



Title	Ras-PI3K複合体の局在制御を介したIRS4によるエンドサイトーシスの制御機構に関する研究 [全文の要約]
Author(s)	堀内, 浩水
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第13027号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/70557
Type	theses (doctoral - abstract of entire text)
Note	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。; 配架番号 : 2406
Note(URL)	https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
File Information	Kosui_Horiuchi_summary.pdf



[Instructions for use](#)

学位論文（要約）

Ras-PI3K 複合体の局在制御を介した IRS4 による
エンドサイトーシスの制御機構に関する研究

(Studies on the regulatory mechanism of endocytosis by IRS4
through endosomal localization of the Ras-PI3K complex)

2018 年 3 月

北海道大学

堀内浩水

Ras は低分子量 GTPase の一種で、GTP と結合した活性化型、GDP と結合した不活性化型の二状態をとり、活性化型の Ras のみが下流の標的因子と結合しシグナルを下流に伝達する。Ras は GTP 加水分解以外の酵素活性を持たないにもかかわらず、細胞の生存や増殖・遊走など様々な現象の制御に関与する。こうした多機能性は、Ras の活性化の制御のみならず、下流の様々な標的因子との相互作用を使い分けることで実現される。Ras と標的因子のシグナル伝達は、「いつ・どこで」結合し活性化するかという、時空間的な制御が重要である。当研究室は、Ras の代表的な標的因子である c-Raf1、Ral guanine nucleotide dissociation stimulator、phosphoinositide 3-kinase (PI3K) のうち、PI3K が Ras と結合した時のみその複合体が細胞膜からエンドソームに移行すること、エンドソーム上の Ras-PI3K 複合体が発するシグナルがクラスリン非依存性エンドサイトーシスを亢進することが明らかにした。Ras と標的分子の複合体のうち PI3K との複合体のみが上皮増殖因子 (epidermal growth factor, EGF) 刺激依存的にエンドソームに移行し、エンドサイトーシスを制御する現象に着目し、前述の標的分子の Ras 結合ドメイン (Ras-binding domain, RBD) のアミノ酸配列を比較した。その結果、PI3K にのみ存在する特徴的な 28 アミノ酸配列が存在した。この配列を欠損させた PI3K の RBD はエンドソームに局在できなかつたことから、PI3K のエンドソーム局在に必須の配列、Ras-PI3K endosomal localization (RAPEL) 配列と名付け、RAPEL 配列との相互作用を介して Ras-PI3K 複合体をエンドソームにリクルートする分子の存在を想定した。本研究では、Ras-PI3K 複合体が特異的にエンドソームに移行する分子機構および、エンドサイトーシスを亢進する分子機構の解明を目指し、RAPEL 配列結合因子を探索し、その機能解析を行った。

本研究で用いた培養細胞株は、Cos-1 細胞、HEK293T 細胞、HeLa 細胞である。RAPEL 配列に結合する因子を網羅的に探索するため、RAPEL 配列との免疫共沈産物の質量解析を行った。候補因子の cDNA を HEK293T 細胞由来 cDNA ライブラリーから分子生物学的手法を用いてクローニングし、発現プラスミドを作製した。発現プラスミドの培養細胞への導入にはポリエチレンジメチルアミン (Cos-1 細胞と HEK293T 細胞) と FuGene HD (Promega; HeLa 細胞) を使用した。タンパク質の発現とリン酸化、タンパク質間相互作用は、ウエスタンブロットティングおよび免疫沈降法で解析した。Ras-PI3K 複合体の挙動は蛍光タンパク質の 2 分子蛍光相補法 (bimolecular fluorescence complementation, BiFC) を用いて複合体を可視化し、蛍光顕微鏡もしくは共焦点顕微鏡で観察した。分子の細胞内局在は免疫蛍光染色法および蛍光顕微鏡観察、共焦点顕微鏡観察により解析した。細胞のエンドサイトーシス能は、蛍光標識デキストランの取り込みを蛍光顕微鏡下で観察し、得られた画像を定量解析することで評価した。候補因子に対する siRNA を用いたノックダウン実験では、ウエスタンブロットティングで標的タンパク質の発現量を定量した後、エンドサイトーシス能の評価および Ras-PI3K 複合体の挙動解析を行った。得られた画像の解析には画像解析ソフト MetaMorph (Universal Imaging) を用いた。

質量分析法による RAPEL 配列との免疫共沈産物のスクリーニングの結果、48 個の候補因子が同定された。48 個の候補因子の中から、insulin receptor substrate 4 (IRS4) という分子に着目した。IRS4 はインスリン依存的にインスリン受容体によってリン酸化される基質分子の 1 つである。免疫沈降法で RAPEL 配列と IRS4 の相互作用を確認した。次に、シアン色蛍光タンパク質 (cyan

fluorescent protein, CFP) を付加した IRS4 を細胞に発現させ、EGF 刺激下での局在変化を観察したところ、細胞質中にびまん性に局在していた IRS4 が EGF 刺激によって顆粒状の局在へと変化した。この顆粒状構造は、初期エンドゾームマーカータンパク質である EEA-1 と共局在した。次に、BiFC によって可視化した EGF 刺激依存的に形成される小胞状の Ras-PI3K 複合体と IRS4 の局在を観察したところ、Ras-PI3K と IRS4 は共局在した。IRS4 が Ras-PI3K 複合体のエンドゾームへリクルートするか否かを評価するために、siRNA で IRS4 をノックダウンした。IRS4 をノックダウンした細胞では、EGF 刺激依存的な Ras-PI3K 複合体のエンドゾームへの移行が抑制され、デキストラン取り込みも抑制された。また抗リン酸化チロシン抗体を用いたウエスタンブロッティングにより、EGF 刺激により IRS4 がリン酸化されることが明らかになった。この EGF 依存性リン酸化は Src ファミリーキナーゼ阻害薬 PP2 によって抑制された。さらに PP2 は EGF 依存的な IRS4 および Ras-PI3K 複合体のエンドゾームへの移行とエンドサイトーシスを抑制した。PI3K 阻害薬 LY294002 によっても、IRS4 および Ras-PI3K 複合体のエンドゾームへの移行が抑制された。IRS4 のトランケーション変異体を作製してその細胞内局在を観察したところ、pleckstrin homology (PH) ドメインとチロシンリン酸化される C 末端側領域 (C2 ドメイン) がエンドゾーム局在を示した。以上のことから、IRS4 のエンドゾームへの移行にはホスホイノシタイドとの結合およびチロシンリン酸化が関与することが示唆された。そこで、全長の IRS4 から PH ドメインを欠損させ、C2 ドメイン内のチロシン残基をフェニルアラニンに置換した変異型 IRS4 の発現ベクターを作製した。初期エンドゾームとの共局在を観察すると、変異型 IRS4 はエンドゾームとの局在が減少し、EGF 刺激にも応答しなかった。IRS4 をノックダウンした細胞に野生型もしくは変異型 IRS4 を発現させ、デキストランの取り込みを評価した。野生型の IRS4 発現によりデキストランの取り込みはコントロール細胞と同程度に回復したのに対して、変異型 IRS4 の発現では、デキストランの取り込みは抑制されたままであった。以上の結果から、EGF 刺激下で IRS4 は自身のエンドゾーム移行を介して Ras-PI3K 複合体の局在を制御することが明らかになった。IRS4 自体のエンドゾームへの移行の分子機構には、PH ドメインとホスホイノシタイドとの結合を介した機構と、IRS4 のリン酸化チロシンと他の分子の相互作用を介した機構が考えられる。

RAPEL 配列を介した Ras-PI3K 複合体の局在制御因子として IRS4 を同定した。IRS4 が Ras-PI3K 複合体と共局在し、IRS4 の KD によって Ras-PI3K 複合体のエンドゾームへの移行とエンドサイトーシスが抑制されたことから、IRS4 は Ras-PI3K 複合体の局在制御を介してエンドサイトーシスに関与することが明らかになった。IRS4 は EGF 刺激によってエンドゾームに移行するが、この移行には PH ドメイン依存的な機構とチロシンリン酸化依存的な機構の 2 つの機構が関与することも明らかになった。

本研究により、IRS4 のエンドゾーム移行に必須の領域が特定され、2 つの機構により移行することを明らかにできた。IRS4 がエンドゾーム移行する、より詳細な分子機構を解明することにより、IRS4 に特異的な機能とその生物学的意義がさらに明らかになることが期待される。