

# 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 篠原正浩

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 (PI 4,5-P<sub>2</sub>) を基質とし、そのD-3位をリン酸化することによりPI 3,4,5-P<sub>3</sub>を産生する。生成したPI 3,4,5-P<sub>3</sub>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。本研究はPI 3,4,5-P<sub>3</sub>に結合するタンパク質をPI 3,4,5-P<sub>3</sub>アナログビーズを用いて精製し、同定された70kDaのタンパク質、p70についてPI (3) K 依存的な機能解明を試み、PI(3)Kの関与する生命現象を分子レベルで解明を行ったものである。

はじめに、p70の細胞内における局在を検討した結果、細胞質に局在すること、また、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することを明らかにした。欠失変異体およびPI 3,4,5-P<sub>3</sub>との結合能を欠いたPHドメインの点変異体を用いた実験により、この細胞膜への移行にはPHドメインが必要であることも示している。これらの結果より、p70は細胞質に存在し、細胞膜上にPI 3,4,5-P<sub>3</sub>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を明らかにした。さらに、増殖因子刺激時におけるp70の局在についても検討を行っている。刺激後、p70の局在はアクチンとの二重染色によりラッフリング膜と一致することを明らかにした。このラッフリング膜への移行はwortmanninで抑制されること、また、PI 3,4,5-P<sub>3</sub>と結合しない変異体およびC末端領域を欠いた変異体では、ラッフリング膜の形成は抑制されることも示している。

次に、P70の374、375番目のリジン残基をアラニン残基に変えた変異体を発現させた細胞において、増殖因子非依存的にラッフリング膜を形成していることを示し、この変異体がp70の恒常的活性化型変異体であると推測している。また、低分子量Gタンパク質Racのdominant negative変異体との共発現により、ラッフリング膜の形成が抑制されることを示し、p70の下流にRacが存在することを明らかにした。

さらに、*in vivo*におけるRacに対する活性化について検討を行っている。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。野生型P70または活性化型p70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と野生型p70の共発現により更に上昇していることを示し、p70はRacの活性化因子であることを明らかにした。

また *in vitro*におけるp70とRacの結合実験を行ったところ、Mg<sup>2+</sup>非存在下においてのみRac特異

的結合が見られ、グアニンヌクレオチド交換因子の性質を示すことを明らかにした。p70がRac特異的グアニンヌクレオチド交換因子であることを推測し、*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い、p70はPI 3,4,5-P<sub>3</sub>依存的なRacに対するグアニンヌクレオチド交換因子であることを示している。

一方、活性化型p70を発現した細胞においてストレスファイバー構造の消失も示し、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推測している。Rhoを不活性化する因子としてp190 RhoGAPの局在を検討した結果、増殖因子刺激した細胞においてラッフリング膜上でのp70との局在の一致を示した。次に、*in vivo*におけるRhoのGTP/GDP比へのp70の影響について検討をRacと同様に行っている。その結果、野生型p70または活性化型p70を共発現させることによりRhoのGTP/GDP比は減少し、活性化型PI(3)KによってもRhoのGTP/GDP比が減少することを明らかにした。

以上、本論文はPI 3,4,5-P<sub>3</sub>結合タンパク質p70が、増殖因子刺激に応答して起こるラッフ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を示したもので、学術上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。