

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 18 年度博士課程進学
氏名 山中大介
指導教員名 千田和広

論文題目 PI 3-kinase に結合する新規シグナルタンパク質と
その下流シグナルの生理的意義の解明

インスリン様成長因子 (IGF) は、個体レベルでは、動物の正常な発生・発達・成長・成熟・タンパク質代謝などに必須なペプチドホルモンであり、細胞レベルでは、様々な細胞の増殖・分化・生存などを誘導する。IGF の特徴のひとつとして、その生理活性は単独で弱く、他の成長因子やホルモンなどの共存下で活性が増強される点を挙げる事ができる。したがって、生体の生理状態に応じて発現する IGF の生理活性を理解するためには、他の細胞外因子と IGF の協働作用の発現機構を解明する必要がある。

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、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に起こることを明らかにしてきた。この相乗作用発現機構を詳細に検討した結果、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 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) p85 制御サブユニットと結合して PI3K p110 触媒サブユニットの持続的な活性化を誘導する、②PI3K の持続的活性化は、G1 cyclin である cyclin D1 量を増加させ、他のシグナル経路の増強と相まって G1 CDK の著しい活性化を誘導、G1 期から S 期への細胞周期の進行が可能となる、③PI3K の持続的活性化は、IGF-I 受容体チロシンキナーゼによってリン酸化される細胞内基質である p66Shc 量を増加させ、この基質の IGF-I 依存性チロシンリン酸化を増強することなどを見出した。したがって、p125 は、cAMP 経路長時間刺激に応答して誘導される IGF-I 依存性 DNA 合成の増強に必要な PI3K 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 PI3K 結合タンパク質と推定された。

p125 の精製・同定を進めた結果、p125 が新規タンパク質であったため (expressed sequence AU041783)、PI 3-kinase-associated protein (PITKAP) と命名した。PITKAP は、分子内に 1 箇所 p85 PI3K 結合モチーフを持ち、更に Src ファミリーチロシンキナーゼの SH2 ドメイン結合モチーフ、SH3 ドメイン結合モチーフ、PI が相互作用する PH ドメイン、タンパク質—タンパク質間相互作用に機能すると予想される coiled-coil ドメインを有していた。また、このタンパク質に相同性のあるタンパク質をデータベースで検索したところ、AFAP-110 (actin filament-associated protein of 110 kDa) というタンパク質が存在した。このタンパク質は、Src にチロシンリン酸化され F-アクチンと相互作用、細胞遊走などに関与することが報告されている。

そこで本研究では、構造から予想された PITKAP の機能を、PI3K との相互作用、アクチンフィラメントとの相互作用という二つの側面から分子レベルで解析し、更に甲状腺細胞 FRTL-5 を用いて PITKAP が仲介している生理活性を明らかにすることを目的とした。

チロシンリン酸化PITKAPとPI3Kとの相互作用

これまでの研究成果から PITKAP は Src ファミリーチロシンキナーゼによってリン酸化される可能性が示されていたので、まず PITKAP と c-Src の結合能を検討した。その結果、dibutryl cAMP で 24 時間処理した FRTL-5 細胞や、PITKAP と c-Src を共発現した 293T 細胞において、PITKAP は c-Src と結合していることが明らかとなった。また、部分精製した PITKAP と c-Src を ATP 存在下 cell-free でインキュベーションしたところ、PITKAP のチロシンリン酸化が確認され、更に、293T 細胞に c-Src と PITKAP を共発現した際には、PITKAP がチロシンリン酸化されると同時に PI3K との結合が観察された。PITKAP と PI3K の結合部位を決定するために、PITKAP が持つ p85 PI3K が結合する YXXM モチーフのチロシン残基をフェニルアラニン残基に代えた変異体 (Y72F) を c-Src とともに 293T 細胞に発現して、PI3K との結合を解析した。Y72F 変異体が PI3K と結合しないという結果から、このモチーフが PI3K との結合に必要であると考えられた。更に PITKAP と PI3K の複合体形成が IGF の細胞増殖誘導活性に与える影響を調べる目的で、NIH3T3 細胞に PITKAP または Y72F 変異体を発現させ、IGF-I で刺激後 DNA 合成量を測定した。その結果、PITKAP を発現させた細胞では IGF-I 誘導性 DNA 合成が増強されたが、PI3K と結合しない Y72F 変異体を発現させた細胞ではこの効果が認められなかった。他の結果も併せ、PITKAP は、c-Src によってチロシンリン酸化され、アミノ酸番号 72 番のリン酸化チロシン残基を含む YXXM モチーフを介して PI3K と結合、この PI3K 活性を介して IGF の細胞増殖誘導活性を増強すると結論した。

PITKAPとアクチンフィラメントの相互作用

PITKAP と相同性の高い分子 AFAP-110 がアクチンフィラメント (F-アクチン) と相互作用することが明らかになっていたので、次に PITKAP と F-アクチンの細胞内局在を解析した。PITKAP の全長、あるいは様々な領域が欠失した変異体を NIH3T3 細胞に発現させ、F-アクチンの局在と比較した。その結果、カルボキシル末端側 69 個のアミノ酸を含む変異体はすべて F-アクチンとの共局在を示したが、この領域を含まない変異体は F-アクチンとの共局在が観察されなかった。同時に cell-free 系の結合実験によっても、PITKAP のこの領域と F-アクチンとの相互作用が確認された (以下、この領域を actin filament-binding region, ABR と呼ぶ)。続いて PITKAP と F-アクチンとの結合が、PITKAP と PI3K との複合体形成や複合体中の PI3K 活性に与える影響を調べるために、293T 細胞に c-Src と共に PITKAP 全長、あるいは ABR を含まない変異体 (Δ ABR) を高発現し、PI3K との結合量、複合体に含まれる PI3K 活性を測定した。PITKAP と Δ ABR 変異体の間に有意な差が観察されなかったことから、PITKAP と F-アクチンとの相互作用は PITKAP 複合体中の PI3K 活性には影響しないが、PITKAP は PI3K を F-アクチン近傍ヘリクルートするという役割を担っていると考えられた。一方、PITKAP のアミノ末端側アミノ酸番号 185 番目までの領域は PITKAP のオリゴマー形成能を担っていることが明らかとなり、PITKAP のオリゴマー化によって F-アクチン同士が架橋され、その結果アクチン線維束の形成が促進されることを初めて示すことができた。一般にアクチン線維束形成活性を持つタンパク質は細胞遊走や細胞接着に重要な役割を果たしていることが知られているので、PITKAP を高発現させた NIH3T3 細胞の移動能や細胞-基質間接着を調べたが、特別な表現型を示さなかった。以上の結果から、PITKAP は PI3K 活性を F-アクチン近傍ヘリクルートし、アクチン線維束形成を促進すると結論した。

PITKAPが仲介する生理活性の解析

FRTL-5 細胞における PITKAP の生理的意義を明らかにするために、PITKAP に対する siRNA を FRTL-5 細胞に導入し、dibutyryl cAMP で 24 時間前処理後 IGF-I で刺激、これまでの研究成果から PITKAP の関与が予想されている cyclin D1 と p66Shc のタンパク量を測定した。その結果、対照細胞において IGF-I 刺激 3 時間後に誘導される cyclin D1 の発現が PITKAP のノックダウンによって抑制され、他の結果も併せると、PITKAP は cyclin D1 の合成量の増加を介して cAMP と IGF の刺激に応答した FRTL-5 細胞の相乗的増殖を誘導していることが明らかとなった。一方、PITKAP ノックダウンによって cAMP 刺激に依存した p66Shc のタンパク量増加が部分的に抑制され、p66 Shc の増加の少なくとも一部は PITKAP により仲介されていると考えられた。p66Shc 増加の生理的意義を解明するために、FRTL-5 細胞に p66Shc を過剰発現あるいは p66Shc をノックダウンし、dibutyryl cAMP で 24 時間前処理後 IGF で処理、Shc 以降の IGF 細胞内シグナル伝達、IGF で誘導される増殖活性などについて検討を加えた。p66Shc 過剰発現により、IGF-I 依存的な p66Shc のチロシンリン酸化は増加したが、下流のセリン/スレオニンキナーゼである Erk

の活性化には影響がなく、IGF-I 誘導性 DNA 合成にも増強効果は認められなかった。一方、p66Shc をノックダウンした FRTL-5 細胞では、IGF-I 依存的な p66Shc のチロシンリン酸化が減少し、Erk 活性化の持続時間が短くなったが、cAMP 前処理による IGF-I 依存性 DNA 合成の増強には p66Shc ノックダウンの影響は観察されなかった。最後に、酸化ストレスが誘導する細胞死に対する p66Shc の影響を解析した。p66Shc の siRNA を導入した FRTL-5 細胞を H₂O₂ で処理し細胞死を誘導したところ、p66Shc ノックダウンによって H₂O₂ に応答して起こる細胞死が増強され、p66Shc が細胞生存活性を仲介していると考えられた。これらの結果は、PITKAP が cyclin D1 や p66Shc の合成を促進することにより、細胞増殖活性や細胞生存活性を増強する機能を発揮することを示している。

これまで、PI3K は、細胞膜上のチロシンキナーゼ内蔵型の受容体が自己リン酸化したもの、あるいは受容体キナーゼによってチロシンリン酸化された細胞膜近傍の基質に PI3K が結合して一過的に活性化され、多種多様な細胞に増殖や分化の誘導・細胞死の抑制・細胞遊走など、広範な生理作用を発揮するものと考えられてきた。しかし、本研究の成果により、分子レベルの機能が明らかとなった PITKAP は、c-Src のような細胞質チロシンキナーゼでリン酸化されこれを認識して PI3K が結合、アクチンフィラメント近傍に持続的に PI3K 活性を局在させるといふ、全く新しいタイプの PI3K 結合タンパク質である。PITKAP が、どのような機構を介して細胞周期制御タンパク質や受容体キナーゼ基質の量を増加させるのかはこれからの研究課題であるが、これらのシグナル分子の合成量を増加させることによって、IGF の増殖誘導活性や細胞生存活性を増強することも明らかとなった。PITKAP は多くの組織で発現が観察されることから、今後、それぞれの IGF 標的組織において IGF 活性の発現や増強に果たす PITKAP の役割を更に検討することにより、新しい観点から他の細胞外因子と IGF の協働作用発現機構が解明されることを期待している。