

## 論文内容の要旨

応用生命化学専攻

平成 13 年度博士課程入学

氏名 若松 猪策無

指導教官 福井 泰久

## 論文題目

細胞運動にかかわるタンパク質 SWAP-70 のホスファチジルイノシトール三リン酸による調節機構の研究

生体内で細胞は刻一刻と変化する環境に適応するため、外界からの刺激に対して適切な応答を示す。増殖因子、成長因子、化学物質や他の細胞との接触を介してやり取りされた情報は細胞のもつ受容体で感知され、そのシグナルは複雑な経路を伝わり厳密な制御のもと分化や増殖、細胞運動など種々の応答を引き起こす。phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) は重要な 2 次メッセンジャーの担い手の一つで、数多くの増殖因子、成長因子の刺激により活性化されるリン脂質キナーゼである。細胞内において膜上に存在する 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 phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP<sub>3</sub>) を産生する。PIP<sub>3</sub> は通常の細胞内ではほとんど存在しないが、刺激後一時的に約 40 倍量にもなり、これが膜結合型セカンドメッセンジャーとして機能することが知られている。

SWAP-70 は PIP<sub>3</sub> アナログビーズを用いた精製により PIP<sub>3</sub> 結合タンパク質として同定された。SWAP-70 の N 末端には EF hand、中央に PIP<sub>3</sub> 結合ドメインとしての pleckstrin homology (PH) domain があり、C 末端側の部分は coiled-coil (CC) domain となっている。また、in vitro で N 末端が活性化型 Rac と、C 末端付近がアクチンと結合することが知られている。増殖因子などの刺激に応じたラッフリング膜の形成時に SWAP-70 がラッフリング膜に移行し、アクチンと共局在すること、そのときラッフリング膜の形成を増強すること、SWAP-70 欠損マウスより培養された細胞ではラッフリング膜形成が抑制され、また SWAP-70 のある種

の変異体ではラッフリング膜形成を阻害すること、等からラッフリング膜形成のシグナリングに SWAP-70 が不可欠なタンパク質であると考えられる。

本研究では細胞刺激時にどのようなメカニズムで SWAP-70 が活性化されるのか、その機構を解明することを目的とした。

## 1. SWAP-70 PH domain の PIP<sub>3</sub> 結合機構

SWAP-70 は PH domain を介して PIP<sub>3</sub> と結合することがその作用に不可欠であり、何らかの機構で PIP<sub>3</sub> は SWAP-70 を活性化することが予想された。まず SWAP-70 の PH domain の GST fusion protein (GST-PH) を作成し、これが PIP<sub>3</sub> ピーズと結合することを確認した。続いて立体構造が既知の PH domain との比較から SWAP-70 の PH domain の構造を予測した。一般的に PH domain には 1 つの $\alpha$ ヘリックスと 7 つの $\beta$ シートからなることが知られているが、それらに相当する SWAP-70 でのアミノ酸配列を確認した。コア部分から突き出ているループ部分はほかのタンパク質と相互作用をする可能性が強いので、そこに存在する荷電をもったアミノ酸をアラニンに置換する変異を複数導入した。その結果、最もアミノ末端寄りの第一ループに変異を導入した変異株群では PIP<sub>3</sub> 結合活性が失われることがわかった。この部位は構造既知の他の蛋白質の PH domain において PIP<sub>3</sub> と結合するのに必要と考えられている部位と一致した。

また、SWAP-70 全長の GFP 融合蛋白質に同様な変異を導入したものの細胞内での局在は野生株のそれと変わらなかった。しかし刺激時にはラッフリング膜への移行は見られず局在に変化は見られなかった。このことから、SWAP-70 の膜移行には PH domain と膜に局在する PIP<sub>3</sub> との相互作用が必要不可欠であると考えられる。

## 2. PH domain と CC domain の相互作用

自己制御ドメインとは分子内相互作用により分子内の機能をもつドメインの活性を抑制するはたらきをもつ領域のことである。近年構造解析の結果などからその詳細な機構が明らかになってきている。SNARE、ERM、WASP、SREBP、Sos 等多くの蛋白質において見出されており、シグナル伝達での重要な制御機構の一つとして注目されている。

そのような機構に PH domain が関与している報告があることから SWAP-70 も同様なメカニズムを持つのではないかと考え PH domain と CC domain との結合を調べることにした。GST-PH と pMAL-CC domain を作成し結合実験を行ったところ、これらのドメインは互いに結合することが示された。また、yeast two hybrid 法を用いて酵母内での PH domain と CC

domain の結合を確かめることが出来た。

続いて上記の GST-PH の変異株を利用し、PH domain のどの部分が CC domain との結合に関与しているのかを明らかにした。その結果、第一ループ変異株の一部が CC domain との結合にも関与していることが分かった。このことは、通常 PH domain が第一ループで CC domain に結合することにより C 末端付近のアクチン結合部位を構造的にマスクし、刺激時に産生された PIP<sub>3</sub> が PH domain の第一ループに割り込み結合することにより、PH domain と CC domain との結合が外れ活性型となることが予想された。

そこで実際に PIP<sub>3</sub> が PH domain-CC domain 相互作用に対する影響を及ぼすか調べた。前述の PH domain-CC domain 結合実験において PIP<sub>3</sub> を添加すると、この相互作用が阻害されることが明らかとなった。PIP<sub>3</sub> と結合しない変異株ではこのような効果は見られなかった。すなわち、SWAP-70 においては PIP<sub>3</sub> により PH domain-CC domain の相互作用が失われ、コンフォーメーション変化を起こし活性化されることが示唆された。

次に CC domain の PH domain との結合に必要な部分を検討した。CC domain の荷電を持つアミノ酸をアラニンに変化させる変異を多数作製し、PH domain との結合が損なわれているものを検索した。その結果 2 種類の変異株 m374、m502 を得た。これらの変異株を細胞中に発現させたところ、PIP<sub>3</sub> 非依存的に細胞膜に移行し、アクチンと共局在することがわかった。SWAP-70 は EGF 刺激時におけるラップリング形成においてアクチンと共局在する。in vitro で SWAP-70 の C 末端部分がアクチンと結合することから SWAP-70 は活性化されるとアクチンと結合できるようになることが予想される。これらのことから通常 CC domain と PH domain の結合により C 末端付近のアクチン結合部位を構造的にマスクされており、この結合が外れると SWAP-70 がオープンな活性化型となりアクチンとの共局在が見られるようになると予想された。

一方、伊原らは SWAP-70 はラップリング制御 G 蛋白質 Rac の effector であることを示唆している。これは SWAP-70 が PIP<sub>3</sub> と Rac の両者によって調節されていることを意味している。そこで dominant negative 型 Rac により Rac のシグナルをとめた状態で細胞を EGF で刺激し、SWAP-70 の挙動を調べた。この時 SWAP-70 は細胞膜に移行しアクチンと共局在したがラップリングは起こらなかった。この表現型は m374 や m502 を単独で発現させた時の表現型と酷似していた。これはこれらの変異株においては PI3K によるシグナルに対しては PIP<sub>3</sub> と CC domain の相互作用がなくなるために活性型となっているが Rac に対しては活性型になっていないことを意味している。以上のことから PH domain と CC domain の相互作用は PI3K のシグナルによる SWAP-70 の活性調節を担っていることが判った。しかしながら CC domain と結合しない PH domain をもつ変異体が活性型にならないなどこの仮説には必ずしも説明できない実験結果もあり、今後の課題として残った。

## まとめ

本研究では SWAP-70 の PIP<sub>3</sub> との結合部位が PH domain の第一ループ中にあること、CC domain との結合部位がこれと重複していることが示され、PIP<sub>3</sub> により CC domain との結合が阻害されることが示唆された。これより SWAP-70 は PIP<sub>3</sub> と結合することにより活性化型となることが予想された。さらに *in vivo* でのラッフリングの表現型はこの仮説を支持した。このコンフォメーション変化が生理学的にどのような活性の変化を導くのかについてはいくつかの不明な点があるが、このような PIP<sub>3</sub> によるタンパク質の構造変化が示された例は少なく、本研究に基づき分子内相互作用による蛋白質活性制御機構の一端が明確に解明されると期待される。