

様式3

神戸大学バイオシグナル総合研究センター共同利用研究報告書

2020年3月11日

神戸大学バイオシグナル総合研究センター長 殿

所属機関・部局名 東京医科歯科大学・難治疾患研究所
 職 名 助教
 研究代表者名 長谷川 純矢

下記のとおり2019年度の共同利用研究成果を報告します。

記

(課題番号:191001)

1. 共同利用研究 課題名	酸化ストレスによるイノシトールリン脂質変動の制御機構の解明		
2. 共同利用研究 目的	活性酸素ストレスである過酸化水素処理で脂質代謝酵素の細胞内局在を詳細に検討するため、受入研究室が保有する全反射照明蛍光顕微鏡(TIRF)を用いて、細胞膜近傍の局在を観察する。		
3. 共同利用研究 期間	2019年7月1日 ～ 2020年3月31日		
4. 共同利用研究組織			
氏 名	所属部局等	職名等	役割分担
(研究代表者) 長谷川 純矢	東京医科歯科大学 難治疾患研究所	助教	研究計画の立案、実施
(分担研究者)			
5. センター内受入研究者	研究部門・ 分野名	シグナル機能制御部門 生体膜機能研究分野	氏 名 伊藤 俊樹

※ 次の6～9の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6～9の項目全体では1頁に収めて下さい。

(課題番号:191001)

6. 共同利用研究計画

本申請課題は、**過酸化水素処理によるPI(3,4)P2レベル増加メカニズムを解明すること**を目的とし、以下の研究計画を遂行する予定にしている。

1) 過酸化水素処理による PIPs 代謝酵素の局在変動

申請者はすでに過酸化水素処理で局在が変動する酵素 (SHIP2 及び PI3KC2 α) を見出している。すでに保有している幾つかの PIPs 代謝酵素の局在変動を検証したが、まだ全てを網羅できていない。哺乳類細胞には約 30 種類の PIPs 脱リン酸化酵素及び約 10 種類のリン酸化酵素があるため、まだ完了していない PIPs 代謝酵素のクローニングを実施する。それらのクローニングが完了した後、まずはコンフォーカル顕微鏡にてコントロール(無処理)と比べ過酸化水素処理で局在が変動する酵素を見出す

2) 過酸化水素処理による各種 PIPs の局在変動

PIPs 代謝酵素だけでなく、過酸化水素処理による PIPs 自体の局在も観察する。PIPs の局在を観察する場合、脂質である PIPs を直接観察方法がないため、各 PIPs 特異的に結合するタンパク質ドメインの局在を観察する方法で行う。PIPs の中でも特に、PI(3,4)P2 特異的に結合することが知られている **Tapp1 PH ドメイン**を用いて、過酸化水素処理による PI(3,4)P2 の細胞内局在の変動をコンフォーカル顕微鏡を用いて検証する。

3) 過酸化水素による PI(3,4)P2 合成酵素の同定

1.で見出した酵素が過酸化水素処理による PI(3,4)P2 合成の責任酵素であるか検証するため、それらのノックアウト細胞を CRISPR/Cas9 システムで作成する。本細胞を作成後、過酸化水素処理し PI(3,4)P2 レベルを測定することで、どの酵素が過酸化水素による PI(3,4)P2 レベル上昇の鍵分子なのか同定する。

7. 共同利用研究の成果

上記研究計画の 1) のクローニングに関しては、ほぼ全て完了した。クローニングした代謝酵素に関して、過酸化水素処理で局在が変動するか検討した結果、SHIP2 及び PI3KC2 α 以外、変化した酵素は見当たらなかった。そこで、CRISPR/Cas9 システムで SHIP2、PI3KC2 α のノックアウト HEK293 細胞を作製(各々4クローン、1クローン作製できた)し、過酸化水素処理により PI(3,4)P2 レベルの変動を検討した。PI3KC2 α の KO 細胞では親株と同程度の PI(3,4)P2 量の上昇が認められたが、SHIP2 の KO 細胞では過酸化水素処理による PI(3,4)P2 量の上昇が約 10%程度まで抑制された。これらのことから、酸化ストレスに伴う PI(3,4)P2 産生は主に SHIP2 が担っていることが強く示唆された。現在は引き続き、SHIP2 に焦点を当て、酸化ストレスによる PI(3,4)P2 上昇とがんなどの病態との関連を検討している。

8. 共同利用研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本センターの担当教員の氏名の記載、又はこの共同利用研究に基づくと記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

現時点ではありません。

9. 共同利用研究に関連した受賞、博士学位論文の取得、大型研究プロジェクトや競争的資金の獲得等がありましたらご記入ください。

現時点ではありません。