

博士論文

新規 PI 3-kinase 結合タンパク質の
同定とその機能の解析

東京大学大学院 農学生命科学研究科

応用動物科学専攻

平成 14 年度進学

赤間 剛

指導教員 高橋伸一郎

目次

論文要旨	3
序章	7
序章の図	12
材料と方法	15
第1章 PI 3-kinase p85 制御サブユニットと結合する新規シグナル分子 p125 の同定	
緒言	29
結果	31
第1節 p85 と結合する p125 の MALDI-TOF/MS 法を用いた同定	
第2節 p125 ラット遺伝子の取得と塩基配列情報の解析	
第3節 p125 と結合する PI 3-kinase 活性の確認	
第4節 p125 発現組織の解析	
考察	35
第1章の図表	39
第2章 p125 による PI 3-kinase 活性化機構と p125 の細胞内局在制御機構の解析	
緒言	52
結果	54
第1節 p125 をチロシンリン酸化するキナーゼの検討	
第2節 p125 のチロシンリン酸化部位と p85 との結合領域の決定	
第3節 p125 の細胞内局在の解析	
第4節 p125 が特徴的な細胞内局在を示すために必要な領域の決定	
考察	56
第2章の図	60

第 3 章	cAMP 刺激と IGF-I 刺激に応答して起こる相乗的 DNA 合成誘導における p125 の役割の解析	
緒言		6 7
結果		6 9
第 1 節	TSH/cAMP の処理濃度や処理時間に応答した p125 量の変動の解析	
第 2 節	cAMP 刺激に応答した p125 の合成誘導機構の解析	
第 3 節	p125 の発現抑制が cAMP 刺激と IGF-I 刺激に応答して起こる相乗的 DNA 合成誘導に及ぼす影響の解析	
第 4 節	p125 の強制発現が IGF-I 依存性 DNA 合成誘導に及ぼす影響の解析	
考察		7 1
第 3 章の図		7 4
総合討論		8 2
総合討論の図表		9 0
謝辞		9 2
参考文献		9 3

要旨

Phosphatidylinositol (PI) (3,4,5)P₃ (PIP₃) は、膜中に存在する PI(4,5)P₂ (PIP₂) がリン酸化されて生じるセカンドメッセンジャーで、近年、多くの生命現象に関与していることが明らかにされている。このリン酸化反応を触媒する I 型 PI 3-kinase は、p85/p55 ファミリータンパク質を形成する制御サブユニットと、p110 ファミリータンパク質を形成する触媒サブユニットが結合したヘテロ二量体である。一般に、PI 3-kinase は、チロシンキナーゼを内蔵した受容体が自己リン酸化したもの、あるいはこの受容体キナーゼによってチロシンリン酸化された基質を、制御サブユニットの SH2 ドメインが認識して結合し、一過的に触媒サブユニットが活性化、生理活性を発現するものと考えられてきた。しかし最近、PI 3-kinase の持続的な活性化が報告され、このような活性化が必要な生理作用の例も明らかになってきた。したがって、PI 3-kinase の持続的活性化の新しい機構の発見が切望されている。

我々は、ラット甲状腺由来正常細胞 FRTL-5 を甲状腺刺激ホルモン (TSH) と IGF-I で処理すると細胞増殖が相乗的に促進されるが、これは TSH 長時間処理によって起こる cAMP 経路の長期活性化が、IGF-I 依存的な DNA 合成を増強するためであることを見出した。この相乗作用発現機構を解析する過程で、①TSH 処理によって起こる cAMP 経路の長時間刺激に応答して 125kDa の細胞内タンパク質、p125 がチロシンリン酸化され、これが PI 3-kinase p85 制御サブユニット (p85) と結合、持続的に PI 3-kinase p110 触媒サブユニットの活性化を引き起こす、②PI 3-kinase の持続的活性化は、IGF-I 受容体基質のひとつ p66 Shc の合成を誘導、IGF-I シグナルを増強すると同時に、G1 cyclin の翻訳活性を上昇させ G1 cyclin 合成量が増加する、③他の機構と相まって G1 cyclin-dependent kinase の活性化が起こり、G1 期から S 期への進行が可能となる、ことなどを明らかにしてきた。したがって、p125 は、cAMP 経路の長期活性化によって起こる IGF-I 依存性 DNA 合成の増強に必要な PI 3-kinase の長期活性化を可能にする、これまでに報告のないタイプの PI 3-kinase 結合タンパク質であると推定されたが、その本体は不明であった。

そこで本研究では、まず p125 を同定、発現を調べた。p125 が新規シグナル分子であったため、p125 による PI 3-kinase の活性化機構、p125 の細胞内局在制御機構を解析、最後に cAMP 刺激と IGF-I 刺激によって誘導される FRTL-5 細胞の相乗的増殖における p125 の役割について検討した。

1. PI 3-kinase p85 制御サブユニットと結合する新規シグナル分子 p125 の同定

当研究室の福嶋は、dibutyl cAMP (Bt₂cAMP) で 24 時間処理した FRTL-5 細胞から調製した抽出液より抗ホスホチロシン抗体を用いた免疫沈降で p125 を部分精製、これを MALDI-TOF/MS で解析し、p125 が KIAA1914、GENBANK Accession No. XM_217643 である可能性を示した。そこで私は、同様に処理した FRTL-5 細胞の抽出液を抗 p85 抗体で免疫沈降し p125 を共免疫沈降させた。SDS-PAGE 後の銀染色により検出された p125 のバンドを定法どおり MALDI-TOF/MS に供し、Peptide Mass Fingerprinting (PMF) 法で解析したところ、KIAA1914 由来のシグナルを得ることに成功した。そこで、p125 の C 末端部分の予想されるアミノ酸配列 20 残基のペプチドに対するポリクローナル抗体を作製した。TSH をはじめとした cAMP を生成する薬剤で FRTL-5 細胞を 24 時間処理後、この抗体を用いて免疫沈降を行ったところ、チロシンリン酸化 p125 およびこれと結合する p85 の沈降に成功し、この沈降物中に PI 3-kinase 活性も確認された。他の結果も併せ、p125 は KIAA1914 であると結論した。

予想されるアミノ酸配列から、p125 は、N 末端領域にチロシンリン酸化されると p85 と結合する YXXM モチーフを 1 箇所、中央部分に 2 つの PH ドメインと 4 つのチロシンリン酸化可能部位、C 末端領域に coiled-coil ドメインを有する新規シグナル分子と考えられた。ラット p125 の遺伝子をクローニングし塩基配列を解析したところ、既にデータが存在するマウス・ヒト p125 と比較して、塩基・アミノ酸配列レベルで 90%以上の相同性を示した。BLASTP によりデータベース検索を行うと、脊椎動物でのみ p125 と相同性を有する分子の存在が確認された。また系統樹解析により、p125 は、既に報告のある Actin Filament Associated Protein-110 と Accession No. AI173486 と合わせてファミリーを形成している可能性が明らかとなった。

次に、生後 3 ヶ月のオス成体ラットの各臓器における p125 発現を RT-PCR 法により調べたところ、甲状腺の他に精巣、心臓、脾臓、腎臓、小腸、肺といった広範な組織で mRNA の発現が確認され、この結果より、p125 は様々な臓器で普遍的に機能しているシグナル分

子と考えられた。

2. p125 による PI 3-kinase 活性化機構と p125 の細胞内局在制御機構の解析

FRTL-5 細胞を Bt₂cAMP で長時間処理する際に src ファミリーキナーゼ阻害剤である PP1、PP2 を添加すると、p125 のチロシンリン酸化、p125 と p85 の結合量が減少した。また、293T 細胞に p125 と恒常的活性型 src を共発現させると、はじめて p125 のチロシンリン酸化、p125 と結合した p85 および PI 3-kinase 活性が確認された。これらの結果は、p125 をチロシンリン酸化するチロシンキナーゼが src ファミリーキナーゼであることを示唆している。

次に p125 の様々な機能ドメインを欠失させた変異体を作製し、これらを 293T 細胞に恒常的活性型 src とともに発現させ、p125 と p85 との結合を調べた。p125 には複数のチロシンリン酸化可能部位が存在するが、N 末端側の YXXM モチーフを含む領域を欠失させると、p85 との結合が観察されなくなった。

続いて、内在性 p125 の細胞内局在を、FRTL-5 細胞を用いた抗 p125 抗体による免疫染色により調べた。その結果、p125 は細胞質で F-actin とよく共局在することを発見した。また、FRTL-5 細胞を Bt₂cAMP 処理する際に actin 重合阻害剤である latrunculin B を添加すると、p125 は細胞質に一樣に存在するようになり、この際、p125 チロシンリン酸化、p125 と結合する p85 量も減少した。そこで、293T 細胞に p125 の種々の領域が欠失した変異体を発現させて局在を解析した結果、C 末端側の coiled-coil ドメインを含む領域が、F-actin との共局在に必要であることが明らかとなった。

以上の結果より、p125 は、C 末端側の領域を用いて F-actin 付近に局在し、src ファミリーキナーゼで N 末端側の YXXM モチーフをチロシンリン酸化されることにより p85 と結合、PI 3-kinase の活性化を引き起こすと結論した。

3. cAMP 刺激と IGF-I 刺激によって誘導される相乗的 DNA 合成における p125 の役割の解析

FRTL-5 細胞を TSH あるいは Bt₂cAMP で種々の時間処理し、p125 の動態を解析した。その結果、p125 mRNA 量およびタンパク量は、cAMP 処理 8 時間以降、処理時間に応じて増加することが明らかとなった。また、p125 のチロシンリン酸化、p125 と結合した p85 量は、TSH および Bt₂cAMP の処理濃度・時間に依存して増加した。

続いて、ラット p125 cDNA 塩基配列の情報から siRNA を設計、FRTL-5 細胞にこの siRNA を導入して p125 の発現を抑制した。この細胞を Bt₂cAMP 24 時間前処理し、その後 IGF-I で処理したところ、p125 発現抑制が、cAMP 前処理により誘導される Akt のリン酸化、p66 Shc の増加、IGF-I 依存性 DNA 合成の増強を顕著に抑制した。

最後に、FRTL-5 細胞に p125 遺伝子を導入、IGF-I で処理し、DNA 合成を測定した。その結果、p125 を強発現した細胞を IGF-I で処理した際に、対照細胞を IGF-I 処理した場合に比較して、有意に DNA 合成が亢進することを見出した。

これらの結果は、cAMP 経路を長時間刺激することによって p125 の遺伝子発現が誘導、タンパク質が増加するとチロシンリン酸化され、p85 が結合、これと結合する PI 3-kinase が活性化される、この p125 を介した PI 3-kinase の持続的な活性化が、cAMP 経路の長期活性化によって起こる IGF-I 依存性 DNA 合成の増強に重要な役割を果たしていることを直接的に示している。

本研究により、PI 3-kinase の持続的活性化の新しい機構を発見することに成功した。p125 は広範な臓器で発現が認められたことを併せると、種々の臓器で PI 3-kinase の活性化を介した様々な生理活性の発現に関与しているものと推定される。今後、この観点から PI 3-kinase の持続的活性化の生理的意義が明らかになるものと期待している。

序章

Phosphatidylinositol のリン酸化と PI 3-kinase

Phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase) はリン脂質 phosphatidyl inositol (PI) のイノシトール環の 3 位をリン酸化する酵素である。PI は細胞膜の構成成分だが、リン酸化を受けて様々なタンパク質と結合し、シグナルを伝達する (Di Paolo and De Camilli, 2006; Gassama-Diagne et al., 2006)。PIP₃ は PDK (phosphatidylinositol-dependent kinase) 1 や Akt の PH ドメインと結合する。これにより PDK1 は活性化し、Akt の 473 番目のセリン残基をリン酸化、活性化させることが明らかになっている。さらに Akt の活性化は下流の mTOR (mammalian target of rapamycin) や p70 S6 kinase の活性化を介して様々なタンパク質の合成を促進する (Woodgett, 2005)。リン酸化されている PI はリン脂質の中でも数%であり、イノシトール環の 3,4,5 位のどのリン酸化も特異的リン酸化酵素によって制御されている。PI、PI(4)P、PI(4,5)P₂ の 3 位をリン酸化する酵素は PI 3-kinase と総称されている。

PI 3-kinase ファミリー

PI 3-kinase ファミリーは基質特異性やタンパク質構造、活性化因子によって 3 種のサブクラスに分けられる。基質特異性については、II 型が PI(4)P を、III 型が PI をリン酸化するのに対し、I 型のみが PI(4,5)P₂ (PIP₂) を基質として 3 位をリン酸化し、PI(3,4,5)P₃ (PIP₃) を生成する (Engelman et al., 2006)。

I 型 PI 3-kinase は、タンパク質構造からさらに IA 型と IB 型に分けられる。IA 型は、制御サブユニットが p85 α 、p85 β 、p55 α 、p55 β 、p50 γ の 4 種の p85 ファミリーと触媒サブユニット p110 α と p110 β の p110 ファミリーがヘテロ二量体を形成する (Inukai et al., 1997; Yu et al., 1998)。IB 型の p110 γ には p85 結合ドメインが存在せず、p101 制御サブユニットとヘテロ二量体を形成する。II 型は単量体で存在し、III 型は p150 とヘテロ二量体を形成している。

活性の調節機構も、サブクラスによって異なっている。IA 型は p85 ファミリーが有する N 末端側の SH2 ドメインが、チロシンリン酸化された YXXM モチーフと結合して活性

化する (Rordorf-Nikolic et al., 1995) のに対して I B 型は p101 制御サブユニットと三量体 G タンパク質の $\beta \gamma$ サブユニットが結合して活性化する (Bousquet et al., 2006; Sotsios and Ward, 2000)。また I 型と II 型の触媒サブユニットには Ras と結合するドメインが存在し、結合により活性化を受けることも知られている (Funaki et al., 2000)。

I 型 PI 3-kinase を活性化させる分子

YXXM モチーフを介して I A 型 PI 3-kinase の p85 制御サブユニット (以下 p85 と略す) と結合する分子は大きく 2 種類に分けることができる。一つは、チロシンキナーゼ内蔵型受容体であり、もう一つはアダプタータンパク質である。

チロシンキナーゼ内蔵型受容体はリガンドと結合することで自己リン酸化を起こし、リン酸化チロシン残基に対して SH2 ドメインを有するタンパク質が結合する。この際 YXXM モチーフがチロシンリン酸化されると p85 が結合する。例えば epidermal growth factor receptor (EGFR) (Marcoux and Vuori, 2003; Shah et al., 2006)、platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) (Wu et al., 2003; Zhang et al., 2003)、nerve growth factor (NGF) receptor (Atwal et al., 2000; Soltoff et al., 1992) といった増殖因子に対するチロシンキナーゼ内蔵型受容体がこれに該当する。

一方、YXXM モチーフを持つアダプタータンパク質は、受容体と p85 の両方に結合することができる。Grb2-associated binder-1 (Gab1) は EGFR (Yu et al., 2002) や PDGFR (Demoulin et al., 2004) など様々なチロシンキナーゼ内蔵型受容体と growth factor receptor-binding protein 2 (Grb2) を介して結合し、YXXM モチーフがリン酸化を受けて p85 と結合する。また Casitas B-lineage lymphoma (Cbl) はサイトカインなどの刺激を受けてリン酸化され、p85 と結合する (Lottin-Divoux et al., 2006; Lupher et al., 1998)。更に insulin receptor substrate (IRS) は、insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor や insulin receptor がリガンドと結合すると自身がチロシンリン酸化されて、これと結合する。4 種の IRS ファミリー分子のうち、IRS1 と IRS2 は YXXM モチーフを有しており、IGF-I receptor、insulin receptor によってチロシンリン酸化されると p85 と結合する (Luo et al., 2005)。

これら既知の p85 と結合する受容体あるいはアダプタータンパク質による PI 3-kinase の活性化は、いずれも刺激に応答して短時間に起こる。これより長時間の刺激に応答した PI 3-kinase の活性化も報告されているが、このような PI 3-kinase 活性化の機構は未だ全く明らかになっていない (Dessauer and Nguyen, 2005; Fuse et al., 2004; Nedachi et al., 2000)。

トロピックホルモンによるインスリン様成長因子の生理活性の増強

一般に IGF-I は単独での生理活性が弱く、内分泌細胞ではトロピックホルモンと協働して相乗的な効果をあらわす。例えば卵巣顆粒膜細胞では follicle-stimulating hormone (FSH) が IGF-I の細胞増殖作用を強めることが報告されている (Ongeri et al., 2005)。他にセルトリ細胞では FSH が IGF-I によるトランスフェリン合成を (Meroni et al., 2004)、また甲状腺の細胞では TSH が IGF-I の細胞増殖作用を (Vella et al., 2001) 強めることがわかっている。

ラット甲状腺由来正常細胞 FRTL-5 は *in vivo* の甲状腺の性質をよく保持しており、腫瘍由来の細胞株に比べて TSH や IGF-I を含むホルモン応答解析に優れている (Ambesi-Impombato et al., 1980; Li et al., 1999)。FRTL-5 細胞は TSH や IGF-I の単独処理によりわずかながら細胞増殖を誘導する。しかし TSH と IGF-I の両方で処理すると、相乗的な DNA 合成が引き起こされる (Takahashi et al., 1990)。TSH シグナルと IGF-I シグナルの合流機構を解析する過程で、予め TSH で長時間前処理した後に IGF-I で処理すると相乗的な DNA 合成が誘導されることを見出した。TSH は三量体 G タンパク質共役型の受容体 TSH receptor (TSHR) に結合する。G タンパク質の α サブユニットは adenylate cyclase (AC) を活性化し、AC によって ATP から合成された cAMP は細胞内セカンドメッセンジャーとしてシグナルを伝達する (Du Villard et al., 2000)。そこで TSH の代わりに cAMP のアナログで長時間前処理 (以下 cAMP 処理と略す) したところ TSH と同様相乗的な DNA 合成が誘導されたため、cAMP 経路の長時間活性化が IGF-I シグナルを増強すると結論した (Fig. 0-1)。

cAMP 処理によってチロシンリン酸化される分子 p125 と cAMP 依存性 PI 3-kinase の活性化

cAMP の下流シグナルの解析を進める過程で、Takahashi らは cAMP 長時間処理に応答して分子質量 125kDa の細胞内タンパク質 (以下 p125 と略す) がチロシンリン酸化されることを見出した (Fig. 0-2) (Takahashi et al., 1991)。チロシンリン酸化 p125 の量は cAMP の処理濃度や処理時間に依存して増加し、チロシンリン酸化された p125 は抗 p85 抗体を用いた免疫沈降により共沈降され、PI 3-kinase と結合していることが明らかとなった (Fig. 0-3A)。また FRTL-5 細胞から調製した全タンパク質抽出液の PI 3-kinase 活性を測定すると、cAMP 長時間処理に応じて活性が増加した (Fig. 0-3B)。TSHR によって活性化される PI 3-kinase として、G タンパク質の $\beta\gamma$ サブユニットに結合する I B 型 PI 3-kinase や、TSHR の YXXM モチーフに結合する I A 型 PI 3-kinase が報告されているが、これらの PI 3-kinase 活性化はいずれも短時間で起こる (Suh et al., 2003; Wymann et al., 2003)。これらの結果からチロシンリン酸化 p125 が p85 と結合することで PI 3-kinase が

活性化すると考えられた。

一方、cAMP 前処理時に PI 3-kinase 阻害剤 LY294002 を加えると、IGF-I 依存性 DNA 合成の cAMP による増強が起こらなくなることも明らかとなった (Fig. 0-3C)。他の結果も併せると、cAMP 経路は p125 をチロシンリン酸化し、p85 と結合して PI 3-kinase を活性化、この活性が IGF-I シグナルの増強に必要であるという作業仮説が考えられた (根建 博士論文, 2000; 福嶋 博士論文, 2005)。

p125 を介して活性化される PI 3-kinase が IGF-I シグナルに与える影響

p125 を介して活性化した PI 3-kinase が IGF-I 依存性 DNA 合成を増強する機構を明らかにする過程で、IGF-I 受容体基質の一つである p66 Shc の転写が増加してタンパク量が增加、IGF-I 刺激を受けた際に p66 Shc チロシンリン酸化量が亢進することを見出した。また、G1 cyclin の一種 cyclin D1 の翻訳活性が増強され、IGF-I 刺激に応じた cyclinD1 転写活性を増強することや、CDK 阻害タンパク質の一種 p27^{kip1} のタンパク質分解を促進することが明らかとなった。

FRTL-5 細胞で cAMP によって PI 3-kinase を活性化する分子の探索

これまで、我々の研究グループでは p125 の同定を試みてきた。まず分子質量が 125kDa 付近の既知のタンパク質が p125 である可能性を検討した。FRTL-5 細胞より、JAK2、p125FAK (focal adhesion kinase)、Cbl、p130CAS (Crk-associated substrate)、c-ret を免疫沈降し、cAMP 長時間処理でチロシンリン酸化され、p85 と結合するタンパク質の可能性を調べたが、いずれのタンパク質も該当しなかった (根建 博士論文, 2000)。更に同定のために p85 SH2 ドメインを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより p125 の精製を行い、エドマン分解法により N 末端アミノ酸を決定しようとしたが、同定には至らなかった (川崎 修士論文, 2003)。

当研究室の福嶋は、cAMP で 24 時間処理した FRTL-5 細胞から SDS と還元剤の存在下で細胞抽出液を調製した。その後希釈によって変性剤の濃度を低下させ、抗ホスホチロシン抗体を用いた免疫沈降を行い、SDS-PAGE により p125 付近のタンパク質を得た。これを MALDI-TOF/MS で解析し、p125 が KIAA1914、Genbank Accession No. XM_217643 である可能性を示した (福嶋 博士論文, 2005)。

本研究の背景と本論文の構成

本研究では、p85 と共免疫沈降する性質を利用して p125 を同定し、このタンパク質の生理的意義を明らかにすることを目的として研究に着手した。

第一章では、p85 と沈降する画分より p125 を部分精製し、MALDI -TOF/MS 法により

p125 を同定し、配列情報など *in silico* 解析を進めた。さらに得られたアミノ酸配列情報をもとに抗体を作製し、沈降物中の PI 3-kinase 活性を検出、p125 が我々が同定を目指していた分子であることを証明した。また p125 の発現する組織を調べた。

第二章では、p125 をチロシンリン酸化するキナーゼを検討し、このキナーゼによるチロシンリン酸化が p125 と p85 の結合に必須であることを示した。また p125 の細胞内局在を検討し、p125 が F-actin と共局在すること、そしてこの局在が p125 を介したシグナル伝達にどのように関係するかを明らかにした。更に p125 の細胞内局在に必要な領域を同定した。

第三章では、FRTL-5 細胞を用いて cAMP 刺激に応答した p125 の発現調節機構を調べた。さらに p125 を siRNA によって発現抑制、あるいは高発現し、下流の PI 3-kinase シグナル伝達に与える影響を明らかにした。同時に IGF-I 依存性 DNA 合成に及ぼす影響を解析し、これらの結果から p125 の生理的機能を検討した。

総合討論では、cAMP 長時間処理が p125 を介した PI 3-kinase 活性を誘導し、IGF-I シグナルを相乗的に増強するメカニズムを、既知の PI 3-kinase 活性化シグナルと比較しながら討論した。

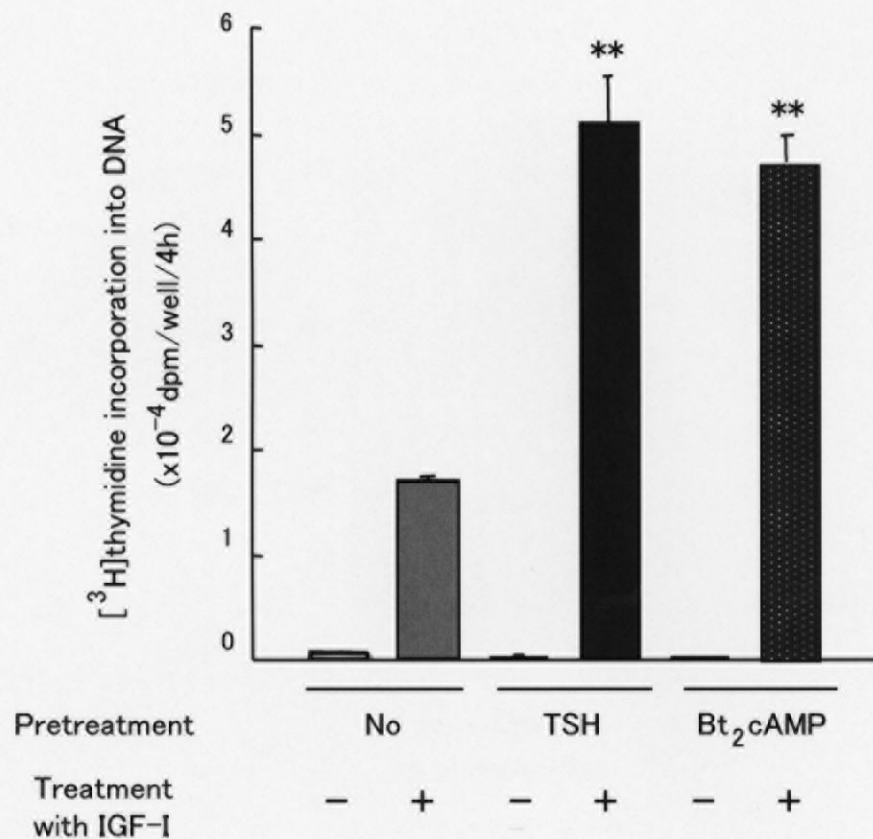


Fig. 0-1 TSHあるいはcAMP前処理がIGF-I依存性DNA合成に及ぼす影響

静止期FRTL-5細胞を1nM TSHを含む培地、1mM Bt₂cAMPを含む培地、これらを含まない培地で24時間培養 (pretreatment) した。HBSSで5回洗浄除去後、100ng/ml IGF-Iを含む、あるいは含まない培地で24時間培養した (treatment)。IGF-I処理の最終4時間のDNA合成を測定した。[**; *P*<0.01 (v.s. No additives)]

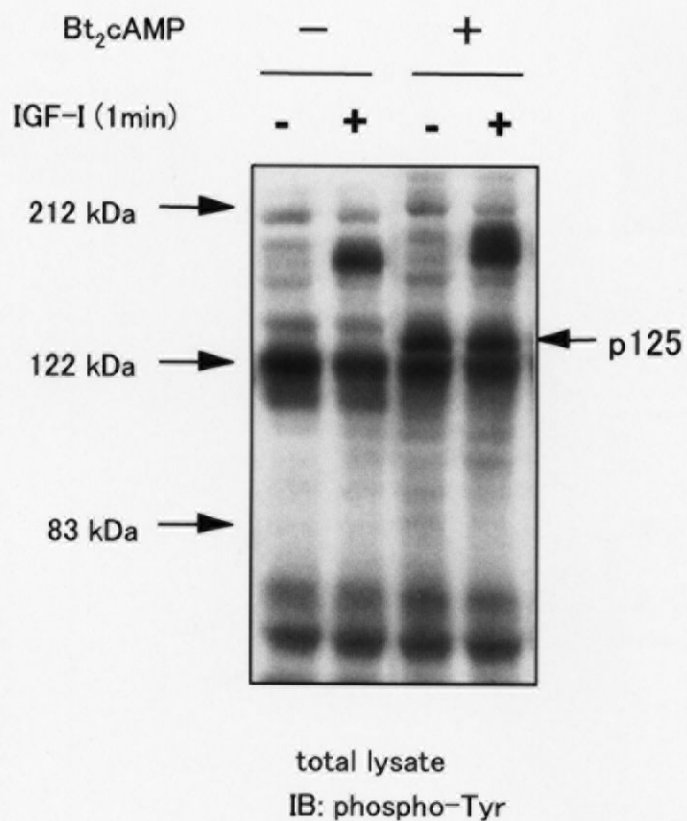


Fig. 0-2 cAMP処理によってチロシンリン酸化されるタンパク質の検出

静止期FRTL-5細胞を1mM Bt₂cAMPを含む培地、あるいは含まない培地で24時間培養した。HBSSで2回洗浄除去後、100ng/ml IGF-Iを含む、あるいは含まない培地で1分間培養した細胞の細胞抽出液を抗リン酸化チロシン4G10抗体を用いて immunoblottingした。

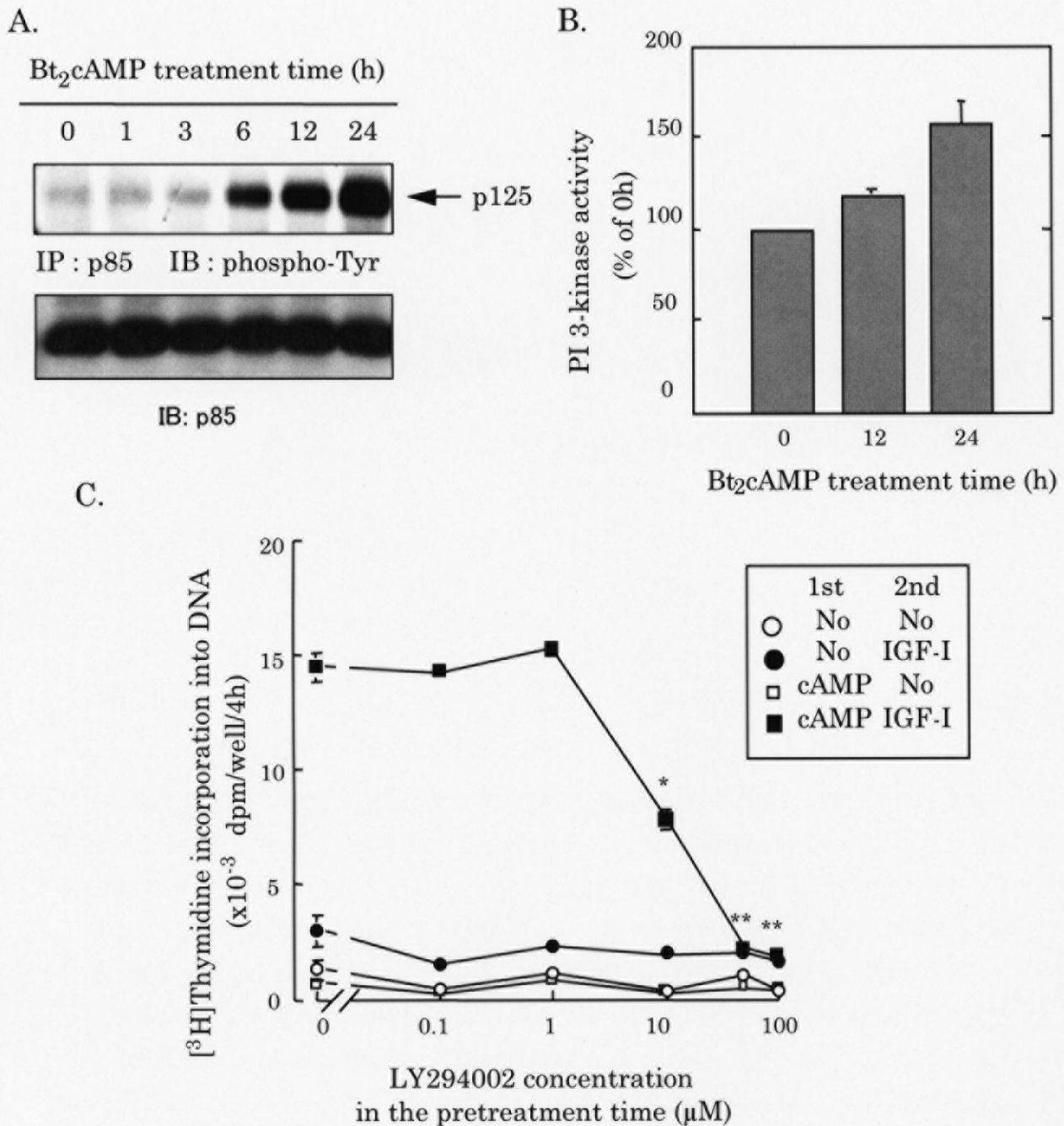


Fig. 0-3 cAMP長時間処理によってチロシンリン酸化されたp125はPI 3-kinaseを活性化し、IGF-Iシグナルを増強する

静止期FRTL-5細胞を様々な時間1mM Bt₂cAMPを含む培地で培養した後、抗p85抗体を用いて免疫沈降した。沈降物に抗リン酸化チロシン4G10抗体を用い、細胞抽出液に抗p85抗体を用いてimmunoblottingを行なった(A)。静止期FRTL-5細胞を様々な時間1mM Bt₂cAMPを含む培地で培養した後、抗p85抗体を用いて免疫沈降し、PI 3-kinase活性を測定した(B)。静止期FRTL-5細胞を1mM Bt₂cAMPを含む、あるいは含まない培地で24時間培養(1st incubation)した。この際、種々の濃度のLY294002を添加した。HBSSで2回洗浄除去後、100ng/ml IGF-Iを含む(IGF-I)、あるいは含まない培地(No)で24時間培養した(2nd incubation)。2nd incubationの最終4時間のDNA合成を測定した(C)。(* ; P<0.05, ** ; P<0.01 (v.s. 0 μM LY294002))