

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 王 峰

本研究はホスファチジルイノシトール脱リン酸化酵素である Pharbin について、HeLa 細胞における (1) アデノウイルス過剰発現系及び (2) RNA 干渉法による内在性の遺伝子の発現を抑制する手法を用い、IGF-1 増殖因子情報伝達系における同酵素の生理機能を解析したものである。本研究によって以下の結果が得られた。

- 1、 発現、精製した GST-Pharbin タンパク質を用い、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、 $PI(4,5)P_2$ と $PI(3,4,5)P_3$ がこの酵素によって脱リン酸化されることが示唆された。さらに TLC blotting 法を用いて、IGF-1 刺激による HeLa 細胞内での $PI(3,4,5)P_3$ 産生が、Pharbin 過剰発現に応じて減少することにより、Pharbin の生理的な基質が $PI(3,4,5)P_3$ であることを明らかにした。
- 2、 次に、IGF-1 シグナル伝達系における Pharbin の役割を調べた。まず、アデノウイルス発現系によって野生型 Pharbin 及び酵素活性を欠損した変異体を HeLa 細胞内に過剰発現させた。IGF-1 の刺激依存的に IGF-1 受容体の自己リン酸化が正常に起こっており、野生型や変異体 Pharbin の過剰発現による有意な差が認められなかった。同様に、下流における MAP kinase の活性を及ぼさないことも明らかになった。その一方で、PI 3-kinase 経路を介する Akt のリン酸化は野生型 Pharbin の過剰発現により顕著に抑制された。反対に、RNA 干渉法によって内在性 Pharbin の発現を減少させると、IGF-1 依存的な Akt のリン酸化が有意に上昇した。これらの結果から Pharbin が PI 3-kinase-Akt 経路を負に制御することが強く示された。

- 3、 Akt よりさらに下流の経路への影響を調べたところ、野生型 Phorbol 12-myristate 13-acetate の過剰発現により、IGF-1 刺激依存的な P70 S6 kinase、GSK3 β および 4E-BP1 のリン酸化を抑制することが明らかになった。さらに、7-methyl-GTP sepharose ビーズを用いた pulldown アッセイの結果から、IGF-1 刺激による 4E-BP1—eIF4E 複合体の解離が野生型 phorbol 12-myristate 13-acetate の過剰発現によって強く抑制されることも明らかになった。さらに、放射性同位体標識したアミノ酸を用いて 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結果、野生型 Phorbol 12-myristate 13-acetate の発現によりタンパク質合成は約 14%低下したことが明らかとなった。
- 4、 次に、IGF-1 依存的なアクチン細胞骨格の再編成および細胞のラップリング形成に対する Phorbol 12-myristate 13-acetate の役割を検討した。コントロールや酵素活性を欠損した変異体を発現させた細胞と比較したところ、野生型 Phorbol 12-myristate 13-acetate の発現により、IGF-1 刺激によるラップリング形成が有意に低下することが観察された。
- 5、 最後に Phorbol 12-myristate 13-acetate 過剰発現が細胞増殖に与える効果を soft agar アッセイにより調べたところ、野生型 Phorbol 12-myristate 13-acetate の発現によって細胞増殖を有意に抑制することが明らかになった。

以上、本論文はホスファチジルイノシトール脱リン酸化酵素である Phorbol 12-myristate 13-acetate が 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 3-kinase-Akt 情報伝達経路を抑制することを明らかにした。さらに IGF-1 刺激依存的なタンパク質合成や細胞膜ラップリングの形成、また細胞増殖を負に制御することを初めて見出した。本研究は、IGF-1 シグナル情報伝達系におけるホスファチジルイノシトール 3 リン酸 5—ホスホターゼの役割の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。