

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成15年度博士課程進学
氏名 濱口典久
指導教員名 舘川宏之

論文題目 新規PI3K下流因子Pleckstrin-2の同定と機能解析

細胞膜上でのシグナル伝達とPI3K経路

主に膜貫通タンパク質と膜脂質で構成される生体膜は、単なる物理的仕切りとしての機能のみならず、細胞内情報伝達の担い手として積極的な役割を果たすことが知られている。そして、レセプターやチャネルなどの膜貫通タンパク質はもちろんのこと、膜脂質も細胞内情報伝達に直接的な関与をすることが、近年明らかになってきた。

ホスファチジルイノシトール(PD)は、そのような積極的な機能を持つ膜脂質の典型例であり、情報伝達や細胞骨格制御において重要な役割を果たす。PIには、イノシトール環のリン酸化状態によってバリエーションがあり、リン酸化・脱リン酸化酵素群によって代謝されている。それらの1つ、ホスファチジルイノシトール3'キナーゼ(以下PI3K)は、イノシトール環の3位をリン酸化する酵素である。I型PI3Kは、チロシンキナーゼ型受容体やGタンパク質共役型受容体などの情報を受けて活性化し、PI(4, 5)P₂の3位をリン酸化してPI(3, 4, 5)P₃(以下PIP₃)を産生する。次いでPIP₃は、PH(Pleckstrin homology)ドメインなどをもつタンパク質と結合する。PHドメインはヒトでは250以上のタンパク質に見出される120アミノ酸ほどのモチーフで、一部のPHドメインはPIに親和性を示すことが知られている。PIP₃結合に伴い細胞膜に移行したタンパク質は、さらに下流へ情報を伝達し、結果として、細胞増殖、運動、接着、生存、小胞輸送など、多くの基本的な細胞活動に関与する。PI3K、PIP₃と疾病の関与についても精力的に研究されており、ガンの進行や転移を促進するほか、糖尿病にも関わることが知られている。このように、PI3Kの機能は多岐に渡るため、基礎、臨床応用を問わず多くの医学・生物学研究者に注目されている。

PI3K下流因子のなかで、最も研究が進んでいるのは、セリンスレオニンキナーゼAktである。Aktは、PIP₃やPI(3, 4)P₂への結合により膜移行、活性化し、タンパク質リン酸化によってさらに

下流ヘシグナルを伝達、アポトーシス回避やグルコース取り込みに寄与する。また、Rac活性化因子Tiam1の研究も進んでいる。Tiam1も、PIP₃に結合して膜移行、活性化し、次いでRacを活性化して細胞の運動や接着を促すと考えられている。しかしながら、上述の通り、PI3Kが関わる細胞機能は多彩であるため、既知の下流因子のみで説明し尽くせないことは明らかである。よって、現在、新たなPI3K下流因子の同定と機能解析が待たれている。

筆者の所属研究室では、PIP₃アナログビーズを用いたアフィニティークロマトグラフィーと、MALDI-TOF-MSを組み合わせたシステムを用い、これまでに、PIP₃BP/Centaurin α 1、SWAP-70、DOCK180などの新規PIP₃結合タンパク質の同定を行ってきた。筆者は、本手法を用いてさらなるPIP₃結合タンパク質の検索、同定と機能解析を行った。

新規PIP₃結合タンパク質PLEK2の同定

ヒト肺がん細胞株Lu65を材料に、PIP₃アフィニティークロマトグラフィーを実施したところ、PIP₃、PI(3, 4)P₂に特異的な結合タンパク質、p40の検出に成功した。そこでp40のバンドをMS分析したところ、ヒトPleckstrin-2タンパク質(以下PLEK2)であることが判明した。

PLEK2遺伝子は、血小板のCキナーゼの基質であるPleckstrin(以下PLEK1)との相同性から、1999年にクローニングされた。PLEK1、2タンパク質は、ともに約350アミノ酸から成り、N、C末端に2つのPHドメイン、その間にDEP(D \bar{u} shevelled, \bar{E} GL-10, and \bar{P} leckstrin)ドメインを有する。また、両者とも脊椎動物以上(ヒト、マウス、ゼブラフィッシュ、カタユウレイボヤなど)で保存されている。相違点としては、PLEK1が血球系のみで発現しているのに対し、PLEK2の発現は広範な組織に認められること、PLEK1と異なり、PLEK2はCキナーゼによるリン酸化を受けにくいこと、が挙げられる。よって、生理的機能にはPLEK1、2間で差異があるものと予想される。細胞内機能について詳細は不明であるものの、両者とも細胞骨格の調節に関する可能性が指摘されている。

まずは、HEK293T細胞に発現させた組み換えPLEK1、2タンパク質を用いてPIP₃結合性を詳細に調べた。PLEK2がPIP₃、PI(3, 4)P₂に特異的に結合することは確認されたが、意外にもPLEK1はPIP₃への結合能が無かった。よって、PLEK1はPKC、PLEK2はPI3K、という上流因子の差異が推察された。また、PLEK2の2つのPHドメインのうち、N末端PH(NPH)ではなく、C末端PH(CPH)のみがPIP₃結合能を持つことが分かった。そこでCPH内に点変異を導入したR267C、R268C変異体(RRCC)を作製したところ、予想通りPIP₃に結合しなかった。以上より、PLEK2はPIP₃結合タンパク質であり、CPHが主たる結合ドメインであることが示された。

細胞膜上でのPLEK2とFアクチンの共局在

PLEK2の細胞内局在を調べるため、共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。MDCK細胞にGFPタグ付きPLEK2を発現させたところ、細胞間接着膜において、Fアクチンとの共局在が認められた。また、肝細胞増殖因子HGFでPI3Kを活性化したところ、PI3K依存的に細胞前縁

膜に移行することが分かった。COS-1細胞を上皮細胞増殖因子EGFで刺激した場合を調べてみると、やはりPI3K依存的に細胞膜に移行し、Fアクチンと共局在した。さらに、ウサギ抗PLEK2抗体を作製し、細胞免疫染色によって内在性PLEK2の局在を調べた結果、MDCKおよびHCC2998細胞において、細胞間接着膜でFアクチンと共局在することが確認された。

これらの結果から、PLEK2は、PI3Kの活性化とPIP₃産生に伴って細胞膜に移行し、Fアクチン骨格の制御に関与する可能性が推察された。

PLEK2の細胞内機能の解析: gain-of-function

PLEK2の細胞内機能を解明するため、本来PLEK2を発現しない細胞に、強制的に発現させることで、“gain-of-function”の効果を調べた。まず、各種細胞株でのPLEK2の発現を調べたところ、多くで発現が見られたものの、一部の血球系・線維芽細胞株などには、発現が見られなかった。そこで、それらのうちCOS-1細胞とHEK293T細胞を選択し、GFPタグ付きPLEK2を発現させたところ、PI3K、PIP₃依存的に、顕著なFアクチン突起様構造の形成が誘導されることが分かった。局在性に注目すると、PLEK2は、誘導されたFアクチン突起構造と共局在したが、同じくFアクチン構造であるストレスファイバーでは共局在が認められなかった。以上より、PI3K-PLEK2経路は、細胞内の特定のFアクチンに対して再構成を誘導することが結論づけられた。

活性化したPI3KからFアクチン再構成に至る経路は、種々の細胞機能において重要な役割を果たすことが知られているが、細胞外マトリックス(ECM)への接着・伸展は、そのような細胞機能の1つである。そこで、COS-1細胞を用い、フィブロネクチン(FN)やコラーゲン(COL)への接着・伸展における、PLEK2の gain-of-function 効果を調べたところ、FNへの細胞伸展面積が有意に上昇すること、COLへの接着時にFアクチン再構成が促進されること、が明らかとなった。さらに、これらの効果は、PI3K、PIP₃依存的であることが確認された。したがって、ECMによって活性化されたPI3K-PLEK2経路は、Fアクチン再構成を通して、細胞のECMへの接着・伸展に寄与することが示唆された。

PLEK2の細胞内機能の解析: loss-of-function

PLEK2の発現抑制による“loss-of-function”効果を調べるため、レトロウイルスによる安定的RNA interference (RNAi)を実施した。材料としては、内在性PLEK2の発現が低いMCF7、中程度のDLD1、高いHCC2998細胞を選択し、それぞれで安定的抑制株を樹立した。

MCF7、DLD1では、コントロールに比してFアクチン構造、細胞接着における明らかな異常は認められなかった。一方、HCC2998では、コントロール細胞が上皮細胞特有の敷石状のコロニーを形成するのに対し、PLEK2抑制細胞では、敷石の配交性が乱れ、よじれたような細胞形態を呈することが分かった。細胞間での差異の理由は不明だが、上述の通りHCC2998細胞は、MCF7、DLD1に比べて高いPLEK2発現レベルを示すことから、全体的なFアクチン調節におけるPLEK2の役割が相対的に大きい可能性が考えられた。

前項までの結果から、Fアクチン組織化と細胞接着の異常が、HCC2998細胞での形態異常

の原因ではないかと推測し、培養基盤への接着および伸展の様子を経時的に観察した。すると、予想通り、PLEK2抑制細胞では、伸展の時間的遅延と減弱が観察され、細胞の接着面積を測定したところ、有意な減少が認められた。

これは前項までの結果を支持しており、細胞外基質→PI3K→PIP₃→PLEK2→Fアクチン→細胞接着・伸展、という経路を改めて示唆するものである。

PLEK2結合タンパク質の検索と同定

PLEK2と相互作用するタンパク質の同定を試みた。HeLa細胞cDNAライブラリを用いた酵母two-hybrid screenの結果、PLEK2結合タンパク質としてPeriplakin (PPL)を得た。PPLは、Plakinファミリーのメンバーであり、ケラチン細胞骨格に結合することが知られるが、Fアクチンに結合するとの報告もある。PLEK2側のPPL結合ドメインを絞り込んだ結果、NPHで必要十分であることが分かった。現時点では、PLEK2とPPLとの結合の生理的意義は見出せていないが、PPLが細胞骨格と相互作用することを考えると、PI3K-PLEK2経路に関与する可能性は高いと考えられた。

次に、PI3Kの下流でFアクチン再構成に関わることが知られるGタンパク質Racについて検討した。細胞内局在を調べたところ、COS-1、MDCK細胞において、PLEK2との共局在が認められた。そこで、物理的相互作用の有無を調べたところ、化学架橋剤DSPの存在下で共免疫沈降が検出された。しかし現在までのところ、Racの局在性や活性に対するPLEK2の関与は見出せておらず、PI3K-PLEK2経路とRacの関係については不明である。

現時点ではPLEK2と機能的に結合するタンパク質の決定には至っていないものの、候補因子を挙げることに成功した。PPLとRacについては、さらに詳細な解析が必要であろう。

総括

本研究によって、PI3K-PIP₃-PLEK2経路の存在が見出され、Fアクチン再構成を通してECMへの接着・伸展を制御する可能性が示唆された。今年(2006年)9月末、ペンシルバニア大学のAbramsらのグループは、ヒト白血病性T細胞株Jurkatにおいて、PLEK2がPI3K依存的にFアクチン再構成を促進し、細胞接着の調節に関与するとの論文を発表した。COS-1、HC C2998、MDCKなど非血球系細胞について得られた本研究の結果は、Abramsらのモデルと大筋で一致するものであった。したがってPLEK2は、T細胞を含む広範な細胞種において役割を果たす可能性が強い。

また、脊椎動物以上しかPLEK1, 2遺伝子を持たないことを想起すれば、PI3K-PLEK2経路の生理的役割は、脊椎動物が進化の過程で得た機能にあると予想できる。その包括的な理解のためには、本研究で得られた細胞・分子レベルの知見が大いに貢献するものと考えられる。