

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成10年度博士課程 進学

氏 名 篠原 正浩
指導教官名 福井 泰久

論文題目

増殖因子によるアクチン再構成を制御する
ホスファチジルイノシトール三リン酸結合タンパク質 p70

Phosphatidylinositol 3-kinase (PI(3)K) は細胞外からの増殖因子や分化因子により活性化されるリン脂質キナーゼで、細胞内情報伝達因子の一つである。この PI(3)K は、細胞内において phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PtdIns 4,5-P₂) を基質とし、その D-3 位をリン酸化することにより PtdIns 3,4,5-P₃ を産生する。生成した PtdIns 3,4,5-P₃ は更にセカンドメッセンジャーとして働き、下流因子へと細胞外からのシグナルを伝えるものと考えられている。近年、PI(3)K が関与している細胞内における現象が明らかにされており、遺伝子の転写、小胞輸送、細胞骨格の再構成など、様々な細胞応答を調節していることが報告されている。セカンドメッセンジャーである PtdIns 3,4,5-P₃ に結合するタンパク質としていくつか同定されているが、それだけでは PI(3)K が関わる多岐にわたる生命現象の全てを説明することはできない。我々の研究室では PtdIns 3,4,5-P₃ に結合するタンパク質を PtdIns 3,4,5-P₃ アナログビーズを用いて精製し、同定を行った。いくつかの PtdIns 3,4,5-P₃ 結合タンパク質が同定されたが、本研究においては 70kDa のタンパク質、p70 についてその機能解明を試みた。

P70 は、B 細胞特異的 immunoglobulin class switch recombinase complex の構成因子、swap-70 としてマウス脾臓 B 細胞より同定されていた。Swap-70 は、

pleckstrin homology (PH) ドメイン、3つの核移行シグナル(NLS)、1つの核外移行シグナル (NES) を持つ。抗体のクラススイッチを誘導する刺激により、脾臓B細胞の核内に発現が見られることが報告されているが、これらの実験結果について再現させることはできなかった。そこで、このタンパク質について PI(3)K 依存的な他の機能があるものと考え、新たな機能を解明することにした。

1. 増殖因子による PI(3)K 依存的ラップリング形成への関与

P70 の cDNA と green fluorescent protein (GFP) の融合タンパク質 GFP-p70 を COS-7 細胞に発現させて、GFP-p70 の局在を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。その結果、NLS の存在にもかかわらず細胞質に局在することが判明した。活性化型 PI(3)K を共発現させることによりこの局在は細胞膜へと変化し、PI(3)K の阻害剤である wortmannin を作用させると細胞膜移行が抑制された。欠失変異体および PtdIns 3,4,5- P_3 との結合能を欠いた PH ドメインの点変異体 (R230C) を用いた同様の実験により、この細胞膜への移行には PH ドメインが必要であることが判明した。これらの結果により、p70 は細胞質に存在するが、細胞膜上に PtdIns 3,4,5- P_3 が生成することにより PH ドメインを介して局在を変化させることが考えられた。

また、GFP-p70 を発現させた COS-7 細胞を、epidermal growth factor (EGF) で刺激して局在の変化を観察した。刺激後3分で強い細胞膜への局在が見られた。この時のアクチンの状態を観察したところ、p70 の局在はラップリング膜と一致した。このラップリング膜への移行は、GFP-p70 を発現させた NIH3T3 細胞を、platelet derived growth factor (PDGF) で刺激した時にも観察され、wortmannin で抑制された。また、PtdIns 3,4,5- P_3 と結合しない R230C 変異体および C 末端領域を欠いた変異体では、ラップリング膜の形成は抑制された。

更に、374、375 番目のリジン残基をアラニン残基に変えた変異体 (K374A/K375A) を発現させた細胞におけるアクチンの状態を観察したところ、非刺激時においてもラップリング膜を形成していた。このことは、K374A/K375A が p70 の恒常的活性型変異であることを示している。また、低分子量 G タンパク質 Rac の dominant negative 変異体や GTP 結合型 Rac 特異的に結合する PAK1(p21-activated kinase)の CRIB (Cdc42/Rac interactive binding) ドメインとの共発現により、この K374A/K375A 変異体によるラップリング膜の形成は抑制されることが判明した。

以上の結果より、p70 は増殖因子による PI(3)K 依存的なラフリング膜形成に関与し、下流には低分子量 G タンパク質 Rac が存在することが示唆された。

2. p70 による Rac の活性化およびグアニンヌクレオチド交換反応促進

in vivo における p70 による Rac に対する活性化について検討を行った。COS-7 細胞に glutathione S-transferase (GST) を融合した Rac を、p70 およびその変異体を単独または活性化型 PI(3)K と共に発現させ、Rac に結合した GTP/GDP 比を測定した。P70 wild type または p70 K374A/K375A を共発現させることにより Rac に結合している GTP/GDP 比は上昇し、活性化型 PI(3)K と p70 wild type の共発現により更に上昇した。それに対して p70 R230C と活性化型 PI(3)K の共発現では GTP/GDP 比の上昇を抑制した。これらの結果より、p70 は PI(3)K 依存的な Rac の活性化因子であることが判明した。

また、Maltose binding protein (MBP) を融合した p70、GST Rac を大腸菌で発現させて精製し、*in vitro* における p70 と Rac の結合実験を行った。その結果、Mg²⁺ 存在下において結合せず、Mg²⁺ 非存在下においてのみ結合が見られた。P70 はヌクレオチドを結合していない中間体の Rac と結合するグアニンヌクレオチド交換因子 (guanine nucleotide exchange factor; GEF) の性質を示した。この結合は Rac 特異的であり、同じファミリーに属する Rho や Cdc42 との結合は見られなかった。この結果から、p70 は Rac 特異的 GEF である可能性が示唆された。

上記の実験結果から p70 は Rac 特異的 GEF であることが予想されたので、*in vitro* におけるグアニンヌクレオチド交換反応に対する影響について検討を行った。GDP を結合させた Rac を、³H]GDP 存在下において p70 または PtdIns 3,4,5-P₃ を結合させた p70 と混合、経時的に Rac と結合した ³H]GDP を定量した(binding assay)。その結果、Rac のみに比べて p70 存在下において交換反応が促進され、PtdIns 3,4,5-P₃ を結合させた p70 存在下では更に促進された。また、あらかじめ ³H]GDP を結合させ、GTP と交換する release assay においても同様の交換反応の促進が認められた。以上の実験により、p70 は Rac に対する GEF として PtdIns 3,4,5-P₃ 依存的に働くことが判明した。

3. p70 によるストレスファイバーの消失および Rho の活性調節

細胞を増殖因子で刺激すると、PI(3)K 依存的にアクチンストレスファイバーの消失が起こることが報告されている。K374A/K375A 変異体を発現した細胞に

においてラップリングが起こることは上述の通りであるが、同時にストレスファイバーの消失も観察された。

低分子量 G タンパク質 Rho の活性化によりストレスファイバーが形成されることが知られているため、ストレスファイバーの消失には GTP 型 Rho の減少が起こるものと考えた。

Rho を不活性化する因子として p190 RhoGAP を候補として考え、この p190 RhoGAP の局在を観察した。GFP p70 を発現した COS-7 細胞を EGF で刺激し、抗 p190 RhoGAP 抗体を用いて免疫染色した。刺激していない細胞においては p70 と p190 RhoGAP との局在の一致は観察されなかったが、刺激した細胞においてラップリング膜上での局在の一致を見出した。

ストレスファイバーの消失および p190 RhoGAP との局在の一致から、p70 による GTP 型 Rho の減少が予想されたため、*in vivo* における Rho の GTP/GDP 比への p70 の影響について検討した。GST Rho を COS-7 細胞に発現させて、Rac と同様に GTP/GDP 比を定量した。P70 wild type または p70 K374A/K375A を共発現させることにより Rho の GTP/GDP 比は減少した。また、活性化型 PI(3)K によっても Rho の GTP/GDP 比が減少することも判明した。以上の結果から p70 は PI(3)K の下流で p190 RhoGAP を活性化し、GTP 型 Rho を減少させることによりストレスファイバーを消失させる可能性が示唆された。

4. 本研究のまとめ

PtdIns 3,4,5- P_3 結合タンパク質 p70 は、増殖因子刺激に応答して起こるラップリング形成およびストレスファイバー消失という PI(3)K 依存的なアクチン再構成を制御している因子であることが判明した。ラップリング形成においては、Rac に対して GEF として働き、直接 Rac を活性化するものと思われる。また、ストレスファイバーの消失に関しては、ラップリング膜上で p190 RhoGAP と局在を共にすることで GAP 活性を上昇させ、Rho の不活性化を引き起こすものと考えられる。従来より PI(3)K はラップリングなどのアクチン再構成を調節していることが示されていたが、それがどのような機構によるものかは明らかにされていなかった。また最近、Rac と Rho は拮抗的に調節される場合が多いことが示唆されているが、その実体も不明であった。本研究により p70 は PI(3)K 依存的アクチン再構成において、この拮抗的調節を司る重要な因子であることが示唆された。