



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〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	堀内, 浩水
Description	配架番号 : 2406
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13027号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70556
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Kosui_Horiuchi_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 堀内 浩水

学 位 論 文 題 名

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)

【背景と目的】 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ったことから、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た。

【材料と方法】 本研究では培養細胞株の Cos-1 細胞、HEK293T 細胞、HeLa 細胞、A431 細胞を用いた。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分析法を行った。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イミン (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、western blotting (WB) および免疫沈降法で解析した。Ras-PI3K 複合体の挙動は蛍光蛋白質の 2 分子蛍光相補法

(bimolecular fluorescence complementation, BiFC) を用いて複合体を可視化した。分子の細胞内局在は免疫蛍光染色法で染色した・それぞれ蛍光顕微鏡もしくは共焦点顕微鏡で観察した。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た。候補因子に対する siRNA を用いた knockdown (KD) 実験では、WB で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。得られた画像は解析ソフト MetaMorph (Universal Imaging) を用いて解析した。

【結果と考察】RAPEL 配列との免疫共沈産物の質量分析法による解析の結果、48 個の候補因子が同定された。これらの中から、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、細胞内局在を観察した。細胞質中のびまん性局在を示したが EGF 刺激によって初期エンドゾームマーカータンパク質である EEA-1 と共局在する顆粒状構造を示した。次に、BiFC によって可視化した Ras-PI3K 複合体と IRS4 は EGF 刺激依存的に共局在した。IRS4 が Ras-PI3K 複合体の局在を制御するか否か評価するために、siRNA で IRS4 を KD した。IRS4-KD 細胞では、EGF 刺激依存的な Ras-PI3K 複合体のエンドゾーム移行とデキストラン取り込みが抑制された。また抗リン酸化チロシン抗体を用いた WB により、EGF 刺激下で IRS4 がリン酸化され、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 によって抑制されることが明らかになった。さらに PP2 は EGF 依存的な IRS4 および Ras-PI3K 複合体のエンドソームへの移行とエンドサイトーシスを抑制した。PI3K 阻害剤 LY294002 でも同様の抑制がみられた。IRS4 のトランケーション変異体を作成したところ、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) がエンドソーム局在を示した。以上のことから、IRS4 のエンドソームへの移行にはホスホイノシタイドと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。変異型 IRS4 はエンドソーム局在が減少し、EGF 刺激にも応答しなかった。IRS4-KD 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回復しなかった。以上の結果から、EGF 刺激下で IRS4 は自身のエンドソーム移行を介して Ras-PI3K 複合体の局在を制御することが明らかになった。IRS4 自体のエンドソームへの移行の分子機構には、PH ドメインとリン酸化チロシンを持つ C2 ドメインを介した二つの機構が考えられる。

【結語】RAPEL 配列を介した Ras-PI3K 複合体の局在制御因子として IRS4 が得られた。IRS4 が Ras-PI3K 複合体と共局在し、IRS4 の KD によって Ras-PI3K 複合体のエンドソ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 複合体の局在制御因子であることが明らかになった。IRS4 は EGF 刺激によってエンドソームに移行するが、PH ドメイン依存的、もしくはチロシンリン酸化依存的な機構によってエンドソームに移行していると考えられ、このエンドソームへの移行は Ras-PI3K 複合体の局在制御にも関与する。