

論文の内容の要旨

論文題目 Functional analysis of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase, Pharbin

和訳 フォスファチジルイノシトール3リン酸5—フォスファターゼ、Pharbin の生理機能の解析

指導教官 竹縄 忠臣 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成15年4月入学

医学博士課程

病因・病理専攻

氏名 王 峰

<背景と目的>

イノシトールリン脂質は単に細胞膜の構成成分だけではなく、様々な細胞内シグナル伝達に関わる重要な分子であることが知られている。これまで、PI(3)Pを始め、PI(4)P、PI(5)P、PI(3,4)P₂、PI(3,5)P₂、PI(4,5)P₂とPI(3,4,5)P₃を合わせて全7種類のイノシトールリン脂質が見出された。中でもPI(4,5)P₂はホスホリパーゼC (PLC)によって加水分解され、二つの重要な二次メッセンジャー、inositol 1,4,5-trisphosphate (Ins(1,4,5)P₃)と diacylglycerol (DG)を生じる。Ins(1,4,5)P₃は小胞体のIns(1,4,5)P₃依存性チャンネルに結合し小胞体からのCa²⁺動員を引き起こし、DGはタンパクキナーゼC(PKC)を活性化する。こうした二次メッセンジャー産生脂質としての役割だけでなく、PI(4,5)P₂はプロフィリン、コフィリンやゲルソリンなどのアクチン調節タンパク質に直接結合し、細胞骨格系を制御することが知られている。また、PI(3)PやPI(3,5)P₂はエンドソームを中心とする細胞内小胞輸送に関与する。一方、PI3-キナーゼ産物の一つPI(3,4,5)P₃はセリン/スレオニンキナーゼであるAktやPDK1などのPHドメインに結合し、この一連の重要なタンパク質を細胞膜に移行させることによって、細胞の増殖、細胞死、タンパク質合成や糖の代謝など様々な機能を制御する役割を果たしている。

細胞内におけるイノシトールリン脂質の代謝はホスファチジルイノシトールキナーゼおよびホスファターゼによって極めて厳密に制御されている。キナーゼとしてPI 3-kinase、PI 4-kinase、PI4P 5-kinaseやPI5P 4-kinaseが知られているが、ホスファタ

一ゼに関してはイノシトール環の3位、4位、あるいは5位のリン酸基への特異性により3—ホスファターゼ、4—ホスファターゼ及び5—ホスファターゼが存在する。中でも PTEN 遺伝子産物は3—ホスファターゼであり、癌患者において p53 の次に高頻度で変異が見出される非常に重要な癌抑制遺伝子でもある。この酵素活性が低下すると、癌の発生する確率が増加するという事実は、PI(3,4,5)P₃ が癌の発生と密接な関係があることを示唆している。5—ホスファターゼは一番大きなファミリーをするホスファターゼで、Type1 5-phosphatase を始め、Synaptojanin1/2, OCRL (oculocerebrorenal syndrome of Lowe), PIPP (proline-rich inositol polyphosphates), SKIP (skeletal muscle- and kidney-enriched inositol polyphosphate phosphatase), SHIP1/2 (SH2 domain-containing inositol phosphatase1/2), 及び Phorb1 の9つのメンバーから成る。これらの5—ホスファターゼは小胞輸送、細胞骨格制御、糖代謝など幅広く細胞機能に関わることが明らかにされつつある。

インスリン様成長因子 (IGF-1) は多くの細胞の増殖、分化に必須なホルモンであり、個体レベルでも個体の発達や成長に重要な役割を果たしている。IGF-1 受容体は IGF-1 の結合によって活性化されるチロシンキナーゼであり、受容体自身を自己リン酸化し、さらにこの基質である insulin receptor substrate (IRS) をリン酸化する。このシグナルは主に二つ経路、すなわち MAP kinase カスケードと PI 3-kinase-Akt 経路に分かれて下流へと伝達される。MAP kinase カスケードへの伝達は IGF-1 の刺激による IRS や Shc などのチロシンリン酸化によって引き起こされる。これらのリン酸化チロシン残基を認識して SH2 ドメインを有する Grb2 が結合し、さらに GDP/GTP 交換因子 Sos と複合体に形成する。その結果、細胞膜にアンカーされている G タンパク質 Ras を活性化し MAP kinase カスケードへと伝達される。一方、リン酸化された IRS は PI 3-kinase を活性化することにより、細胞膜で PI(3,4)P₂ と PI(3,4,5)P₃ を生じ、PH ドメインを有する Akt や PDK 1 などが細胞膜に呼び寄せられ、そして Akt が活性化される。次に活性化された Akt は更なる下流に存在する数種類の基質分子をリン酸化し、細胞増殖や分化、細胞死、タンパク質合成や糖代謝など幅広い細胞機能を制御する。

近年、IGF-1 シグナルが PI3-kinase-Akt-mTOR を経由して p70 S6 kinase や 4E-BP1 をリン酸化することにより、mRNA の翻訳開始を誘導することが報告されている。しかし、このシグナル伝達を負に制御する機構は明らかとなっていない。そこで本研究では、5—ホスファターゼである Phorb1 が IGF-1 情報伝達系において果たす役割、特にタンパク質合成に至る制御機構を中心として検討した。

<結果と考察>

まず、GST タグをつけた Phorbol タンパク質を Sf9 細胞発現系で発現させ、精製したのち、全7種類のイノシトールリン脂質に対する基質特異性を検討した。その結果、PI(4,5)P₂と PI(3,4,5)P₃がこの酵素の基質であることが判明した。さらに、PI(4,5)P₂と PI(3,4,5)P₃を基質とするみかけ上の Km 値はそれぞれ 507μmol/Lと 287μmol/Lと算出された。PI(3,4,5)P₃に対する反応速度はPI(4,5)P₂の1.8倍と速いことから、PI(3,4,5)P₃がもっとも効率の良い Phorbol の基質であることが示唆された。

次に分子レベルで Phorbol の生理機能を調べるため、野生型 Phorbol 遺伝子、二つのホスファターゼ活性モチーフを欠失した変異体 Phorbol 遺伝子、およびコントロールとして GFP 遺伝子の組み換えアデノウィルスを作製した。この3種類のアデノウィルスを HeLa 細胞に感染させ、それぞれの最適な発現条件を決定したのち、Phorbol の機能解析を行った。

まず、コントロールおよび野生型 Phorbol 過剰発現細胞における全リン脂質を抽出し、TLC blotting 法によって各種イノシトールリン脂質量を測定した。その結果、Phorbol 過剰発現細胞内ではPI(3,4,5)P₃量が有意に低下しており、同脂質が本酵素の生理的な基質であることが明らかとなった。

次に、上記の3種類の組み換えアデノウィルスを発現させた HeLa 細胞を 50ng/ml の IGF-1 で刺激した。細胞抽出液調製後、ウェスタンブロッティングにより検討したところ、まず IGF-1 受容体の自己リン酸化は野生型、変異型 Phorbol の発現による有意な差は認められなかった。次に、IGF-1 受容体の下流における MAP kinase カスケードへの影響を特異的リン酸化抗体を用いて検討した。IGF-1 刺激依存的な MAP kinase のリン酸化が観察されたものの、Phorbol の過剰発現による影響は認められなかった。その一方で、PI 3-kinase 経路を介する Akt のリン酸化は野生型 Phorbol の過剰発現により顕著に抑制された。さらに、反対に RNA 干渉によって内在性 Phorbol の発現を約 40%程度まで低下させたところ、IGF-1 刺激による Akt のリン酸化が約 20—30%増加した。これらの結果から Phorbol が PI 3kinase-Akt 特異的な情報伝達経路を負に制御することが強く示された。PI3-kinase-Akt 情報伝達経路は細胞増殖、細胞死、タンパク質合成など、様々な細胞機能に深く関与することが知られており、Phorbol はこれを抑制することにより、生体内においても重要な役割を担うと考えられた。

次に、Akt よりさらに下流経路への phorbol の関与を検討するために、IGF-1 刺激依

存的な GSK3 β と p70 S6 kinase のリン酸化レベルを比較した。P70 S6 kinase の場合、IGF-1 刺激によって酵素活性を決定する Thr389 のリン酸化が野生型 Pharbin の発現によって強く抑えられた一方、MAP kinase の活性化のみに依存する Thr421/Ser424 のリン酸化は影響を受けなかった。この結果は、前述した Pharbin が MAP kinase の活性化に影響しないことに一致した。P70 S6 kinase は Ribosomal protein S6 をリン酸化し、そして活性化された Ribosomal protein S6 は 5'-TOP(5'-terminal oligopyrimidine tract)を持つ mRNA の翻訳を開始させ、タンパク質合成を進めることが知られている。そこで、Pharbin は IGF-1 依存的なタンパク質合成を制御する可能性が考えられた。

タンパク質合成を制御するもう一つの重要な分子である 4E-BP1 が Akt-mTOR の下流に存在する。細胞が静止期にある時は、4E-BP1 がタンパク質合成の開始因子である eIF4E と強く結合し、mRNA の翻訳を開始させる eIF4F (eIF4E、eIF4G と eIF4A) 複合体の形成を阻害する。増殖因子などの刺激により 4E-BP1 がリン酸化されると、速やかに 4E-BP1-eIF4E 複合体が解離し、eIF4E は eIF4G、eIF4A と複合体を形成してタンパク質合成を開始する。本研究においても、IGF-1 刺激によって 4E-BP1 の段階的なリン酸化が観察された。さらに、7-methy-GTP sepharose ビーズを用いた pulldown アッセイの結果から、4E-BP1 と eIF4E との結合が IGF-1 刺激に伴うリン酸化によって減少することが確認された。重要なことに、野生型 Pharbin の過剰発現によってこの 4E-BP1 のリン酸化を強く抑えられるとともに、コントロールと比較して 4E-BP と eIF4E との複合体形成が上昇していることが明らかになった。この一連の結果から Pharbin が IGF-1 依存的なタンパク質合成の誘導を負に制御することが強く示された。次に、³⁵S 標識されたアミノ酸の HeLa 細胞への取込みを測定し、IGF-1 刺激によるタンパク質合成への効果を比較したところ、野生型 Pharbin の発現によりタンパク質合成は約 14%低下することが判明した。細胞内のタンパク質合成への影響はアミノ酸の濃度を始めとする複雑な要因があり、さらに最適な条件を検討する必要があると考えられる。

IGF-1 刺激により、アクチン細胞骨格の再編成および細胞膜のラッフリング形成を引き起こすことが報告されている。そこで Pharbin はこの過程に関与するかを検討するために、Myc タグを付加した野生型 Pharbin 遺伝子、ホスファターゼ活性モチーフを欠失した変異体 Pharbin 遺伝子およびベクターのみを各々 HeLa 細胞系に一過性に発現させた。16 時間血清飢餓条件で培養したのち、10 分間の IGF-1 刺激を施し、共焦点顕微鏡下で細胞の形態変化を観察した。コントロールと比較して、野生型 pharbin の発現によって IGF-1 刺激依存的なラッフリング形成が有意に低下することが観察さ

れた。この効果は主に Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) が PI 3-kinase シグナルを負に制御することが原因であると考えられた。

次に、phorbol 12-myristate 13-acetate 過剰発現が細胞増殖に与える効果を soft agar アッセイにより検討した。前述した三種類のアデノウイルスを感染させた HeLa 細胞を 0.3%の soft agar に継代し、37°Cで二週間培養し、形成された colony の数を数えた。その結果、野生型 Phorbol 12-myristate 13-acetate の発現によって細胞増殖を有意に抑えられることが明らかになった。

<総括>

以上の結果から、Phorbol 12-myristate 13-acetate は PI(3,4,5)P₃ を脱リン酸化することにより、IGF-1 刺激依存的な PI 3kinase-Akt カスケードの活性化を抑制し、さらにタンパク質合成に至るシグナル伝達を負に制御することが強く示唆された。近年、IGF-1 によるタンパク質合成経路の異常が様々な筋疾患に深く関わることで報告されている。今後、心筋などの筋細胞において Phorbol 12-myristate 13-acetate の生理機能を調べる必要があると考えられる。