HOKKAIDO UNIVERSITY

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_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称　　博士（医　学）　　氏 名　堀内　浩水

主査　教授　渡邉　雅彦
審査担当者　副査　教授　村上　正晃
副査　教授　佐邊　壽孝
副査　教授　野口　昌幸

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）

申請者は、低分子量 G タンパク質である Ras とその標的分子の一つである phosphoinositide 3-kinase（PI3K）の複合体が、エンドソームへの局在を介してエンドサイトーシスを制御する分子機構の探索を行った。まず、PI3K の Ras 結合ドメインに複合体のエンドソーム局在に重要な配列を見出し、その配列を Ras-PI3K endosomal localization（RAPEL）配列と命名した。次に RAPEL 配列と相互作用する因子を質量分析によって探索した結果、候補因子として insulin receptor substrate-4（IRS4）を同定した。IRS4 が Ras-PI3K 複合体のエンドソームへの移行と、クラスリン非依存性エンドサイトーシスを制御していることを IRS4 のノックダウン実験で証明した。また、IRS4 自身も上皮増殖因子（epidermal growth factor, EGF）刺激によって、pleckstrin homology（PH）ドメインを介した機構と IRS4 のチロシンリン酸化を介した機構からなる 2 つの機構を介してエンドソームに移行する。そうした IRS4 の移行が Ras-PI3K 複合体の局在制御とエンドサイトーシスの制御に重要であることも明らかにした。

審査にあたり副査の村上教授から、定常状態において IRS4 と RAPEL 配列が相互作用しているか否かという質問があり、IRS4 と RAPEL 配列は定常状態でも相互作用していると考えられると回答した。さらに、PH ドメインがホスファチジルイノシトール-3-リン酸［phosphatidylinositol 3-phosphate, PI(3)P］よりもフォスファチジン酸（phosphatidic acid, PA）と強く結合している意義について質問があり、PA は細胞膜に局在しているので IRS4 が細胞膜に局在するのに重要かもしれないが、エンドソーム移行には PI(3)P が重要だと考えていると回答した。最後に、IRS4 のエンドソームへの移行にはチロシンリン酸化を介する機構と PH ドメインを介する機構のどちらがメインの機構であるかに関する質問がなされ、それ

ぞれのドメインの関連性については今後さらに検討したいと回答した。

次に副査の佐邊教授から、大学院生の仕事としては十分なレベルであるが、博士課程終了後も研究者として職に就こうとするのであれば、研究の中核を明確化して研究を進めるとともに、収集した関連情報から読み取れる既成事実のみにとらわれず、様々な可能性を考慮して挑戦する必要があるとのコメントがあった。

つづいて副査の野口教授から、PI3K の調節サブユニットである p85 と IRS の他のファミリーである IRS1 や IRS2 が相互作用についての質問があり、p85 については検討していないと回答した。実験に用いた IRS4 の変異体と RAPEL 配列が結合するかどうかという質問に対しては、IRS4 は phosphotyrosine binding（PTB）ドメインを介して RAPEL と結合するが、どの変異体も共通して PTB ドメインを有していることから RAPEL 配列と相互作用すると予想されると回答した。また、ノックアウトマウスの表現型が IRS ファミリーの発現の臓器特異性によるものかという質問があり、マウスでは IRS ファミリーはユビキタスに発現しており、発現臓器の違いによる表現型の違いではないと考えると回答した。さらに、複数の候補因子から IRS4 を選んだ理由についての質問があり、質量分析のスコアが比較的高く、インスリン受容体の基質となりうるにもかかわらずインスリンシグナルでの機能が未知な分子として興味を持ったと回答した。

最後に主査の渡邉教授から、候補因子を選ぶ際に組織発現等に考慮したか否かという質問があり、組織発現は考慮していないと回答した。内在性 IRS4 の検討状況に関する質問に対しては、抗 IRS4 抗体を用いて内在性 IRS4 の免疫染色を試みたが、特異的な染色像が得られず結果が得られていないと回答した。また、PI3K の他のアイソフォームの配列を用いた場合の質量分析の結果についての質問がなされ、申請者は他のアイソフォーム由来の配列を用いた場合に異なる因子が得られる可能性もあるが、RAPEL の機能にとって重要なアミノ酸は各アイソフォーム間で保存されていると回答した。さらに、IRS4 のリン酸化されうるチロシン残基のうちが重要なものはどれかという質問がなされ、今後単一のチロシン残基を置換した変異体を作製し検討したいと回答した。

その後再度副査の野口教授から、クラス III の PI3K 特異的な阻害薬を用いた実験は行わないのかという質問があり、今後実施予定であると回答した。また、IRS4 の oncogenic な機能と今回発見した現象との関係について質問があり、Ras-PI3K 複合体を介したメンブレントラフィック制御を介して、栄養や物質の取り込みによって関与していると予測されると回答した。

本論文は、Ras-PI3K 複合体の局在制御を介したエンドサイトーシスの制御機構に IRS4 が関与していることを明らかにし、さらに IRS4 の新たな機能を報告する意義深いものである。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。