

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 赤間 剛
指導教員名 高橋伸一郎

論文題目 新規 PI 3-kinase 結合タンパク質の同定とその機能の解析

Phosphatidylinositol (PI) (3,4,5)P₃ (PIP₃) は、膜中に存在する PI(4,5)P₂ (PIP₂) がリン酸化されて生じるセカンドメッセンジャーで、近年、多くの生命現象に関与していることが明らかにされている。このリン酸化反応を触媒する I 型 PI 3-kinase は、p85/p55 ファミリータンパク質を形成する制御サブユニットと、p110 ファミリータンパク質を形成する触媒サブユニットが結合したヘテロ二量体である。一般に、PI 3-kinase は、チロシンキナーゼを内蔵した受容体が自己リン酸化したもの、あるいはこの受容体キナーゼによってチロシンリン酸化された基質を、制御サブユニットの SH2 ドメインが認識して結合し、一過的に触媒サブユニットが活性化、生理活性を発現するものと考えられてきた。しかし最近、PI 3-kinase の持続的な活性化が報告され、このような活性化が必要な生理作用の例も明らかになってきた。したがって、PI 3-kinase の持続的活性化の新しい機構の発見が切望されている。

我々は、ラット甲状腺由来正常細胞 FRTL-5 を甲状腺刺激ホルモン (TSH) と IGF-I で処理すると細胞増殖が相乗的に促進されるが、これは TSH 長時間処理によって起こる cAMP 経路の長期活性化が、IGF-I 依存的な DNA 合成を増強するためであることを見出した。この相乗作用発現機構を解析する過程で、①TSH 処理によって起こる cAMP 経路の長時間刺激に応答して 125kDa の細胞内タンパク質、p125 がチロシンリン酸化され、これが PI 3-kinase p85 制御サブユニット (p85) と結合、持続的に PI 3-kinase p110 触媒サブユニットの活性化を引き起こす、②PI 3-kinase の持続的活性化は、IGF-I 受容体基質のひとつ p66 Shc の合成を誘導 IGF-I シグナルを増強すると同時に、G1 cyclin の翻訳活性を上昇させ G1 cyclin 合成量が増加する、③他

の機構と相まって G1 cyclin-dependent kinase の活性化が起こり、G1 期から S 期への進行が可能となる、ことなどを明らかにしてきた。したがって、p125 は、cAMP 経路の長期活性化によっておこる IGF-I 依存性 DNA 合成の増強に必要な PI 3-kinase の長期活性化を可能にする、これまでに報告のないタイプの PI 3-kinase 結合タンパク質であると推定されたが、その本体は不明であった。

そこで本研究では、まず p125 を同定、発現を調べた。p125 が新規シグナル分子であったため、p125 による PI 3-kinase の活性化機構、p125 の細胞内局在制御機構を解析、最後に cAMP 刺激と IGF-I 刺激によって誘導される FRTL-5 細胞の相乗的増殖における p125 の役割について検討した。

1. PI 3-kinase p85 制御サブユニットと結合する新規シグナル分子 p125 の同定

当研究室の福嶋は、dibutyryl cAMP (Bt₂cAMP) で 24 時間処理した FRTL-5 細胞から調製した抽出液より抗ホスホチロシン抗体を用いた免疫沈降で p125 を部分精製、これを MALDI-TOFMS で解析し、p125 が KIAA1914、GENBANK Accession No. XM_217643 である可能性を示した。そこで私は、同様に処理した FRTL-5 細胞の抽出液を抗 p85 抗体で免疫沈降し p125 を共免疫沈降させた。SDS-PAGE 後の銀染色により検出された p125 のバンドを定法どおり MALDI-TOFMS に供し、Peptide Mass Fingerprinting 法で解析したところ、KIAA1914 由来のシグナルを得ることに成功した。そこで、p125 の C 末端部分の予想されるアミノ酸配列 20 残基のペプチドに対するポリクローナル抗体を作製した。TSH をはじめとした cAMP を生成する薬剤で FRTL-5 細胞を 24 時間処理後、この抗体を用いて免疫沈降を行ったところ、チロシンリン酸化 p125 およびこれと結合する p85 の沈降に成功し、この沈降物中に PI 3-kinase 活性も確認された。他の結果も併せ、p125 は KIAA1914 であると結論した。

予想されるアミノ酸配列から、p125 は、N 末端領域にチロシンリン酸化されると p85 と結合する YXXM モチーフを 1 箇所、中央部分に 2 つの PH ドメインと 4 つのチロシンリン酸化可能部位、C 末端領域に coiled-coil ドメインを有する新規シグナル分子と考えられた。ラット p125 の遺伝子をクローニングし塩基配列を解析したところ、既にデータが存在するマウス・ヒト p125 と比較して、塩基・アミノ酸配列レベルで 90%以上の相同性を示した。BLASTP によりデータベース検索を行うと、脊椎動物でのみ p125 と相同性を有する分子の存在が確認された。また系統樹解析により、p125 は、既に報告のある Actin Filament Associated Protein-110 と Accession No. AI173486 と合わせてファミリーを形成している可能性が明らかとなった。

次に、生後 3 ヶ月のオス成体ラットの各臓器における p125 発現を RT-PCR 法により調べたところ、甲状腺の他に精巣、心臓、脾臓、腎臓、小腸、肺といった広範な組織で mRNA の発現が確認され、この結果より、p125 は様々な臓器で普遍的に機能しているシグナル分子と考えられた。

2. p125 による PI 3-kinase 活性化機構と p125 の細胞内局在制御機構の解析

FRTL-5 細胞を Bt₂cAMP で長時間処理する際に src ファミリーキナーゼ阻害剤である PP1、PP2 を添加すると、p125 のチロシンリン酸化、p125 と p85 の結合量が減少した。また、293T 細胞に p125 と恒常的活性型 src を共発現させると、はじめて p125 のチロシンリン酸化、p125 と結合した p85 および PI 3-kinase 活性が確認された。これらの結果は、p125 をチロシンリン酸化するチロシンキナーゼが src ファミリーキナーゼであることを示唆している。

次に p125 の様々な機能ドメインを欠失させた変異体を作製し、これらを 293T 細胞に恒常的活性型 src とともに発現させ、p125 と p85 との結合を調べた。p125 には複数のチロシンリン酸化可能部位が存在するが、N 末端側の YXXM モチーフを含む領域を欠失させると、p85 との結合が観察されなくなった。

続いて、内在性 p125 の細胞内局在を、FRTL-5 細胞を用いた抗 p125 抗体による免疫染色により調べた。その結果、p125 は細胞質で F-actin とよく共局在していることを発見した。また、FRTL-5 細胞を Bt₂cAMP 処理する際に actin 重合阻害剤である latrunculinB を添加すると、p125 は細胞質に一樣に存在するようになり、この際、p125 チロシンリン酸化、p125 と結合する p85 量も減少した。そこで、293T 細胞に p125 の種々の領域が欠失した変異体を発現させて局在を解析した結果、C 末端側の coiled-coil ドメインを含む領域が、F-actin との共局在に必要であることが明らかとなった。

以上の結果より、p125 は、C 末端側の領域を用いて F-actin 付近に局在し、src ファミリーキナーゼで N 末端側の YXXM モチーフをチロシンリン酸化されることにより p85 と結合、PI 3-kinase の活性化を引き起こすと結論した。

3. cAMP 刺激と IGF-I 刺激によって誘導される相乗的 DNA 合成における p125 の役割の解析

FRTL-5 細胞を TSH あるいは Bt₂cAMP で種々の時間処理し、p125 の動態を解析した。その結果、p125 mRNA 量およびタンパク量は、cAMP 処理 8 時間以降、処理時間に応じて増加することが明らかとなった。また、p125 のチロシンリン酸化、p125 と結合した p85 量は、TSH および Bt₂cAMP の処理濃度・時間に依存して増加した。

続いて、ラット p125 cDNA 塩基配列の情報から siRNA を設計、FRTL-5 細胞に siRNA 導入して p125 の発現を抑制した。この細胞を Bt₂cAMP 24 時間前処理し、その後 IGF-I で処理したところ、p125 発現抑制が、cAMP 前処理により誘導される Akt のリン酸化、p66 Shc の増加、IGF-I 依存性 DNA 合成の増強を顕著に抑制した。

最後に、FRTL-5 細胞に p125 遺伝子を導入、IGF-I で処理し、DNA 合成を測定した。その結果、p125 を強発現した細胞を IGF-I で処理した際に、対照細胞を IGF-I 処理した場合に比較して、有意に DNA 合成が亢進することを見出した。

これらの結果は、cAMP 経路を長時間刺激することによって p125 の遺伝子発現が誘導、タンパク質が増加するとチロシンリン酸化され、p85 が結合、これと結合する PI 3-kinase が活性化

される、この p125 を介した PI 3-kinase の持続的な活性化が、cAMP 経路の長期活性化によって起こる IGF-I 依存性 DNA 合成の増強に重要な役割を果たしていることを直接的に示している。

本研究により、PI 3-kinase の持続的活性化の新しい機構を発見することに成功した。p125 は広範な臓器で発現が認められたことを併せると、種々の臓器で PI 3-kinase の活性化を介した様々な生理活性の発現に関与しているものと推定される。今後、この観点から PI 3-kinase の持続的活性化の生理的意義が明らかになるものと期待している。