

[別紙2]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名

山中 大介

PI 3-kinase (PI3K) は、膜中のフォスファチジルイノシトール (PI) のイノシトール環 3 位の OH 基をリン酸化する酵素で、生成される PI(3,4,5)P<sub>3</sub> (PIP3) が引き金となって種々のシグナル系下流を活性化、多様な生理作用を発揮することが明らかにされている。一般に、PI3K はチロシンリン酸化タンパク質に p85 制御サブユニットが結合することにより、p110 触媒サブユニットが活性化されている。申請者が所属する研究室では、甲状腺細胞 FRTL-5 をモデル細胞として、甲状腺刺激ホルモン (TSH) 等による cAMP シグナル伝達系の長期活性化 (cAMP 処理) が、インスリン様成長因子 (IGF)-I の細胞増殖活性を増強する機構を解析する過程で、PI3K に結合する新規チロシンリン酸化タンパク質 (PI 3-kinase-associated protein, PITKAP と命名) を同定している。本論文は、PITKAP と PI3K の複合体形成機構や PITKAP の細胞内局在制御機構を分子レベルで明らかにし、PITKAP の制御下で働く下流因子の生理的意義を解明したもので、序章、本論が 3 章、そして総合討論からなる。

まず序章では、本研究の背景および意義を概説し、本研究の目的と本論文の構成について述べている。

FRTL-5 細胞を cAMP 処理すると PITKAP のタンパク量が増加し、チロシンリン酸化されて PI3K に結合することが明らかにされていた。そこで、第 1 章では、PITKAP のチロシンリン酸化や、PI3K との相互作用の分子機構について解析している。その結果、PITKAP は、c-Src によって直接チロシンリン酸化され、チロシンリン酸化された PITKAP は、アミノ酸番号 72 番のリン酸化チロシンを含むモチーフを介して、PI3K と結合することを明らかにした。さらに、PITKAP は IGF-I によって誘導される DNA 合成を促進し、この促進には PI3K との結合が必要であることを見出した。

FRTL-5 細胞を用いた細胞内局在の解析から、PITKAP はアクチンフィラメントに局在することが示されていた。そこで、第 2 章では、PITKAP がどのようにアクチンフィラメントに局在するか、また、PITKAP がアクチンフィラメントに局在することでどのような機能を発揮するかを解析している。その結果、PITKAP のカルボキシル末端側 69 アミノ酸から成る領域がアクチンフィラメントへの局在に必要かつ十分な領域で、この領域がアクチンフィラメントに直接結合することを明らかにした。さらに、PITKAP のアミノ末端側 185 アミノ酸からなる領域がオリゴマー形成能を有し、PITKAP のオリゴマー化によってアクチンフィラメントが架橋されることを発見した。

FRTL-5 細胞において、cAMP 処理に応答して、PI3K が活性化することが示されており、この活性化は PITKAP によって引き起こされると考えられている。この PI3K 活性化を介して、①IGF-I 刺激が誘導する cyclin D1 タンパク量增加が促進されること、②cAMP 処理に応

答した p66Shc タンパク量増加が起こることが明らかになっていたことから、cyclin D1、p66Shc は PITKAP が制御する下流因子の候補である。そこで、第 3 章では、PITKAP が cyclin D1、p66Shc の発現量を調節するかを調べ、PITKAP がどのような生理作用を仲介するかを解析している。その結果、PITKAP が IGF-I 刺激によって誘導される cyclin D1 のタンパク量増加を増強し、細胞周期の進行を促進することが明らかになった。また一方で、PITKAP は、cAMP 处理に応答した p66Shc のタンパク量増加の少なくとも一部を仲介することを見出した。さらに、p66Shc が、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>によって誘導される細胞死を抑制することを発見した。

総合討論では、PITKAP と他の PI3K 結合タンパク質間での PI3K 活性調節の特徴を比較し、PI3K 活性の時間的、空間的な調節の生理的意義について考察している。

このように、本研究は、c-Src によってチロシンリン酸化されて、PI3K と結合した PITKAP が、アクチンフィラメント近傍での PIP3 生成を誘導し、その下流因子として cyclin D1 のタンパク量増加を増強することで、IGF-I が誘導する細胞増殖を促進し、また一方で、p66Shc をもう一つの下流因子としてそのタンパク量増加を仲介し、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が誘導する細胞死を抑制するという生理的意義があることを初めて示したもので、学術上・応用上貢献するところが少くない。よって、審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位として価値あるものと認めた。