

審査の結果の要旨

氏名 陳 旻岑

白血球遊走因子ケモカインは、Gタンパク質共役受容体（GPCR）であるケモカイン受容体と結合して白血球遊走を制御しており、なかでも CCR2 および CCR5 はマクロファージなどの遊走および活性化を制御することで、炎症性疾患やがんの悪性化に関与している。これらの GPCR を介した細胞内遊走シグナルは、クラス IB 型 PI3K（PI3KIB）の活性化によって制御されていることが知られているものの、クラス IA 型 PI3K（PI3KIA）の関与については不明な点が多い。これまでにケモカイン受容体 CCR2 および CCR5 の細胞内領域に特異的に会合するシグナル制御分子フロント（FROUNT）が PI3K 経路の上流で細胞遊走シグナルを制御し、マクロファージに発現するフロントタンパクは、がんを悪化させることが報告されている。本研究は「フロントが如何にして PI3K 経路を活性化するのか」を明らかにすることを目的として試みた研究であり下記の結果を得ている。

1. PI3KIA は CCR2 依存的な細胞遊走に関与している

フロントタンパク内に PI3KIA 結合モチーフ（Tyr(P)-X-X-Met : 598-601 残基）が存在したことから、クラス特異的な PI3K 阻害剤処置や PI3KIA の p85 制御サブユニットのドミナントネガティブタンパクを発現した細胞の遊走活性を解析した結果、CCR2 依存的な細胞遊走には、従来考えられていた PI3KIB に加えて、PI3KIA が関与していることが示された。

2. ケモカイン刺激依存的リン酸化フロントの細胞内局在変動

598 番目のチロシン残基がリン酸化したフロントタンパク（FROUNT-Y598P）を特異的に認識できる抗体を作出して、細胞分画フラクションにおけるタンパク局在解析および免疫染色解析を実施した。この結果、FROUNT-Y598P は、ケモカイン刺激に伴う量的な変動はないものの、CCR2 または CCR5 の活性化依存的に細胞質から細胞膜へ一過性に局在が変化すること、遊走に伴う極性形成細胞における葉状仮足部にて PIP3（PI3K 経路の下流シグナル分子である Akt の PH ドメインタンパクを用いて可視化）および F-アクチンと共局在していることが示された。無刺激状態では非リン酸化タンパクと同様に細胞質

に存在する FROUNT-Y598P は、ケモカイン受容体の活性化に伴って細胞先導部の細胞膜部へ移行して PI3K 経路の下流シグナルを活性化することが示唆された。

3. リン酸化フロントは PI3KIA との複合体を形成し、細胞遊走を制御する

大腸菌を用いた組み換えタンパク発現系を用いて、リン酸化および非リン酸化フロント組換えタンパク質を発現・精製し、免疫共沈殿実験により PI3K、CCR2 との相互作用を検証した結果、リン酸化フロントは、PI3KIA の p85 制御サブユニットおよび CCR2 に結合し、598 番目のチロシン残基の点変異型フロントタンパクは p85 および CCR2 と結合しなかった。また、このチロシン残基へ点変異を導入したリン酸化できない変異型フロント (FROUNT-Y598E/Y598F) を発現した細胞では、遊走活性が低下していることが示された。これらの結果より、リン酸化フロントタンパクは PI3KIA と直接結合することでケモカイン受容体および PI3KIA からなる細胞遊走シグナル複合体を形成して細胞遊走シグナルを制御することが示唆された。

以上、本論文では、これまでに知られていたフロントタンパクのなかでも、ごく一部として存在する 598 番目のチロシン残基がリン酸化した活性化型フロントタンパク (FROUNT-Y598P) の存在を初めて明らかにして、FROUNT-Y598P はケモカイン刺激依存的に遊走細胞先導部へ移行し、ケモカイン受容体/FROUNT-Y598P/PI3KIA からなる細胞遊走シグナル複合体を形成することで、下流の遊走シグナルを活性化していることを示した。本研究は、ケモカイン受容体などの GPCR を介した細胞遊走シグナル制御機構において、これまで注目されていなかった PI3KIA の重要性およびその活性化分子機構を見出し、細胞遊走が関わるがんや炎症性疾患の治療や診断につながる可能性の高い重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものだと考えられる。

よって本論文は博士（医学）の学位請求論文として合格と認められる。