

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 株田 智弘

インスリン受容体基質 (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) -I 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。本研究は、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もので、序論、本章の五章、そして終章からなる。

まず、序論では、本研究の背景および意義を概説し、本研究の目的と本論文の構成について述べている。

第一章では、green fluorescent protein (GFP) とそれぞれの IRS との融合タンパク質を培養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ている。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。更に、脂肪細胞の免疫染色および生化学的細胞分画により、内在性 IRS-3 も核に存在することを明らかにした。

第二章では、IRS-3 の核局在機構を解析し、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を見出した。一方、IRS-3 の PH ドメインに、importin β および transportin が結合することがわかった。他の結果も併せると、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と結論している。

第三章では、核内 IRS-3 が転写制御活性を有しているか、検討している。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 HEK293 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。その結果、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することが明らかとなった。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ず、IRS-3 が特異的に転写制御活性を有していることを確認した。

第四章では、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 を行い、Smad7 や Bcl-3 などの転写制御因子の遺伝子取得に成功した。Pull-down assay により、IRS-3 は Smad7 の他に、Smad2、Smad3 とも相互作用し、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。また、同様な assay により、IRS-3 は、Bcl-3 のアンキリン・リピートに結合することを明らかにした。このように、IRS-3 がいくつかの転写制御因子と相互作用することを見出した。

第五章では、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を導入した HEK293 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おり、他の結果も併せ、IRS-3 と Bcl-3 は核内に存在し、TNF- α 刺激に応答して核移行してくる p50 NF- κ B と複合体を形成、転写制御因子として機能することを明らかにした。更に、IRS-3 を HEK293 細胞に安定的に発現した細胞株を作製し、TNF- α で処理したところ、BclxL、HIAP-1 など細胞死抑制の機能を有するタンパク質の遺伝子の mRNA 量が増加し、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わかった。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ている。

終章、総合討論では、IRS-3 の新しい生理的意義について考察し、他の IRS との差異を討論している。

以上、本論文では、IRS-3 が、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を、はじめて明らかとしたもので、学術上・応用上貢献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）の学位として価値あるものと認めた。