

論文の内容の要旨

応用動物科学専攻
平成 13 年度博士課程 入学
氏名 株田智弘
指導教官名 高橋伸一郎

論文題目

インスリン受容体基質 (IRS)-3の転写制御因子としての新規機能の解明

IRS は、活性化されたインスリン受容体・インスリン様成長因子 (IGF) 受容体などにより細胞膜付近でチロシンリン酸化され、このリン酸化を介してシグナルを下流に伝える分子で、これまでに IRS-1 から 4 の 4 つの分子種が報告されている。いずれの IRS も、pleckstrin homology (PH) ドメイン、phosphotyrosine binding (PTB) ドメインという相同性の高い領域を有しているが、それ以外の領域については、受容体によりチロシンリン酸化される数カ所のモチーフを除いて、アミノ酸配列の共通性が低いことが明らかになっている。これらの差異は、それぞれの IRS が異なる機能を有していることを示唆しているが、IRS の生理的意義の違いについては未だに不明である。そこで、本研究では、IRS の機能の差異を細胞内局在の違いから明らかにすることを目的とした。

1. IRS の細胞内局在の解析

はじめに、green fluorescent protein (GFP) とそれぞれの IRS との融合タンパク質を COS-7 細胞に過剰発現させ、蛍光顕微鏡を用いて、細胞内局在を検討した。その結果、GFP-IRS-1、GFP-IRS-2 は細胞質に斑点状に存在、GFP-IRS-4 は細胞質または細胞膜に存在したのに対して、GFP-IRS-3 は細胞質や細胞膜のみならず核にも局在することを発見した。また、tag のつかない IRS-3 を過剰発現させた COS-7 細胞を抗 IRS-3 抗体で免疫染色した場合にも、IRS-3 が主に核に存在することがわかった。同時に、IRS-3 を発現させた COS-7 細胞を細胞質・細胞膜・核に分画後、各画分について抗 IRS-3 抗体を用いたイムノブロットを行い、IRS-3 が核画分に存在することを確認した。また、IRS-3 の発現が報告されているラット単離脂肪細胞を抗 IRS-3 抗体で免疫染色、ラット脂肪組織から調製した単離核抽出液を抗 IRS-3 抗体でイムノブロットするなどにより、内在性 IRS-3 も核に存在することを明らかにした。

2. IRS-3 の核局在化機構の解析

(1) IRS-3 の核局在とチロシンリン酸化

最初に、核内と核外の IRS-3 のチロシンリン酸化状態を調べた。IRS-3 を発現させた HEK 293T 細胞を細胞質・細胞膜・核に分画後、各画分について抗 IRS-3 抗体と抗リン酸化チロシン抗体を用いたイムノブロットを行った。その結果、細胞質・細胞膜画分にはリン酸化 IRS-3 と非リン酸化 IRS-3 が存在したが、核画分にはリン酸化 IRS-3 のみが観察され、チロシンリン酸化が IRS-3 の核移行に関与する可能性が考えられた。そこで、IRS-3-GFP を発現させた HEK 293T 細胞をインスリンで処理後、経時的に細胞内局在を調べたが、インスリン刺激に応答した大きな変化は観察されなかった。また、IRS-3 分子内のそれぞれのチロシン残基をフェニルアラニンに変異させた mutant IRS-3、あるいは、全てのチロシン残基をフェニルアラニンに変異させた mutant IRS-3 を GFP と融合させて局在を調べたところ、wild type と同様の局在を示した。これらの結果から、IRS-3 の核移行にチロシンリン酸化は必須ではないが、IRS-3 は、核に移行するまでの過程あるいは核内でチロシンリン酸化されると考えられた。

(2) IRS-3 の核局在に必要な領域の検討

続いて、IRS-3 の種々の deletion mutants を GFP 融合蛋白質として COS-7 細胞に発現後、細胞内局在を検討した。その結果、少なくとも、PTB ドメイン内で他の IRS には存在しない 192-223 アミノ酸部分が、IRS-3 の核移行に重要な領域であることが明らかとなった。

(3) IRS-3 と核輸送タンパク質との相互作用

IRS-3 は、分子内に典型的な classical nuclear localization signal (NLS) を有していないため、核輸送タンパク質である Importin β や Transportin と結合する可能性が考えられた。そこで、GST と融合した Importin β および Transportin を用いて pull-down assay を行ったところ、IRS-3 と両者の相互作用が確認された。さらに IRS-3 の種々の deletion mutants を用いた pull-down assay の結果、Importin β および Transportin は IRS-3 の PH ドメインに結合することがわかった。

以上の結果より、IRS-3 は PH ドメインを介して核輸送タンパク質と結合し核内に輸送されるが、同時に、PTB ドメインは、IRS-3 特異的な核移行に重要な役割を果たしている結論した。

3. IRS-3 の転写制御活性の解析

次に、核内 IRS-3 が転写制御活性を有しているか、検討した。Gal4 結合配列制御下でルシフェラーゼが発現するレポータープラスミドを導入した HEK 293 細胞に、IRS-3 の全長、N 末端部分、C 末端部分をそれぞれ Gal4 DNA binding domain との融合タンパク質として発現させ、ルシフェラーゼ活性を測定した。Gal4 DNA binding domain のみを発現した対照細胞と比較し、IRS-3 C 末端部分を発現した細胞では、ルシフェラーゼ活性が有意に上昇した。これに対して、IRS-1、IRS-2、IRS-4 の C 末端部分について同様な検討を行ったところ、ルシフェラーゼ活性の上昇は観察されなかった。一方、IRS-3 を過剰発現した NIH 3T3 細胞について DNA マイクロアレイ解析を行い、IRS-3 の過剰発現が、複数種の遺伝子の mRNA 量に影響を与えることを明らかにした。一連の結果は、IRS-3 が転写制御活性を有する可能性を示していた。

4. IRS-3 と相互作用する転写制御因子の解析

(1) IRS-3 と相互作用する転写制御因子の検索

IRS-3 分子内に転写因子が有する典型的な DNA binding domain が認められないことから、IRS-3 は他の転写制御因子の co-activator として働く可能性が考えられた。そこで、IRS-3 と相互作用する転写制御因子を検索するために、転写促進活性を有しない IRS-3 の N 末端部分を bait、ヒト胎盤 cDNA ライブラリーを prey とした yeast two-hybrid screening を行った。その結果、Smad7 や Bcl-3 などの遺伝子取得に成功した。

(2) IRS-3 と Smad ファミリータンパク質の相互作用

Smad7 は、Smad6 とともに、TGF- β シグナルを抑制する分子であり、これに対して、Smad2、Smad3、Smad4 は TGF- β シグナルを伝達する転写制御因子であることが知られている。まず、共免疫沈降法により細胞内での

IRS-3 と Smad7 の結合を確認した。次に、GST と融合した Smad2、Smad3、Smad4、Smad6、Smad7 を用いて pull-down assay を行ったところ、IRS-3 は Smad7 の他に、Smad2、Smad3 と相互作用した。この結果から、IRS-3 が Smad による転写制御に関わっている可能性が示された。

(3) IRS-3 と Bcl-3 との相互作用および NF- κ B の co-activator としての IRS-3 の機能

Bcl-3 は核内に存在し、TNF- α 刺激などにより核移行した p50 NF- κ B と結合して転写を促進することが知られている分子である。初めに、共免疫沈降法により細胞内での IRS-3 と Bcl-3 の結合を確認した。次に、GST と融合させた Bcl-3 の deletion mutants を用いた pull-down assay により、IRS-3 は Bcl-3 の ankyrin repeat domain に結合することを明らかにした。続いて、NF- κ B 結合部位制御下にルシフェラーゼが発現するレポータープラスミド、pNF- κ B-Luc を導入した HEK 293 細胞に、IRS-3 を共発現し、TNF- α 処理後、ルシフェラーゼ活性を指標に転写活性を測定した。IRS-3 を発現させた細胞では、対照細胞と比較してルシフェラーゼ活性が有意に上昇していた。さらに、クロマチン免疫沈降法により、IRS-3 は、TNF- α 依存的に pNF- κ B-Luc と相互作用することも確認した。他の結果も併せると、IRS-3 や Bcl-3 はそもそも核内に存在し、核移行してくる p50 NF- κ B と結合して co-activator として機能すると考えられた。一方、IGF-I 処理により NF- κ B を活性化させた際は、IRS-3 の発現により NF- κ B の転写促進活性が完全に抑制され、IRS-3 は、IGF-I シグナル、TNF- α シグナルに応答して起こる NF- κ B を介した転写制御に異なる影響を及ぼすことが明らかとなった。

5. IRS-3 の転写制御活性を介した生理作用の解析

これまで、いくつかの細胞系において、TNF- α 刺激に応答した NF- κ B の活性化は、アポトーシス抑制因子として知られる Bcl-xL や H-IAP1 などの遺伝子の転写を促進し、その結果、細胞死抑制を引き起こすことが報告されている。そこで、IRS-3 を HEK 293 細胞に安定的に発現した細胞株を作製し、TNF- α で処理後、Bcl-xL や H-IAP1 の mRNA 量を RT-PCR 法で測定した。その結果、IRS-3 高発現細胞では、対照細胞と比較して、TNF- α 処理に応答した BclxL、HIAP-1 の mRNA 量が増加していた。更に、 β -Galactosidase 発現ベクターと共に、IRS-3 発現ベクターを一過的に HEK 293 細胞に発現させ、TNF- α 処理により細胞死を誘導後、 β -Galactosidase assay により細胞の生存率を検討した。その結果、IRS-3 を発現させた細胞では対照細胞と比較して細胞死が抑制されることが明らかとなった。以上の結果から、IRS-3 は、NF- κ B の転写促進活性を増強することにより、細胞死抑制を誘導すると結論した。

以上、本論文において、IRS-3 は、これまでに知られていたように、細胞質においてインスリン受容体・IGF-I 受容体の基質として働くだけではなく、他の IRS と異なり核内に存在し、転写制御因子と相互作用、遺伝子の転写活性を制御するという新しい機能を有していることが、はじめて明らかとなった。