

領域融合レビュー, 5, e008 (2016)  
DOI: 10.7875/leading.author.5.e008  
2016年10月3日 公開

## ホスファチジルイノシトール 4-リン酸による細胞機能の制御 Role of phosphatidylinositol 4-phosphate in cellular function

中津 史  
Fubito Nakatsu

新潟大学大学院医歯学系総合研究科 神経生化学

### 要約

イノシトールリン脂質は生体膜を構成するリン脂質の一種であり、イノシトール環がリン酸化あるいは脱リン酸化されることにより 7 種類の異なるイノシトールリン脂質が産生される。これらイノシトールリン脂質は細胞膜やオルガネラ膜に独自の特異性にて局在し、シグナル伝達、細胞骨格、メンブレントラフィックなどさまざまな細胞機能に密接に関与する。なかでも、ホスファチジルイノシトール 4-リン酸は細胞膜やゴルジ体に豊富に存在し、種々のエフェクタータンパク質をリクルートすることにより膜ダイナミクスを制御したり、ホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸の前駆体として機能したりする。さらに近年、ホスファチジルイノシトール 4-リン酸は小胞体と細胞膜との接触部位あるいは小胞体とゴルジ体との接触部位を介した脂質輸送において必須の役割を担うことが明らかにされた。このレビューにおいては、イノシトールリン脂質のなかでもあまり機能のわかっていなかったホスファチジルイノシトール 4-リン酸に着目し、その細胞機能について、とくに膜接触部位を介した脂質輸送の分子実体とその機能にふれつつ、筆者らによる最近の研究の成果をまじえて解説する。

### はじめに

イノシトールリン脂質は生体膜を構成するリン脂質の一種であり、親水基としてイノシトール環をもつ。細胞において生体膜におけるリン脂質の総量に占める割合は約 1 割と微量であるが、さまざまな細胞機能をつかさどる重要な脂質である。イノシトールリン脂質の特徴として、細胞質の側に表出したイノシトール環の 3 位, 4 位, 5 位に可逆的にリン酸化あるいは脱リン酸化が起こり、その組合せにより 7 種類の異なるイノシトールリン脂質が産生さ

れることがあげられる<sup>1)</sup>。これらのイノシトールリン脂質は細胞膜やオルガネラ膜などの生体膜において均一に分布するのではなく、特定の生体膜に濃縮して分布する<sup>2)</sup>。たとえば、ホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸は細胞膜に、ホスファチジルイノシトール 4-リン酸は細胞膜およびゴルジ体に、ホスファチジルイノシトール 3-リン酸やホスファチジルイノシトール 3,5-ビスリン酸はエンドソーム膜およびリソソーム膜に、それぞれ多く存在する (図 1)。これは、おのおののイノシトールリン脂質の合成あるいは代謝を制御するキナーゼおよびホスファターゼが特定の生体膜に異なる特異性にて局在することに起因する<sup>1,3)</sup>。

### 1. 細胞機能を制御するイノシトールリン脂質

イノシトールリン脂質は生体膜を構成する脂質のひとつとしての役割のほか、いくつかの重要な生理的な役割を担う。古くから知られる機能のひとつは、セカンドメッセンジャーの産生を介したシグナル伝達の制御である。細胞膜に存在する G タンパク質共役受容体が活性化するとホスホリパーゼ C によりホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸がイノシトール 1,4,5-トリスリン酸とジアシルグリセロールに分解されセカンドメッセンジャーの産生が促進される<sup>4-6)</sup>。

さらに、イノシトールリン脂質は細胞においておのおのの生体膜の目印としてのランドマーク的な役割も担う。リン酸化部位の異なるイノシトールリン脂質はそれぞれの特異性にしたがって異なる生体膜に分布する。そして、これら異なるイノシトールリン脂質にはそれぞれ特異的に結合するエフェクタータンパク質が存在する。たとえば、ホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸に結合する PH ドメインをもつタンパク質は、細胞膜におけるホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸の局所的な濃度の上昇にとまない細胞膜にリクルートされる。また、ホスファチ

ジルイノシトール 3-リン酸に結合する PX ドメインや Fyve ドメインをもつタンパク質は、局所的なホスファチジルイノシトール 3-リン酸の濃度の上昇にともないエンドソーム膜に局在する<sup>7)</sup>。このように、おのおののイノシトールリン脂質の異なる局在はエフェクタータンパク質の時空間的に特異的なリクルートを可能にし、さまざまなタンパク質を適切な場所に的確なタイミングでリクルートすることにより種々の生理反応に秩序をもたらす。この特性により、イノシトールリン脂質は細胞の局所におけるシグナル伝達の場合やスイッチとして機能したり、輸送小胞の形成や膜ダイナミクスをともなうメンブレントラフィックなどの複雑なカスケードに秩序をもたらしたりする。このように、イノシトールリン脂質は細胞膜やオルガネラ膜にアイデンティティをあたえることにより細胞機能を制御する。

このほかにも、イノシトールリン脂質はほかの脂質の前駆体としての機能をもち、また、細胞内における脂質輸送および脂質ホメオスタシスにおいてきわめて重要な役割を担うことが明らかにされつつある。また、細胞骨格の制御、チャネルの機能の制御、細胞の走化性など、さまざまな生理反応に関与することも明らかにされている。このように、イノシトールリン脂質は細胞機能をささえる重要な因子となっている。

## 2. さまざまな生体膜ダイナミクスを制御するホスファチジルイノシトール 4-リン酸

ホスファチジルイノシトール 4-リン酸は細胞における存在量のもっとも多いイノシトールリン脂質のひとつであるにもかかわらず、その機能の詳細に関してはいまだに多くの謎が残されている。ホスファチジルイノシトール 4-リン酸はホスファチジルイノシトールを基質とし、イノシトール環の 4 位をリン酸化する PI4 キナーゼにより新規に合成される。これまで、出芽酵母においては 3 種類、哺乳類においては 4 種類の PI4 キナーゼが同定されている<sup>8,9)</sup> (図 2)。哺乳類においては、PI4 キナーゼは構造お

よび生化学的な特性によりタイプ II とタイプ III に分類されており、それぞれに  $\alpha$  および  $\beta$  の 2 種類が存在する。もともとはタイプ I も存在したが、これはのちにイノシトール環の 3 位をリン酸化する PI3 キナーゼであることが判明した。これらの PI4 キナーゼはそれぞれが異なる生体膜に局在し、独自の機能を担うことが明らかにされている。

一方、イノシトール環の 4 位を脱リン酸化するホスファターゼも複数が同定されており、Sac1 ドメインを共通してもつ<sup>10)</sup> (図 3)。Sac1 は小胞体、および、細胞の状態に応じゴルジ体<sup>11)</sup> に局在する膜タンパク質であり、細胞膜およびゴルジ体において合成されたホスファチジルイノシトール 4-リン酸の脱リン酸化を担う。小胞体に局在する膜タンパク質がどのように細胞膜およびゴルジ体のホスファチジルイノシトール 4-リン酸を制御するのか、その分子機構は議論的であったが、Sac1 が小胞体と細胞膜との接触部位に局在することによりトランス側の細胞膜に局在するホスファチジルイノシトール 4-リン酸を脱リン酸化することが出芽酵母および動物細胞において示された<sup>12,13)</sup>。しかし最近、筆者らを含む複数の研究グループは、Sac1 は小胞体と細胞膜との接触部位あるいは小胞体とゴルジ体との接触部位を介して小胞体に輸送されてきたホスファチジルイノシトール 4-リン酸を、シス側である小胞体において脱リン酸化することを見出した<sup>14-16)</sup>。また、小胞体とゴルジ体との接触部位に局在し、オキシステロール結合タンパク質である OSBP と複合体を形成してゴルジ体のラフト構造の形成に寄与することも示されている<sup>17)</sup>。Sac1 ドメインをもつほかのホスファターゼのうち、synaptojanin<sup>18)</sup> および Sac2<sup>19)</sup> はエンドサイトーシス経路においてホスファチジルイノシトール 4-リン酸のホスファターゼとして機能することが知られている。

## 3. ゴルジ体中存在するホスファチジルイノシトール 4-リン酸

ゴルジ体はホスファチジルイノシトール 4-リン酸が豊富に存在するオルガネラのひとつである。出芽酵母におい



図 1 イノシトールリン脂質の分子種およびその細胞における局在

イノシトール環の 3 位, 4 位, 5 位がリン酸化あるいは脱リン酸化されることにより 7 種類の異なるイノシトールリン脂質が産生される。それらのイノシトールリン脂質は、細胞において細胞膜やオルガネラ膜に独自の特異性をもち局在する。

では PI4 キナーゼである *Pik1* がゴルジ体におけるホスファチジルイノシトール 4-リン酸の産生を担う<sup>20,21)</sup>. *pik1* 欠損株においてはホスファチジルイノシトール 4-リン酸の量が 50%ほど減少することから, *Pik1* がゴルジ体において産生するホスファチジルイノシトール 4-リン酸は細胞におけるホスファチジルイノシトール 4-リン酸の総量の約半分をしめるとされる<sup>22,23)</sup>. また, *pik1* 欠損株は致死となることから, *Pik1* の機能は細胞膜においてホスファチジルイノシトール 4-リン酸の産生を担う *Stt4* とは独立しており, 機能的に重複しないと考えられている. *Pik1* は *Frq1* に依存してゴルジ体にリクルートされる<sup>24)</sup>. *Pik1* のゴルジ体へのリクルートは *Arf1* によっても制御される. *pik1* 欠損株においてはゴルジ体の形態の異常, 動物細胞のリソソームに相当する液胞の断片化, 細胞分裂の異常などが生じる. また, ホスファチジルイノシトール 4-リン酸はゴルジ体からの小胞輸送において必須である.

動物細胞においては, *Pik1* のホモログである PI4 キナーゼ III  $\beta$  がゴルジ体におけるホスファチジルイノシトール 4-リン酸の産生を担う. PI4 キナーゼ II  $\alpha$  もゴルジ体におけるホスファチジルイノシトール 4-リン酸の産生に関与するという報告もある. PI4 キナーゼ III  $\beta$  のゴルジ体への局在には, *Pik1* と同様に, 出芽酵母 *Frq1* のホモログで *NCS1* とよばれる *frequenin* や *Arf1* が関与すると考えられている<sup>25,26)</sup>. また, PI4 キナーゼ III  $\beta$  の結合タンパク質である *ACBD3* のノックダウンにより PI4 キナーゼ

III  $\beta$  が細胞質に散在したことから, *ACBD3* もまた PI4 キナーゼ III  $\beta$  のゴルジ体への局在に関与するという報告もある<sup>27,28)</sup>.

ゴルジ体において, ホスファチジルイノシトール 4-リン酸は種々のエフェクタータンパク質をリクルートすることによりその機能を制御する. クラスリンのアダプタータンパク質である *AP1* は, ホスファチジルイノシトール 4-リン酸によりゴルジ体にリクルートされることにより積み荷となるタンパク質の選別およびクラスリン被覆小胞の形成を促進し, ゴルジ体からの小胞輸送を制御する<sup>29)</sup>. *GOLPH3* もまた, ホスファチジルイノシトール 4-リン酸と結合することによりゴルジ体にリクルートされ, アクチン骨格の制御を介してゴルジ体の形態形成に関与する<sup>30,31)</sup>. また, 脂質輸送に関与するタンパク質はホスファチジルイノシトール 4-リン酸に依存してゴルジ体へと局在することにより機能を発揮する. *CERT* は小胞体からゴルジ体へのセラミドの輸送を担うタンパク質であるが, *CERT* のもつ PH ドメインがゴルジ体においてホスファチジルイノシトール 4-リン酸を特異的に認識して結合することにより, ゴルジ体へのセラミドの輸送を制御する<sup>32)</sup>. そのほか, *FAPP1* および *FAPP2* はグリコスフィンゴ脂質の輸送を担うが, やはり, それぞれのもつ PH ドメインがゴルジ体においてホスファチジルイノシトール 4-リン酸を認識することによりその輸送を制御する. さらに, オキシステロール結合タンパク質である *OSBP* もやはり PH

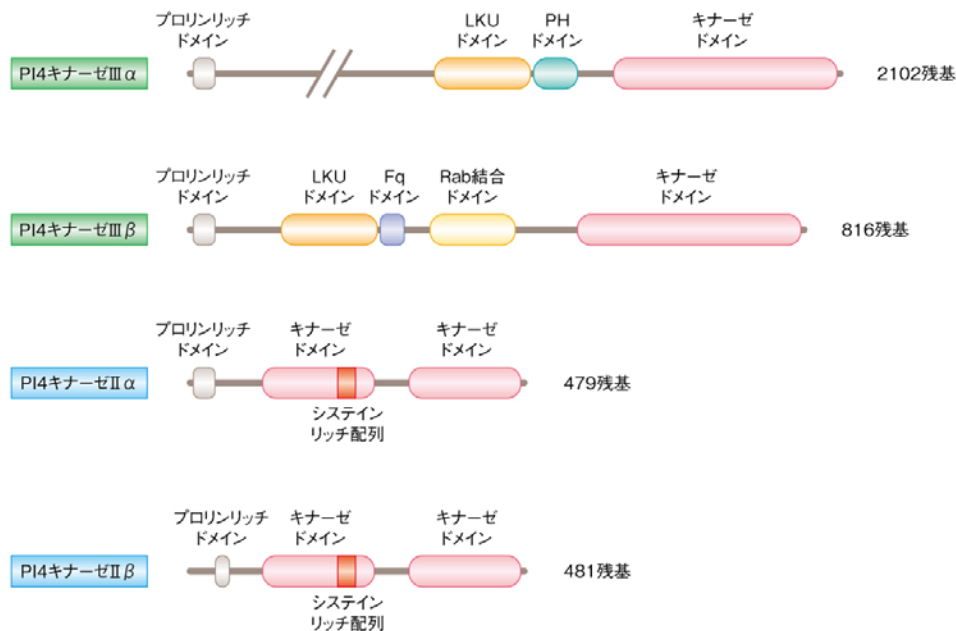


図2 イノシトール環の4位をリン酸化するPI4キナーゼの構造

PI4 キナーゼにはタイプ II とタイプ III が存在する. ヒトにおいて, PI4 キナーゼ III  $\alpha$  は細胞膜におけるホスファチジルイノシトール 4-リン酸の産生を, PI4 キナーゼ III  $\beta$  はゴルジ体におけるホスファチジルイノシトール 4-リン酸の産生を担う. タイプ II としては, エンドソームおよびゴルジ体におけるホスファチジルイノシトール 4-リン酸の産生を制御する PI4 キナーゼ II  $\alpha$ , および, 細胞膜あるいはエンドソームにおけるホスファチジルイノシトール 4-リン酸の産生を担うことが示唆されている PI4 キナーゼ II  $\beta$  が存在する.

ドメインをもち、ゴルジ体においてホスファチジルイノシトール 4-リン酸を認識することによりゴルジ体へと局在する。この OSBP は小胞体とゴルジ体との膜接触部位に局在し、小胞体からコレステロールを輸送すると同時に、ゴルジ体からホスファチジルイノシトール 4-リン酸を輸送する。

#### 4. 細胞膜に存在するホスファチジルイノシトール 4-リン酸

細胞膜はゴルジ体とならんでホスファチジルイノシトール 4-リン酸の豊富に存在する生体膜である。出芽酵母において細胞膜におけるホスファチジルイノシトール 4-リン酸の産生は Stt4 が担う。Stt4 はプロテインキナーゼ C の阻害剤である staurosporine に感受性を示す変異体のスクリーニングにより単離された<sup>33)</sup>。Stt4 は Efr3 および Ypp1 と複合体を形成することにより細胞膜に局在しホスファチジルイノシトール 4-リン酸を産生する<sup>34)</sup>。stt4 遺伝子の温度感受性変異を抑圧する遺伝子の産物として単離された膜貫通型の細胞膜タンパク質である Sfk1 もまた、Stt4 の細胞膜へのリクルートに関与することが報告されている<sup>35)</sup>。遺伝学的、細胞生物学的、生化学的な解析により、Stt4 は細胞膜におけるホスファチジルイノシトール 4-リン酸の産生において必須であることが判明している<sup>23)</sup>。stt4 欠損株においては細胞におけるホスファチジルイノシトール 4-リン酸の総量が半減し致死となる。これは、ゴルジ体においてホスファチジルイノシトール 4-リン酸を産生する Pik1 の強制発現によりレスキューされないことから、Stt4 と Pik1 は同じ PI4 キナーゼでありながら機能的には重複せず独立していること、そして、細胞膜とゴルジ体のホスファチジルイノシトール 4-リン酸プール

は異なることが示された<sup>23)</sup>。stt4 遺伝子の温度感受性変異株はプロテインキナーゼ C シグナル伝達系、アクチン骨格、細胞壁など細胞膜におけるホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸の生理機能に密接した機能に異常を示すことから、Stt4 により産生されるホスファチジルイノシトール 4-リン酸はホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸の前駆体としての役割を担うことが明らかにされている。しかしながら、stt4 遺伝子の温度感受性変異株においては液胞の形態に異常がみられることから、細胞膜に存在するホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸とはいっけんして直接の関係のない生体膜における機能の存在も示唆されている。

動物細胞においては PI4 キナーゼ III $\alpha$  が Stt4 のホモログとして機能する。PI4 キナーゼ III $\alpha$  をコードする cDNA のクローニングは 1996 年に報告された<sup>36)</sup>。PI4 キナーゼ III $\alpha$  はアミノ酸配列の相同性から機能的にも Stt4 と同様に細胞膜におけるホスファチジルイノシトール 4-リン酸の産生を介した生理機能を担うと予想された。事実、アンジオテンシン II 受容体への刺激ののちホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸が再合成され、その供給源として必要なホスファチジルイノシトール 4-リン酸の産生に PI4 キナーゼ III $\alpha$  が関与することが報告されたが<sup>37,38)</sup>、詳細な機能解析は遅々として進まなかった。その理由のひとつに、PI4 キナーゼ III $\alpha$  の局在がながらく不明であることがあった。それまで、PI4 キナーゼ III $\alpha$  の細胞膜への局在を示すデータは得られておらず、代わりに、小胞体、ゴルジ体、核に局在するなど諸説が提唱されていた<sup>8)</sup>。

2012 年、それまで開始コドンであると信じられていた Met をコードするコドンがじつは開始コドンではなく、全長の cDNA とされていた配列には N 末端側の 59 アミノ

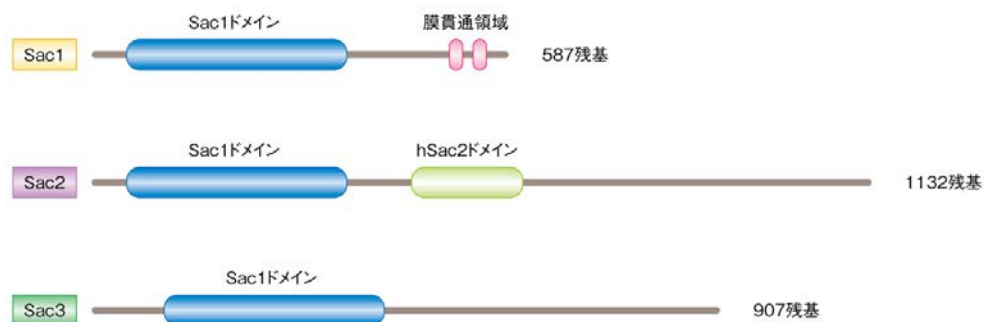


図3 Sac1 ドメインをもつホスファターゼの構造

ヒトにおいては、イノシトールリン脂質を脱リン酸化する Sac1 ドメインをもつ 3 種類のホスファターゼが同定されている。Sac1 は膜貫通領域を介して小胞体に局在する。細胞においてはおもにホスファチジルイノシトール 4-リン酸を脱リン酸化することがよく知られているが、in vitro においてはホスファチジルイノシトール 4-リン酸のほかホスファチジルイノシトール 3-リン酸やホスファチジルイノシトール 3,5-ビスリン酸などに対しても脱リン酸化活性を示す。Sac2 は初期エンドサイトーシス経路においてホスファチジルイノシトール 4-リン酸の脱リン酸化を担う。Sac3 はおもにエンドソームに局在しホスファチジルイノシトール 3,4-ビスリン酸の脱リン酸化を担う。なお、synaptojanin1 および synaptojanin2 も Sac1 ドメインをもつイノシトールリン脂質のホスファターゼであるが、ここには示していない。

酸残基をコードする配列が欠けていることが判明した<sup>39)</sup>. さらに, 新たな PI4 キナーゼ III $\alpha$  結合タンパク質として EFR3A/B および TTC7A/B が同定され, 全長の PI4KIII $\alpha$  はこれらのタンパク質と複合体を形成することにより細胞膜に局在することが示された. PI4 キナーゼ III $\alpha$  をノックアウトした細胞において, クラスリン被覆小胞の形成の異常やアクチン骨格の形成の異常など細胞膜におけるホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸の欠損にともなう異常がみられたことから, PI4 キナーゼ III $\alpha$  は細胞膜に存在するホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸の前駆体であるホスファチジルイノシトール 4-リン酸の産生に必須であることが示された. また, PI4 キナーゼ III $\alpha$  をノックアウトした細胞においては細胞膜におけるコレステロールの減少や細胞膜に局在するタンパク質の異所的な局在化が生じたことから, PI4 キナーゼ III $\alpha$  により産生されるホスファチジルイノシトール 4-リン酸は細胞膜のアイデンティティの確立に重要な役割を担うことが明らかにされた<sup>39)</sup>. さらに, Stt4 の細胞膜へのリクルートを促進する Sfk1 のホモログである TMEM150A がやはり PI4 キナーゼ III $\alpha$  と結合し細胞膜におけるホスファチジルイノシトール 4-リン酸の産生に寄与すること<sup>40)</sup>, そして, 新たな PI4 キナーゼ III $\alpha$  の結合タンパク質として FMA126A/B が単離され<sup>41)</sup>, PI4 キナーゼ III $\alpha$  は EFR3A/B, TTC7A/B, TMEM150A, FAM126A/B と複合体を形成することが判明した. FAM126A (別名: Hyccin) は神経の脱髄を生じる遺伝性の疾患である白質ジストロフィーの原因遺伝子の産物であり, PI4 キナーゼ III $\alpha$  複合体を介した細胞膜におけるホスファチジルイノシトール 4-リン酸の産生がミエリンの形成において重要な役割を担うことが明らかにされた<sup>41)</sup>. このほか, 細胞膜に存在するホスファチジルイノシトール 4-リン酸はホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸とともに細胞膜における負電荷の形成に寄与し, 種々のタンパク質の細胞膜へのリクルートやチャネルの機能の制御に関与することも報告された<sup>42)</sup>.

## 5. ホスファチジルイノシトール 4-リン酸による膜接触部位における脂質輸送の制御

これまで, 細胞膜に存在するホスファチジルイノシトール 4-リン酸はホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸の前駆体としての役割がおもな機能であると考えられてきた. しかしながら近年になり, ホスファチジルイノシトール 4-リン酸は細胞内における脂質輸送の制御をつうじ, 細胞における脂質ホメオスタシスの制御にきわめて深い関連をもつことが徐々に明らかにされつつある. 細胞内における脂質輸送には, メンブレントラフィックにより制御される小胞輸送に依存的な経路のほか, 小胞輸送に非依存的な経路が存在し, これは脂質輸送タンパク質 (lipid transfer protein) と総称される一連のタンパク質により

制御される. 脂質輸送タンパク質は脂質と結合するリガンド結合ドメインをもち, それが疎水性ポケットとして機能することにより特定の脂質を囲い込み, 脂質を保持することができる. この特性により, 脂質輸送タンパク質は一方の生体膜から脂質を抽出し, その脂質を別の生体膜へと輸送することにより, 異なる生体膜のあいだの脂質輸送を媒介することができる.

## 6. オキシステロール結合タンパク質ファミリーによるホスファチジルイノシトール 4-リン酸を介した脂質輸送の制御

オキシステロール結合タンパク質ファミリーは脂質輸送タンパク質のなかでも比較的大きなファミリーを構成し, 酵母からヒトにいたるまで保存されている<sup>43)</sup>. そのプロトタイプである OSBP はオキシステロールに結合するタンパク質として 1984 年に同定された. これをきっかけに多数のホモログの存在が判明し, 現在では, 出芽酵母において 7 種, ヒトにおいて 12 種のオキシステロール結合タンパク質ファミリーのメンバーの存在が確認されている<sup>44)</sup>. オキシステロール結合タンパク質ファミリーには共通してリガンド結合ドメインが存在し, このドメインが疎水性ポケットとして機能することにより特定の脂質を囲い込む<sup>45)</sup>. 当初は, すべてのオキシステロール結合タンパク質ファミリーのもつリガンド結合ドメインは共通してステロール (出芽酵母においてはエルゴステロール, 動物細胞においてはオキシステロールおよびコレステロール) が囲い込まれると考えられていたが, 最近では, ホスファチジルイノシトール 4-リン酸やホスファチジルセリンと特異的に結合するリガンド結合ドメインの存在も判明している. さらに, オキシステロール結合タンパク質ファミリーには細胞内における局在を規定するドメインやモチーフがいくつか存在し, なかでも, FFAT モチーフとよばれる配列が多く存在する. FFAT モチーフは小胞体膜タンパク質である VAP-A および VAP-B のもつ MSP ドメインと結合し, これによりオキシステロール結合タンパク質ファミリーは小胞体膜に繫留される. また, ほぼすべてのオキシステロール結合タンパク質ファミリーには PH ドメインが存在し, 脂質を輸送すべき生体膜の認識やそれ自体の局在においてきわめて重要な役割を担う.

このような構造における特徴から, オキシステロール結合タンパク質ファミリーは機能的にはステロールの脂質の輸送や脂質ホメオスタシスの制御に関与すると予想されていた. 事実, 組換えタンパク質として発現し精製したリガンド結合ドメインを *in vitro* においてリポソームと混合すると, 一方のリポソームから他方のリポソームへのコレステロールの輸送活性が認められたことから, オキシステロール結合タンパク質ファミリーはコレステロールなどの脂質の輸送に関与する可能性が示唆された. 他方, 出芽酵母を用いた解析においては, ステロールの輸送ではな

く脂質ホメオスタシスに関与するという報告やシグナル伝達に関与するという報告がなされ、細胞レベルにおける詳細な機能の解析は遅れていた。

### 7. 小胞体とゴルジ体膜との接触部位におけるホスファチジルイノシトール 4-リン酸とコレステロールの交換輸送

出芽酵母におけるオキシステロール結合タンパク質ファミリーのメンバーである Osh4 は、以前より、*in vitro* におけるリボソームを用いたアッセイにおいてステロールを一方のリボソームから他方のリボソームへと輸送する活性をもつことが知られていた<sup>45)</sup>。2011 年、類似の *in vitro* 脂質輸送アッセイ系を用いて、Osh4 によるステロールの輸送活性がホスファチジルイノシトール 4-リン酸により特異的に阻害されること、そして、このホスファチジルイノシトール 4-リン酸によるステロールの輸送の阻害はホスファチジルイノシトール 4-リン酸が Osh4 のリガンド結合ドメインに入り込むことによる拮抗阻害であることが見いだされた<sup>46)</sup>。つまり、Osh4 のリガンド結合ドメインはステロールだけでなくホスファチジルイノシトール 4-リン酸もリガンドとすることが示唆され、実際に、Osh4 は *in vitro* においてホスファチジルイノシトール 4-リン酸を輸送する活性をもつことが示された。このホスファチジルイノシトール 4-リン酸が Osh4 の新たなリガンドであるというアイデアは、リガンド結合ドメインとホスファチジルイノシトール 4-リン酸との共結晶の X 線結晶構造解析により証明された<sup>46)</sup>。Osh4 のリガンド結合ドメインにはステロールとホスファチジルイノシトール 4-リン酸のどちらも結合が可能であるが、どちらか一方のみが入り込む空間しか存在しないことも判明した。これらのデ

ータをもとに、Osh4 はステロールとホスファチジルイノシトール 4-リン酸を交換輸送するのではないかと提唱され、この仮説は、その 2 年後、同じ研究グループにより動物細胞を用いて証明された。

2013 年、Osh4 の哺乳類におけるホモログである OSBP が、ゴルジ体に存在するホスファチジルイノシトール 4-リン酸との PH ドメインによる結合、および、小胞体膜タンパク質である VAP との FFAT モチーフを介した結合によりゴルジ体と小胞体との接触部位に局在し、小胞体において合成されたコレステロールをゴルジ体へと輸送すると同時に、ゴルジ体に豊富に存在するホスファチジルイノシトール 4-リン酸を小胞体へと逆輸送することが証明された<sup>14)</sup>。この輸送の形式は交換輸送であり、輸送される脂質の方向性は一定であった。つまり、コレステロールは小胞体からゴルジ体へ、ホスファチジルイノシトール 4-リン酸はゴルジ体から小胞体へと輸送されていた。

### 8. 小胞体と細胞膜との接触部位におけるホスファチジルイノシトール 4-リン酸とホスファチジルセリンの交換輸送

細胞膜もホスファチジルイノシトール 4-リン酸が豊富な生体膜であるが、ここでもホスファチジルイノシトール 4-リン酸が脂質の輸送に重要な役割を担うことが明らかにされた。ORP5 および ORP8 はほかのオキシステロール結合タンパク質ファミリーのメンバーとは異なり膜貫通領域をもち、小胞体に局在する<sup>43)</sup>。ORP5 は小胞体とリソソームとの接触部位において NPC1 と結合することによりコレステロールの代謝および輸送に関与することが報告されていたが<sup>47)</sup>、ORP8 の機能についてはほとんど知られていなかった。一方で、ORP5 および ORP8 と

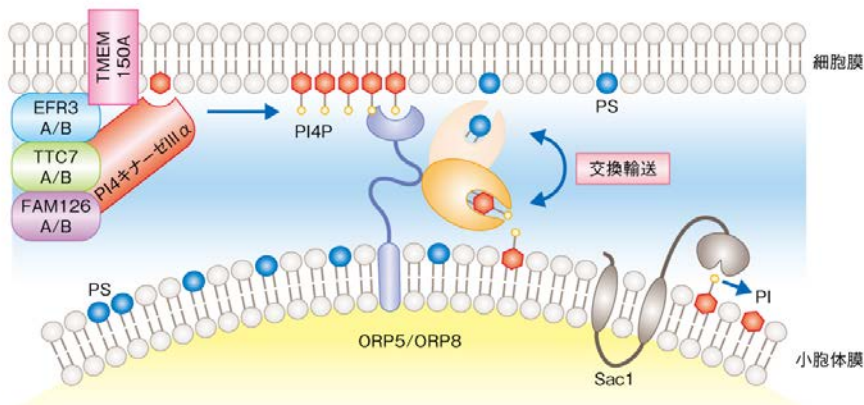


図 4 ORP5 および ORP8 によるホスファチジルイノシトール 4-リン酸とホスファチジルセリンの交換輸送の制御

細胞膜において PI4 キナーゼ III $\alpha$  複合体により合成されたホスファチジルイノシトール 4-リン酸は ORP5 および ORP8 のもつリガンド結合ドメインに囲い込まれ小胞体へと輸送される。一方、小胞体において合成されたホスファチジルセリンは ORP5 および ORP8 により細胞膜へと逆輸送される。細胞膜と小胞体のあいだにはホスファチジルイノシトール 4-リン酸の濃度勾配が存在し、これによりホスファチジルセリンの逆輸送が可能になる。

PI4P : ホスファチジルイノシトール 4-リン酸, PS : ホスファチジルセリン, PI : ホスファチジルイノシトール。

比較的相同性の高い Osh6 および Osh7 はステロールではなくホスファチジルセリンの輸送をつかさどるという報告もなされており<sup>48)</sup>, 動物細胞における ORP5 あるいは ORP8 の機能はその局在も含め解明されていなかった。

ORP5 および ORP8 は HeLa 細胞において小胞体と細胞膜との接触部位に局在し, この局在は, N 末端側に存在する PH ドメインによる細胞膜に存在するホスファチジルイノシトール 4-リン酸の認識によるものであることが明らかにされた。機能を知るうえで, ORP5 あるいは ORP8 のリガンドとなる脂質の同定は欠かせない。そこで, ORP5 のリガンド結合ドメインを動物細胞に発現させたのち精製し, 質量分析法により結合している脂質の同定を試みたところ, ホスファチジルイノシトール 4-リン酸およびホスファチジルセリンが生理的なりガンドとして同定された。これは, ORP5 および ORP8 に比較的相同性の高い Osh6 および Osh7 がステロールではなくホスファチジルセリンをリガンドとするという報告<sup>48)</sup> と一致した。*in vitro* におけるリボソーム脂質輸送アッセイおよび培養細胞を用いた機能解析により, ORP5 および ORP8 はホスファチジルイノシトール 4-リン酸とホスファチジルセリンの交換輸送を媒介することが判明した<sup>16)</sup>。すなわち, ORP5 および ORP8 は, 1) 細胞膜に存在するホスファチジルイノシトール 4-リン酸との PH ドメインによる結合を介して小胞体と細胞膜をつなぎとめ膜接触部位を形成し, 2) PI4 キナーゼ III $\alpha$  により産生されたホスファチジルイノシトール 4-リン酸を細胞膜からそれ自体のもつリガンド結合ドメインへと囲い込み, 3) ホスファチジルイノシトール 4-リン酸を小胞体へと輸送する。つづいて, 4) 小胞体において合成されたホスファチジルセリンと結合し, 5) ホスファチジルセリンを細胞膜へと逆輸送する (図 4)。このように, ホスファチジルイノシトール 4-リン酸が細胞膜から小胞体へと輸送されることにより, ホスファチジルセリンの小胞体から細胞膜への輸送が成立する。すなわち, ORP5 および ORP8 によるホスファチジルセリンの輸送はホスファチジルイノシトール 4-リン酸が駆動していたのである。

それでは, この脂質輸送の方向性はどのような分子機構により説明されるのだろうか? それにはホスファチジルイノシトール 4-リン酸が重要な鍵をにぎっている。ホスファチジルイノシトール 4-リン酸は細胞膜およびゴルジ体に豊富に存在する。これは, 細胞膜に局在する PI4 キナーゼ III $\alpha$ , および, ゴルジ体に局在する PI4 キナーゼ III $\beta$  の作用による。一方で, 小胞体にはホスファチジルイノシトール 4-リン酸はほとんど存在しない。それは, 小胞体に局在するホスファチジルイノシトール 4-リン酸のホスファターゼである Sac1 の作用による。つまり, 細胞膜およびゴルジ体と小胞体とのあいだにはホスファチジルイノシトール 4-リン酸の濃度勾配が存在するため, ホスファチジルイノシトール 4-リン酸は高濃度である細胞膜およ

びゴルジ体から低濃度である小胞体へと一方向に輸送される。これが, ホスファチジルセリンやコレステロールの逆輸送, つまり, 小胞体から細胞膜およびゴルジ体への輸送を規定する, というモデルである。このモデルは, 細胞膜で合成されたホスファチジルイノシトール 4-リン酸がなぜ小胞体で代謝されるのかという別の問題も説明する。すなわち, ホスファチジルイノシトール 4-リン酸が細胞膜から小胞体へと輸送される力が, 別の脂質の逆輸送に利用されているからである。

## おわりに

ホスファチジルイノシトール 4-リン酸は動物細胞においてもっとも多いイノシトールリン脂質のひとつであり, ゴルジ体や細胞膜, そして, エンドサイトーシス経路を構成するオルガネラ膜においては, メンブレントラフィックの制御に欠かせないイノシトールリン脂質として知られていた。しかしながら, それ以外のホスファチジルイノシトール 4-リン酸のもつ本来の機能についてはほとんどわかっていなかった。とくに, 細胞膜においては単純にホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸の前駆体としての存在意義のみが明確な機能として認識されていた。そのような背景のもと, ホスファチジルイノシトール 4-リン酸はオキシステロール結合タンパク質ファミリーによる膜接触部位を介した脂質の交換輸送に必須の役割を担うことが明らかにされた。このホスファチジルイノシトール 4-リン酸により駆動される脂質の交換輸送の分子機構や生理的な意義についてはまだまだ不明な点が多い。しかし最近, ホスファチジルセリンの代謝異常を呈する Lenz-Majewski 症候群において, オキシステロール結合タンパク質ファミリーを介したホスファチジルイノシトール 4-リン酸とホスファチジルセリンの交換輸送が関与する可能性が示唆された<sup>49)</sup>。さらに, 細胞膜やゴルジ体だけでなく, エンドソームと小胞体との接触部位においてもホスファチジルイノシトール 4-リン酸の関与する膜ダイナミクスの制御機構が明らかにされつつある<sup>50)</sup>。そして, オキシステロール結合タンパク質ファミリーのほかにも膜接触部位を介した脂質輸送を制御するタンパク質が多く存在することも明らかにされている。今後のさらなる解析により, ホスファチジルイノシトール 4-リン酸による膜ダイナミクスの制御や膜接触部位を介したたぐみな脂質輸送のしくみ, それらの生理機能がより一層解明されることを期待したい。

## 文献

- 1) Balla, T.: Phosphoinositides: tiny lipids with giant impact on cell regulation. *Physiol. Rev.*, 93, 1019-1137 (2013)

- 2) Di Paolo, G. & De Camilli, P.: Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature*, 443, 651-657 (2006)
- 3) Sasaki, T., Takasuga, S., Sasaki, J. et al.: Mammalian phosphoinositide kinases and phosphatases. *Prog. Lipid Res.*, 48, 307-343 (2009)
- 4) Takenawa, T. & Nagai, Y.: Purification of phosphatidylinositol-specific phospholipase C from rat liver. *J. Bio. Chem.*, 256, 6769-6775 (1981)
- 5) Nishizuka, Y.: The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature*, 308, 693-698 (1984)
- 6) Berridge, M. J. & Irvine, R. F.: Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*, 312, 315-321 (1984)
- 7) Lemmon, M. A.: Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9, 99-111 (2008)
- 8) Balla, A. & Balla, T.: Phosphatidylinositol 4-kinases: old enzymes with emerging functions. *Trends Cell Biol.*, 16, 351-361 (2006)
- 9) Balla, T.: Phosphatidylinositol 4-kinases. *Biochim. Biophys. Acta*, 1436, 69-85 (1998)
- 10) Hsu, F. & Mao, Y.: The Sac domain-containing phosphoinositide phosphatases: structure, function, and disease. *Front. Biol.*, 8, 395-407 (2013)
- 11) Blagoveshchenskaya, A., Cheong, F. Y., Rohde, H. M. et al.: Integration of Golgi trafficking and growth factor signaling by the lipid phosphatase SAC1. *J. Cell Biol.*, 180, 803-812 (2008)
- 12) Stefan, C. J., Manford, A. G., Baird, D. et al.: Osh proteins regulate phosphoinositide metabolism at ER-plasma membrane contact sites. *Cell*, 144, 389-401 (2011)
- 13) Dickson, E. J., Jensen, J. B., Vivas, O. et al.: Dynamic formation of ER-PM junctions presents a lipid phosphatase to regulate phosphoinositides. *J. Cell Biol.*, 213, 33-48 (2016)
- 14) Mesmin, B., Bigay, J., Moser von Filseck, J. et al.: A four-step cycle driven by PI(4)P hydrolysis directs sterol/PI(4)P exchange by the ER-Golgi tether OSBP. *Cell*, 155, 830-843 (2013)
- 15) Moser von Filseck, J., Copic, A., Delfosse, V. et al.: Phosphatidylserine transport by ORP/Osh proteins is driven by phosphatidylinositol 4-phosphate. *Science*, 349, 432-436 (2015)
- 16) Chung, J., Torta, F., Masai, K. et al.: PI4P/phosphatidylserine countertransport at ORP5- and ORP8-mediated ER-plasma membrane contacts. *Science*, 349, 428-432 (2015)
- 17) Wakana, Y., Kotake, R., Oyama, N. et al.: CARTS biogenesis requires VAP-lipid transfer protein complexes functioning at the endoplasmic reticulum-Golgi interface. *Mol. Biol. Cell*, 26, 4686-4699 (2015)
- 18) McPherson, P. S., Garcia, E. P., Slepnev, V. I. et al.: A presynaptic inositol-5-phosphatase. *Nature*, 379, 353-357 (1996)
- 19) Nakatsu, F., Messa, M., Nandez, R. et al.: Sac2/INPP5F is an inositol 4-phosphatase that functions in the endocytic pathway. *J. Cell Biol.*, 209, 85-95 (2015)
- 20) Flanagan, C. A., Schnieders, E. A., Emerick, A. W. et al.: Phosphatidylinositol 4-kinase: gene structure and requirement for yeast cell viability. *Science*, 262, 1444-1448 (1993)
- 21) Flanagan, C. A. & Thorner, J.: Purification and characterization of a soluble phosphatidylinositol 4-kinase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 267, 24117-24125 (1992)
- 22) Walch-Solimena, C. & Novick, P.: The yeast phosphatidylinositol-4-OH kinase Pik1 regulates secretion at the Golgi. *Nat. Cell Biol.*, 1, 523-525 (1999)
- 23) Audhya, A., Foti, M. & Emr, S. D.: Distinct roles for the yeast phosphatidylinositol 4-kinases, Stt4p and Pik1p, in secretion, cell growth, and organelle membrane dynamics. *Mol. Biol. Cell*, 11, 2673-2689 (2000)
- 24) Hendricks, K. B., Wang, B. Q., Schnieders, E. A. et al.: Yeast homologue of neuronal frequenin is a regulator of phosphatidylinositol-4-OH kinase. *Nat. Cell Biol.*, 1, 234-241 (1999)
- 25) Godi, A., Pertile, P., Meyers, R. et al.: ARF mediates recruitment of PtdIns-4-OH kinase- $\beta$  and stimulates synthesis of PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> on the Golgi complex. *Nat. Cell Biol.*, 1, 280-287 (1999)
- 26) Hilfiker, S.: Neuronal calcium sensor-1: a multifunctional regulator of secretion. *Biochem. Soc. Trans.*, 31, 828-832 (2003)
- 27) Sasaki, J., Ishikawa, K., Arita, M. et al.: ACBD3-mediated recruitment of PI4KB to picornavirus RNA replication sites. *EMBO J.*, 31, 754-766 (2012)
- 28) Klima, M., Toth, D. J., Hexnerova, R. et al.: Structural insights and *in vitro* reconstitution of membrane targeting and activation of human PI4KB by the ACBD3 protein. *Sci. Rep.*, 6, 23641 (2016)



- 29) Wang, Y. J., Wang, J., Sun, H. Q. et al.: Phosphatidylinositol 4 phosphate regulates targeting of clathrin adaptor AP-1 complexes to the Golgi. *Cell*, 114, 299-310 (2003)
- 30) Wood, C. S., Schmitz, K. R., Bessman, N. J. et al.: PtdIns4P recognition by Vps74/GOLPH3 links PtdIns 4-kinase signaling to retrograde Golgi trafficking. *J. Cell Biol.*, 187, 967-975 (2009)
- 31) Dippold, H. C., Ng, M. M., Farber-Katz, S. E. et al.: GOLPH3 bridges phosphatidylinositol-4- phosphate and actomyosin to stretch and shape the Golgi to promote budding. *Cell*, 139, 337-351 (2009)
- 32) Hanada, K., Kumagai, K., Yasuda, S. et al.: Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature*, 426, 803-809 (2003)
- 33) Yoshida, S., Ohya, Y., Goebel, M. et al.: A novel gene, *STT4*, encodes a phosphatidylinositol 4-kinase in the *PKC1* protein kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 269, 1166-1172 (1994)
- 34) Baird, D., Stefan, C., Audhya, A. et al.: Assembly of the PtdIns 4-kinase Stt4 complex at the plasma membrane requires Ypp1 and Efr3. *J. Cell Biol.*, 183, 1061-1074 (2008)
- 35) Audhya, A. & Emr, S. D.: Stt4 PI 4-kinase localizes to the plasma membrane and functions in the Pkc1-mediated MAP kinase cascade. *Dev. Cell*, 2, 593-605 (2002)
- 36) Nakagawa, T., Goto, K. & Kondo, H.: Cloning, expression, and localization of 230-kDa phosphatidylinositol 4-kinase. *J. Biol. Chem.*, 271, 12088-12094 (1996)
- 37) Balla, A., Tuymetova, G., Tsiomenko, A. et al.: A plasma membrane pool of phosphatidylinositol 4-phosphate is generated by phosphatidylinositol 4-kinase type-III alpha: studies with the PH domains of the oxysterol binding protein and FAPP1. *Mol. Biol. Cell*, 16, 1282-1295 (2005)
- 38) Balla, A., Kim, Y. J., Varnai, P. et al.: Maintenance of hormone-sensitive phosphoinositide pools in the plasma membrane requires phosphatidylinositol 4-kinase III  $\alpha$ . *Mol. Biol. Cell* 19, 711-721 (2008)
- 39) Nakatsu, F., Baskin, J. M., Chung, J. et al.: PtdIns4P synthesis by PI4KIII  $\alpha$  at the plasma membrane and its impact on plasma membrane identity. *J. Cell Biol.*, 199, 1003-1016 (2012)
- 40) Chung, J., Nakatsu, F., Baskin, J. M. et al.: Plasticity of PI4KIII  $\alpha$  interactions at the plasma membrane. *EMBO Rep.*, 16, 312-320 (2015)
- 41) Baskin, J. M., Wu, X., Christiano, R. et al.: The leukodystrophy protein FAM126A (hyccin) regulates PtdIns(4)P synthesis at the plasma membrane. *Nat. Cell Biol.*, 18, 132-138 (2016)
- 42) Hammond, G. R., Fischer, M. J., Anderson, K. E.: PI4P and PI(4,5)P<sub>2</sub> are essential but independent lipid determinants of membrane identity. *Science*, 337, 727-730 (2012)
- 43) Olkkonen, V. M. & Li, S.: Oxysterol-binding proteins: sterol and phosphoinositide sensors coordinating transport, signaling and metabolism. *Prog. Lipid Res.*, 52, 529-538 (2013)
- 44) Lehto, M., Laitinen, S., Chinetti, G. et al.: The OSBP-related protein family in humans. *J. Lipid Res.*, 42, 1203-1213 (2001)
- 45) Raychaudhuri, S. & Prinz, W. A.: The diverse functions of oxysterol-binding proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 26, 157-177 (2010)
- 46) de Saint-Jean, M., Delfosse, V., Douguet, D. et al.: Osh4p exchanges sterols for phosphatidylinositol 4-phosphate between lipid bilayers. *J. Cell Biol.*, 195, 965-978 (2011)
- 47) Du, X., Kumar, J., Ferguson, C. et al.: A role for oxysterol-binding protein-related protein 5 in endosomal cholesterol trafficking. *J. Cell Biol.*, 192, 121-135 (2011)
- 48) Maeda, K., Anand, K., Chiapparino, A. et al.: Interactome map uncovers phosphatidylserine transport by oxysterol-binding proteins. *Nature*, 501, 257-261 (2013)
- 49) Sohn, M., Ivanova, P., Brown, H. A. et al.: Lenz-Majewski mutations in *PTDSS1* affect phosphatidylinositol 4-phosphate metabolism at ER-PM and ER-Golgi junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 113, 4314-4319 (2016)
- 50) Dong, R., Saheki, Y., Swarup, S. et al.: Endosome-ER contacts control actin nucleation and retromer function through VAP-dependent regulation of PI4P. *Cell*, 166, 408-423 (2016)

## 著者プロフィール

中津 史 (Fubito Nakatsu)

略歴: 2001年 千葉大学大学院医学研究科 修了, 同年 金沢大学がん研究所 博士研究員, 2002年 理化学研究所 研究員, 2006年 米国 Yale 大学 School of Medicine 研究員を経て, 2014年より新潟大学大学院医歯学総合研究科 准教授.



**研究テーマ:** イノシトールリン脂質による膜ダイナミクス 生物学に興味をもっている。  
の制御機構を中心に, 最近, オルガネラの膜接触部位の

© 2016 中津 史 Licensed under a Creative Commons 表示 2.1 日本 License