

論文の内容の要旨

応用動物科学専攻
平成 14 年度博士課程進学
氏名 福嶋俊明
指導教員名 高橋伸一郎

論文題目 インスリン様成長因子の細胞増殖活性を調節するシグナル分子複合体の新しい機能の解析

成長因子のシグナル伝達において、タンパク質チロシンリン酸化は、伝達系の初期段階で中心的な役割を果たす。すなわち、成長因子が細胞膜上の受容体に結合すると、受容体内蔵型チロシンキナーゼが活性化し、受容体自体や基質タンパク質がチロシンリン酸化される。続いて、これらのタンパク質のチロシンリン酸化モチーフに SH2 ドメインを有するシグナル分子が結合し、それを契機に下流シグナル経路が活性化される。インスリン様成長因子 (IGF) のシグナル伝達もこの例にもれず、IGF-I 受容体キナーゼによる受容体基質 (IRS) のチロシンリン酸化と、それに続く SH2 ドメインを有する PI 3-kinase (PI3K) の結合・活性化などが、IGF の生理活性発現に重要な役割を果たす。

IGF は、多くの細胞の増殖や分化を誘導する活性を有し、*in vivo* 系では動物の成長に必須なホルモンである。IGF の特徴の一つは、その生理活性が他のホルモンや成長因子によって増強される点である。我々は、ラット甲状腺細胞 FRTL-5 において、甲状腺刺激ホルモン等によって cAMP シグナル伝達系をあらかじめ長時間活性化 (cAMP 前処理) すると、IGF-I の細胞増殖活性が増強されることを見出し、この分子機構の解明を進めてきた。その過程で、cAMP 刺激に応答して 125kDa 付近の新規シグナル分子 (p125) がチロシンリン酸化され、これが PI3K と結合し、更に cAMP 依存性 PI3K の活性化が IGF-I の増殖活性の増強に必須であることを明らかにしてきた。一方、我々は、cAMP 前処理が IGF-I 刺激に応答した IGF-I 受容体キナーゼの活性化に影響しないにも関わらず、IGF-I 依存性の IRS-2 チロシンリン酸化を増強し、その結果 IRS-2 に結合する PI3K が著しく活性化し、この IGF-I 依存性 PI3K 活性化が相乗的な増殖誘導に必須な役割を果たすことも見出している。

そこで、本研究では、このモデル細胞を用いて、p125 や IRS、IGF-I 受容体などのチロシンリン酸化タンパク質を介して形成される PI3K を含むシグナル分子複合体の活性の調節について明らかにし、これらの複合体が cAMP シグナルと IGF シグナルによる細胞周期進行の制御に果たす役割を解明することを目的とした。

1) cAMP 刺激および IGF-I 刺激に応答した細胞周期制御因子の調節

G1 期から S 期への細胞周期進行には、Cyclin D、E の増加と p27^{Kip1} など抑制因子の減少による、CDK の活性化が必須である。そこで、cAMP 前処理後 IGF-I で刺激した際に、これら細胞周期制御因子の量や活性がどう調節されるか解析した。その結果、Cyclin D1、E の IGF-I 依存的な増加と p27^{Kip1} の IGF-I 依存的な減少が、cAMP 前処理によって促進され、これらの変動によって CDK が相乗的に活性化、細胞周期が S 期へ進行することが明らかとなった。そこで、cAMP と IGF-I で刺激した際にみられる Cyclin D1 の相乗的増加と p27^{Kip1} の相乗的減少の分子機構について解析したところ、Cyclin D1 は、cAMP 前処理によって IGF-I 依存的な mRNA の増加が促進されると同時に、cAMP 前処理によって翻訳活性が上昇する結果、相乗的なタンパク質の増加が起こることがわかった。これに対し、p27^{Kip1} は、cAMP 前処理によって IGF-I 依存的なユビキチン化が増加し、その結果、著しく分解が促進されることが明らかとなった。

2) p125-PI3Kシグナル分子複合体が細胞周期進行の制御に果たす役割

cAMP 刺激に応答した PI3K の活性化機構を明らかにするため、cAMP 刺激に応答してチロシンリン酸化され PI3K に結合する新規シグナル分子、p125 の同定を行った。cAMP 長時間処理した細胞の抽出液を抗リン酸化チロシン抗体で免疫沈降し、SDS-PAGE で分離後、PMF 法によって同定した。p125 は膜局在に重要な PH ドメインや多数のチロシンリン酸化モチーフを有する新規シグナル分子 (AU041783) で、PI3K の SH2 ドメインが結合するモチーフを有していた。

次に、cAMP 刺激に応答した PI3K 活性化が細胞周期進行の制御に果たす役割を明らかにするため、cAMP 前処理時に PI3K 阻害剤を添加し、薬剤を除去後 IGF-I で刺激し、Cyclin D1 の mRNA 量やタンパク量、および p27^{Kip1} のユビキチン化やタンパク量の変動を解析した。その結果、阻害剤を加えることにより、cAMP 前処理後の IGF-I 刺激で著増する Cyclin D1 タンパク量が、IGF-I 単独処理時のレベルまで低下することがわかった。この際 Cyclin D1 mRNA 量には阻害剤の影響がなかったことなどから、cAMP 刺激に応答した PI3K の活性化は Cyclin D1 の発現を翻訳段階で促進すると結論した。

3) IRS-2-PI3Kシグナル分子複合体が細胞周期進行の制御に果たす役割

次に、cAMP 前処理による IGF-I 依存性 IRS-2 チロシンリン酸化の増強機構を解析した。まず、cAMP 長時間処理した細胞の IRS-2 を免疫沈降し、IGF-I 受容体チロシンキナーゼを用いて *in vitro* でチロシンリン酸化したところ、cAMP 処理しない場合に比べチロシンリン酸化が増強された。この結果から、IRS-2 は cAMP 処理によって何らかの修飾を受け、IGF-I 受容体によってチロシンリン酸化されやすくなることが明らかとなった。次に、cAMP 処理した細胞の抽出液をゲル濾過クロマトグラフィーで分離したところ、IRS-2 は 700kDa 以上のタンパク複合体を形成していることを見出した。また、IRS-2 免疫沈降物を高塩濃度の緩衝液で処理してタンパク複合体を分離し、その後 *in vitro* チロシンリン酸化反応に供すると、cAMP 処理によるチロシンリン酸化の増強がなくなった。これらの結果は、IRS-2 のチロシンリン酸化の増強には IRS-2 を介したタンパク複合体の形成が必須であることを示している。そこで、cAMP 処理によって IRS-2 と相互作用する分子の同定を試みた。cAMP 処理した細胞より IRS-2 を免疫沈降し、共沈降するタンパク質を PMF 法によって同定した。その結果、ユビキチンリガーゼ Nedd4 など複数のタンパク質が IRS-2 と相互作用することが明らかとなった。特に、Nedd4 はアダプター分子 Grb10 を介して IGF-I 受容体と相互作用することが報告されているので、cAMP 刺激に応じた Nedd4 と IGF-I 受容体、Nedd4 と IRS-2 の相互作用について調べた。その結果、Nedd4 と IGF-I 受容体の相互作用は cAMP 刺激の有無に関わらずみられたが、IRS-2 との相互作用は cAMP 刺激により増加した。これらの結果は、cAMP 刺激に応答して Nedd4 が IRS-2 を IGF-I 受容体にリクルートし、IRS-2 のチロシンリン酸化を増強する可能性を強く示している。他の結果も併せ、cAMP 長時間刺激に応答して Nedd4 などと IRS-2 の相互作用や IRS-2 のセリンリン酸化がおり、IRS-2 は、より IGF-I 受容体にチロシンリン酸化されるようになると結論した。

続いて、IGF-I 刺激に応答した PI3K 活性化が細胞周期進行の制御に果たす役割を明らかにするため、cAMP 前処理後、IGF-I 処理時に PI3K 阻害剤を添加し、Cyclin D1 の mRNA 量や p27^{Kip1} のユビキチン化などに及ぼす影響を解析した。その結果、IGF-I 刺激に応答した PI3K の活性化は、Cyclin D1 mRNA の増加や p27^{Kip1} のユビキチン化に必須であることが明らかとなった。Cyclin D1 の mRNA の増加や p27^{Kip1} のユビキチン化が IRS-2 のチロシンリン酸化とよく関連することを併せ、IRS-2 下流の PI3K シグナルがこれらの変動を引き起こすと考えられた。

4) IGF-I受容体-PI3Kシグナル分子複合体が細胞周期進行の制御に果たす役割

IGF-I刺激によるIRSのチロシンリン酸化は一過的で、刺激後数分で脱リン酸化により基底レベルに戻るが、対照的に、IGF-I受容体のチロシンリン酸化はG1期にわたって持続することを見出した。この際、チロシンリン酸化したIGF-I受容体にPI3Kが直接結合し、IGF-Iに依存した長期のPI3K経路の活性化を引き起こしていることが明らかとなった。

このIGF-I刺激による長期PI3K活性化が細胞周期進行の制御に果たす役割を明らかにするため、IGF-I処理時間の途中でIGF-Iを培養液から除去、あるいはPI3K阻害剤を添加すると、G1後期にCyclin D1が高いレベルで維持できなくなり、S期への進行が阻害されることがわかった。他の結果も併せると、IGF-Iに依存してIGF-I受容体が持続的にチロシンリン酸化され、これに結合するPI3Kの活性化がG1期にわたって続き、この活性化がG1後期のCyclin D1のレベルを維持することが、S期への細胞周期進行に必要であると考えられた。

このように、本研究では、p125、IRS-2、IGF-I受容体という異なるチロシンリン酸化タンパク質がPI3Kを含むシグナル分子複合体を形成し、これらが合目的的に連携して機能することによりcAMPシグナルとIGFシグナルの合流による細胞周期進行が可能となる、という全く新しい機構を明らかにすることができた。