

## 脂質ホスファターゼ INPP4A による神経細胞死抑制機構の解明\*

佐々木 純子

秋田大学大学院医学系研究科 医学専攻病態制御医学系微生物学講座

(平成 23 年 4 月 28 日掲載決定)

## The lipid phosphatase INPP4A suppresses excitotoxic neuronal death

Junko Sasaki

Department of Medical Biology, Akita University Graduate School of Medicine

Key words : phosphatidylinositol, phosphatase, neuron

## はじめに

ホスファチジルイノシトールは、小胞体においてホスファチジン酸から CDP-ジアシルグリセロールを中間体として合成され、その後イノシトール環の 3 位, 4 位, 5 位水酸基にリン酸化を受ける。ホスファチジルイノシトールとそのリン酸化による派生体はホスホイノシタイドと総称され、全部で 8 種類存在する。ホスホイノシタイドは細胞膜構成脂質の数%に過ぎない微量なリン脂質群であるが、形質膜やオルガネラ膜の細胞質に面した層に局在して、小胞輸送や細胞骨格の再構築、増殖、分化、細胞死につながるシグナル伝達を調節している<sup>1,3)</sup>。図 1 に示すように各ホスホイノシタイドの生成と分解は相互に関連している。想定しうる 24 のリン酸化/脱リン酸化反応のうち 19 の反応について、それらを触媒する酵素が確認されており、哺乳動物には 19 のキナーゼと 28 のホスファターゼをコードする遺伝子が存在する<sup>1)</sup>。また、制御タンパク質(酵素の制御サブユニット)も多数存在し、酵素との会合の組合せも多様であり、一つのホスホイノシタイド変換反応に複数の酵素が携わると考えられる。

最近、ホスホイノシタイド代謝酵素の活性が遺伝子変異などによって変調することで、様々な病態が発現する例が報告されている<sup>1,4-6)</sup>。理由は不明であるが、キナーゼよりホスファターゼの異常にそのようなケースが多い。最も研究が進んでいるのは癌抑制遺伝子産物 PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog Deleted from Chromosome 10) である。ヒトの種々の癌において PTEN 遺伝子の欠失やタンパク質の発現低下が見出されており、また、T 細胞や肝臓など様々な組織特異的 Pten 欠損マウスは発癌することが報告されて

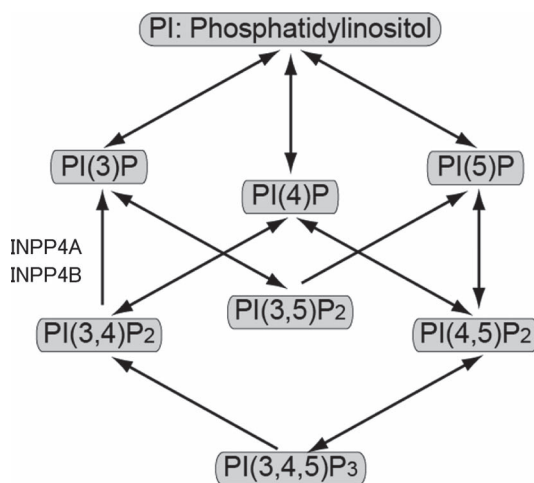


図 1. ホスホイノシタイド代謝  
哺乳動物では、想定される 24 の反応のうち、19 の反応について、これらを触媒する酵素が同定されている。

Correspondence : Junko Sasaki  
Department of Medical Biology, Akita University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Hondoh, Akita 010-8543, Japan  
Tel : 81-18-884-6079  
Fax : 81-18-836-2607  
E-mail : sasakij@med.akita-u.ac.jp  
\*第 21 回秋田医学会学術賞

(18)

脂質ホスファターゼ INPP4A による神経細胞死抑制機構の解明

いる<sup>7)</sup>。PTENは、ホスファチジルイノシトール3,4,5-三リン酸(PI(3,4,5)P<sub>3</sub>)の3位脱リン酸化酵素であり、通常の細胞内PI(3,4,5)P<sub>3</sub>レベルを低く保つハウスkeeping的な役割を通して多彩な細胞応答の発現に関与する。PTENの欠損は、PI(3,4,5)P<sub>3</sub>依存的な増殖、細胞死抑制シグナリングの亢進につながる。

PI(3,4,5)P<sub>3</sub>と似た特徴をもつホスホイノシチドが存在する。それは、ホスファチジルイノシトール3,4-二リン酸(PI(3,4)P<sub>2</sub>)である。PI(3,4)P<sub>2</sub>の結合タンパク質として明らかになっているものには、原癌遺伝子産物AktなどPI(3,4,5)P<sub>3</sub>と共通の標的が多いこと、また、細胞内レベルが通常非常に低く抑えられている(細胞内全脂質の1/10000以下)が、増殖因子などによる細胞膜受容体刺激後に一過的に数十～数百倍に上昇する点が類似している<sup>8)</sup>。PI(3,4,5)P<sub>3</sub>とPI(3,4)P<sub>2</sub>が共通に、あるいは、個々に選択的に制御する標的タンパク質の過剰で持続的な活性化を防ぐうえで、これらの脱リン酸化酵素は重要であると考えられる。癌抑制遺伝子産物PTENをはじめ、PI(3,4,5)P<sub>3</sub>の脱リン酸化酵素の生物学的機能は詳しく研究されている<sup>7)</sup>。一方、PI(3,4)P<sub>2</sub>脱リン酸化酵素の機能については、ほとんど解明されていない。哺乳動物には、INPP4(inositol polyphosphate phosphatase 4) AとINPP4Bという、二つのPI(3,4)P<sub>2</sub>脱リン酸化酵素が存在する<sup>9)</sup>。今回我々は、INPP4Aが中枢神経系でグルタミン酸の

興奮毒性の抑制因子として働くことを明らかにし、INPP4AがINPP4BやPTENとは異なる生理機能を有する知見を得た<sup>10)</sup>。また最近、INPP4Bが癌抑制遺伝子の候補であり、PTENと同様の機能を有するという報告がなされた<sup>11,12)</sup>。本稿では、最近明らかにされてきつつあるこれらのPI(3,4)P<sub>2</sub>の生理機能について紹介させていただく。

### INPP4A と神経変性

Inpp4A欠損マウスはメンデル比に従って正常に生まれるが、生後2週までに、後弓反張、バリズム、ジストニアの症候を含む不随意運動を呈する(図2)。このような運動異常は、中枢神経特異的Pten欠損マウスやInpp4B欠損マウスでは認められない(筆者ら未発表)。Inpp4A欠損マウスの不随意運動は、大脳皮質-大脳基底核ループの活動異常による錐体外路性運

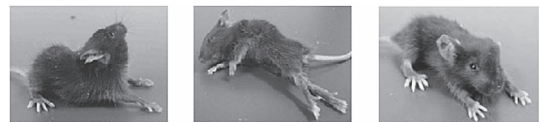


図2. INPP4A欠損による不随意運動。後弓反張(左)、四肢の硬直進展(中)、ジストニア姿勢(右)。

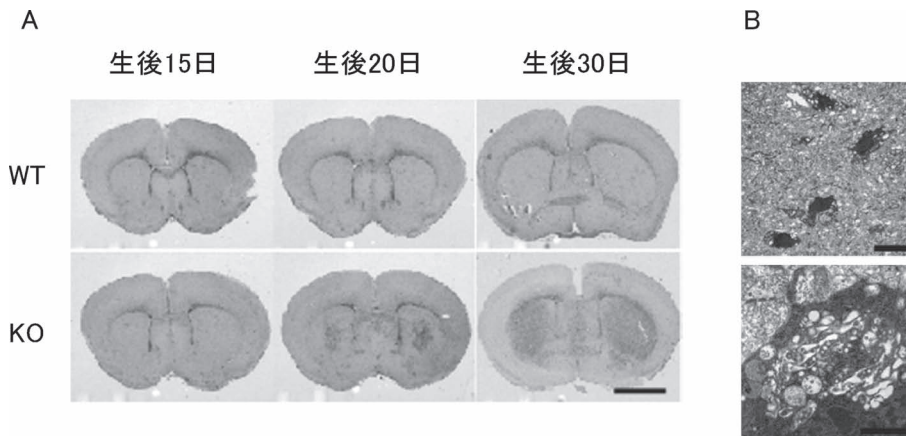


図3. INPP4A欠損マウス線条体における神経変性

A: 脳組織の抗GFAP染色像。INPP4A欠損マウスでは生後20日から、線条体の中心部に神経膠症が認められ、生後30日には病変が線条体全体に広がっている。スケールバーは2 mm。

B: INPP4A欠損マウス線条体の電子顕微鏡解析。INPP4A欠損マウスでは、“dark cell degeneration”と呼ばれる異常な神経細胞の像が認められる。オルガネラが著しく空胞化している。スケールバーは10 μm(上)、1 μm(下)。

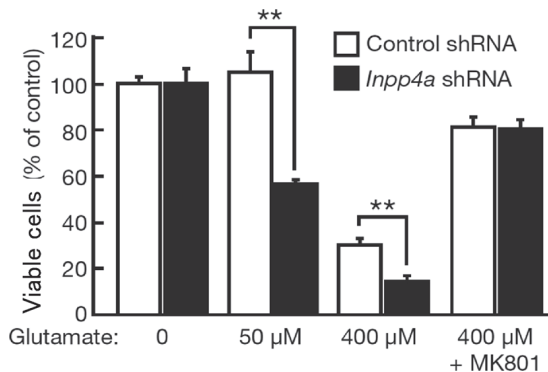


図4. INPP4Aはグルタミン酸による細胞死を抑制する。

野生型マウス線条体神経細胞でのINPP4Aの発現をRNA干渉によりノックダウンすると、グルタミン酸刺激による細胞死が亢進する。NMDA型グルタミン酸受容体アンタゴニストMK801はこの細胞死を抑制する。

動制御の障害によって起こることが知られている。INPP4A欠損マウスでは、大脳基底核の入力部である線条体において、野生型マウスと比してPI(3,4)P<sub>2</sub>レベルが優位に上昇していた。線条体の介在ニューロンの細胞数は正常であるが、淡蒼球内節へ投射するエンケファリン含有のmedium-sized spiny neuronの細胞死が亢進して細胞数が減少しており、また、顕著なグリオーシスが認められた(図3A)。

INPP4A欠損マウス線条体の電子顕微鏡解析では、オスミウム好染色性でエンドソームが空胞化した異常な細胞が多数認められた(図3B)。この細胞像は、線条体にグルタミン酸受容体アゴニストを直接投与したマウスにみられる、グルタミン酸細胞毒性により出現する死細胞と酷似していた。グルタミン酸は中枢神経系での主要な興奮性神経伝達物質である反面、神経細胞死を誘発する活性を有し、急性の神経変性(脳虚血、脳外傷)や、慢性神経変性疾患(ハンチントン舞踏病など)における神経細胞死の一因と考えられている。INPP4A欠損マウス線条体でのグルタミン酸トランスポーターの発現やグルタミン酸取り込み、細胞外グルタミン酸濃度は正常であったことから、神経細胞のグルタミン酸への感受性の亢進が細胞死の機構であると推察された。実際に、RNA干渉でINPP4Aの発現を低下させた線条体神経細胞は、コントロール細胞に作用を示さない低濃度のグルタミン酸によっても死滅した(図4)。この細胞死は、N-メチル-Dアスパラギン酸

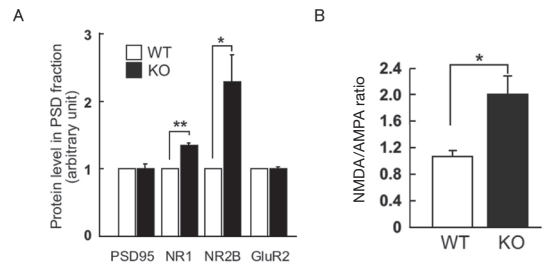


図5. INPP4AによるNMDA受容体の制御。

A: INPP4A欠損マウスの線条体では、PSDに局在するNMDA受容体量が増加している。

B: INPP4A欠損線条体では、NMDA受容体を介した興奮性シナプス後電流が上昇している。

型グルタミン酸受容体(NMDAR)アンタゴニストMK801で抑制された。

INPP4Aはシナプス後肥厚部(PSD)に存在する。INPP4A欠損マウスではPSDでのNMDAR量が増加しており、NMDARを介した興奮性シナプス後電流も上昇している(図5)。NMDARの形質膜でのレベルは、クラスリン依存性エンドサイトーシスによって制御されることが知られている。NMDARのNR2Bサブユニットのチロシンリン酸化は、クラスリンアダプターのAP-2との結合を阻害し、形質膜NMDARレベルの上昇につながる。INPP4A欠損マウスではNR2Bのチロシンリン酸化が亢進しており、その結果としてシナプス後膜でのNMDARの発現上昇につながると考えられる。組織学的解析でまだ神経変性が認められていない生後19日齢前のマウスにおいては、MK801の投与が一過性の改善効果を示したことから、神経細胞死とともにシナプス伝達の異常も、INPP4A欠損による運動異常の一因であると考えられる<sup>10)</sup>。

今回の研究で、PI(3,4)P<sub>2</sub>やPI(3,4,5)P<sub>3</sub>とそれらに作用する脱リン酸化酵素がそれぞれ異なった生体調節機能を担うことが明らかになり、PI(3,4)P<sub>2</sub>代謝酵素の独特な性質と生理的な重要性を知ることができた。INPP4Aは、ニューロンで興奮毒性による細胞死を防ぐ機能をもつ、我々の知る限りでは初めてのシグナル伝達タンパク質である。PI(3,4)P<sub>2</sub>代謝と神経変性や不随意運動との直接的な関係の提示は、神経変性疾患の新しい治療法の開発に役立つ可能性もある。INPP4Aがなぜ特に線条体での神経保護作用を持つのか、PI(3,4)P<sub>2</sub>がどのような分子機構でNMDARのシナプス局在を調節するのかなど、この研究で生じた新たに疑問について、今後さらなる解析を続けていきたい。

## INPP4B と癌

2つのグループから、*INPP4B* が癌抑制遺伝子であるとの報告がなされた<sup>11,12)</sup>。*INPP4B* locus (4q31.21) のヘテロ接合性の消失 (LOH) が basal-like タイプの乳癌 (エストロゲン受容体 (ER), プロゲステロン受容体, 上皮増殖因子受容体 2 (HER2) の発現が陰性の癌) において約 6 割の頻度で見出され、*INPP4B* mRNA の発現レベルが低下している。一方、luminal A タイプの乳癌 (ER 陽性, HER2 陰性の癌, basal-like タイプの乳癌より予後が良好) では、この LOH の頻度は 5% と低い。卵巣癌, 食道癌, メラノーマにも 4q31.21 の LOH が認められ、乳癌と卵巣癌においては、組織染色での *INPP4B* 発現消失と予後の悪化には有意な相関が示されている。また、乳癌細胞株で *INPP4B* の発現を RNA 干渉で抑制すると、PTEN を抑制した場合と同様に AKT のリン酸化/活性化が亢進する。これらの知見は、*INPP4B* が PTEN と同様に癌抑制の働きをもつこと、また、その基質の PI(3, 4)P<sub>2</sub> と PI(3, 4, 5)P<sub>3</sub> が発癌に促進性の機能を持つことを示唆している。

## おわりに

ノックアウトマウスの解析やヒト疾患の遺伝子解析によって、PI(3, 4)P<sub>2</sub> が神経疾患、癌といった生体調節において重要な役割を担うことが明らかになってきた。同じ脱リン酸化反応を触媒する *INPP4A* と *INPP4B* が同一細胞内に存在する場合でも、特定の酵素の欠損が顕著な病態に結びつく事実は興味深い。今後、これらホスファターゼの活性調節機構や内在性酵素の細胞内局在について確定し、遺伝子の異常がどのような脂質の異常につながるのか、そして脂質の異常がどのようにして病態の発現につながるのかという機構について明らかにしていく必要がある。

## 謝 辞

この研究は、榊山俊彦教授 (慈恵医大), 平井宏和教授 (群馬大), 竹縄忠臣教授 (神戸大), 鈴木聡教授 (九州大) らとの共同研究によるものです。深く感謝いたします。また、日々の研究にご協力いただきました、佐々木雄彦教授をはじめとする秋田大学微生物学講座の皆様に深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) Sasaki, T., Takasuga, S., Sasaki, J. *et al.* (2009) Mammalian phosphoinositide kinases and phosphatases. *Prog. Lipid Res.*, **48**, 307-343.
- 2) Takenawa, T. and Itoh, T. (2001) Phosphoinositides, key molecules for regulation of actin cytoskeletal organization and membrane traffic from the plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta.*, **31**, 190-206.
- 3) Di Paolo, G. and De Camilli, P. (2006) Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature*, **443**, 651-657.
- 4) Kok, K., Geering, B. and Vanhaesebroeck, B. (2009) Regulation of phosphoinositide 3-kinase expression in health and disease. *Trends Biochem. Sci.*, **34**, 115-127.
- 5) Wymann, M.P. and Schneider, R. (2008) Lipid signaling in disease. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **9**, 162-176.
- 6) 佐々木純子, 小藤智史, 佐々木雄彦 (2010) ホスホイノシタイトドホスファターゼの異常と病態. 実験医学 **28**, 158-163.
- 7) Suzuki, A., Nakano, T., Mak, T.W. *et al.* (2008) Portrait of PTEN: messages from mutant mice. *Cancer Sci.*, **99**, 209-213.
- 8) Stephens, L.R., Jackson, T.R. and Hawkins, P.T. (1993) Agonist-stimulated synthesis of phosphatidylinositol(3, 4, 5)-trisphosphate: a new intracellular signalling system? *Biochim. Biophys. Acta.*, **1179**, 27-75.
- 9) Norris, F.A., Atkins, R.C. and Majerus, P.W. (1997) The cDNA cloning and characterization of inositol polyphosphate 4-phosphatase type II. Evidence for conserved alternative splicing in the 4-phosphatase family. *J. Biol. Chem.*, **272**, 23859-23864.
- 10) Sasaki, J., Kofuji, S., Itoh, R. *et al.* (2010) The PtdIns(3, 4)P<sub>2</sub> phosphatase INPP4A is a suppressor of excitotoxic neuronal death. *Nature*, **65**, 497-501.
- 11) Gewinner, C., Wang, Z.C., Richardson, A. *et al.* (2009) Evidence that inositol polyphosphate 4-phosphatase type II is a tumor suppressor that inhibits PI3K signaling. *Cancer Cell*, **16**, 115-125.
- 12) Fedele, C.G., Ooms, L.M., Ho, M. *et al.* (2010) Inositol polyphosphate 4-phosphatase II regulates PI3K/Akt signaling and is lost in human basal-like breast cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **107**, 22231-22236.