小板に比べて凝集率が低かった⁷⁾。 $PIP5K1B$ -KO マウス由来の血小板における IP_3 産生および血小板凝集は野生型と同程度であった。このことは、トロンピンによる血小板凝集には $PIP5K1A$ が主要な役割を担っていることを示している。一方、トロンピン刺激後の IP_3 産生は、 $PIP5K1A$ -KO 血小板で減弱していたものの野生型の半分程度が残っていたのに対して、 $PIP5K1A$ と $PIP5K1B$ の両者を欠損したダブルノックアウト血小板では全く見られなかった。このことから、正常な血小板はトロンピン依存的な IP_3 産生に $PIP5K1A$ から産生された

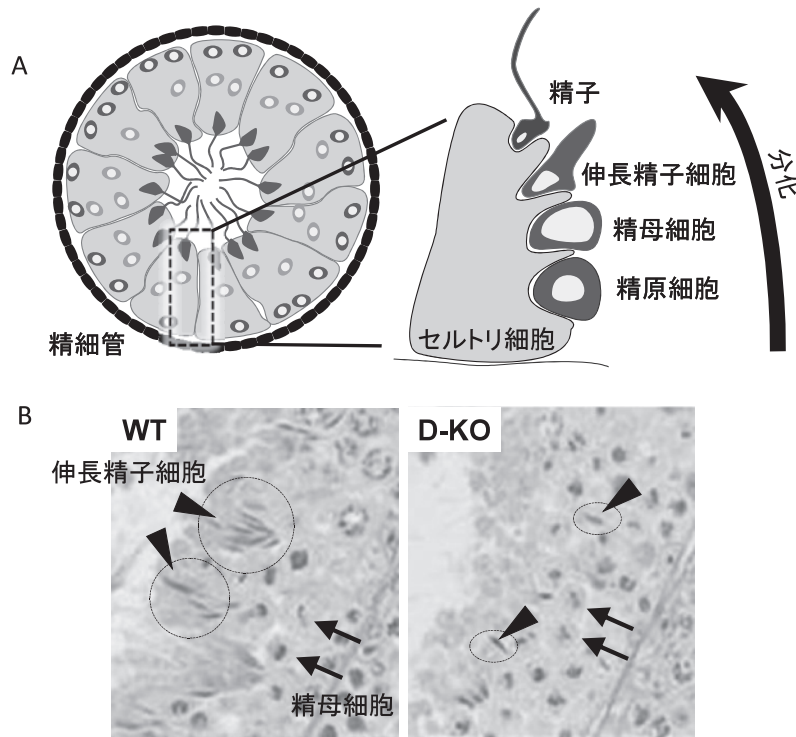


図2 $PIP5K1A$, $PIP5K1B$ ダブル欠損による精子形成の異常

(A) 精子形成の模式図。精子は精細管内の精原細胞の非対称分裂により生じる。精母細胞、精子細胞、精子の順に分化しながら管腔側に向かって移動する。(B) $PIP5K1A/PIP5K1B$ ダブルノックアウト (D-KO) マウスにおける伸長精子細胞の欠如。野生型および D-KO マウスの精巣切片を H&E 染色した像。矢印は精母細胞、矢頭は伸長精子細胞を示す。精母細胞の数は野生型と D-KO の間で変化がないが、伸長精子細胞の数は D-KO で顕著に少ない。

PI[4, 5]P₂を選択的に利用するが、PIP5K1A が欠損した時には PIP5K1B が機能を部分的に代償できることがわかった。また、血小板は PIP5K1C も多量に発現しているが、上記の結果からは、PIP5K1C により産生された PI[4, 5]P₂ はトロンビン依存的な IP₃ 産生には利用されないと考えられる。

D) 生殖系系の表現型

我々は、PIP5K1A-KO マウスの雄が産仔数の少ない低妊孕性であることを見いだした¹⁾。精子は精巣の精子幹細胞（精原細胞）より分化する（図 2A）。精巣は 1 本の精細管が折りたたまれた組織であり、精細管の最外層に精子幹細胞である精原細胞が存在する。精原細胞の非対称分裂により生じた精母細胞は減数分裂を行うとともに、管腔内側に移動する。さらに精母細胞は形態変化を経て精子特有の尾部を持った伸長精子細胞へと分化する。分化が完了した精子は精細管管腔内に放出される。この精原細胞から精子への分化を支えるのが、精細管内唯一の体細胞であるセルトリ細胞である。

PIP5K1A-KO マウスの精巣を解剖学的に解析した結果、精子の数はほぼ正常であったが、精子尾部の形態に顕著な異常が観察された。この尾部の異常により、PIP5K1A-KO 精子は運動能が低く、卵子に到達できないものと考えられた。尾部の異常は、尾部の形成段階で起きるのではなく、精子が精細管管腔内に放出された後に起きる現象であり、したがって PIP5K1A は精子の形態保持に重要であると考えられた。PIP5K1B-KO マウスの雄では、産仔能力や精巣の組織構造、精子の形態・運動能に異常は観察されなかった。

一方、PIP5K1A と PIP5K1B の両者を欠くダブルノックアウトマウス (D-KO) の精巣では、産生される精子が顕著に少なかった。D-KO マウスの精細管では精子細胞とセルトリ細胞の間の細胞間接着部位でアクチン骨格系の再構成が不全であり、そのために精子細胞が脱落していく可能性が示唆された（図 2B）。また、少数産生された精子は顕著な形態異常を示し、運動能力が著しく減弱していた。これらの異常のために、D-KO の雄は完全に不妊であった。これらの結果から、精子尾部の形態保持においては PIP5K1A がユニークな機能を持ち、精子細胞とセルトリ細胞の細胞間接着制御においては PIP5K1A と PIP5K1B が重複した機能を持つと考えられた。なお、これまでの解析では、PIP5K1A-KO、PIP5K1B-KO、D-KO の雌マウスには生殖能力の異常を認めていない。

3. PIP5K1C の生理機能

哺乳動物の PIP5K1C には、mRNA の選択的スプライシングにより生じる複数のアイソフォームが存在する。これまでに、マウスでは 3 種類（図 1B）、ヒトでは 4 種類が報告されている。我々が作製したマウスにおける 3 種類のアイソフォーム全てを認識する抗体を用いた発現解析の結果、PIP5K1C は神経系に特異的に発現していることがわかった。しかし一方で、過去の mRNA 発現解析では全身の多くの臓器に発現が見られること⁸⁾、また好中球や線維芽細胞、幾つかの細胞株を用いた培養実験系による研究で PIP5K1C の機能的な重要性が示されていることから、PIP5K1C には、神経系以外の臓器や細胞に発現する未知のアイソフォームが存在する可能性が考えられる。

上記のように、これまで同定されている PIP5K1C のアイソフォームは神経系に特異的であることから、我々のグループは神経細胞における PIP5K1C の役割を検討した。その結果、前シナプス部位において PIP5K1C は、脱リン酸化されることによりアダプタータンパク質複合体 AP-2 と結合し、酵素活性が上昇することがわかった⁹⁾。この活性化された PIP5K1C が産生した PI[4, 5]P₂ は、クラスリン依存的なエンドサイトーシスを誘導し、シナプス小胞の再取り込みを促進する（図 3A）。この知見をもとに、我々は後シナプス部位における PIP5K1C の役割も検討した。PIP5K1C と AP-2 の結合を Bimolecular Fluorescent Complementation (BiFC) システム（図 3B）を用いてリアルタイムでモニターしたところ、NMDA 型グルタミン酸受容体を刺激することにより後シナプス部位で PIP5K1C と AP-2 が結合することがわかった（図 3C）¹⁰⁾。この PIP5K1C と AP-2 との結合およびその結果誘起される PIP5K1C の活性化は、NMDA 受容体刺激による AMPA 型グルタミン酸受容体のエンドサイトーシスに必須であった。このように、後シナプス部位の PIP5K1C はグルタミン酸作動性シナプスにおける長期抑圧の重要なシグナル伝達分子であると考えられる（図 3A）。

PIP5K1C の KO マウスは二つのグループより報告されている。イエール大学の De Camilli らのグループは、PIP5K1C-KO マウスは生後 24 時間以内に死亡すると報告している¹¹⁾。彼らの PIP5K1C-KO マウスは動くことができず、授乳もできなかった。解剖学的に大きな障害は認められなかったが、PIP5K1C-KO マウス由来の培養神経細胞では、前シナプス部位からの神経伝達物質の放出が減少していた。これは、シナプス間隙からの神経伝達物質の再

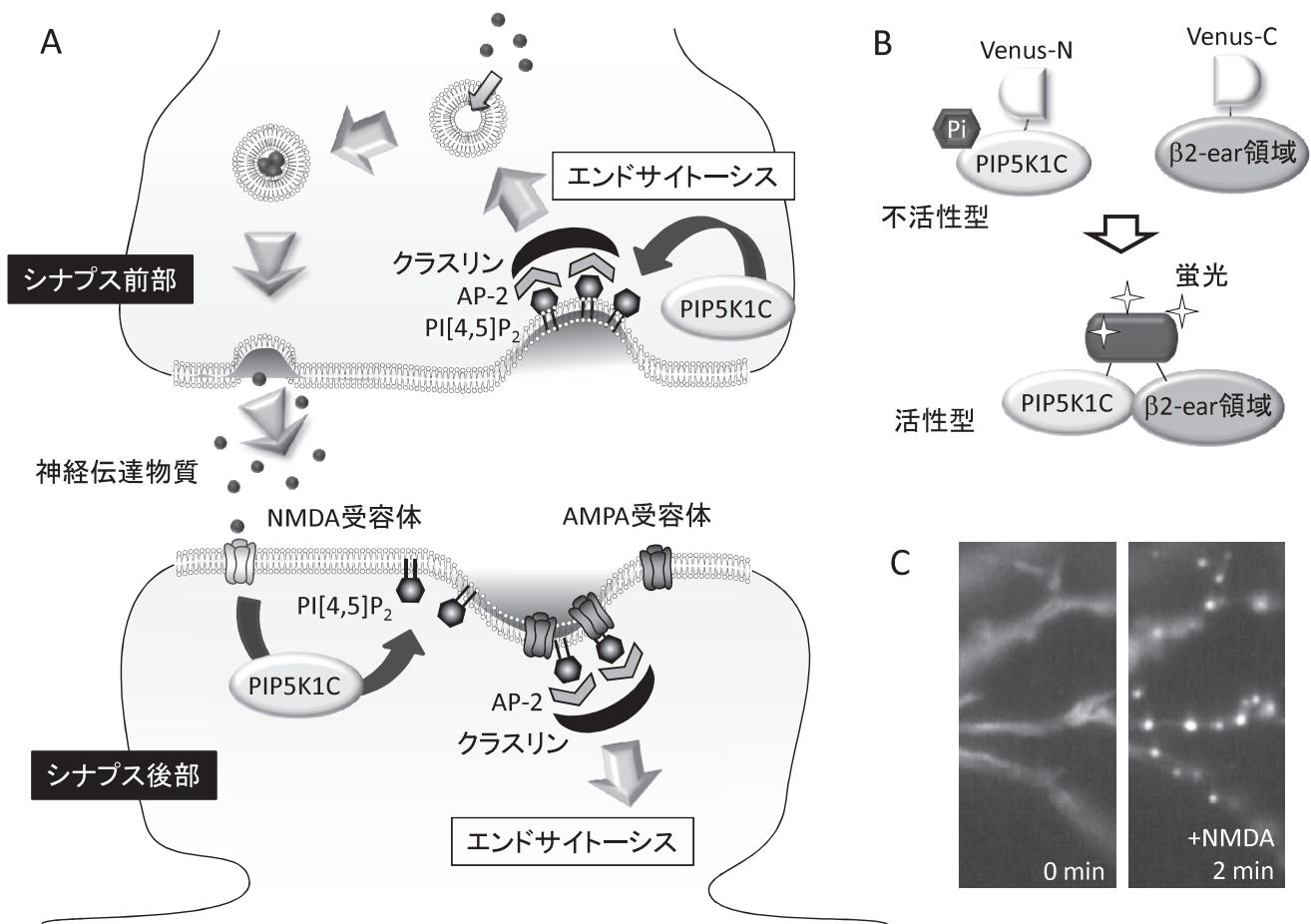


図3 PIP5K1Cの神経系における機能

(A) シナプス部位での PIP5K1C の機能を示す模式図。

(B) PIP5K1C と AP-2 の結合を検出する BiFC 法の概略。脱リン酸化により活性化された PIP5K1C と AP-2 の構成タンパク質である β2 アダプチンの ear 領域が結合すると、蛍光タンパク質 Venus が再構成され、蛍光を発するようになる。

(C) NMDA 刺激後における PIP5K1C と AP-2 の結合。初代培養海馬神経細胞に Venus-N-PIP5K1C と Venus-C-β2-ear 領域をトランスフェクションにより発現させ、NMDA で 2 分間刺激した。AP-2 との結合により活性化された PIP5K1C がシナプス部位に観察できる。

取り込みが減少していることに起因しており、前述の我々のグループの結果と一致する。一方、ペンシルバニア大学の Abrams らのグループによる *PIP5K1C*-KO マウスは胎生中期に死亡した¹²⁾。彼らの *PIP5K1C*-KO マウスは全身のサイズが小さく、心臓の低形成や神経管の閉鎖不全を示す。これらの異常は細胞間の接着結合の異常に起因する。このような違いがなぜ生じるのかは現在のところ明らかではないが、De Camilli らのマウスでは PIP5K1C のコーディング領域を完全に欠損しているのに対し、Abrams らのマウスでは遺伝子トラップ法を用いた KO であることが理由の一つとして考えられる。

これらの KO マウスを用いた成体での表現型解析は不可

能であるが、細胞を初代培養することによる表現型の解析が行われている。アレルゲンを用いて肥満細胞の IgE 受容体を刺激すると小胞体からのカルシウムイオン放出が観察されるが、*PIP5K1C*-KO マウス骨髄由来の肥満細胞ではこの反応が減弱していた¹³⁾。したがって、PIP5K1C は IgE 受容体のシグナルに対して促進的な機能を担っていると考えられる。*PIP5K1C*-KO マウス由来のマクロファージは IgG によりオプソニン化したラテックス粒子に結合することができず、ファゴサイトーシスを行うことができない¹⁴⁾。これは、PIP5K1C が欠損することにより、アクチン細胞骨格系の再構築ができず、Fcγ 受容体の集積が低下するためであると考えられる。興味深いことに、*PIP5K1A*-

KO マウス由来のマクロファージでもファゴサイトーシスの障害が見られるが, こちらはFcγ受容体の集積ではなく, ファゴサイトーシス部位で細胞膜が窪みを形成した時のアクチン重合が減少することに起因する¹⁴⁾。

4. お わ り に

これまで述べてきたように, PIP5K1 サブタイプは生体において高度に使い分けられていると考えられる。しかし, PIP5K1 の個体レベルでの機能解析はまだ始まったばかりであり, 明らかにすべき多くの点が残されている。上述のように, PIP5K1A とアレルギーなどの免疫系疾患, PIP5K1B と糖尿病, PIP5K1C と高次脳機能障害など, 多くの疾患との関連が示唆されるため, これらの PIP5K1 サブタイプと疾患との関係については特に興味深い。PI[4, 5]P₂ の下流シグナルに関しても不明な点が多い。PIP5K1 の各サブタイプにより産生される PI[4, 5]P₂ が, PLC や PI3K を介して細胞機能を制御するのか, もしくは直接タンパク質に結合することにより細胞機能を制御しているのかは現在のところ解析が困難である。この問題を解決するための新しい実験技術の開発が待たれる。

- 1) Hasegawa, H., Noguchi, J., Yamashita, M., Okada, R., Sugimoto, R., Furuya, M., Unoki, T., Funakoshi, Y., Baba, T., & Kanaho, Y. (2012) *Biol. Reprod.*, **86**, 136, 1–12.
- 2) Honda, A., Nogami, M., Yokozeki, T., Yamazaki, M., Nakamura, H., Watanabe, H., Kawamoto, K., Nakayama, K., Morris, A.J., Frohman, M.A., & Kanaho, Y. (1999) *Cell*, **99**, 521–532.
- 3) Doughman, R.L., Firestone, A.J., Wojtasiak, M.L., Bunce, M. W., & Anderson, R.A. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 23036–23045.
- 4) Sasaki, J., Sasaki, T., Yamazaki, M., Matsuoka, K., Taya, C., Shitara, H., Takasuga, S., Nishio, M., Mizuno, K., Wada, T., Miyazaki, H., Watanabe, H., Iizuka, R., Kubo, S., Murata, S., Chiba, T., Maehama, T., Hamada, K., Kushimoto, H.,

- Frohman, M.A., Tanaka, K., Penninger, J.M., Tonekawa, H., Suzuki, A., & Kanaho, Y. (2005) *J. Exp. Med.*, **201**, 859–870.
- 5) Zhang, J., Luo, R., Wu, H., Wei, S., Han, W., & Li, G. (2009) *Endocrinology*, **150**, 2127–2135.
- 6) Huang, P., Yeku, O., Zong, H., Tsang, P., Su, W., Yu, X., Teng, S., Osisami, M., Kanaho, Y., Pessin, J.E., & Frohman, M.A. (2011) *Diabetes*, **60**, 454–463.
- 7) Wang, Y., Chen X., Lian, L., Tang, T., Stalker, T.J., Sasaki, T., Kanaho, Y., Brass, L.F., Choi, J.K., Hartwig, J.H., & Abrams, C.S. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 14064–14069.
- 8) Ishihara, H., Shibasaki, Y., Kizuki, N., Wada, T., Yazaki, Y., Asano, T., & Oka, Y. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 8741–8748.
- 9) Nakano-Kobayashi, A., Yamazaki, M., Unoki, T., Hongu, T., Murata, C., Taguchi, R., Katada, T., Frohman, M.A., Yokozeki, T., & Kanaho, Y. (2007) *EMBO J.*, **26**, 1105–1116.
- 10) Unoki, T., Matsuda, S., Kakegawa, W., Van, N.T.B., Kohda, K., Suzuki, A., Funakoshi, Y., Hasegawa, H., Yuzaki, M., & Kanaho, Y. (2012) *Neuron*, **73**, 135–148.
- 11) Di Paolo, G., Moskowitz, H.S., Gipson, K., Wenk, M.R., Voronov, S., Obayashi, M., Flavell, R., Fitzsimonds, R.M., Ryan, T.A., & De Camilli, P. (2004) *Nature*, **431**, 415–422.
- 12) Wang, Y., Lian, L., Golden, J.A., Morrissey, E.E., & Abrams, C.S. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 11748–11753.
- 13) Vasudevan, L., Jeromin, A., Volpicelli-Daley, L., De Camilli, P., Holowka, D., & Baird, B. (2009) *J. Cell Sci.*, **122**, 2567–2574.
- 14) Mao, Y.S., Yamaga, M., Zhu, X., Wei, Y., Sun, H.-Q., Wang, J., Yun, M., Wang, Y., Di Paolo, G., Bennett, M., Mellman, I., Abrams, C.S., De Camilli, P., Lu, C.Y., Yin, H.L. (2009) *J. Cell Biol.*, **184**, 281–296.

長谷川 潤, 金保 安則
(筑波大学医学医療系生理化学)

Physiological significance of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in mammals

Hiroshi Hasegawa and Yasunori Kanaho (Department of Physiological Chemistry, Faculty of Medicine, University of Tsukuba, 1-1-1 Ten-noudai, Tsukuba, Ibaraki 305-8575, Japan)