



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13027
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/88827
Type	doctoral thesis
File Information	Kosui_Horiuchi.pdf



学位論文

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

【目次】

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	2 頁
略語表	6 頁
実験方法	8 頁
実験結果	17 頁
考察	32 頁
総括および結論	35 頁
謝辞	36 頁
引用文献	37 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に投稿中である

1. Kosui Horiuchi, Yoichiro Fujioka, Aya O. Satoh, Mari Fujioka, Sarad Paudel, Shinya Nishide, Aasuka Nanbo, Chikashi Obse, and Yusuke Ohba
IRS4 mediates EGF-promoted upregulation of endocytosis through endosomal localization of the Ras-PI3K complex
Nature Structural & Molecular Biology (in submission)

本研究の一部は以下の学会に発表した

1. 堀内浩水、藤岡容一郎、南保明日香、佐藤絢、西出真也、小布施力史、大場雄介.
Ras-PI3Kシグナルによるエンドサイトーシス制御に関与する分子の探索
第37回日本分子生物学会年会 2014年11月25日～2014年11月27日 パシフィコ横浜
2. 堀内浩水、藤岡容一郎、南保明日香、佐藤絢、西出真也、小布施力史、大場雄介.
Ras-PI3Kの時空間制御を介したエンドサイトーシス調節因子の機能解析
第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会 2015年12月1日～
2015年12月4日 神戸ポートアイランド
3. 堀内浩水、藤岡容一郎、南保明日香、佐藤絢、西出真也、小布施力史、大場雄介.
Ras-PI3Kシグナルを介したエンドサイトーシスの制御に関与する分子の機能解析
第93回日本生理学会大会 2016年3月22日～2016年3月24 札幌コンベンションセンター
4. 堀内浩水、藤岡容一郎、佐藤絢、Prabha Nepal、堀口美香、Jing Wang、西出真也、南保明日香、小布施力史、大場雄介.
Ras-PI3K 複合体の時空間制御を介したエンドサイトーシス調節因子の探索
第68回日本細胞生物学会. 2016年6月15日～2016年6月17日 京都テルサ
5. 堀内浩水、藤岡容一郎、佐藤絢、Prabha Nepal、Jing Wang、堀口美香、Paudel Sarad、西出真也、南保明日香、小布施力史、大場雄介
Ras-PI3K複合体によるエンドサイトーシスの制御因子の探索と機能解析
第69回日本細胞生物学会大会 2017年6月13日～2017年6月15日 仙台国際センター

【緒言】

細胞内シグナルが正しく伝達されるためには、タンパク質の修飾、タンパク質間相互作用、酵素活性の変化などが秩序正しく行われている必要がある。この秩序が厳密かつ、時空間的に制御される、すなわち分子の活性化が「いつ・どこで」生じるかによって、細胞の形態変化や遺伝子発現制御などの表現型が決定される。例えば、神経成長因子受容体は細胞膜で活性化すると細胞の増殖を、エンドソームで活性化すると細胞の分化を促進することが報告されている^{1,2}。他にもエンドソームから発信されるシグナルの重要性が明らかになりつつあり^{3,4}、エンドソームは単なるオルガネラではなく、シグナルを積極的に発信するプラットフォームとしても注目されている。低分子量 GTP 結合タンパク質である Ras は、酵素活性としては GTP の加水分解能のみを有するにも関わらず、細胞増殖や転写、生存、遊走といった様々な生命現象において重要な役割を持つ⁵。したがって、Ras は標的因子群を「いつ・どこで」活性化するかを厳密に制御することで、生体内において多彩な役割を担うことができるのではないかと考えられている。

Ras には Harvey rat sarcoma virus のホモログ（同族体）の H-Ras、Kirsten rat sarcoma virus ホモログの K-Ras、後に神経芽細胞腫から単離された N-Ras の三種類がある。ヒトの様々な悪性腫瘍で Ras の変異が見つかっている。H-Ras は膀胱がん、K-Ras は膵がんや大腸がん、N-Ras はリンパ性腫瘍や黒色腫で特に変異が多く見られる。恒常的活性化型変異を有する Ras は、いずれも GAP による抑制がきかなくなり、過剰な細胞の増殖や細胞死、浸潤などを引き起こす⁶。一方で、K-Ras 欠損マウスが胎生致死であるのに対し、H-Ras 欠損マウス、N-Ras 欠損マウスおよび H-Ras と N-Ras の二重欠損マウスの発達や成長が寿命も野生型マウスと同等であることから、少なくとも胎生期には K-Ras 特異的な機能があるものと考えられる^{7,8}。すべての Ras は C 末端に CAAX モチーフと呼ばれる脂質修飾部位を持っている。H-Ras と N-Ras はパルミトイル化されており K-Ras はファルネシル化されることで細胞膜に局在することが報告されている⁹。また、Ras ホモログのうち H-Ras と N-Ras は細胞膜の他にゴルジ体に存在することが知られており、さらに H-Ras はエンドソーム上にも存在することが報告されている¹⁰。こうした細胞内での局在の違いは、それぞれの Ras ホモログが異なる時空間制御を使い分けていることを示唆している。

Ras の標的因子は代表的な Raf、phosphoinositide 3-kinase (PI3K)、Ral guanine nucleotide dissociation stimulator (RalGDS) をはじめ、10 種類以上が報告されており、Ras 結合ドメイン (Ras-binding domain, RBD) を介して活性型 Ras と結合する¹¹。これら複数の標的因子を使い分けることによって Ras は様々な生命現象を制御する (図 1)。例えば、標的因子の一つである Raf は古典的 mitogen-activated protein

kinase (MAPK) 経路を活性化し、最終的に extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) の活性化と核移行を介して遺伝子発現を促進する^{12,13}。RalGDS は Ral を活性化し¹⁴、ZO-1-associated nucleic acid-binding protein (ZONAB) や Ral binding protein 1, (RalBP1) -POB1 を活性化して、転写やエンドサイトーシスを制御する^{15,16}。

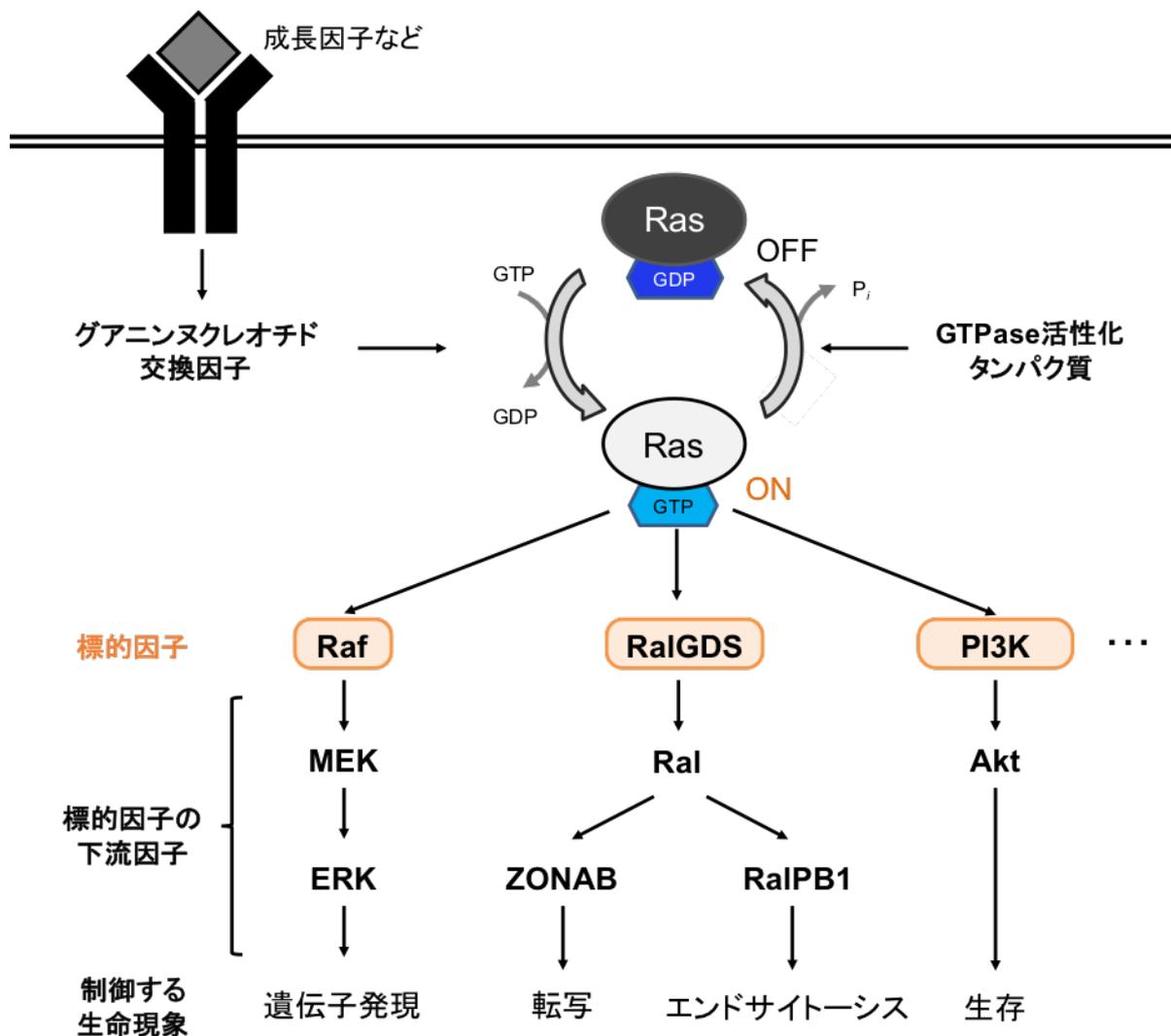


図1 複数の標的因子を介した Ras シグナル経路

PI3K は構造的な特徴と基質特異性の違いによって Class IA から III に分類されている¹⁷。全てのクラスに共通の機能として細胞膜上のイノシトールリン脂質のイノシトール環 3 位の水酸基をリン酸化し、ホスファチジルイノシトール 3-リン酸 (phosphatidylinositol 3-phosphate, PI(3)P)、ホスファチジルイノシトール 3,4-ビスリン酸 (PI(3,4)P₂)、ホスファチジルイノシトール 3,5-ビスリン酸 (PI(3,5)P₂)、ホスファチジルイノシトール 3,4,5-トリスリン酸 (PI(3,4,5)P₃) を生成する¹⁸。これらイノシトールリン脂質と相互作用するドメインである、Fab 1, YOTB, Vac 1, and

EEA-1 (FYVE) ドメイン、pleckstrin homology (PH) ドメイン、Phox (PX) ドメインを持つ分子をエンドソームや細胞膜へリクルートして下流にシグナルを伝達する。例えば、PI(3)P と結合する FYVE ドメインを持つ early endosome antigen-1 (EEA-1) は、初期エンドソーム上で産生された PI(3)P との結合を介して集積し、初期エンドソーム同士の融合を促進する¹⁹。一方、PX ドメインを持つ sorting nexins が PI(3)P と結合すると、ダイナミンによるエンドソームの切り離しや細胞膜の管状の陥入形成が起こる²⁰。PH ドメインを持つ Akt は PI(3,4,5)P₃ との結合で活性化され、細胞の生存を亢進する。

当研究室は Ras と標的因子の相互作用が時空間的に制御されていることの一例として、Ras の標的因子である Raf、RalGDS、PI3K の中で、Ras が PI3K と相互作用した時のみ、特異的にエンドソームに移行することを報告した²¹。また、エンドソーム上に存在する Ras-PI3K 複合体から発せられるシグナルが、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を明らかにした²²。このような Ras と PI3K に特異的なエンドソームへの移行には、PI3K の RBD に存在する 28 アミノ酸からなる Ras PI3K endosomal localization (RAPEL) 配列が必要であることが明らかになり (論文投稿中)、RAPEL 配列に結合するタンパク質が存在し、Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行を制御することが示唆された。そこで本研究では、RAPEL 配列を介した Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行メカニズムの解明を目指し、RAPEL 配列と相互作用する分子のスクリーニングを行った。その結果、得られた候補因子の一つである insulin receptor substrate 4 (IRS4) に注目して研究を行った。

IRS4 はインスリン受容体のチロシンキナーゼの基質分子である IRS ファミリーに属する分子である。IRS はリガンドと結合したインスリン受容体もしくはインスリン様増殖因子 I (insulin-like growth factor, IGF-I) 受容体によってリン酸化され、PI3K や growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2) と相互作用することによって下流へシグナルを伝達する分子である²³。N 末端に相同性の高い PH ドメインと phosphotyrosine binding (PTB) ドメインを持っており、C 末端側の領域にチロシンキナーゼによってリン酸化されるチロシン残基が存在する²⁴⁻²⁶。IRS4 はヒト胎児由来腎臓上皮細胞株 human embryonic kidney (HEK) 293 細胞からクローニングされた分子量 160 kDa のタンパク質で、インスリン刺激によってリン酸化されることおよび、IRS1-IRS3 との相同性から 4 つ目の IRS ファミリーの分子として同定された^{27,28}。IRS4 と IRS1、2 とのアミノ酸配列の同一性はそれぞれ 27%、29%とあまり高くないが、N 末端側の PH ドメインと PTB ドメインのみのアミノ酸配列の同一性をそれぞれ比較すると、IRS4 の PH ドメインに対する IRS1~3 の PH ドメインの同一性はそれぞれ 34%、50%、43%で、IRS4 の PTB ドメインに対する IRS1-3 の PTB

ドメインの同一性はそれぞれ 66%、62%、43%であり、N 末端側の領域でより高い同一性を持っている²⁶。ヒトで発現している IRS は IRS1、IRS2 と IRS4 の 3 種類で、IRS1 と IRS2 はインスリンシグナルにおいて重要な役割を持っていることが報告されている²⁹。IRS1 と IRS2 は受容体型チロシンキナーゼによってリン酸化されると、PI3K の p85 サブユニットとの相互作用を介して PI3K-Akt 経路を活性化し、グルコーストランスポーターの局在を細胞内から細胞膜へと変化させることで細胞内へのグルコース取り込みを亢進させる^{30,31}。一方 IRS4 は、インスリン刺激下でのリン酸化とそれに伴う下流因子 (PI3K と Grb2) との相互作用が認められるものの、IRS4 ノックアウトマウスでは 2 型糖尿病やインスリン抵抗性などの表現型は認められない³²。また、ノックアウトマウスには他の顕著な表現型が認められないことから、インスリンシグナル経路における役割を含め IRS4 の機能はあまり明らかにされていなかった。

本研究では IRS4 が EGF 刺激に伴ってエンドソームへ移行し、Ras-PI3K 複合体をエンドソームにリクルートしすること、およびこのエンドソーム移行を介してエンドサイトーシスを制御していることを明らかにした。さらに、IRS4 は EGF 刺激によって Src 依存的にリン酸化されエンドソームへ移行すること、および EGF 非存在下においては PH ドメインを介してエンドソームに移行することが明らかになった。

【略語表】

BiFC	: bimolecular fluorescence complementation
BMP	: bone morphogenic proteins
BSA	: bovine serum albumin
CBB	: Coomassie brilliant blue
CFP	: cyan fluorescent protein
DMEM	: Dulbecco's modified Eagle medium
EEA-1	: early endosome antigen-1
EGF	: epidermal growth factor
EGFP	: enhanced green fluorescent protein
EGFR	: epidermal growth factor receptor
ERK	: extracellular signal-regulated kinase
FBS	: fetal bovine serum
FYVE	: Fab 1, YOTB, Vac 1, and EEA-1
glut4	: glucose transporter type 4
Grb2	: growth factor receptor-bound protein 2
GST	: glutathione S-transferase
HEK	: human embryonic kidney
HRP	: horseradish peroxidase
IF	: immunofluorescence staining
IGF-I	: insulin-like growth factor 1
IP	: immunoprecipitation
IRS	: insulin receptor substrate
MAPK	: mitogen-activated protein kinase
PBS	: phosphate-buffered saline
PFA	: paraformaldehyde
PH	: pleckstrin homology
PHIP	: PH-interacting protein
PI(3,4,5)P ₃	: phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate
PI(3,4)P ₂	: phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate
PI(3,5)P ₂	: phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate
PI(3)P	: phosphatidylinositol 3-phosphate

PI3K : phosphoinositide 3-kinase
PTB : phosphotyrosine binding
PVDF : polyvinylidene difluoride
PX : Phox
RalBP : Ral binding protein
RalGDS : Ral guanine nucleotide dissociation stimulator
RAPEL : Ras-PI3K endosomal localization
RBD : Ras-binding domain
RFP : red fluorescent protein
ROI : region of interest
rpm: rotation per minutes
SH : Src homology
siRNA : small interference RNA
SOC : super optimal broth (SOB) with catabolite repression
TBS : Tris-buffered saline
WB : western blotting
ZONAB : ZO-1-associated nucleic acid-binding protein

【実験方法】

細胞培養

HEK293T (CRL-3216)、アフリカミドリザル由来腎臓上皮細胞株 Cos-1 (CRL-1650)、ヒト子宮頸癌由来細胞株 HeLa (CCL-2) は American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) から購入した。10%ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) と 1%ペニシリン-ストレプトマイシン (Sigma, St Louis, MO, USA) 含有ダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle Medium-high glucose, DMEM, Sigma) を用い、37°C、5% CO₂、湿潤環境下で培養した。

遺伝子導入

HEK293T および Cos-1 細胞への遺伝子導入はポリエチレンイミン (PEI Max 40K, Polyscience, Warrington, PA, USA) を用いた。OPTI-MEM (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) 250 μ l に精製プラスミドと 2 μ l のポリエチレンイミンを加えて vortex をした後、室温で 5 分インキュベートし細胞培養液中に加えた。CO₂ インキュベーターで 6 時間インキュベート後に培養液を交換した。HeLa 細胞への遺伝子導入は FuGene HD Transfection Reagent (Roche, Indianapolis, IN, USA) を用いた。OPTI-MEM 100 μ l に精製プラスミドと精製プラスミドの三倍量の FuGene HD を加え vortex をした後、室温で 10 分インキュベートし、1 ml の DMEM に培地を交換して細胞培養液中に加えた。培養細胞は 37°C で 4 時間インキュベート後に培養液を交換した。

プラスミド構築

pCAGGS-Venus-NT-H-Ras-WT、pCXN2-Flag-PI3KRBD-Venus-CT²¹、pCAGGS-CFP³³、pFX-SECFP-FAT、pFX-EGFP-FAT、pFX-Venus-FAT、pCAGGS-PI3KRBD-FLAG、pCAGGS-CFP-Rab5(ref. 22)、pCAGGS-ECFP-RAPEL、pCAGGS-GST および pCAGGS-GST-RAPEL (論文投稿中) は当教室において以前に作製されたものを使用した。pCMV-TagRFP-T-EEA-1 (#42635) は AddGene より購入した³⁴。全長の IRS4 を pCR-Blunt II-TOPO-IRS4 から *EcoRI* と *PspOMI* で切り出し (ただし、ベクターと IRS4 のサイズを区別するために *ApaI* でベクターを切断した)、pCAGGS-PI3KRBD-FLAG の *EcoRI/NotI* サイトにクローニングして pCAGGS-IRS4-FLAG を得た。

IRS4 とその変異体 (Δ *SaI*、トランケーション変異体、 Δ PH 変異体、6YtoF 変異体、 Δ PH-6YtoF 変異体) のコード配列を *SaI* と *PspOMI* で切り出し、pFX-SECFP-FAT、pFX-EGFP-FAT、pFX-Venus-FAT の *XhoI/NotI* サイトにサブクローニングして

pFX-SECFP-IRS4、pFX-SECFP-IRS4_PH、pFX-SECFP-IRS4_PTB、
 pFX-SECFP-IRS4_C1、pFX-SECFP-IRS4_C2、pFX-SECFP-IRS4_C3、
 pFX-SECFP-IRS4 Δ PH、pFX-SECFP-IRS4YtoF、pFX-SECFP-IRS4 Δ PH-6YtoF、
 pFX-EGFP-IRS4、pFX-EGFP-IRS4 Δ PH、pFX-EGFP-IRS4YtoF、
 pFX-EGFP-IRS4 Δ PH-6YtoF、pFX-Venus-IRS4_PH、pFX-Venus-IRS4_C2 を得た。
 上記のプラスミドのうち細胞に遺伝子導入するものは、形質転換した大腸菌を 100 ml の Lysogeny Broth (LB) 液体培地を用いて、一晩 37°C で震盪培養したのち NucleoBond Xtra Midi EF (タカラバイオ、草津、滋賀) を用いて midi prep を行い精製プラスミドを得た。

抗体

本研究で使用した抗体を表 1 に示す。

表 1. 使用した抗体リスト

No.	Antibody	Cat.#	Species	Supplier
1	anti-GFP (serum)	-	Rabbit	(Ref 35)
2	anti-IRS4	ab56477	Mouse	Abcam
3	anti-phosphoTyrosin (PY20)	610000	Mouse	BD
4	anti-GFP (polyclonal)	598	Rabbit	MBL
5	anti-GFP (monoclonal)	D153-3	Mouse	MBL
6	anti-GST	017-21854	Mouse	Wako
7	anti-Akt	9272S	Rabbit	CST
8	anti-phosphoAkt (S473)	9271	Rabbit	CST
9	anti-ERK1/2	9102	Rabbit	CST
10	anti-phosphoERK1/2	9101	Rabbit	CST
11	anti-FLAG (M2)	F1804-1MG	Mouse	Sigma
12	anti-EEA-1	610456	Mouse	BD
13	anti- β -actin	sc-1616	Goat	Santa Cruz
14	Goat anti-mouse IgG-HRP	G21040	Goat	Invitrogen
15	Goat anti-rabbit IgG-HRP	A-6667	Goat	Sigma
16	Donkey anti-goat IgG-HRP	V8051	Donkey	Promega
17	Alexa Fluor 647-conjugated goat anti-mouse IgG	A21236	Goat	Invitrogen

希釈倍率

ウエスタンブロッティング (WB): #1-#12=1/1000 dilution, #13=1/200 dilution and #14-16=1/5000 dilution

蛍光免疫染色 (IF): #12 = 1/1000 dilution and #17=1/250 dilution

免疫沈降 (IP): #1= and #5, #11=1 µg/sample,

IRS4: insulin receptor substrate 4

GST: glutathione S-transferase

GFP: green fluorescent protein

ERK: extracellular signal-regulated kinase

EEA-1: early endosome antigen-1

HRP: horseradish peroxidase

#1 の抗 GFP ウサギ血清は京都大学大学院の松田道行先生から譲与頂いた。

免疫沈降

6 ウェルプレートに HEK293T 細胞を 1 ウェル当たり 3×10^5 個播種し、24 時間培養後に pCAGGS-PI3KRBD-FLAG 2.0 µg と pFX-SECFP-IRS4 1.0 µg もしくは pCAGGS-IRS4-FLAG 2.0 µg と pCAGGS-CFP 1.0 µg を導入した。24 時間後に細胞を PBS で洗浄し、500 µl の NP40 lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% Nonide P-40, 5 mM EDTA, 10% グリセロール, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 100 mM NaF, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml aprotinin) で細胞を可溶化した。可溶化液を 4°C、 $20,400 \times g$ で 10 分間遠心して上清を回収した。Bradford 法でタンパク質濃度を測定した。細胞可溶化液に NP40 lysis buffer で希釈した抗 FLAG 抗体を 1.0 µg ずつ入れ、4°C で 1 時間回転させながらインキュベートした。NP40 lysis buffer で 2 回洗浄した Protein A-Sepharose beads (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) を 30 µl 加え、再び 4°C で 1 時間回転させながらインキュベートした。4°C、500 rpm で 3 分間遠心してから上清を取り除き、NP40 lysis buffer を加えて洗浄した。この洗浄過程を 3 回繰り返す、上清を取り除いた後、 $2 \times$ SDS sample buffer を 30 µl 加えた。95°C で 5 分間熱変性処理を行い、遠心後のサンプルをウエスタンブロットティングに供した。

質量分析による RAPEL 配列との相互作用因子のスクリーニング

HEK293T 細胞をディッシュ一枚につき 5.0×10^5 個の細胞を 10 cm ディッシュ 10 枚に播種し、一晩培養した。ディッシュ一枚あたり 10 µg の pCAGGS-CFP もしくは pCAGGS-CFP-RAPEL を遺伝子導入した。24 時間後に細胞可溶化液を調整し、総タンパク質の量が 3.0 mg になるように希釈調製した細胞可溶化液に 37.5 µl の Protein A-Sepharose beads (GE Healthcare) および抗 GFP 血清 (4.5 µl) を用いて免疫沈降を行った。得られた免疫沈降産物を SDS-PAGE 用いて展開したのち、クマ

シーブリアントブルーCoomassie Brilliant Blue(CBB)染色溶液(0.25% CBB R-250, Sigma, St Louis, MO, USA、5%メタノール、7.5%酢酸)に浸し室温で1時間振とうした後、CBB脱染色液(25%メタノール、7.5%酢酸)に浸し室温で3時間30分間振とうした。

質量分析は北海道大学大学院先端生命科学研究院分子細胞生物学研究室の小布施力史先生(現:大阪大学大学院理学研究科染色体構造機能学研究室)に依頼した。サンプルを泳動した各レーンをそれぞれ9つのパートに分割し、分割後のゲルを10 mM dithiothreitolで還元、55 mM iodoacetamiでアルカリ化した後、12.5 µg/ml 改変型トリプシン(Roche)で37°C、14時間処理することで、含まれるタンパク質をゲル内で消化した。得られたペプチド断片を溶出し、タンデム質量分析をMagic2002(Michrom BioResources, Auburn, CA, USA)、nanospray electrospray ionization device(AMR社、目黒、東京)およびLXQ Linear Ion Trap(Thermo Finnigan, San Jose, CA)を用いて行った。Mascot(Matrix Science, London, UK)およびInternational Protein Index(IPI, <http://www.ebi.ac.uk/IPI/>)のヒトデータベース(version 3.29)を用いてデータファイルを解析した。

プライマー

本研究で使用したプライマーを表2に示す。

表2.使用したプライマーリスト

No	Experiment	Primer name	Sequence (5' to 3')
1	Cloning of IRS4	IRS4_HindIII_fw	GGAAGCTTATGGCGAGTTGCTCCTTCAC
2	Cloning of IRS4	IRS4_PspOMI_rv	CCGGGCCCGACCTCTTTGGGAGAGTC
3	Sequence of IRS4	Hin232fw	GGAAGCTTGCCACCATGGAGTCCGAAGAGGAGGACCTG
4	Sequence of IRS4	Hin673fw	GGAAGCTTGCCACCATGGACGGAGAGAGCCGGCCGCGCTG
5	Sequence of IRS4	Hin997fw	GGAAGCTTGCCACCATGGAGCTGTTTTGGAGAAGATG
6	Sequence of IRS4	1700fw	ACGGTTCAGGTGGTGGCCAGAGACC
7	Sequence of IRS4	2400fw	TCCAAAAAACCAGAAATCCTCAG
8	SalI deletion	IRS4_delsalI_fw	CGAATCTATGTGGTAGACCCATTTTCTGAG
9	SalI deletion	IRS4_delsalI_rv	CTCAGAAAATGGGTCTACCACATAGATTCCG
10	Full length IRS4	IRS4_SalI_fw	CCGTCGACATGGCGAGTTGCTCCTTCACTC
11	IRS4 PTB domain	IRS4_200aa_fw	GTGTCGACACCACCATGGAGAGCAAGCGCCGCGCTG
12	IRS4 C1 domain	IRS4_335aa_fw	GTGTCGACACCACCATGGAATACAGAGCCCGCTGCCG
13	IRS4 C2 domain	IRS4_644aa_fw	GTGTCGACACCACCATGGGTGAAAAGGGAAGTCTGG
14	IRS4 C3 domain	IRS4_952aa_fw	GTGTCGACACCACCATGAGACAGTCAGCCTTTTC

15	IRS4 PH domain	IRS4_PH-rv	GTGGGCCCTTGAGGATGAGGCGGCTGAG
16	IRS4 PTB domain	IRS4_PTB-rv	GTGGGCCCTTGTCTGCACACAAGGCTCTC
17	IRS4 C1 domain	IRS4_643aa rv	GTGGGCCCTCAGTTCCTCCAGCTGGTGGGGGTG
18	IRS4 C2 domain	IRS4_951aa rv	GTGGGCCCTCGGGTTCAGCAATTATGCCCC
19	Mutation Y to F	482-491 Y487F fw	GGAAGCGGAGGTGACTTCATGCCTATGAAC
20	Mutation Y to F	695-705 Y700F fw	GATGAGGATGACCCATTCGTGCCAATGAGGCC
21	Mutation Y to F	712-722 Y717F fw	GTAAGCTCCAGTGATTTTCATGCCAATGGCTCC
22	Mutation Y to F	738-748 Y743F fw	GAAGATTCAAGAGGGTTCATGATGATGTTTCCC
23	Mutation Y to F	774-784 Y779F fw	GACAGTGAGAGTGACTTCATGTTTATGGCTCC
24	Mutation Y to F	823-833 Y828F fw	AATGACAACAGTGAGTTCGTGCCAATGTTACC
25	Mutation Y to F	916-926 Y921F fw	GACAGCTCTAGTGACTTCGTCAACATGGACTTC
26	Mutation Y to F	482-491 Y487F rv	GTTTCATAGGCATGAAGTCACCTCCGCTTCC
27	Mutation Y to F	695-705 Y700F rv	GGCCTCATTGGCACGAATGGGTTCATCCTCATC
28	Mutation Y to F	712-722 Y717F rv	GGAGCCATTGGCATGAAATCACTGGAGCTTAC
29	Mutation Y to F	738-748 Y743F rv	GGGAAACATCATCATGAACCCTCTTGAATCTTC
30	Mutation Y to F	774-784 Y779F rv	GGAGCCATAAACATGAAGTCACTCTCACTGTC
31	Mutation Y to F	823-833 Y828F rv	GGTAACATTGGCACGAACTCACTGTTGTC
32	Mutation Y to F	916-926 Y921F rv	GAAGTCCATGTTGACGAAGTCACTAGAGCTGTC

IRS4 の cDNA クローニング

10 cm ディッシュ上で 80–90%コンフルエンスまで培養した HEK293T 細胞から RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) を用いて全 RNA を抽出した。得られた全 RNA (3.5 μ g) から SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit (Life Technologies) を用いて cDNA を合成した。得られた cDNA 1.0 μ g を鋳型として IRS4 の cDNA 領域全長に対するプライマー (#1 と #2) を用いて PCR で IRS4 の cDNA 領域を増幅した。ポリメラーゼとして KOD-FX (TOYOBO、大阪) を使用した。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動し、目的のバンドを含む領域を切り出して、QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN) で精製した。得られた PCR 産物を、Zero-blunt TOPO PCR cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて pCR-Blunt II -TOPO ベクターにクローニングした。コンピテントセル (JM109 株) を形質転換し、super optimal broth (SOB) with catabolite repression (SOC) 培地を加えて 37°C で 1 時間振とうした後カナマイシン (40 ng/ μ l) 含有 LB プレート上で一晩培養した。得られたコロニーを 40 μ g/ml カナマイシン含有 LB 培地中で培養し、

AxyPrep™ Plasmid DNA Purification Miniprep Kit (Axygen, Union City, CA, USA) を用いてプラスミドを精製し、pCR-Blunt II -TOPO-IRS4 を得た。

部位特異的変異導入 (site-directed mutagenesis)

野生型 IRS4 配列内部に存在する *SaI* 認識サイトへのサイレント変異導入と、Src によりリン酸化される候補配列中のチロシン残基をフェニルアラニンへ置換するために、部位特異的変異導入を行った。上記の目的用に設計されたプライマーペア (サイレント変異導入には#8 と#9、アミノ酸置換には#19 と#26、#20 と#27、#21 と#28、#22 と#29、#23 と#30、#24 と#31、#25 と#32) と KOD-plus-neo (TOYOBO) を用いてプラスミド全長を増幅し、PCR 反応後 *DpnI* (Roche) を加えて 37°C で 2 時間処理した。*DpnI* は塩基配列が GATC かつアデニンがメチル化されている場合にのみ切断するため、PCR で増幅されず変異が導入されていない鋳型プラスミドのみを切断し、PCR 産物は消化されない。1.5 μ l の 5 M NaCl と 100 μ l のエタノールを加えてエタノール沈殿を行い、滅菌蒸留水に再懸濁後そこに 2×Rapid Ligation kit (Roche) と T4 Poly Nucleotide kinase (TOYOBO) を加えて 37°C で 1 時間反応させた。コンピテントセル (100 μ l) を加えて形質転換したのち、SOC 培地を加えて 37°C で 1 時間振とう培養し、カナマイシン含有 LB プレート上で一晩培養した。得られたコロニーをカナマイシン含有 LB 培地中で培養し、FastGene Plasmid Mini Kit (Nihon Genetics、東京) を用いて精製し、pCR-Blunt II -TOPO-IRS4 Δ *SaI* および pCR-Blunt II -TOPO-IRS4-6YtoF を得た。なおこれらのプラスミドはシーケンス解析によって変異が正しく導入されていることを確認した。

トランケーション変異体の作製

pCR-Blunt II -TOPO-IRS4 Δ *SaI* を鋳型とし、トランケーション変異体作製の目的で設計したプライマーペア (PH ドメイン：#10 と#15、PTB ドメイン：#11 と#15、C1 領域：#12 と#17、C2 領域：#13 と#18、C3 領域：#14 と#2、 Δ PH 変異体：#11 と#2) と KOD-plus neo kit を用いて PCR を行った。また、 Δ PH-6YtoF 変異体を得るために pCR-Blunt II -TOPO-IRS4-6YtoF PCR 産物をアガロースゲル電気泳動し、目的のバンドを含む領域を切り出して gel extraction を行った。得られた PCR 産物は Zero-blunt TOPO PCR cloning kit を用いて pCR-Blunt II -TOPO ベクターにサブクローニングし、コンピテントセルを形質転換した。SOC 培地を加えて 37°C で 1 時間振とうした後、カナマイシン含有 LB プレート上で一晩培養した。得られたコロニーをカナマイシン含有 LB 培地中で培養し、FastGene Plasmid Mini Kit を用いてプラスミドを精製し、pCR-Blunt II -TOPO-IRS4_{PH}、pCR-Blunt II -TOPO-IRS4_{PTB}、pCR-Blunt II -TOPO-IRS4_{C1}、pCR-Blunt II -TOPO-IRS4_{C2}、pCR-Blunt II -TOPO-IRS4_{C3} を得た。

small interference RNA (siRNA) による IRS4 の発現抑制 (ノックダウン)

6 ウェルプレート (Corning, Corning, NY, USA) に HEK293T 細胞を $3.0\text{--}6.0 \times 10^5$ で播種した 24 時間後に、OPTI-MEM 100 μl に HiPerFect (QIAGEN) 10 μl と siRNA (FlexiTube、Hs_IRS4_7 FlexiTube siRNA、Hs_IRS4_8 FlexiTube siRNA、Hs_IRS4_9 FlexiTube siRNA) 15 pmol を加えてボルテックスした後 10 分間室温でインキュベートし、細胞培養液中に加えた。コントロール siRNA は AllStars Negative Control siRNA (QIAGEN) を用いた。ノックダウン効率は siRNA 導入 72 時間後に細胞可溶化液を調製し、ウエスタンブロッティング (後述) で確認した。各実験に供する場合は、siRNA 導入 24 時間後に細胞をコラーゲンコートしたガラスボトムディッシュに播種し、導入 72 時間後から顕微鏡観察、デキストラン取り込みアッセイ等を行った。相補実験では、siRNA 導入後 24 時間後にガラスボトムディッシュに播種し、48 時間後に CFP と融合させた IRS4 もしくは IRS4 変異体の発現ベクターを遺伝子導入した後、72 時間後に顕微鏡観察及びデキストラン取り込みアッセイを行った。

ウエスタンブロッティング (WB)

8–10%のポリアクリルアミドゲルは常法に基づいて作製した。調製した細胞可溶化液と 2×SDS サンプルバッファーを 1:1 の量比で混合し、95°Cで 5 分間加熱したのち、SDS-PAGE で展開した。展開されたタンパク質はメタノールで親水化処理を行った polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Millipore) へ転写した。ブロットした PVDF 膜を 1% polysorbate 20 (Tween®20) 含有トリス緩衝生理食塩水 (Tris-buffered saline, TBS) (TBST) に終濃度 5% のスキムミルクを加えたブロッキング溶液を用いて室温で 1 時間ブロッキングした。ブロッキングの後の PVDF 膜は、一次抗体を TBST に希釈した溶液中で 4°Cで一晩振とうした。TBST で 3 回洗浄した後、二次抗体を TBST に希釈した溶液中において室温で 1 時間インキュベートした。TBST で 3 回洗浄したのち、ECL WB Detection Reagents (GE Healthcare) を用いて LAS-1000UVmini イメージアナライザー (FUJIFILM、東京) で発光シグナルを検出した。得られた画像データ上のバンドのシグナル強度を MultiGuage (FUJIFILM) によって定量した。

免疫蛍光染色

1 mM 塩酸で希釈した 10%コラーゲン (新田ゼラチン、八尾、大阪) で処理し、コラーゲンコートした 35 mm ガラス底ディッシュ (AGC テクノグラス、吉田、静岡) に 3.0×10^4 個の Cos-1 細胞を播種し、16 時間培養した後に pFX-SECFP-IRS4 2.0 μg を遺伝子導入し、さらに 24 時間培養した。FBS 不含 DMEM/F12 (Invitrogen) 培地中で 4 時間培養することで血清飢餓処理を行った。終濃度 100 ng/ml になるよう調製した EGF (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) を添加し 37°Cで 30 分間インキュベートした。PBS で二回洗浄した後、3%パラホルムアルデヒド paraformaldehyde (PFA)

中に室温で15分間インキュベートすることで細胞を固定し、0.1% Triton X-100で細胞膜透過処理を行った(4分間)。1%ウシ血清アルブミン bovine serum albumin (BSA) 含有リン酸緩衝生理食塩水 phosphate-buffered saline (PBS) 溶液を用いて室温で1時間ブロッキングを行った後、一次抗体として100 μ l のPBT (0.1% BSA、0.05% Triton X-100 含有 PBS) に抗 EEA-1 抗体 0.25 μ g を加えた溶液を加え、4°Cで一晩インキュベートした。PBT で3回洗浄した後、二次抗体として100 μ l のPBT に Alexa Fluor 647 標識抗マウス IgG 抗体溶液を 0.8 μ g 加えた溶液中で遮光の上1時間処理した。PBT で2回洗浄したのちにさらに PBS で1回洗浄し、PBS 1ml を加えて観察まで冷蔵庫で保管した。細胞の観察には共焦点ユニット FSCM3 (ソーラボジヤパン、東京) を装着した倒立型リサーチ顕微鏡 IX71 (オリンパス、東京) および開口数 1.40 の 60 倍油浸対物レンズ(オリンパス)を使用した。機器の制御は ThorImage ソフトウェアを (ソーラボジヤパン) で行った。

蛍光タンパク質再構成法(bimolecular fluorescence complementation)、BiFC 法による生細胞での Ras-PI3K 複合体の可視化

コラーゲンコートした 35 mm ガラス底ディッシュに 3.0×10^4 個の Cos-1 細胞もしくは 8.0×10^4 個の 293T 細胞を播種し、37°C で 24 時間培養した。pFX-SECFP-IRS4 2.0 μ g、pCAGGS-Venus-NT-H-Ras-WT 2.0 μ g と pCXN2-Flag-PI3KRBD-Venus-CT 2.0 μ g を遺伝子導入し、37°C の CO₂ インキュベーターで一晩培養した。4 時間の血清飢餓処理の後、を行うため、FBS 不含 DMEM/F12 培地に置換し 4 時間培養した。阻害薬を加える実験においては、血清飢餓処理に引き続いて 50 μ M LY294002 (Calbiochem/Merck Millipore, Darmstadt, Germany) もしくは 20 μ M PP2 (Calbiochem) を FBS 不含 DMEM/F12 培地に添加し、さらに 37°C で 1 時間インキュベートした。37°C に恒温した蛍光イメージングワークステーションを用いてタイムラプス撮影を行い、開始 10 分後に終濃度 100 ng/ml になるよう調製した EGF を添加し、添加後 50 分間 (合計 1 時間) 観察した。蛍光イメージングワークステーションは、倒立型リサーチ顕微鏡 IX83 (オリンパス)、検出器として冷却 electro multiplying charge-coupled device (EMCCD) カメラ Rolera EM-C² (QImaging, Surrey, BC, Canada)、励起光源として高圧水銀ランプ (U-HGLGPS、オリンパス) を用い、MetaMorph ソフトウェア (モレキュラーデバイスジャパン、東京) で顕微鏡および周辺機器を制御した。cyan fluorescent protein (CFP)、yellow fluorescent protein (YFP)、Alexa Fluor 546 の観察にはそれぞれ CFP-2432B-OMF-ZERO、YFP-2427B-OMF-ZERO、TRITC-B-OMF-ZERO (Semrock, Rochester, NY, USA) のフィルターセットを用いた。対物レンズは開口数 1.35 の 60 倍油浸対物レンズ (オリンパス) を使用し、サンプル周囲環境は Chamlide インキュベーターシステム (Live

Cell Instrument, Soul, Korea) を用いて温調した。

デキストラン取り込みアッセイ

コラーゲンコートしたガラス底ディッシュ一枚あたり 1.0×10^5 個の HEK293T 細胞もしくは 3.0×10^4 個の A431 細胞を播種し、24 時間後に血清不含 DMEM に培地を交換し 37°C で 4 時間インキュベートすることで血清飢餓処理を行った。50 μ M LY294002 もしくは 20 μ M PP2 を加えて 37°C で 1 時間インキュベートした後、終濃度 100 ng/ml の EGF を加えて、37°C で 10 分インキュベートした。10 mg/ml の Alexa Fluor 546 で標識したデキストラン (Invitrogen) 5 μ l を OPTI-MEM 25 μ l と細胞培養上清 70 μ l を混合し (終濃度 500 ng/ml)、培養上清を除いた培養細胞に加えて 37°C で 30 分インキュベートした。4°C の PBS で二回洗浄したのち 3% PFA で固定し、PBS でさらに二回洗浄した後 PBS を 1 ml 加えた。蛍光顕微鏡下で観察して得られた画像から細胞内部の Alexa Fluor 546 の蛍光強度を定量化してデキストランの取り込み量とした。

生細胞での IRS4 と EEA-1 の共局在観察

コラーゲンコートした 35 mm ガラス底ディッシュに 3.0×10^4 個の Cos-1 細胞を播種し、37°C で 24 時間培養した。IRS4 とその変異体の発現プラスミド pFX-EGFP-IRS4 (野生型、 Δ PH 変異体、6 YtoF 変異体) 2.0 μ g と TagRFP-T-EEA-1 の発現ベクター 3.0 μ g を遺伝子導入し、37°C の CO₂ インキュベーターで一晩培養した。4 時間の血清飢餓処理後 37°C に恒温した蛍光イメージングワークステーションにてタイムラプス撮影を行い、開始 10 分後に終濃度 100 ng/ml になるよう調製した EGF を添加し、添加後 50 分間 (合計 1 時間) 観察した。蛍光イメージングワークステーションは BiFC 法の項で記載したものと同一であるが、スピニングディスク共焦点ユニット sDISK (Andor Technology, Belfast, UK) を用いて共焦点画像を取得した。また、GFP と TagRFP の観察にはそれぞれ GFP-1828A-OMF-ZERO と TRITC-B-OMF-ZERO (Semrock) のフィルターセットを用いた。得られた画像は、MetaMorph の Transfluor モジュールを用いて各波長の顆粒状構造の領域を検出してマスク画像を作成し、二波長の画像間で重なる領域を共局在している領域として定量した。

統計的解析

得られたデータは、3 回の独立した試行から得られた平均 \pm 標準誤差で表示した。二群の平均の差の比較にはスチューデントの *t* 検定を用いた。二以上の多群の比較を行う際はテューキーの HSD 検定 (honestly significant difference test) を用いた。時系列データの比較の際は多変量分散分析 (multivariate-analysis of variance, MANOVA) を用い、他群を比較した際は Bonferroni の補正をかけた。有意水準を

$p < 0.05$ とし、 p 値を図中に示す、もしくは有意差がある場合*で示した。

【実験結果】

IRS4 は PI3K のエンドソーム局在化配列 (RAPEL 配列) と相互作用する

Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行とそれによるエンドサイトーシス制御メカニズムを明らかにするため、RAPEL 配列と相互作用するタンパク質を網羅的に探索した。具体的には、CFP を付加した RAPEL 配列を HEK293T 細胞に発現させ、抗 GFP 抗体を用いて免疫沈降し、免疫沈降産物に含まれるタンパク質をタンデム質量分析法で網羅的に解析した。その結果 48 個の候補因子が得られた (表 3)。得られた候補因子の中から IRS4 に着目し、詳細に解析することとした。CFP を付加した IRS4 と FLAG タグを付加した RBD の発現ベクターを HeLa 細胞に導入し、24 時間後に細胞可溶化液を回収した。抗 FLAG 抗体と ProteinA-Sepharose beads で FLAG-RBD を免疫沈降し、抗 FLAG 抗体と GFP 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。その結果、IRS4 が RBD と共沈降したことから、両者の結合が確認された (図 2a、左)。HEK293T 細胞および CFP-RAPEL と IRS4-FLAG を用において同様の実験を行ったところ、期待通り両者の結合が確認できた (図 2a、右)。以上より、IRS4 は RAPEL 結合因子であることが明らかとなった。

表 3. 質量分析で得られた因子のリスト

Identified protein	Acc. number	M. W.
Tubulin beta chain	IPI01019113	50 kDa
Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	IPI00304925	70 kDa
Tubulin alpha-1C chain	IPI00218343	50 kDa
Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	IPI00179330	18 kDa
ADP/ATP translocase 2	IPI00007188	33 kDa
Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit gamma isoform	IPI00292690	126 kDa
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	IPI00011913	31 kDa
ATP-dependent RNA helicase DDX3X	IPI00215637	73 kDa
cDNA FLJ60076, highly similar to ELAV-like protein 1	IPI00301936	39 kDa
Tubulin beta-2C chain	IPI00007752	50 kDa
DnaJ homolog subfamily A member 1	IPI00012535	45 kDa
40S ribosomal protein S13	IPI00221089	17 kDa
Translational activator GCN1	IPI00001159	293 kDa
Emerin	IPI00032003	29 kDa
Insulin receptor substrate 4	IPI00020729	134 kDa
eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1 isoform 1	IPI00479262	176 kDa
60S acidic ribosomal protein P0	IPI00008530	34 kDa

probable ATP-dependent RNA helicase DDX17 isoform 3	IPI00651653	80 kDa
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	IPI00003881	46 kDa
Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar2	IPI00007084	74 kDa
Isoform 1 of F-actin-capping protein subunit beta	IPI00026185	31 kDa
40S ribosomal protein S6	IPI00021840	29 kDa
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	IPI00027834	64 kDa
Isoform 1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	IPI00171903	78 kDa
Vimentin	IPI00418471	54 kDa
40S ribosomal protein S4, X isoform	IPI00217030	30 kDa
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G	IPI00304692	42 kDa
60S ribosomal protein L17	IPI00413324	21 kDa
Ig kappa chain V-I region DEE	IPI00387025	12 kDa
BAG family molecular chaperone regulator 2	IPI00000643	24 kDa
U1 small nuclear ribonucleoprotein A	IPI00012382	31 kDa
Stress-induced-phosphoprotein 1	IPI00013894	63 kDa
Isoform 1 of Large proline-rich protein BAG6	IPI00465128	119 kDa
14-3-3 protein zeta/delta	IPI00021263	28 kDa
Tricarboxylate transport protein, mitochondrial	IPI00294159	34 kDa
Isoform Complexed of Arginyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	IPI00004860	75 kDa
Isoform SMN of Survival motor neuron protein	IPI00003394	32 kDa
40S ribosomal protein S5	IPI00008433	23 kDa
cDNA FLJ51909, highly similar to Serine-threonine kinase receptor-associated protein	IPI00294536	40 kDa
Mitochondrial glutamate carrier 1	IPI00003004	34 kDa
Uncharacterized protein	IPI00179298	482 kDa

IRS4 は EGF 依存的にエンドソームに移行して Ras-PI3K 複合体と共局在する

IRS4 の細胞内局在を確認するために、CFP との融合タンパク質の発現ベクターを Cos-1 細胞に導入した。IRS4 は刺激前には細胞質にびまん性の局在を示したが、EGF 刺激によって顆粒状に集積した (図 2b, c 左)。次に、IRS4 が局在している顆粒状構造が初期エンドソームであるかを確認するため、初期エンドソームのマーカータンパク質である EEA-1 との共局在を定量化したところ、EGF 刺激によって EEA-1 との共局在が増加した (図 2b, c 右)。

次に、生細胞タイムラプスイメージングを用いて IRS4 と Ras-PI3K 複合体の挙動を観察した。Ras-PI3K 複合体は以前に当研究室で開発した BiFC 法を用いて細胞内で可視化した²¹。SECFP-IRS4 と VN-H-Ras-WT と PI3KRBD-WT-VC の発現ベクターを導入した Cos-1 細胞に EGF を加えると、Ras-PI3K 複合体と IRS4 が顆粒状構造で共局在した (図 2d)。以上の結果より、IRS4 が EGF 刺激依存的にエンドソーム上に移行し、Ras-PI3K 複合体と共局在することが確認された。

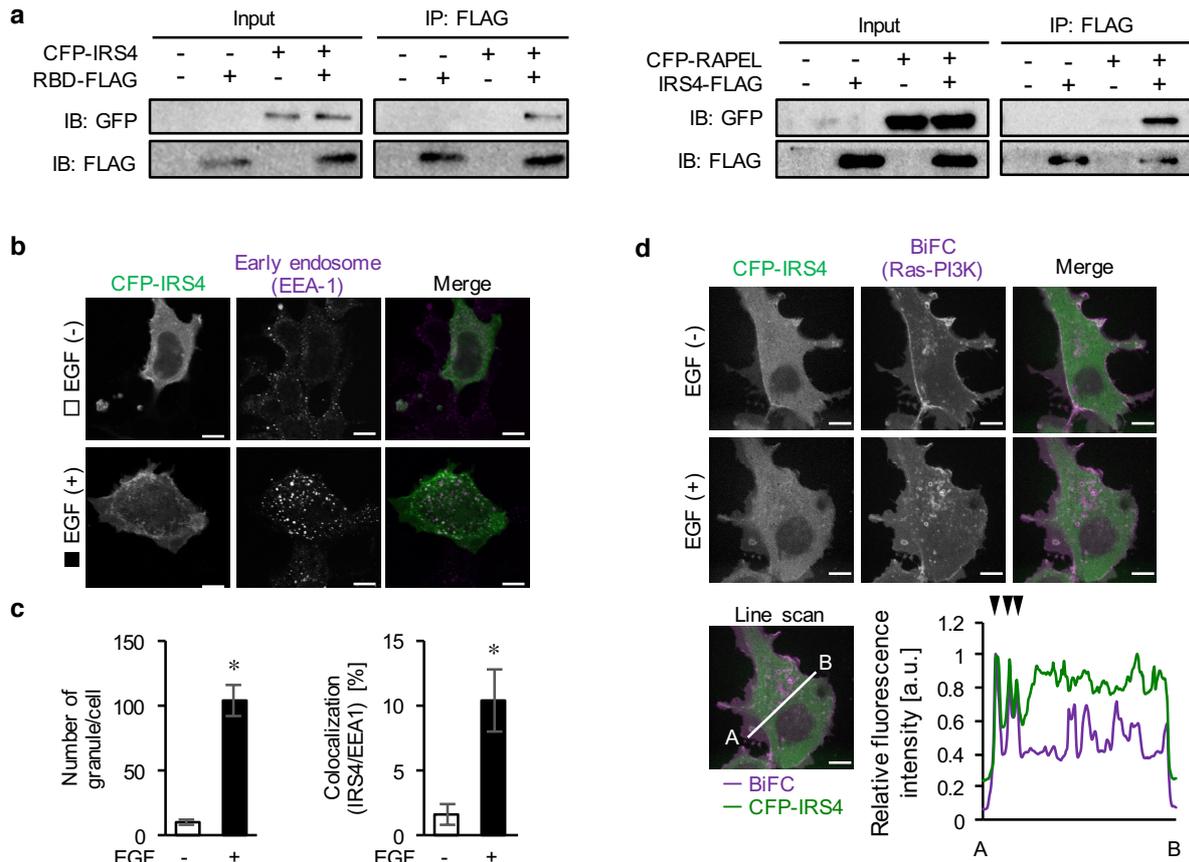


図2 IRS4 は RAPEL 配列と相互作用しエンドソームに局在する

- a) (左) HeLa 細胞に CFP-IRS4 と PI3K-RBD-FLAG の発現ベクターを導入した。24 時間後に細胞可溶化液を調製し、抗 FLAG 抗体とプロテイン A セファロースビーズで免疫沈降した。得られた免疫沈降産物と全細胞可溶化液を抗 FLAG 抗体と抗 GFP 抗体を用いてウエスタンブロットで検出した。(右) IRS4-FLAG と CFP-RAPEL を発現する HEK293T 細胞を用い、上段と同様に解析した。
- b) Cos-1 細胞に CFP-IRS4 の発現ベクターを導入し、24 時間後に血清飢餓処理を 4 時間行った後、終濃度 100 ng/ml の EGF を加えて、37°C で 30 分インキュベートした。3% パラホルムアルデヒド (PFA) で細胞を固定したのち、抗 EEA-1 抗体で一晩インキュベートし、Alexa Fluor647 で標識された抗マウス IgG 抗体で処理をした。共焦点顕微鏡を用いて細胞を観察した。(bar = 15 μm)
- c) b) で得られた画像を画像解析ソフト MetaMorph の Granularity モジュールで解析した。一細胞あたりの IRS4 が形成する顆粒状構造の数 (左) および EEA-1 が形成する顆粒状構造のうち IRS4 による顆粒と共局在した割合 (右) を EGF 刺激前後で定量してプロットした。データは平均 ± 標準誤差で示す (n = 3, 5)。
- d) Cos-1 細胞に VN-H-Ras-WT と PI3KRBD-WT-VC および CFP-IRS4 の発現ベクターを導入して 24 時間培養した。血清飢餓処理を 4 時間行った後、生細胞タイムラプス観察を行った。観察開始後 10 分で終濃度 100 ng/ml の EGF を加えた。図の上段は刺激前の画像を示し (bar = 15 μm)、

下段は刺激後 30 分の細胞の様子を示す。左下の参照画像上の白線に沿った蛍光強度を定量し、(右の) グラフにプロットした。黒の三角形は Ras-PI3K 複合体の蛍光のピークと IRS4 の蛍光のピークの重複を示す。

IRS4 のノックダウンは Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行を抑制する

IRS4 が Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行を制御するか否かを検討するために、IRS4 をノックダウンし、IRS4 と Ras-PI3K 複合体の挙動を評価した。HEK293T 細胞に IRS4 に対する siRNA (siIRS4) およびコントロール siRNA (siCtrl) を導入し、ウエスタンブロッティングによって IRS4 の発現量を定量したところ、ノックダウンによって IRS4 発現量が 50%程度減少していることを確認した (図 3a)。同様に調製した細胞を用いて Ras-PI3K 複合体を BiFC 法で可視化すると、コントロールの細胞では EGF 依存的に Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行が観察されたのに対し、IRS4 をノックダウンした細胞ではその移行がほとんど認められなかった (図 3b)。このことから、IRS4 が Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行を制御していることが示された。また、IRS4 がエンドサイトーシスを制御するか評価するため、同様に調製した細胞を用いて蛍光標識されたデキストランの取り込みを評価した。EGF 非存在下では IRS4 をノックダウンした細胞のデキストランの取り込み量はコントロールの細胞と比較して差は認められなかった (図 3c)。一方で、コントロールの細胞では EGF 刺激によってデキストランの取り込み量が 2.5 倍程度亢進するが、IRS4 のノックダウン細胞においては EGF 刺激によるデキスタン取り込みの亢進は認められなかった (図 3c)。すなわち、IRS4 は EGF 依存的な Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行とエンドサイトーシスを亢進していることが示された。

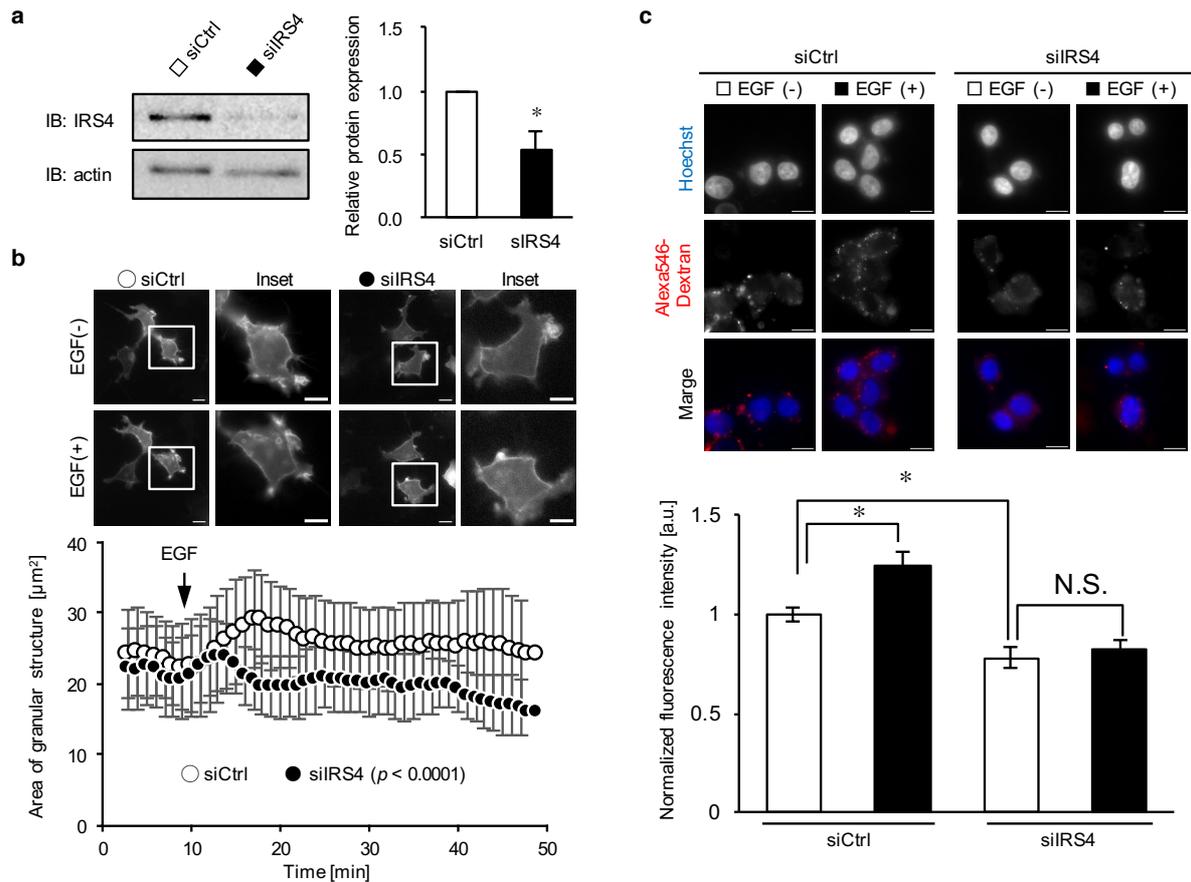


図3 IRS4のノックダウンにより Ras-PI3K 複合体のエンドソームへの移行とエンドサイトーシスが抑制される

- a) (左) HEK293T 細胞にコントロール siRNA (siCtrl) および IRS4 に対する siRNA (siIRS4) を導入し、72 時間後に細胞可溶化液を回収し、抗 IRS4 抗体と抗 Actin 抗体を用いたウェスタンブロットで検出した。(右) 得られたブロットの輝度情報からそれぞれの発現量を定量し、コントロールを 1 とした時のすることで IRS4 の発現量と β -actin の発現量を見積もり、 β -actin で標準化した IRS4 の発現量について、コントロール siRNA を 1 としてグラフ化した。n = 3 (平均 \pm 標準偏差)
- b) HEK293T 細胞に siCtrl および siIRS4 を導入し、48 時間後に VN-H-Ras-WT と PI3KRBD-WT-VC の発現ベクターを導入した。24 時間後に血清飢餓処理を 4 時間行った後、生細胞タイムラプス観察を行った。1 分に一枚の時間間隔で 50 分のタイムラプスを行い、観察開始後 10 分で終濃度 100 ng/ml の EGF を加えた。上段は代表的な刺激後の蛍光画像を示す (bar = 15 μm , inset: bar = 10 μm)。下段は画像解析ソフト MetaMorph の Integrated Morphometry Analysis モジュールを用いて、細胞内の顆粒状構造を抽出し、各時刻における顆粒状構造の面積をプロットしたもの。データは平均 \pm 標準誤差を示す (n = 10)。
- c) HEK293T 細胞に siCtrl および siIRS4 を導入した。72 時間後に血清飢餓処理を 4 時間行い、終濃度 100 ng/ml の EGF で 10 分間処理した後、さらに終濃度 500 $\mu\text{g/ml}$ の Alexa Fluor 546 標識デキ

ストランを加えて 37°C で 30 分間インキュベートした。PBS で洗浄後、3% PFA で固定し蛍光顕微鏡で観察した (上段、bar = 15 μ m)。得られた画像は解析ソフト MetaMorph を用いて測定した細胞内デキストラン由来の蛍光強度を取り込み量としてプロットした。データは平均 \pm 標準誤差を示す (n = 62, 60, 36, 32)。

Src が EGF 依存的な IRS4 のリン酸化とエンドソーム移行を促進する

IRS4 が EGF 依存的にエンドソームへリクルートされる機構を検討した。UniProt データベースで IRS4 のアミノ酸配を調べたところ、他の IRS ファミリーと同様に C 末端領域に 7 個のチロシンキナーゼ認識配列 YXXM モチーフが存在した。そこで、EGF 刺激によって IRS4 がリン酸化されるか否かを評価した。IRS4-FLAG を発現する Cos-1 細胞から EGF 刺激前後の細胞可溶化液をそれぞれ調製し、抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降産物を抗リン酸化チロシン抗体でウエスタンブロットしたところ、EGF 刺激によって IRS4 のチロシンリン酸の亢進が認められ (図 4a)、EGFR 阻害薬である Afatinib により抑制された (data not shown)。このチロシンリン酸化に関与する分子を探索するために、Ras のドミナントネガティブ変異体と MAPK/ERK 経路の阻害薬 (MEK 阻害薬 U0126)、と非受容体型チロシンキナーゼ Src の阻害薬 PP2 の IRS4 のリン酸化に対する効果を検討した。その結果、PP2 処理によって EGF 依存的な IRS4 リン酸化が抑制されたが、Ras ドミナントネガティブ変異体の発現や他の阻害薬に抑制効果は認められなかった (図 4a)。このことから、IRS4 が Ras の上流で非受容体型チロシンキナーゼ Src を介してリン酸化されていることが明らかになった。

次に EGF 刺激依存的な IRS4 のエンドソームへの移行が Src ファミリーキナーゼもしくは PI3K によって制御されるかを検討した。EGFP-IRS4 と RFP-EEA-1 を発現させた Cos-1 細胞を PP2 もしくは LY294002 で処理し、EGF 刺激前後の IRS4 の局在変化をタイムラプス観察した。その結果、PP2 もしくは LY294002 存在下では EGF 刺激による IRS4 のエンドソームへの移行が抑制されており (図 4b)、IRS4 のエンドソームへの移行は Src ファミリーおよび PI3K に制御されていることが明らかになった。

そこで、PP2 が Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行に与える影響を評価した。HEK293T 細胞に Ras と PI3K の結合を可視化する BiFC 法用の発現ベクターを導入し、Afatinib、LY294002 もしくは PP2 で 1 時間処理した後、EGF 刺激を行った。その結果、全ての阻害薬処理によって、Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行が抑制された (図 4d)。以上から、Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行も Src ファミリーキナーゼによって制御されることがわかった。また、PP2 存在下および非存在下でデ

キストランの取り込みアッセイを行ったところ、EGF 刺激された細胞で認められるデキストラン取り込みの亢進は、PP2 を処理した細胞では認められなかった (図 4c)。一方、未刺激の細胞においては PP2 処理の有無でデキストラン取り込み量に差はなかった (図 4c)。すなわち、EGF 依存的なエンドサイトーシスの亢進には Src ファミリーキナーゼが関与していることが明らかになった。

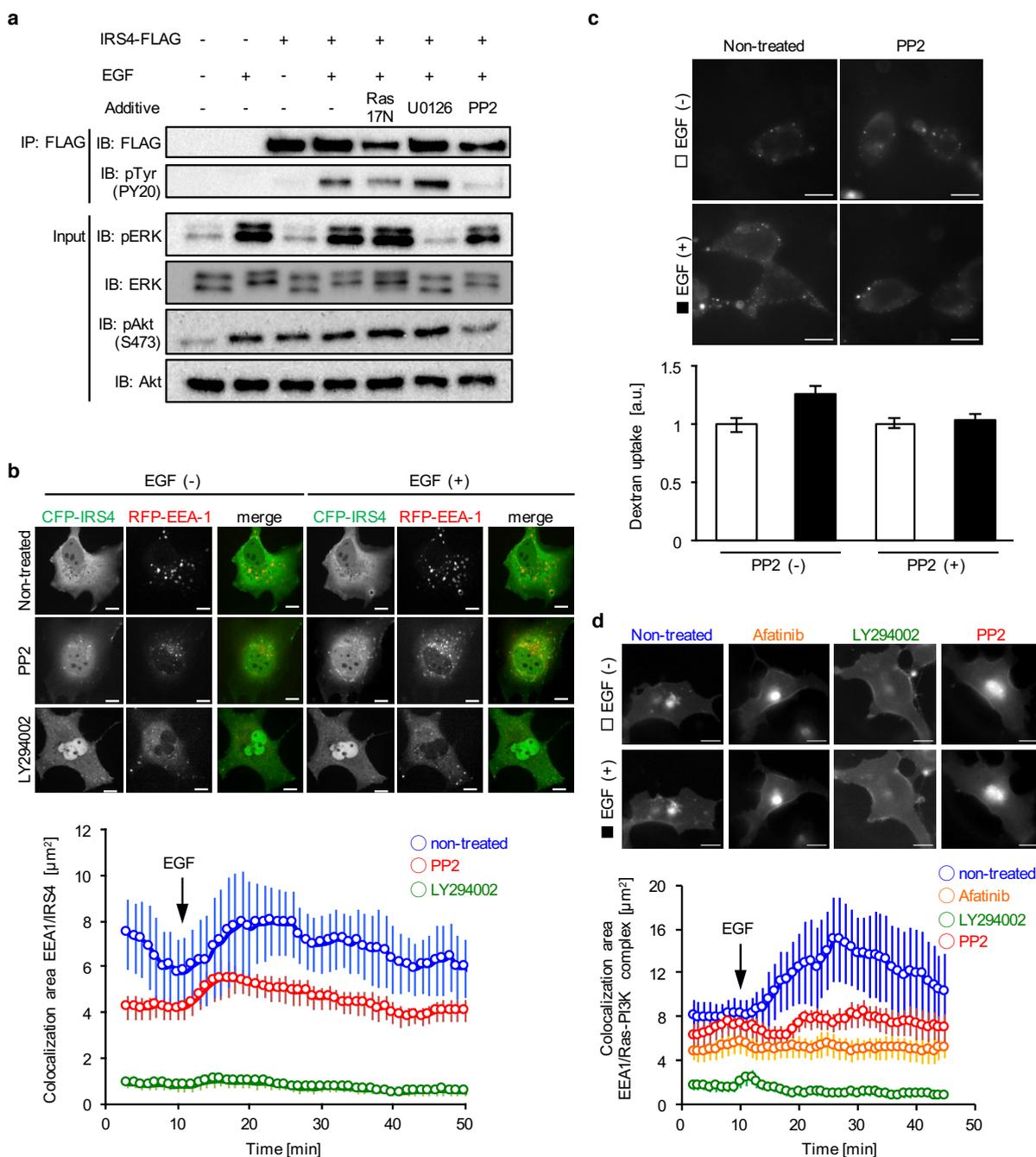


図 4 EGF 刺激による IRS4 エンドソームへの移行とエンドサイトーシスの亢進は Src の活性化に依存する

a) IRS4-FLAG と H-Ras のドミナントネガティブ変異体 (17N) を発現する Cos-1 細胞に血清飢餓

処理を4時間行った後、5 µg/ml U0126 もしくは 20 µM PP2 で1時間前処理した。終濃度 100 ng/ml の EGF を加えて 37°C で 10 分インキュベートした後、細胞可溶化液を調製して抗 FLAG 抗体とプロテイン A セファロースビーズで免疫沈降した。得られた免疫沈降産物は抗 FLAG 抗体と抗リン酸化チロシン抗体 (PY20) を用いてウエスタンブロットした。全細胞可溶化液は抗 ERK 抗体、抗リン酸化 ERK 抗体、抗 Akt 抗体、抗リン酸化 Akt (S473) 抗体を用いたウエスタンブロットで解析した。

- b) Cos-1 細胞に CFP-IRS4 と RFP-EEA-1 を導入した 24 時間後に、4 時間血清飢餓処理を行い、50 µM LY294002 もしくは 20 µM PP2 で 1 時間処理した後、タイムラプス観察を行い、観察を始めてから 10 分後に終濃度 100 ng/ml の EGF で細胞を刺激し、50 分まで観察を行った。スピニングディスク共焦点顕微鏡を用いて観察した (上段、bar = 15 µm)。得られた画像は各波長ごとに MetaMorph の Granularity モジュールで顆粒状構造を抽出した後、measure colocalization モジュールを用いて顆粒状構造の領域の共局在を定量してプロットした (下段)。データは平均±標準誤差を表す (n = 4、7、6)。
- c) HEK293T 細胞に 4 時間血清飢餓処理を行い、50 µM LY294002 もしくは 20 µM PP2 で 1 時間処理した後、終濃度 100 ng/ml の EGF で 10 分間刺激した。終濃度 500 µg/ml の Alexa Fluor 546 標識デキストラン存在下で 30 分間インキュベートした後 PBS で洗浄し、3% PFA で固定した細胞を蛍光顕微鏡で観察した (上段、bar=15 µm)。得られた画像は解析ソフト MetaMorph を用いて細胞内のデキストラン由来の蛍光強度を測定し、取り込み量としてプロットした。データは平均±標準誤差を示す (n = 84、87、68、77)。
- d) Cos-1 細胞に VN-H-Ras-WT、PI3KRBD-WT-VC と RFP-EEA1 の発現ベクターを導入し、24 時間後に血清飢餓処理を 4 時間行い、10 µM Afatinib、50 µM LY294002 もしくは 20 µM PP2 で 1 時間処理した後、生細胞タイムラプス観察を行った。観察開始後 10 分で終濃度 100 ng/ml の EGF を加えた。代表的な Ras-PI3K 複合体の画像を上段に示す (bar = 15 µm)。細胞内の小胞状の構造と EEA1 との共局在している面積を定量してプロットした。データは平均±標準誤差を示す (n = 15、17、16、18)。

IRS4 のエンドソーム移行には PH ドメインと C2 ドメインが重要である

IRS4 のエンドソーム移行に重要な領域を特定するために、IRS4 のトランケーション変異体を作製し、それらの動態を評価した。IRS4 の N 末端側にはホスファチジルイノシトールリン酸と結合する PH ドメインとリン酸化チロシンと結合する PTB ドメインが存在するが、それらを除いた C 末端側の領域は機能未知である。そこで、C 末端側の領域を三つに分割し、それぞれを C1、C2、C3 領域と名付けた (図 5a)。トランケーション変異体と RAPEL 配列の結合を免疫沈降法で検討したところ、PH ドメイン、PTB ドメインおよび C3 ドメインが RAPEL と結合した (図 5b)。次に、

CFP と融合させたトランケーション変異体の細胞内局在を観察したところ、PH ドメインと C2 ドメインが EEA-1 と部分的に共局在した (図 5c)。

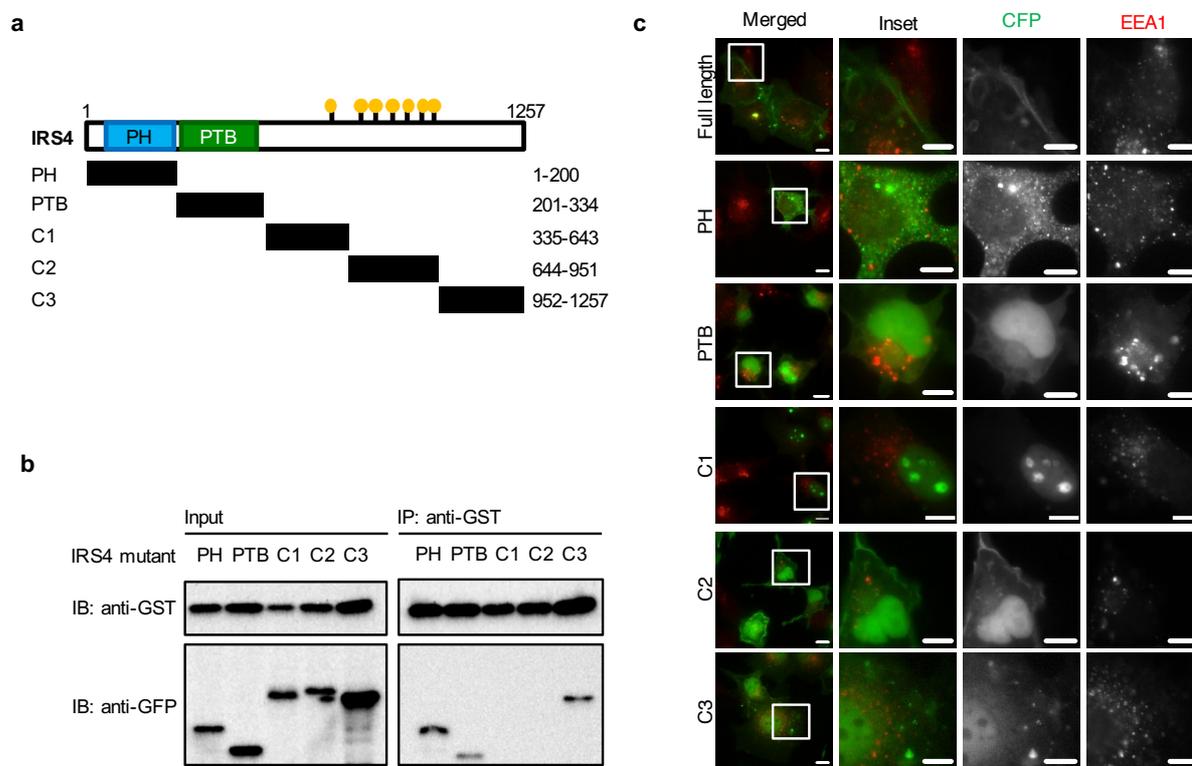


図5 IRS4 のトランケーション変異体のうちPH ドメインとリン酸化チロシンリッチな領域(C2 領域) はエンドソームに局在する。

- a) IRS4 のトランケーション変異体の模式図。PH、pleckstrin homology ドメイン； PTB、phosphotyrosine binding ドメイン。上部の丸は YXXM モチーフ中のリン酸化されるチロシン残基を、右に記載されている数字は変異体のアミノ酸番号を示す。
- b) CFP タグした全長の IRS4 もしくは IRS4 のトランケーション変異体の発現ベクターを GST もしくは GST-RAPEL の発現ベクターとともに HEK293T 細胞に導入した。24 時間後に、細胞可溶化液を調製し、グルタチオンセファロースビーズで沈降した。得られた沈降産物は抗 GFP 抗体と抗 GST 抗体を用いてウエスタンブロットした。
- c) Cos-1 細胞に CFP-IRS4 もしくは CFP と融合された IRS4 のトランケーション変異体と RFP-EEA-1 の発現ベクターを導入した。24 時間後に細胞を 3% PFA で固定し、スピニングディスク共焦点顕微鏡で観察した。(bar = 15 μ m, inset: bar = 10 μ m)

IRS4 の PH ドメインと C2 ドメインは EGF 刺激によりエンドソームへ移行する。

C2 ドメインにはリン酸化される可能性があるチロシン残基が複数存在することが

UniProt タンパク質データベースを用いた解析から示唆された (<http://www.uniprot.org>)。そこで、免疫沈降とウエスタンブロットを用いて EGF 刺激後の各トランシェーション変異体のチロシンリン酸化を評価すると、C2 ドメインが最もリン酸化されていた (図 6a)。Src によるチロシンリン酸化が IRS4 のエンドソーム移行に重要かどうかを調べるため、EGF 刺激依存的な C2 ドメインのエンドソームへの移行を PP2 存在下で評価した。その結果、EGF 刺激によって増加傾向を示した C2 ドメインと初期エンドソームとの共局在は、PP2 処理によって抑制された (図 6b)。また、PH ドメインも EGF 刺激依存的に初期エンドソームとの共局在が増加傾向を示し、LY294002 処理により抑制された (図 6c)。以上の結果から、IRS4 のエンドソーム移行にはホスファチジルイノシトールリン酸もしくは Src ファミリー依存的なチロシンリン酸化を介する機構が存在することが示唆された。

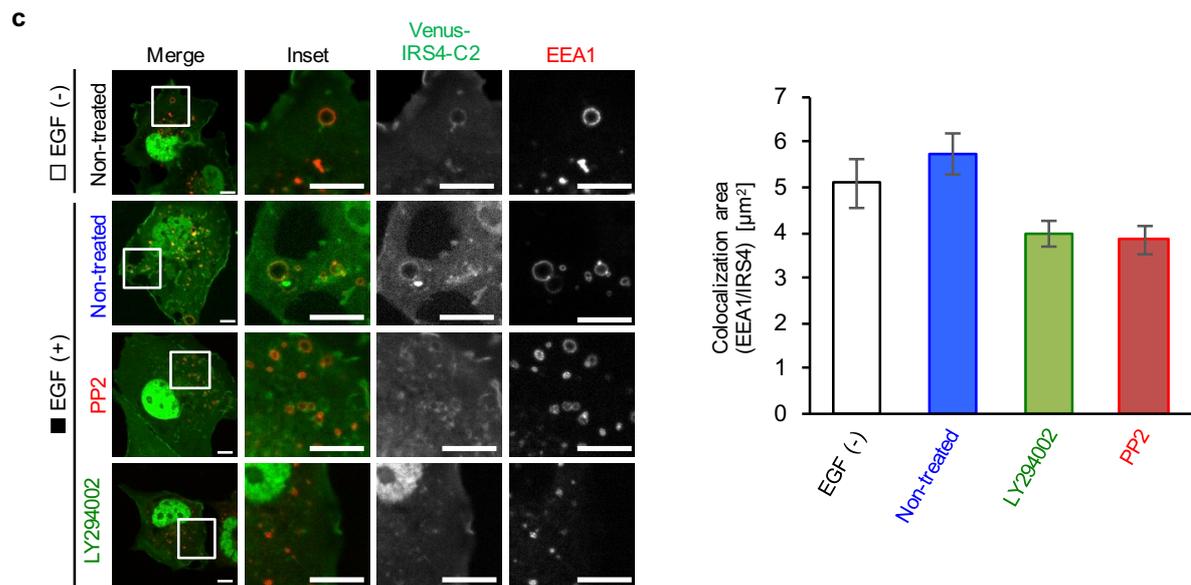
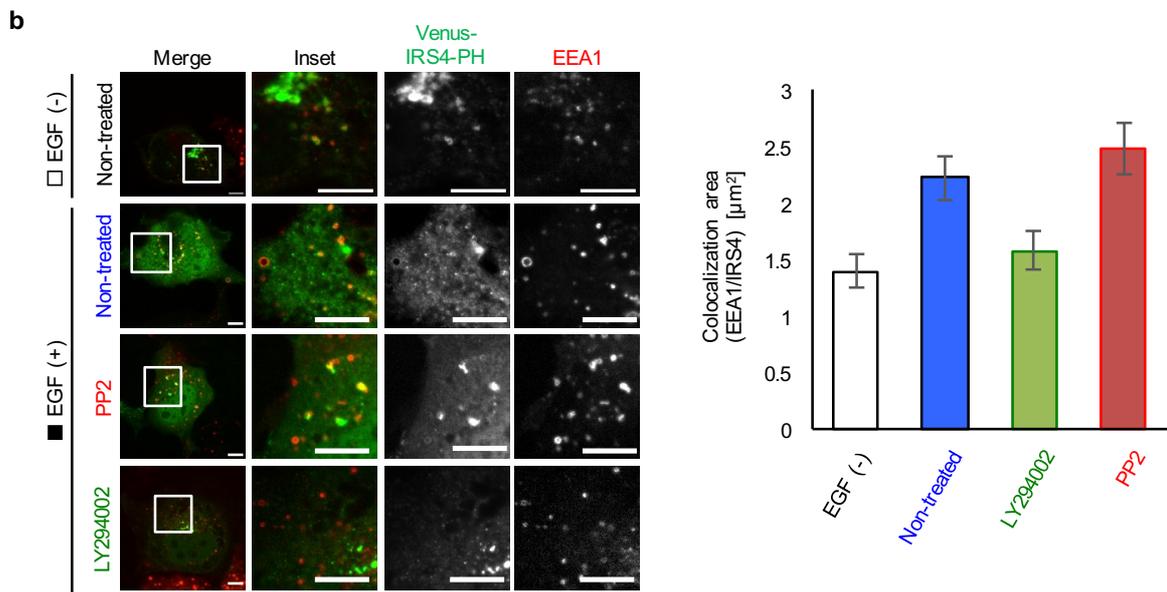
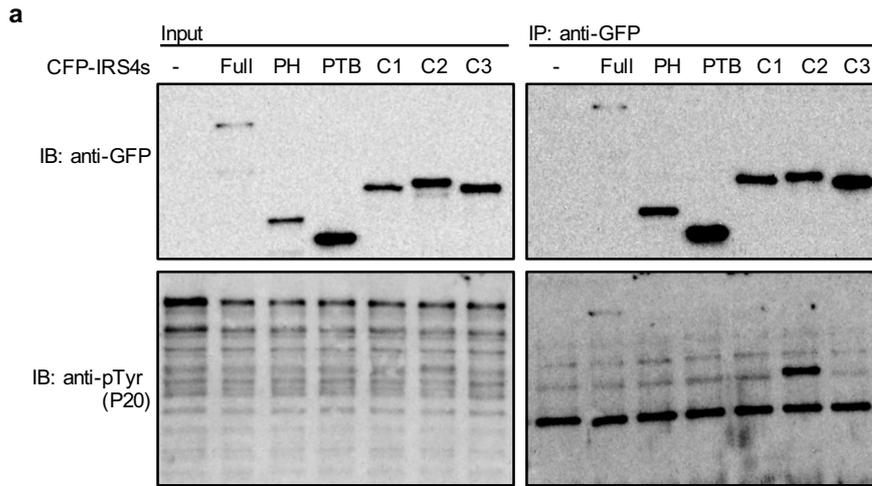


図6 PH ドメインとリン酸化チロシンリッチな領域 (C2 領域) は EGF 刺激によりエンドソームへ移行する

- a) CFP タグした全長の IRS4 もしくは IRS4 のトランケーション変異体の発現ベクターを発現する Cos-1 細胞に血清飢餓処理を 4 時間行った後、終濃度 100 ng/ml の EGF を加えて 37°C で 10 分インキュベートした後、細胞可溶化液を調製して抗 GFP 抗体とプロテイン G セファロースビーズで免疫沈降した。得られた免疫沈降産物は抗 GFP 抗体と抗リン酸化チロシン抗体 (PY20) を用いてウエスタンブロットした。
- b) CFP-IRS4-PH を発現する Cos-1 細胞に 4 時間血清飢餓処理を行い、50 μ M LY294002 もしくは 20 μ M PP2 で 1 時間処理した後、終濃度 100 ng/ml の EGF で 10 分間刺激した。細胞を 3%PFA で固定したのち、抗 EEA-1 抗体で一晩インキュベートし、Alexa Fluor647 で標識された抗マウス IgG 抗体で処理をした。スピニングディスク共焦点顕微鏡を用いて観察した。得られた画像は各波長ごとに MetaMorph の Granularity モジュールで顆粒状構造を抽出した後、Measure Colocalization モジュールを用いて顆粒状構造の領域の共局在を定量した。データは平均 \pm 標準誤差を示す (n = 12、16、15、16)。
- c) (b)と同様に Cos-1 細胞に CFP-IRS4-C2 と RFP-EEA-1 を発現させ、両者の共局在を定量した。平均 \pm 標準誤差を示す (n = 8、14、10、5)

IRS4 のエンドソーム移行は IRS4 のリン酸化と PI3K の活性化に制御される

IRS4 のエンドソーム移行に PH ドメインと C2 ドメインが重要かどうかを調べるために、IRS4 の PH ドメインを欠失させた変異体 (Δ PH 変異体)、C2 に存在するチロシン残基 6 個すべてをフェニルアラニンに置換した変異体 (6YtoF 変異体) および両方の変異を加えた変異体 (Δ PH-6YtoF 変異体) を作製した (図 7a)。CFP を付加したこれらの変異体あるいは全長の IRS4 を Cos-1 細胞に発現させ、EGF 刺激による局在変化を観察した。EGF 未刺激の状態では Δ PH 変異体および Δ PH-6YtoF 変異体のエンドソーム局在は野生型 IRS4 と比較して抑制傾向にあったが (図 7b)、6YtoF 変異体のエンドソーム局在は、野生型のそれと比較して同程度であった。一方、EGF 刺激後は Δ PH 変異体のエンドソーム局在は亢進し、その上昇率は野生型と同程度だった。対照的に、6YtoF 変異体のエンドソーム局在は EGF 刺激の有無に関わらず野生型に比して減少傾向が認められた。以上の結果から、IRS4 のエンドソーム局在は①EGF 刺激非依存性に生じる PH ドメインとホスファチジルイノシトールリン酸との結合による機構、および②EGF 刺激依存的にリン酸化されたチロシンを介する機構によって制御されていることが示唆された。

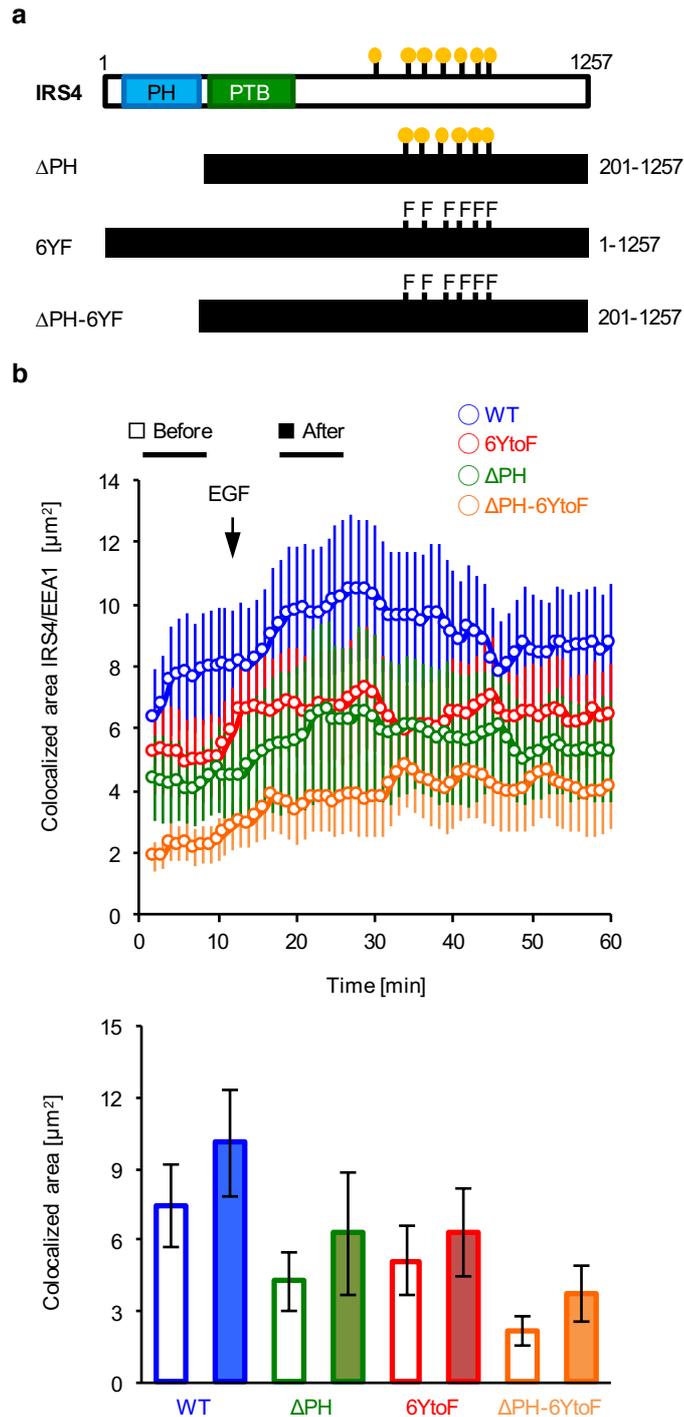


図7 IRS4のエンドソームへの移行にはPHドメインとリン酸化チロシンが重要な役割を持つ

- a) 作製したIRS4の変異体[全長のIRS4からPHドメインを欠失させた変異体(ΔPH変異体)と、リン酸化チロシン残基のチロシンをフェニルアラニンへ置換した変異体(6YtoF変異体)]の模式図を示す。上部に示されているFの表記は、チロシン残基からフェニルアラニン残基への置換を示す。加えて、PHドメインを欠失させ、チロシンをフェニルアラニンへ置換させた変異体(ΔPH-6YtoF変異体)も作製した。

b) Cos-1 細胞に EGFP-IRS4 の変異体（全長、 Δ PH 変異体、6YtoF 変異体、 Δ PH-6YtoF 変異体）と RFP-EEA-1 の発現ベクターを導入した。24 時間培養した後、血清飢餓処理を 4 時間行いスピニングディスク共焦点蛍光顕微鏡下でのタイムラプス観察を行った。1 分に 1 枚の時間間隔で、計 50 分間のタイムラプスを行い、観察開始から 10 分後に終濃度 100 ng/ml の EGF を加えた。得られた画像は各波長ごとに MetaMorph の Granularity モジュールで顆粒状構造を抽出した後、全画像に対して Measure Colocalization モジュールを用いて IRS4 と EEA-1 がそれぞれ形成する顆粒状構造が互いに共局在する領域の面積を定量し、その時系列データを得た。データは平均±標準誤差を示す (n = 20、18、20)。下のグラフは、刺激前 10 分間と刺激後 10 分から 20 分の 10 分間での共局在する領域の面積の時間平均値をプロットした。データは平均±標準誤差を示す (n = 20、18、20)。

PH ドメインと C2 ドメインを介した IRS4 のエンドソーム移行は Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行とエンドサイトーシスを制御する

上記仮説を検証するために、非翻訳領域を標的とする siRNA を用いて IRS4 をノックダウンした細胞に野生型および変異型の IRS4 を発現させ、Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行とデキストランの取り込みを評価した。野生型 IRS4 を発現させた細胞では Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行とデキストランの取り込みが回復した (図 8a, b)。一方、 Δ PH 変異体発現細胞では EGF 刺激前のデキストランの取り込みは野生型発現細胞ほど回復しなかったが、EGF 刺激によるデキストランの取り込みの亢進は同程度に回復した。6YtoF 変異体では EGF 刺激前のデキストランの取り込みが低下しており、刺激後の取り込みの亢進も抑制された。 Δ PH-6YtoF 変異体を発現させても、EGF 刺激による Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行は抑制されたままであった。さらに、EGF の有無に関わらずデキストランの取り込みも抑制されたままであった (図 8a, b)。以上の結果から、EGF 刺激時には IRS4 が自身のチロシン酸化を介して、非刺激時には PH ドメインを介してエンドソームに移行し、エンドサイトーシスを制御することが明らかとなった。

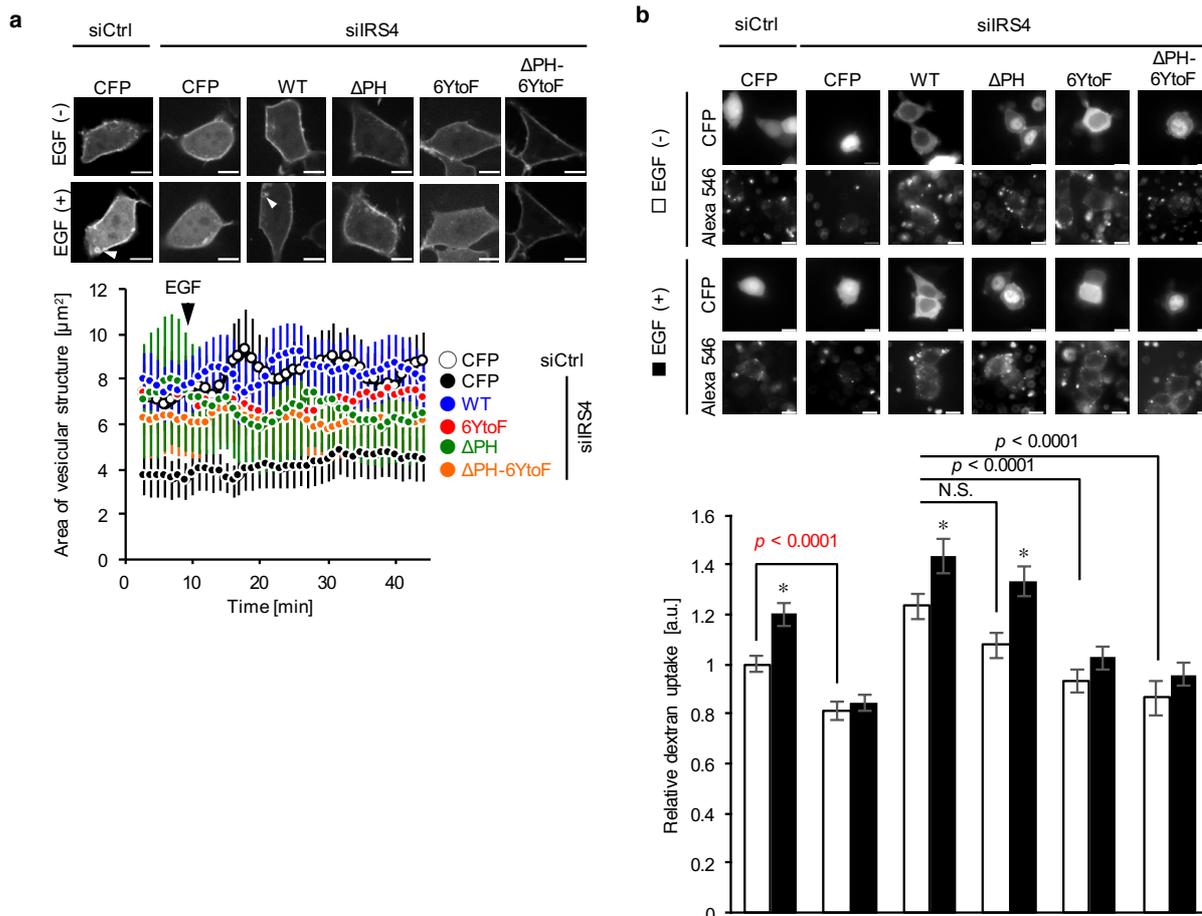


図8 IRS4のエンドソームへの移行がRas-PI3K複合体のエンドソームへの移行に寄与する

- a) HEK293T細胞に siCtrl および siIRS4 を導入し、48時間後に CFP または CFP と融合した IRS4 変異体の発現ベクターと VN-H-Ras-WT と PI3KRBD-WT-VC の発現ベクターを導入した。発現ベクター導入の24時間後 (siRNA 導入後72時間) に血清飢餓処理を4時間行った後、生細胞タイムラプス観察を行った。1分間に1画像の時間間隔で、計70分間のタイムラプスを行い、観察開始10分後に終濃度100 ng/ml の EGF を加えた。細胞内の小胞状の構造を画像解析ソフト MetaMorph の Integrated Morphometry Analysis モジュールを用いて定量した。データは平均±標準誤差を示す (n = 5, 6, 6, 4, 4, 5)。
- b) HEK293T細胞に siCtrl および siIRS を導入し、48時間後に CFP または CFP と融合した IRS4 の変異体の発現ベクターを導入した。遺伝子導入から24時間後に血清飢餓処理を4時間行い、終濃度100 ng/ml の EGF で10分間刺激した後、終濃度500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の Alexa Fluor 546 標識デキストランを加えて37°Cで30分間インキュベートした。PBS で洗浄後、3%PFA で固定し蛍光顕微鏡で観察した。得られた画像は解析ソフト MetaMorph を用いて CFP 発現細胞の領域に興味領域 (region of interest, ROI) を作成し、同じ ROI 内のデキストラン由来の蛍光強度を取込量としてプロットした。データは平均±標準誤差を示す (n = 66, 60, 55, 52, 39, 42, 48, 50, 46, 47, 37, 47)。

【考察】

本研究では、Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行に必要な配列である RAPEL 配列（論文投稿中）と結合する因子を、質量分析を用いてスクリーニングし、48 個の候補因子を同定した（表 3）。その中で IRS4 に注力して研究した結果、IRS4 が Ras-PI3K 複合体のエンドソームへのリクルートと、それに伴うエンドサイトーシスの制御に関与することが示された。以上から、これまでに明らかになっていなかった Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行メカニズムの一端を明らかにすることができた。IRS4 自体がエンドソームに移行するメカニズムはまだ完全には解明されていないが、ホスファチジルイノシトールリン酸依存性およびチロシンリン酸化依存性の二つの機構が示唆された。本論文では IRS4 以外の候補因子には言及していないが、IRS4 の機能解析と並行して他の候補因子の機能解析も進めている。今後これらの候補因子を解析することによって、Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行とエンドサイトーシス制御機構の全貌の解明、およびその生理的意義が明らかになると期待される。

細胞内シグナル伝達における IRS4 の機能

IRS ファミリーのうち IRS1-3 はインスリン受容体もしくは IGF-I 受容体によってリン酸化され、PI3K 活性化を介してグルコーストランスポーターである Glut4 の細胞膜移行³⁶やインスリン受容体と IGF-I 受容体の内在化³⁷を制御する。また、IRS1 と IRS2 は IR のみならず EGFR によってもリン酸化され、PI3K の活性を制御することが報告されている³⁸。一方、IRS4 はノックアウトマウスにおいてインスリン感受性も血中グルコース濃度も野生型とほとんど差がなく、インスリンシグナル経路における機能がほとんど明らかになっていなかった。しかし、IRS4 は PI3K や Grb2 と相互作用し²³、細胞外の刺激非依存的に PI3K-Akt 経路の活性化を介して細胞の増殖や生存を亢進することが報告されている^{39,40}。これら先行研究において報告された IRS4 の機能は、いずれもインスリンもしくは IGF-I の下流シグナルに着目して同定されたものであり、EGF の下流で IRS4 がリン酸化されるか否かは報告されていなかった。本研究では IRS4 が EGF-EGFR シグナルの下流でリン酸化され、Ras-PI3K 複合体のリクルートを介してエンドサイトーシスを制御することを明らかにした。さらに、このリン酸化は Src によって制御されることが示唆されたが、IRS4 が Src の直接の基質であるかどうかは今後確認する必要がある。タンパク質データベース UniProt (<http://www.uniprot.org>) でのアミノ酸配列解析によると、Src に存在する SH3 ドメインのリガンドであるプロリンリッチ領域が IRS4 の 628-639 番目のアミノ酸領域に存在する。したがって、Src と IRS4 が直接相互作用し、基質となることは充分可能であると考えられる。

IRS ファミリーの細胞内局在

IRS1 と IRS2 はインスリン刺激後に細胞質からエンドソーム画分へ移行することが報告されている⁴¹。IRS1 は、IGF-I 刺激によりチロシン残基がリン酸化され、リン酸化チロシン残基と AP-1 複合体の μ 1A の相互作用を介して細胞内の低密度マイクロソーム (low density microsome, LDM) と呼ばれる小胞構造に移行することが報告されている³⁷。他にも、PH ドメインが PH ドメイン結合タンパク質 (PH-interacting protein, PHIP) との相互作用を介して IRS1-IRS3 の細胞質から細胞膜への移行を促進することが報告されている⁴²。本研究では、IRS4 が受容体型チロシンキナーゼ依存的に二つの異なるメカニズムでエンドソームに移行することが明らかになった。PH ドメイン依存的なエンドソーム移行は LY294002 によって抑制されることから、PH ドメインと PI(3,4,5)P₃ や PI(3)P との相互作用が移行機序の 1 つであると考えられる。一方で、チロシンリン酸化を介したエンドソーム移行については、その分子メカニズムは明らかになっていない。想定されるメカニズムとしては、SH2 ドメインもしくは PTB ドメインを持つ分子が IRS4 の C2 ドメインのリン酸化チロシン残基と相互作用し、IRS4 をエンドソームへリクルートする、もしくは IRS4 の PTB ドメインがエンドソーム上に存在する分子のリン酸化チロシン残基と相互作用してエンドソーム移行を促進するといったメカニズムが挙げられる。しかしながら、IRS4 の C2 ドメインは単独でエンドソーム移行が可能であることや、リン酸化されない IRS4 はエンドソーム移行が抑制されたことから、C2 ドメインの寄与が強く支持される。

IRS4 とエンドサイトーシス

IRS ファミリーはインスリン刺激によって引き起こされるクラスリン依存性エンドサイトーシスと、それに伴うインスリン受容体の内在化に関与する³⁷。また、IRS1 はカベオラ依存性エンドサイトーシスによるインスリン受容体の取り込みの際に、caveolin-2 と相互作用することが報告されている⁴³。しかしこれまで、クラスリン非依存性エンドサイトーシスに関与するか否かは検討されていなかった。本研究では IRS4 が Ras-PI3K 複合体の時空間的制御を介してクラスリン非依存性エンドサイトーシスを促進することを明らかにした。IRS4 は Slingshot-1 と相互作用し、コフィリンのリン酸化を介してアクチンフィラメントの脱重合・切断を抑制することでアクチンの安定化に寄与する⁴⁴。IRS4 は Ras-PI3K 複合体の局在制御以外にもアクチンの制御を介してエンドサイトーシスを制御している可能性も考えられる。また上述の caveolin と IRS1 の相互作用は PTB ドメインを介しているため、IRS1 の PTB ドメインと高い相同性を有する IRS4 が、同様の相互作用を介してカベオラ依存性エンドサイトーシスを制御する可能性もある。

IRS4 シグナルの生物学的意義

IRS1 のノックアウトマウスはインスリン抵抗性と膵 β 細胞のインスリン分泌機能の低下を示し⁴⁵、IRS2 ノックアウトマウスは 2 型糖尿病の表現系を示す⁴⁶。IRS1 と IRS2 のダブルノックアウトマウスは致死である⁴⁶。これに対して、IRS4 のノックアウトマウスが顕著な表現型を示さなかったため、IRS4 は個体の恒常性維持に重要ではないと結論付けられ、その生物学的意義はこれまでほとんど注目されていなかった⁴⁷。しかし最近の報告によると、筋形成において筋芽細胞の分化や恒常性維持を制御する骨形成タンパク質 (bone morphogenic proteins, BMP) の活性を制御する因子として IRS4 が同定され、マウス発生過程の下肢において IRS4 の発現量が転写レベルで上昇し、BMP との相互作用を介して骨形成や筋肉への分化を誘導することが報告されている⁴⁸。また、乳がんの薬剤耐性に関わる遺伝子のスクリーニングにより IRS4 が同定された⁴⁹。IRS4 が発現したがん細胞では PI3K-Akt 経路の活性化を介して細胞の増殖・生存が亢進される。このことにより、EGFR 阻害薬による EGFR 経路の遮断が補償され、がん細胞が薬剤耐性化を獲得することが報告されている⁴⁰。他にも細胞内で起こる染色体の体細胞性コピー数変化によって発現が上昇される遺伝子を網羅的に解析したところ、様々ながん細胞において IRS4 の発現が亢進しており、IRS4 を強制発現させた肺がん細胞はマウス xenograft モデルにおいて腫瘍形成能が亢進することも報告されている⁴⁹。これら新しい知見により、IRS4 の生物学的意義が徐々に明らかになりつつある。

本研究において、IRS4 が EGFR の下流で Ras-PI3K 複合体の時空間的制御を介して、エンドサイトーシスを促進するという機能が新たに同定された。IRS4 は他の IRS ファミリーとは異なり、インスリンシグナル以外にも EGFR シグナルの下流で機能することが明らかとなった。また、他の IRS ファミリーが受容体型チロシンキナーゼであるインスリン受容体により直接リン酸化されるのに対し、IRS4 のリン酸化は非受容体型チロシンキナーゼである Src が仲介することも特徴的である。今後、IRS4 がエンドソーム移行する詳細な分子機構を解析することにより、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。

【総括および結論】

1. RAPEL 配列と結合する因子として IRS4 を同定した。
2. IRS4 は EGF 刺激により Src ファミリーキナーゼによってリン酸化され、エンドソームに移行した。
3. IRS4 は EGF 刺激依存的な Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行およびエンドサイトーシスを促進した。
4. Src 阻害薬 PP2 により IRS4 と Ras-PI3K 複合体のエンドソームへの移行およびエンドサイトーシスが抑制された。
5. IRS4 のエンドソームへの移行には PH ドメインと C2 ドメインが必要であった。

【新知見の意義・今後の展望】

これまでインスリンシグナル経路において機能が明らかにされていなかった IRS4 が EGFR の下流で Ras-PI3K 複合体の時空間的制御を介して、エンドサイトーシスを促進するという機能が新たに同定された。IRS4 は他の IRS ファミリーとは異なり、インスリン受容体以外のチロシンキナーゼによってリン酸化され EGFR シグナルの下流で機能することが明らかとなった。また、他の IRS ファミリーが受容体型チロシンキナーゼであるインスリン受容体により直接リン酸化されるのに対し、IRS4 のリン酸化は非受容体型チロシンキナーゼである Src が仲介している点は特徴的である。

本研究では、IRS4 がエンドソームに移行するのに必須の領域が特定されたのみで、どのような機構でエンドソームへリクルートされているかは明らかにされていない。IRS4 がエンドソーム移行する詳細な分子機構を解析することにより、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。

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、手厚い御指導、御鞭撻を賜りました北海道大学大学院医学研究院生理学分野細胞生理学教室の教授大場雄介先生に心より御礼申し上げます。また、丁寧な実験の御指導と研究の議論など様々な面で多大な御協力を賜りました、北海道大学大学院医学研究院生理学分野細胞生理学教室助教（同大学医学研究院医学教育センター助教、兼任）の藤岡容一郎先生に深く御礼申し上げます。そして、日々の研究において御助言、御助力下さいました北海道大学大学院医学研究院生理学分野細胞生理学教室の皆様にも心より感謝を申し上げます。

【引用文献】

1. Murphy, J. E., Padilla, B. E., Hasdemir, B., Cottrell, G. S. & Bunnett, N. W. Endosomes: A legitimate platform for the signaling train. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 17615–17622 (2009).
2. Grimes, M. L., Zhou, J., Beattie, E. C., Yuen, E. C., Hall, D. E., Valletta, J. S., Topp, K. S., LaVail, J. H., Bunnett, N. W., & Mobley, W. C., Endocytosis of activated TrkA: evidence that nerve growth factor induces formation of signaling endosomes. *J. Neurosci.* **16**, 7950–7964 (1996).
3. Honda, K., Ohba, Y., Yanai, H., Negishi, H., Mizutani, T., Takaoka, A., Taya, C., & Taniguchi, T., Spatiotemporal regulation of MyD88–IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. *Nature* **434**, 1035–1040 (2005).
4. Sorkin, A. & Zastrow, von, M. Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 609–622 (2009).
5. Bos, J. L., Rehmann, H. & Wittinghofer, A. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* **129**, 865–877 (2007).
6. Karnoub, A. E. & Weinberg, R. A. Ras oncogenes: split personalities. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 517–531 (2008).
7. Johnson, L., Greenbaum, D., Cichowski, K., Mercer, K., Murphy, E., Schmitt, E., Bronson, RT., Umanoff, H., Edelman, W., Kucherlapati, R., & Jacks, T. K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras. *Genes Dev.* **11**, 2468–2481 (1997).
8. Koera, K., Nakamura, K., Nakao, K., Miyoshi, J., Toyoshima, K., Hatta, T., Otani, H., Aiba, A., & Katsuki, M. K-ras is essential for the development of the mouse embryo. *Oncogene* **15**, 1151–1159 (1997).
9. Laude, A. J. & Prior, I. A. Palmitoylation and localisation of RAS isoforms are modulated by the hypervariable linker domain. *J. Cell Sci.* **121**, 421–427 (2008).
10. Jura, N., Scotto-Lavino, E., Sobczyk, A. & Bar-Sagi, D. Differential Modification of Ras Proteins by Ubiquitination. *Mol. Cell* **21**, 679–687 (2006).
11. Vojtek, A. B. & Der, C. J. Increasing complexity of the Ras signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **273**, 19925–19928 (1998).
12. Vojtek, A. B., Hollenberg, S. M. & Cooper, J. A. Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell* **74**, 205–214 (1993).

13. Robbins, D. J., Cheng, M., Zhen, E., Vanderbilt, C. A., Feig, L. A., & Cobb, M. H., Evidence for a Ras-dependent extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) cascade. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 6924–6928 (1992).
14. Urano, T., Emkey, R. & Feig, L. A. Ral-GTPases mediate a distinct downstream signaling pathway from Ras that facilitates cellular transformation. *EMBO J.* **15**, 810–816 (1996).
15. Frankel, P., Aronheim, A., Kavanagh, E., Balda, M. S., Matter, K., Bunney, T. D., & Marshall, C. J., RalA interacts with ZONAB in a cell density-dependent manner and regulates its transcriptional activity. *EMBO J.* **24**, 54–62 (2005).
16. Nakashima, S., Morinaka, K., Koyama, S., Ikeda, M., Kishida, M., Okawa, K., Iwamatsu, A., Kishida, S., & Kikuchi, A. Small G protein Ral and its downstream molecules regulate endocytosis of EGF and insulin receptors. *EMBO J.* **18**, 3629–3642 (1999).
17. Thorpe, L. M., Yuzugullu, H. & Zhao, J. J. PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 7–24 (2015).
18. Jean, S. & Kiger, A. A. Classes of phosphoinositide 3-kinases at a glance. *J. Cell Sci.* **127**, 923–928 (2014).
19. Murray, D.H., Janel, M., Lauer, J., Avellaneda, M. J., Brouilly, N., Cezanne, A., Morales-Navarrete, H., Perini, E. D., Ferguson, C., Lupas, A. N., Kalaidzidis, Y., Parton, R. G., Grill, S. W., & Zerial, M., An endosomal tether undergoes an entropic collapse to bring vesicles together. *Nature* **537**, 107–111 (2016).
20. Shin, N., Ahn, N., Chang-Ileto, B., Park, J., Takei, K., Ahn, S. G., Kim, S. A., Di Paolo, G., & Chang, S., SNX9 regulates tubular invagination of the plasma membrane through interaction with actin cytoskeleton and dynamin 2. *J. Cell Sci.* **121**, 1252–1263 (2008).
21. Tsutsumi, K., Fujioka, Y., Tsuda, M., Kawaguchi, H. & Ohba, Y. Visualization of Ras-PI3K interaction in the endosome using BiFC. *Cell. Signal.* **21**, 1672–1679 (2009).
22. Fujioka, Y., Tsuda, M., Hattori, T., Sasaki, J., Sasaki, T., Miyazaki, T., & Ohba, Y., The Ras–PI3K Signaling Pathway Is Involved in Clathrin-Independent Endocytosis and the Internalization of Influenza Viruses. *PLoS ONE* **6**, e16324– e16329, (2011).

23. Fantin, V. R., Sparling, J. D., Slot, J. W., Keller, S. R., Lienhard, G. E., & Lavan, B. E., Characterization of insulin receptor substrate 4 in human embryonic kidney 293 cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 10726–10732 (1998).
24. Sun, X. J., Rothenberg, P., Kahn, C. R., Backer, J. M., Araki, E., Wilden, P. A., Cahill, D. A., Goldstein, B. J., & White, M. F., Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* **352**, 73–77 (1991).
25. Sun, X. J., Crimmins, D. L., Myers, M. G., Miralpeix, M. & White, M. F. Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 7418–7428 (1993).
26. Lavan, B. E., Lane, W. S. & Lienhard, G. E. The 60-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family. *J. Biol. Chem.* **272**, 11439–11443 (1997).
27. Lavan, B. E., Fantin, V. R., Chang, E. T., Lane, W. S., Keller, S. R., & Lienhard, G. E. A novel 160-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family. *J. Biol. Chem.* **272**, 21403–21407 (1997).
28. Fantin, V. R., Sparling, J. D., Slot, J. W., Keller, S. R., Lienhard, G. E., & Lavan, B. E., Characterization of insulin receptor substrate 4 in human embryonic kidney 293 cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 10726–10732 (1998).
29. Nandi, A., Kitamura, Y., Kahn, C. R. & Accili, D. Mouse models of insulin resistance. *Physiol. Rev.* **84**, 623–647 (2004).
30. Araki, E., Lipes, M. A., Patti, M. E., Brüning, J. C., Haag, B. 3rd, Johnson, R. S., & Kahn, C. R., Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature* **372**, 186–190 (1994).
31. Withers, D. J., Gutierrez, J. S., Towery, H., Burks, D. J., Ren, J. M., Previs, S., Zhang, Y., Bernal, D., Pons, S., Shulman, G. I., Bonner-Weir, S., & White, M. F. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* **391**, 900–904 (1998).
32. Fantin, V. R., Wang, Q., Lienhard, G. E. & Keller, S. R. Mice lacking insulin receptor substrate 4 exhibit mild defects in growth, reproduction, and glucose homeostasis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **278**, E127– E133 (2000).
33. Ohba, Y., Kurokawa, K. & Matsuda, M. Mechanism of the spatio-temporal regulation of Ras and Rap1. *EMBO J.* **22**, 859–869 (2003).

34. Navaroli, D. M., Bellvé, K. D., Standley, C., Lifshitz, L. M., Cardia, J., Lambright, D., Leonard, D., Fogarty, K. E., & Corvera, S. Rabenosyn-5 defines the fate of the transferrin receptor following clathrin-mediated endocytosis. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **109**, E471– E480 (2012).
35. Mochizuki, N., Yamashita, S., Kurokawa, K., Ohba, Y., Nagai, T., Miyawaki, A., & Matsuda, M. Spatio-temporal images of growth-factor-induced activation of Ras and Rap1. *Nature* **411**, 1065–1068 (2001).
36. Zhou, L., Chen, H., Lin, C. H., Cong, L. N., McGibbon, M. A., Sciacchitano, S., Lesniak, M. A., Quon, M. J., & Taylor, S. I. Insulin receptor substrate-2 (IRS-2) can mediate the action of insulin to stimulate translocation of GLUT4 to the cell surface in rat adipose cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 29829–29833 (1997).
37. Yoneyama, Y., Matsuo, M., Take, K., Kabuta, T., Chida, K., Hakuno, F., & Takahashi, S. The AP-1 Complex Regulates Intracellular Localization of Insulin Receptor Substrate 1, Which Is Required for Insulin-Like Growth Factor I-Dependent Cell Proliferation. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 1991–2003 (2013).
38. Fujioka, T., Kim, J. H., Adachi, H., Saito, K., Tsujimoto, M., Yokoyama, S., & Ui, M. Further evidence for the involvement of insulin receptor substrates in epidermal growth factor-induced activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Eur. J. Biochem.* **268**, 4158–4168 (2001).
39. Hoxhaj, G., Dissanayake, K. & MacKintosh, C. Effect of IRS4 levels on PI 3-kinase signalling. *PLoS ONE* **8**, e73327– e73329 (2013).
40. Ikink, G. J., Boer, M., Bakker, E. R. M. & Hilkens, J. IRS4 induces mammary tumorigenesis and confers resistance to HER2-targeted therapy through constitutive PI3K/AKT-pathway hyperactivation. *Nat. Commun.* **7**, 13567 (2016).
41. Kelly, K. L. & Ruderman, N. B. Insulin-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase. Association with a 185-kDa tyrosine-phosphorylated protein (IRS-1) and localization in a low density membrane vesicle. *J. Biol. Chem.* **268**, 4391–4398 (1993).
42. Kaburagi, Y., Okochi, H., Satoh, S., Yamashita, R., Hamada, K., Ikari, K., Yamamoto-Honda, R., Terauchi, Y., Yasuda, & K., Noda, M. Role of IRS and PHIP on insulin-induced tyrosine phosphorylation and distribution of IRS proteins. *Cell Struct. Funct.* **32**, 69–78 (2007).
43. Kwon, H., Lee, J., Jeong, K., Jang, D. & Pak, Y. Fatty acylated caveolin-2 is a substrate of insulin receptor tyrosine kinase for insulin receptor

- substrate-1-directed signaling activation. *Biochem. Biophys. Acta* **1853**, 1022–1034 (2015).
44. Homma, Y., Kanno, S., Sasaki, K., Nishita, M., Yasui, A., Asano, T., Ohashi, K., & Mizuno, K. Insulin Receptor Substrate-4 Binds to Slingshot-1 Phosphatase and Promotes Cofilin Dephosphorylation. *J. Biol. Chem.* **289**, 26302–26313 (2014).
 45. Kulkarni, R. N., Winnay, J. N., Daniels, M., Brüning, J. C., Flier, S. N., Hanahan, D., & Kahn, C. R. Altered function of insulin receptor substrate-1-deficient mouse islets and cultured β -cell lines. *J. Clin. Invest.* **104**, R69–R75 (1999).
 46. White, M. F. IRS proteins and the common path to diabetes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **283**, E413–E422 (2002).
 47. Fantin, V. R., Wang, Q., Lienhard, G. E. & Keller, S. R. Mice lacking insulin receptor substrate 4 exhibit mild defects in growth, reproduction, and glucose homeostasis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **278**, E127–E133 (2000).
 48. Dörpholz, G., Murgai, A., Jatzlau, J., Horbelt, D., Belverdi, M. P., Heroven, C., Schreiber, I., Wendel, G., Ruschke, K., Stricker, S., & Knaus, P. IRS4, a novel modulator of BMP/Smad and Akt signalling during early muscle differentiation. *Sci. Rep.* **7**, 8778–8817 (2017).
 49. Weischenfeldt, J., Dubash, T., Drainas, A. P., Mardin, B. R., Chen, Y., Stütz, A. M., Waszak, S. M., Bosco, G., Halvorsen, A. R., Raeder, B., Efthymiopoulos, T., Erkek, S., Siegl, C., Brenner, H., Brustugun, O. T., Dieter, S. M., Northcott, P. A., Petersen, I., Pfister, S. M., Schneider, M., Solberg, S. K., Thunissen, E., Weichert, W., Zichner, T., Thomas, R., Peifer, M., Helland, A., Ball, C. R., Jechlinger, M., Sotillo, R., Glimm, H., & Korbel, J. O. Pan-cancer analysis of somatic copy-number alterations implicates IRS4 and IGF2 in enhancer hijacking. *Nat. Genet.* **49**, 65–74 (2017).