

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 濱口 典久

増殖因子や細胞外マトリックス (ECM) などによって活性化される脂質リン酸化酵素フォスファチジルイノシトール 3' キナーゼ (PI3K) は、細胞膜上のイノシトールリン脂質 PI(4,5)P₂ の 3 位をリン酸化し、PI(3,4,5)P₃ (以下 PIP₃) を産生する。PIP₃ は脱リン酸化を受けて PI(3,4)P₂ を生じるが、PIP₃ と PI(3,4)P₂ は PI3K 脂質産物と総称される。PI3K 脂質産物は、結合タンパク質の細胞膜へのリクルートを介して、細胞増殖、小胞輸送、接着、運動、細胞骨格制御など、多岐に渡る細胞応答に関与する。しかしながら、その詳細な分子メカニズムに関しては不明な部分が多く残されており、解明が待たれている。本研究は、PI3K 脂質産物 PIP₃ に直接結合するタンパク質の同定と機能解析を通して、この問題へのアプローチを試みたもので、研究の背景を述べる第 1 章と材料と方法を説明する第 2 章、それに続く 3 章、および研究結果を討論する第 6 章からなる。

第 3 章では、新規 PIP₃ 結合タンパク質の同定と、その細胞内局在性についての検討を行った。PIP₃ アフィニティークロマトグラフィーと MALDI-TOF-MS によって、ヒト肺ガン由来細胞株 Lu65 の細胞抽出液から、ヒト Pleckstrin-2 タンパク質 (以下 PLEK2) を同定した。PLEK2 は、血小板内の C キナーゼ基質である Pleckstrin (以下 PLEK1) との相同性から、近年同定されたタンパク質である。PLEK1 は免疫細胞のみに発現するのに対して PLEK2 は普遍的に発現しており、両者の生理的役割は異なるものと考えられるが、両者共に機能はほとんど不明である。また両者とも、N 末端と C 末端にイノシトールリン脂質結合ドメインとして知られる PH ドメインを有する。まず PLEK2 の PIP₃ 結合性を検討したところ、C 末端 PH ドメインを介して PIP₃ および PI(3,4)P₂ に結合することが確認された。次に、PLEK2 の細胞内局在を検討した。PI3K を活性化する増殖因子 HGF および EGF で、それぞれ MDCK および HeLa 細胞を刺激したところ、PLEK2 は PI3K 依存的に細胞膜へと移行し、F アクチン細胞骨格と共局在することが明らかとなった。F アクチン骨格は、PI3K によって制御され、細胞の運動や進展に関与することが知られている。以上から、PLEK2 は、*in vitro* で PI3K 脂質産物に結合することが示され、さらに細胞内では、PI3K 活性化に伴って膜移行し、F アクチン細胞骨格の制御に関与する可能性が示唆された。

第 4 章では、PI3K/PLEK2 経路が F アクチン再構成に関与するかどうかについて検討

するため、PLEK2 の強制発現による gain-of-function 解析、および RNAi を用いた発現抑制による loss-of-function 解析を実施した。まず COS-1 細胞を用いた gain-of-function 解析の結果、PLEK2 の発現が、PI3K 依存的に F アクチンの突起状構造の形成を誘導することが明らかになった。PI3K を活性化することが知られる ECM 分子コラーゲンで細胞を刺激したところ、PLEK2 は PI3K 依存的に F アクチンの突起構造を誘導することが示された。また、同じく PI3K 活性化因子である ECM 分子フィブロネクチンで刺激したところ、PLEK2 の発現は細胞の進展を促進し、培養基盤への接着面積を有意に上昇させた。次に、HCC2998 細胞を用いた loss-of-function 解析を行ったところ、PLEK2 抑制細胞は形態異常をもたらし、細胞の接着面積が低下することから、細胞進展が抑制されていることが明らかとなった。さらに PLEK2 の発現抑制は、EGF 刺激に伴う F アクチン突起構造を阻害することが示された。以上から PLEK2 は、PI3K の下流において F アクチン突起構造の形成、および細胞の進展に関与することが示された。

第 5 章では、PLEK2 による F アクチン制御の分子メカニズムの解明を目的とし、PLEK2 結合タンパク質の同定を行った。その結果、中間径フィラメントや F アクチンに結合するタンパク質 Periplakin が同定された。また、F アクチン制御に関与する低分子量 GTPase、Rac と PLEK2 の結合が示された。さらに、PLEK2 が F アクチンと *in vitro* で直接結合することが示された。これらの相互作用の生理的な意義は現時点で不明であるが、PLEK2 下流の F アクチン制御メカニズムの解明に繋がる可能性が考えられた。

以上のように本論文は、細胞外刺激から PI3K、PLEK2 を介して F アクチン骨格に至る経路の存在を示すものである。一連の知見は、PI3K が担う多様な機能、なかでも F アクチン骨格制御や細胞進展の分子メカニズムの一端を明らかにするものであり、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）の学位論文として価値あるものと認めた。