

## 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>

前章で述べたように p125 は、YXXM モチーフを有するタンパク質で、そのチロシンリン酸化量と p85 との結合が良く相関することが明らかとなっていた。一般に、p85 に 2 つ存在する SH2 ドメインのうち N 末端側のドメインがアダプター分子のチロシンリン酸化された YXXM モチーフを認識することにより結合すると考えられている (Sarmay et al., 2006; Songyang et al., 1993)。したがって、p125 も何らかのチロシンキナーゼにより YXXM モチーフがチロシンリン酸化され、これを認識して p85 との結合が起こると予想された。

既知の YXXM モチーフをリン酸化するチロシンキナーゼはアダプター分子と刺激によって異なる。FRTL-5 細胞では、cAMP 経路を長時間刺激すると、poly [Glu:Tyr] (4:1) を基質に用いた実験によりチロシンキナーゼ活性が上昇、特に Src peptide を基質に用いた実験により Src family のキナーゼ活性が亢進していることが、これまでに明らかになっている (根建 博士論文, 2000)。また p125 の配列中には、Src family キナーゼが持つ SH3 ドメインが結合する Proline-rich モチーフと、Src によってチロシンリン酸化されると予想されるチロシン残基も存在している (Roskoski, 2004)。

そこで本章では Src family のキナーゼを阻害する薬剤 PP1 と PP2 (Chong et al., 2005) を用いて p125 のチロシンリン酸化と p85 との結合への影響を調べ、p125 をリン酸化するチロシンキナーゼの種類を推定した。次に、p125 の部分欠失変異体を用いてチロシンリン

酸化されることにより p85 と結合する領域の検討を進めた。更に p125 のチロシンリン酸化、p85 との結合による PI 3-kinase の活性化が細胞内のどの部位で起こるのか明らかにするために、p125 の免疫染色を行った。p125 が F-actin と共局在することが明らかとなったため、actin 重合阻害剤を用いて p125 と F-actin が共局在できなくなった際に p125 の細胞内局在とチロシンリン酸化、p85 との結合がどう変化するのかを解析した。更に、p125 欠失変異体の細胞内局在を免疫染色することによって p125 の細胞内局在に必要な領域を調べた。

## <結果>

### 第1節 p125 をチロシンリン酸化するキナーゼの検討

#### Src family キナーゼ阻害剤が p125 のチロシンリン酸化、p125 と p85 の結合に及ぼす影響

p125 をチロシンリン酸化するキナーゼが Src family キナーゼかどうか検討するため、静止期同調培養後の FRTL-5 細胞を Bt<sub>2</sub>cAMP を含む培地で 24 時間処理する際に様々な濃度の Src family キナーゼ阻害剤 PP1 あるいは PP2 で処理した。p125 のタンパク量は阻害剤処理で変化しなかったが、PP1 と PP2 共に 3  $\mu$ M で処理した時に、p125 のチロシンリン酸化が抑制された。同時に p125 と共免疫沈降する p85 量も減少した (Fig. 2-1)。

#### Src によってチロシンリン酸化された p125 と p85 の結合

内在性 p125 が発現していない 293T 細胞に Flag タグを融合した p125 を発現させ、Flag-p125 のチロシンリン酸化と p125 と p85 の結合を検討した。Flag-p125 を単独で発現した細胞と比較して、チロシンキナーゼ Src を同時に発現すると強くチロシンリン酸化され (Fig. 2-2A)、Src を発現した場合にのみ Flag-p125 と p85 の結合が観察された。そこで、Flag-p125 免疫沈降物に含まれる PI 3-kinase 活性を測定したところ、Src を同時に導入した時にのみ高い活性が確認された (Fig. 2-2B)。

### 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

まず p125 の種々の領域を欠失した変異体を 6 種類作製し、この N 末端側に Flag タグを融合して、293T 細胞に Src と共発現させた。一晚培養後、抗 Flag 抗体を用いて免疫沈降を行い、Flag 融合タンパク質のチロシンリン酸化、p85 との共沈降を検討した (Fig. 2-3)。アミノ酸残基 1-510 の部分と、184-843 の部分との融合タンパク質が強くチロシンリン酸化された。1-185 の部分はチロシンリン酸化されるが、他の変異体と比較してリン酸化される度合いが低かった。p85 は、1-510 の部分と 1-185 の部分に共沈降が確認された。これらの結果を Table 2-1 にまとめた。

### 第3節 p125 の細胞内局在の解析

#### 内在性 p125 の局在部位

Bt<sub>2</sub>cAMP を加える、あるいは加えない培地で FRTL-5 細胞を 24 時間培養して、抗 p125 抗体を用いた免疫染色を行った。この際抗原として用いたペプチドを抗 p125 抗体に予め加えて反応させ、中和した抗体をネガティブコントロールとした。同時に Phalloidin-TRITC を用いて F-actin を染色した (Fig. 2-4)。p125 は細胞質に存在したが、stress fiber と細胞

膜直下の F-actin との共局在が観察された。stress fiber は Bt<sub>2</sub>cAMP 処理に応答して形成されていた。Bt<sub>2</sub>cAMP 処理をしない細胞では p125 の発現量が低いため蛍光強度が非常に弱い、Bt<sub>2</sub>cAMP 処理をした細胞と同様 F-actin と共局在が確認された。ネガティブコントロールでは Bt<sub>2</sub>cAMP 処理をしない細胞よりも蛍光強度が弱く、また特定の局在を示さなかった。

#### F-actin 重合阻害剤が p125 の細胞内局在と p125 のチロシンリン酸化、p125 と p85 の結合に及ぼす影響

p125 と F-actin との共局在が観察されたため、actin の重合阻害剤 latrunculin B 処理した際に p125 の細胞内局在がどのように変化するか調べた。FRTL-5 細胞を 24 時間 Bt<sub>2</sub>cAMP と latrunculin B を加えた培地で培養し、抗 p125 抗体と Phalloidin-TRITC を用いて免疫染色を行った (Fig. 2-5A)。latrunculin B 添加は、細胞の形態を球形に変化させた。同時に F-actin の量は大きく減少、細胞膜直下にわずかに存在した他は正常な構造を示さず、stress fiber が観察されなくなった。p125 は検出されうる F-actin と共局在したが、大部分は細胞質に一樣に存在した。

この条件下での p125 チロシンリン酸化および p85 との結合を調べた (Fig. 2-5B)。p125 のチロシンリン酸化は添加した latrunculin B の濃度依存的に抑制され、同時に p125 と結合した p85 量も減少した。この際 latrunculin B 処理は p125 タンパク量をわずかに減少させた。

#### **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**

N 末端側に myc タグを融合した、p125 のアミノ酸残基 1-185 の部分と、654-843 の部分を FRTL-5 細胞に発現した後、Bt<sub>2</sub>cAMP を加えた培地で培養し、抗 myc 抗体と Phalloidin-TRITC を用いて免疫染色を行った (Fig. 2-6)。myc タグを融合した全長 p125 は、内在性 p125 と同じ局在を示した。一方アミノ酸残基 654-843 の部分を発現させた場合は全長 p125 と同様に細胞膜直下で F-actin と共局在したが、1-185 の部分との融合タンパク質は細胞質に一樣に存在し、F-actin と共局在を示さなかった。

## <考察>

### p125 チロシンリン酸化酵素の検討

p85 とアダプター分子の結合はアダプター分子の YXXM モチーフのチロシンリン酸化を p85 が認識するために起こる。Fig. 1-3A、Fig. 2-1 の p125 のチロシンリン酸化量とよく対応して p125 と p85 が結合する結果は、p125 が他のアダプター分子と同様第 1 章で示した YXXM モチーフで p85 と結合していることを示唆している。本章ではまず YXXM モチーフをチロシンリン酸化するキナーゼとして Src family キナーゼに着目し、この阻害剤として知られている PP1 と PP2 を用いて検討した。これまでに Src family キナーゼは Src、Fyn、Lyn、Yes、Lck、Hck、Blk、Fgr の 8 種の分子が報告されている (Boggon and Eck, 2004)。これらの分子のうち、PP1 が *in vitro* リン酸化反応を半分に抑制する半量阻害濃度が、Lck と Fyn に対して 10nM 以下、Hck に対して 20nM、Src に対して 170nM であることが報告されている。一方 PP2 の *in vitro* リン酸化反応に対する半量阻害濃度は Fyn、Lck、Hck に対して 10nM 以下であり、Src を抑制しない (Chong et al., 2005; Hanke et al., 1996)。そこでそれぞれ 0.3  $\mu$ M を加えて培養を行ったが、p125 のチロシンリン酸化は一部抑制された (Fig. 2-1)。細胞培養に加える PP1、PP2 の濃度は細胞種や実験条件により異なること、細胞内へ浸透して作用する効率が明らかではないことから (Ishizawa et al., 2004; Thamilselvan et al., 2004; Yeh et al., 2004)、更に検討が必要だが、Src、Fyn、Lck、Hck は p125 をチロシンリン酸化するキナーゼではないと考えた。この場合 PP1 と PP2 が作用しない Src family 分子の Lyn や Yes が p125 のチロシンリン酸化キナーゼの可能性はある。Lyn については活性化によってアダプター分子がチロシンリン酸化され、p85 と結合する報告もあり (Dombrosky-Ferlan and Corey, 1997; Kuruvilla et al., 1994)、一つの候補である。

### p125 のチロシンリン酸化と PI 3-kinase の関係

293T 細胞に p125 のみを強制発現させた場合、cAMP アナログや血清存在下で培養してもチロシンリン酸化がほとんど起きなかった (data not shown)。これは p125 をチロシンリン酸化する機構が存在しないためと考えられる。一方 Src を強制発現させると、p125 がチロシンリン酸化され、p85 との結合が観察された (Fig. 2-2A)。この理由としては、GFP タグを融合した p125 を 293T 細胞に強制発現させると GFP-p125 の細胞内局在は細胞質全体に存在するため (data not shown)、p125 が強制発現した Src と相互作用し、活性化するためと考えられる。Fig. 2-1 の結果と併せて考えると、p125 の内在性チロシンキナーゼは Src family キナーゼ分子である可能性が高い。免疫沈降物からは PI 3-kinase 活性も検

出されており (Fig. 2-2B)、Src family キナーゼによる p125 のチロシンリン酸化は PI 3-kinase との結合に必須であると結論した。

### p125 チロシンリン酸化部位と p85 結合部位の決定

p125 の欠失変異体を用いてチロシンリン酸化部位と p85 結合部位を決定した (Fig. 2-3)。p125 を N 末端側半分と C 末端側半分に欠失させ、また N 末端側と、PH ドメインと 2 つのチロシン残基、coiled-coil ドメインを分けて機能解析できるように欠失変異体を設計した。p85 は p125 アミノ酸残基 1-185 の部分に結合した。この中には YXXM モチーフも含まれているが、他のチロシン残基や Proline-rich domain が p85 との結合に関与しないことを示すためにも、YXXM の 72 番目チロシン残基を点変異させて同様の解析を早急に行う必要がある。

p85 と結合する部位を欠失したアミノ酸残基 184-843 部分の p125 変異体が強くチロシンリン酸化されていることから、p85 の結合とは直接関係ないチロシンリン酸化も起こることが明らかとなった。そのリン酸化されるチロシン残基の候補としては AFAP-110 との相同性からリン酸化が予測された 475 番目、477 番目のチロシン残基が挙げられる。特に 475 番目のチロシン残基周囲の配列 YDYV は Src のチロシンリン酸化モチーフ Y- E/D-E/D-Ψ との類似性が高いが、これらのチロシン残基を含む変異体のうち、186-510 部分の変異体はチロシンリン酸化されないことも明らかとなった。

p85 が結合する p125 のアミノ酸残基 1-185 部分は、チロシンリン酸化が非常に弱かった。Src のリン酸化配列 Y-E/D-E/D-Ψ に対して、p125 の YXXM モチーフの配列は YTYM であり、配列の違いがリン酸化効率に影響していることが考えられる。Src と共発現しなければこの変異体は p85 と共免疫沈降しなかった (data not shown) ことから、この弱いリン酸化が p85 との結合に重要だと考えている。

### p125 の細胞内局在とチロシンリン酸化に果たす役割

内在性 p125 の細胞内局在を解析したところ、p125 は F-actin と共局在した (Fig. 2-4)。F-actin には様々な構造が存在し、それぞれ異なる役割を果たしている。細胞接着を基点に伸長し、細胞の進展した形態を維持する stress fiber、細胞移動に関わる葉状仮足や糸状仮足、細胞膜を裏打ちする網目状構造や、エンドソームを取り巻く F-actin などが存在する (Cabodi et al., 2004; Kaverina et al., 2002)。p125 とよく共局在した F-actin の構造は stress fiber (Gloushankova et al., 1997; Small et al., 1998) と細胞膜直下の裏打ち構造 (Vadlamudi et al., 2002) であった。cAMP 処理によって stress fiber が形成されることと併せて考えると、F-actin を足場タンパク質とすることで p125 は細胞内局在を決定されており、この局在が p125 を介したシグナル伝達に重要であるという作業仮説を考えることが

できる。p125 が F-actin と直接結合しているのか、あるいは何らかのアダプター分子を介しているのかは、p125 のチロシンリン酸化機構や p125 により活性化された PI 3-kinase 経路の下流分子を解明するために重要であり、*in vitro*での F-actin binding assay を行う必要がある (Ihara et al., 2006; Roof et al., 1997)。

F-actin が存在しない場合に内在性 p125 の細胞内局在がどうなるのか、actin 重合阻害剤 latrunculin B を用いて検討した。F-actin が大きく減少し、p125 は細胞質に一様に存在した (Fig. 2-5A)。この際、p125 のタンパク量は latrunculin B によってほとんど変化しなかった。しかし p125 のチロシンリン酸化は latrunculin B の濃度に応じて抑制され、p125 と p85 との結合も同様に抑制された (Fig. 2-5B)。この結果は、F-actin は p125 タンパク質合成には必要ではないが、合成された p125 は F-actin と結合することでチロシンキナーゼと反応、リン酸化され、PI 3-kinase 活性をリクルートすることができるという機能の存在を示している。

stress fiber が結合している細胞接着点は focal adhesion と呼ばれており、ここでは integrin が細胞外基質と結合し、様々なタンパク質と複合体を形成している。このタンパク質複合体の中には FAK や Src family チロシンキナーゼが含まれており (Velling et al., 2004)、FAK が I A 型 PI 3-kinase を活性化する可能性も報告されている (Akagi et al., 2002; Xia et al., 2004) ことを併せると p125 は focal adhesion に存在し、Src family チロシンキナーゼによってチロシンリン酸化を受けて PI 3-kinase を活性化する可能性も考えられる。

### p125 の細胞内局在に必要な領域の決定

myc タグを融合した p125 部分欠失変異体を用いて F-actin との結合に必要な領域を検討した。アミノ酸残基 654-853 部分のみの p125 が p125 全長と同じ細胞内局在を示した結果から、C 末端側の coiled-coil を含む領域が必要であることがわかった (Fig. 2-6)。一方、p125 全長を導入した際に核の周囲に局在が観察され、654-853 部分の融合タンパク質もまとまって局在している様子が観察されたが、これらの局在は過剰に発現したために小胞体に蓄積していると考えている。また、1-185 部分は細胞質に一様に存在した。塊状の F-actin が観察されるが、これはプラスミドを導入した際に用いた DEAE-dextran による細胞毒性のために形態異常が現れていると予想している。

本章で得られた結果より、p125 は cAMP 処理によって発現が誘導され、新たに合成されたタンパク質は coiled-coil ドメインを介して F-actin に結合、そこで Src family チロシンキナーゼによってアミノ酸残基 1-185 の部分にチロシンリン酸化を受け、p85 と結合、この

細胞内局在に PI 3-kinase の活性をリクルートするという機構の存在が示唆された (Fig. 2-7) 。



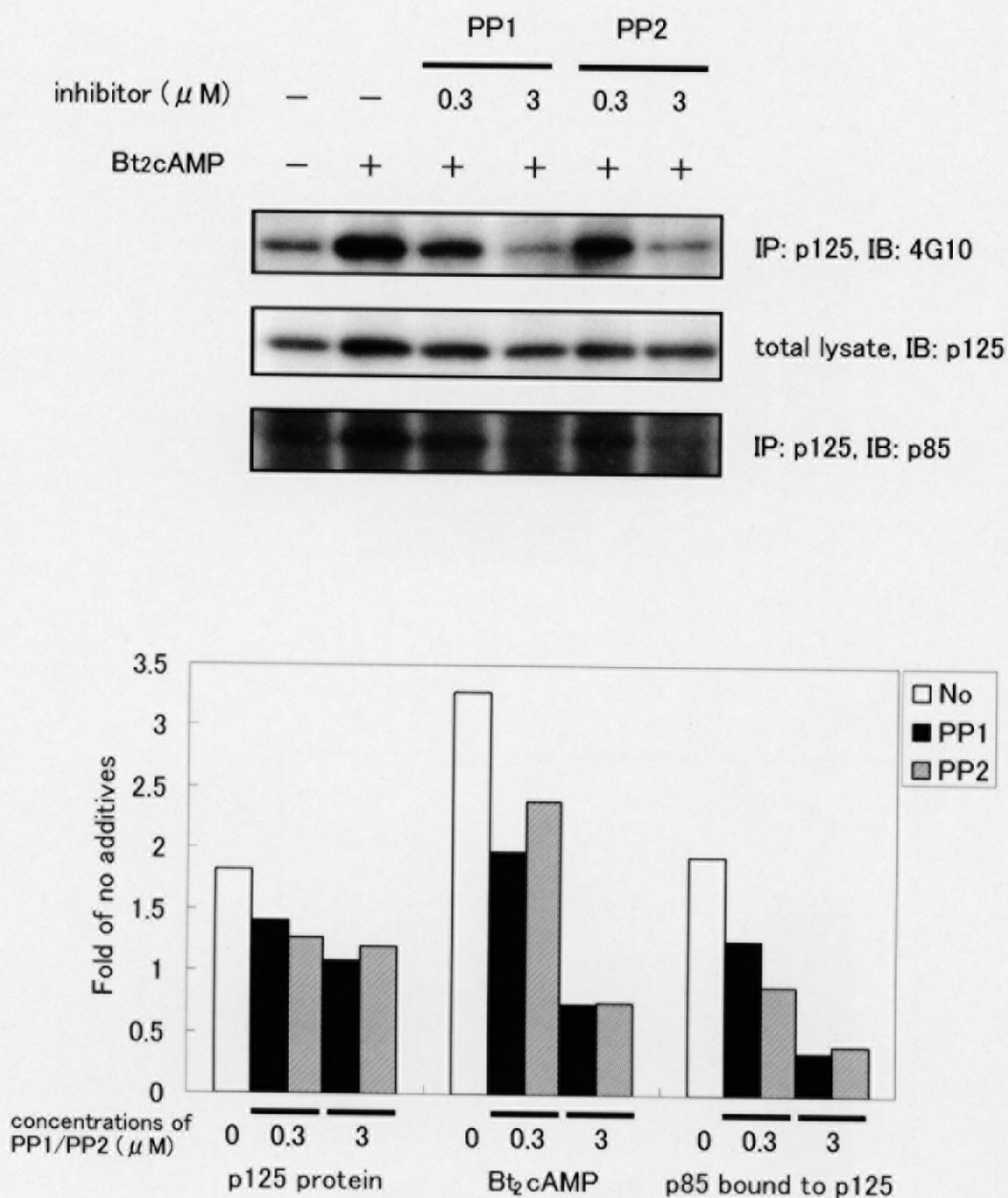
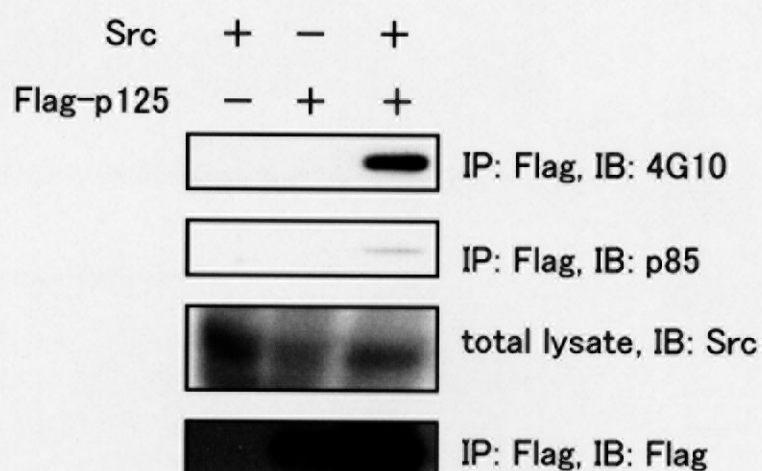


Fig. 2-1 cAMP処理によって誘導されるp125のチロシンリン酸化とp85との結合にSrc family kinase阻害剤が及ぼす影響

静止期FRTL-5細胞を1mM Bt<sub>2</sub>cAMPで処理する際に、同時に0.3  $\mu$  M、3  $\mu$  MのSrc family kinase inhibitor PP1あるいはPP2で処理し、対照として用意したBt<sub>2</sub>cAMP処理しない細胞と共に24時間培養、抗p125抗体を用いて免疫沈降した。沈降物を細胞抽出液とともに図に示した抗体を用いてimmunoblottingし、得られたバンドを定量した。

A.



B.

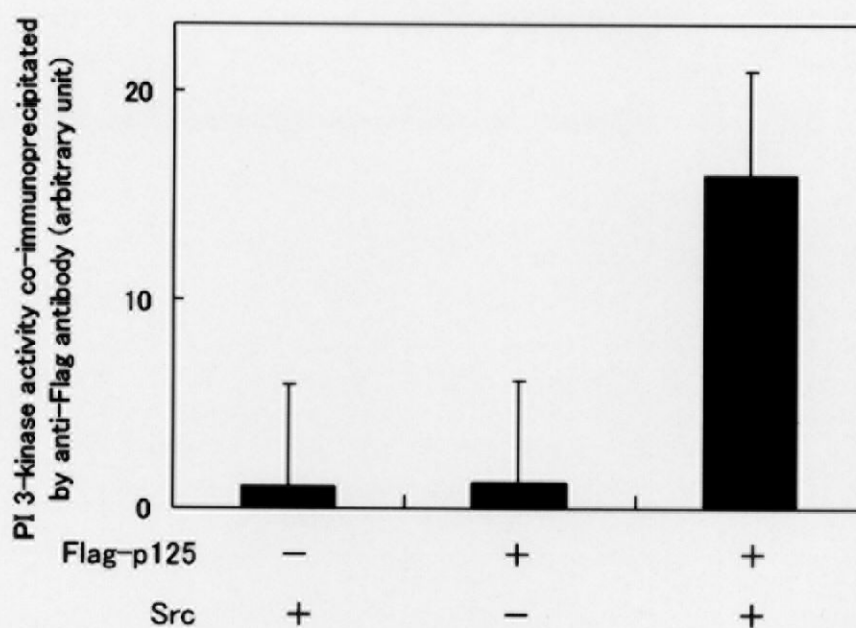
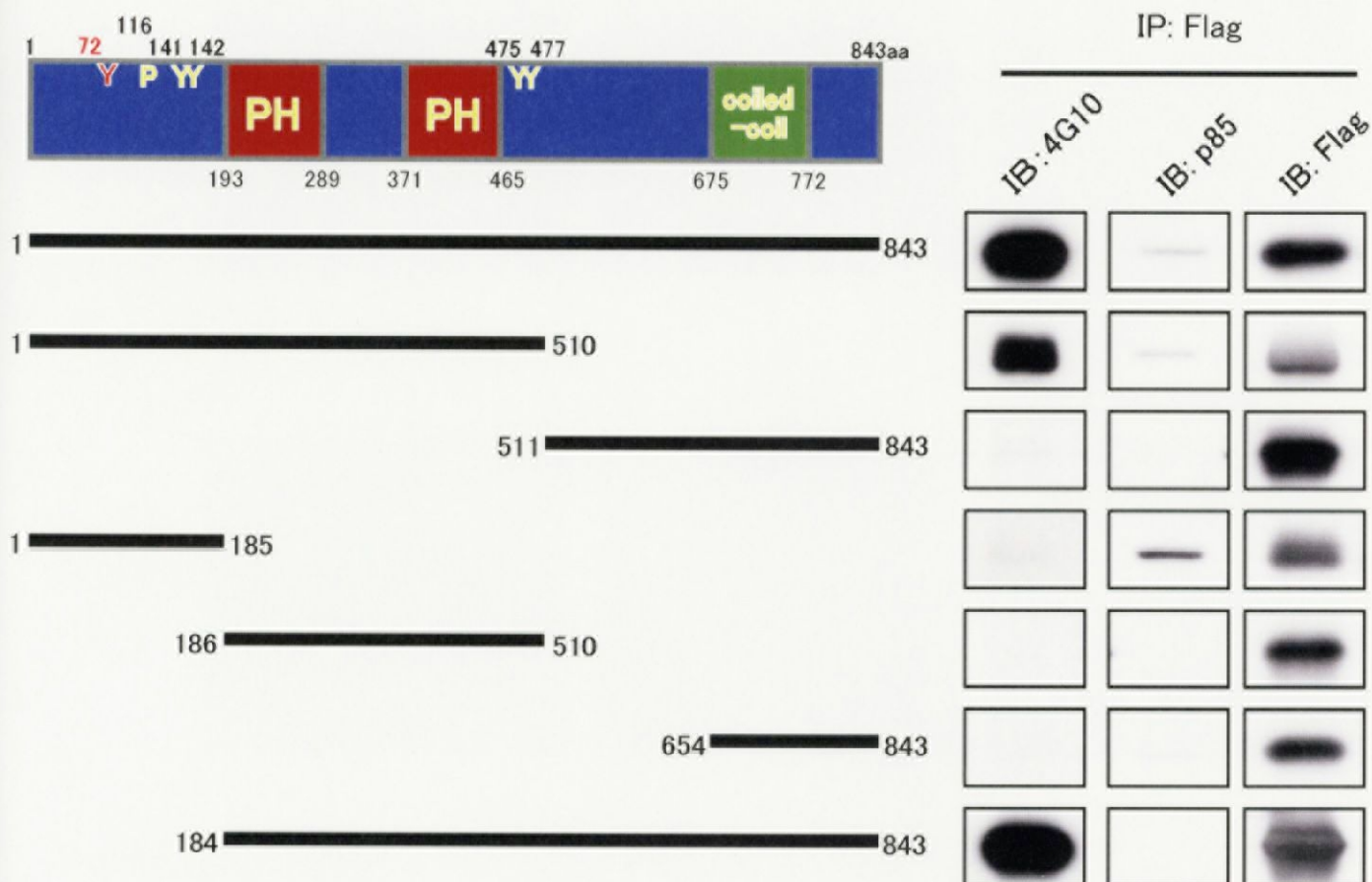


Fig. 2-2 p125チロシンリン酸化がp125とp85の結合に及ぼす影響

293T細胞にFlag-p125とSrc発現プラスミドをリン酸カルシウム法にて導入した。24時間培養後、細胞抽出液を調製し、抗Flag抗体を用いて免疫沈降を行った。3xFLAG peptideを用いて溶出後、免疫沈降前の抽出液と共に図に示した抗体を用いてimmunoblottingした(A)。(A)と同様に免疫沈降を行った後、PI 3-kinase assayを行った(B)。



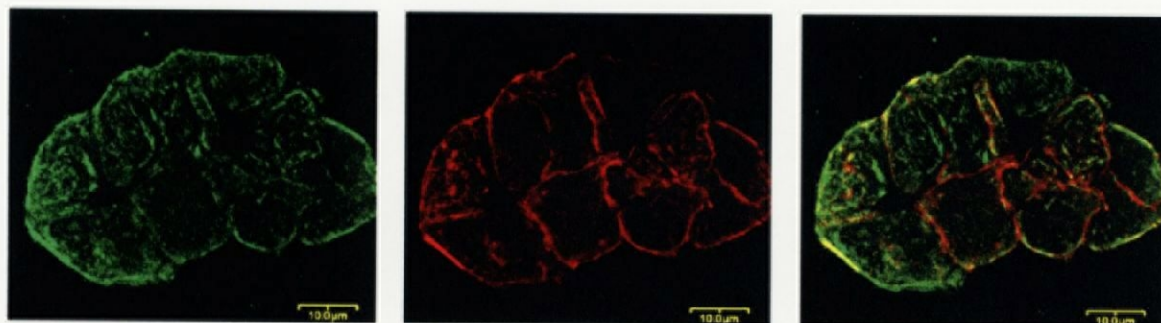
p125 変異体	1-510	511-843	1-185	186-510	654-843	184-843
チロシン リン酸化	++	-	+	-	-	++
p85 結合能	+	-	++	-	-	-

Fig. 2-3 欠失変異体を用いたp125のチロシンリン酸化領域とp85結合領域の解析

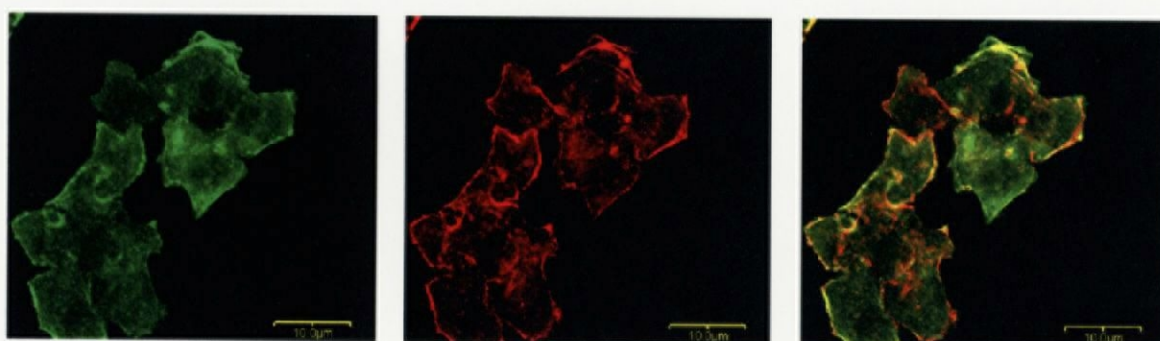
293T細胞にFlag-p125全長あるいは様々な欠失変異体とSrcを発現するプラスミドをリン酸カルシウム法にて導入した。24時間培養後、細胞抽出液を調製し、抗Flag抗体を用いて免疫沈降を行った。3xFLAG peptideを用いて溶出後図に示した抗体を用いてimmunoblottingした。得られた結果を下にまとめた。赤字はアミノ酸残基1-185番目を含んだ変異体。



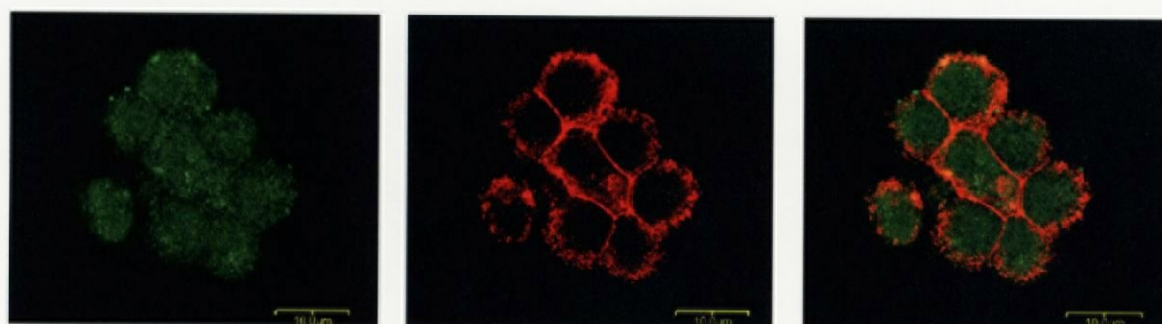
−Bt<sub>2</sub>cAMP



+Bt<sub>2</sub>cAMP



+Bt<sub>2</sub>cAMP  
+peptide block



p125

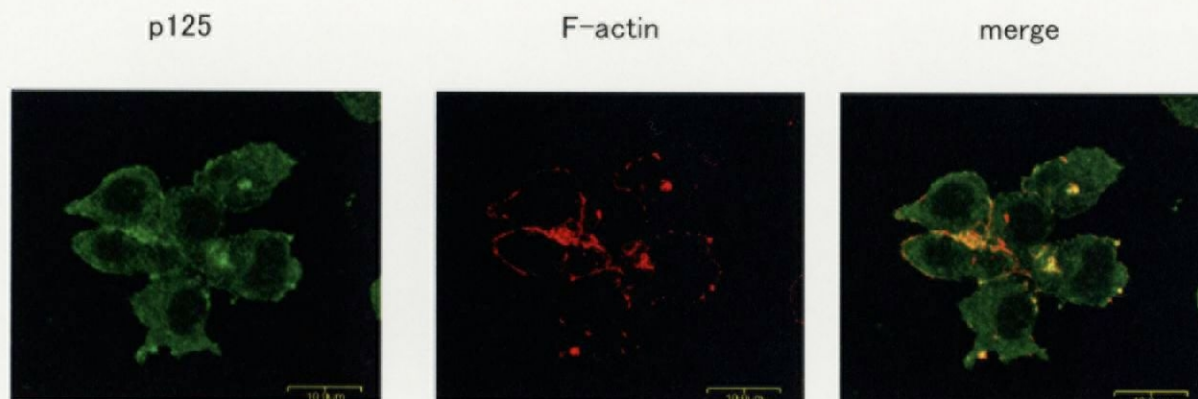
F-actin

merge

Fig. 2-4 FRTL-5細胞における内在性p125の細胞内局在

静止期FRTL-5細胞を1mM Bt<sub>2</sub>cAMPを含む、あるいは含まない培地で24時間培養し、抗p125抗体を用いて免疫染色を行なった。この時抗p125抗体と抗原ペプチドを予め反応させて免疫染色に用いてネガティブコントロールとした。抗体反応液にはCanGet Signalを用い、二次抗体の抗ラビットIgG-FITC抗体を反応させる時にPhalloidin-TRITCを加えた。共焦点顕微鏡FL-500を用いて観察を行い、細胞内局在の解析のためにそれぞれの処理の細胞は異なる感度で観察を行った。

A.



B.

latrunculin B ( $\mu$ M)	—	—	1	10
Bt <sub>2</sub> cAMP	—	+	+	+

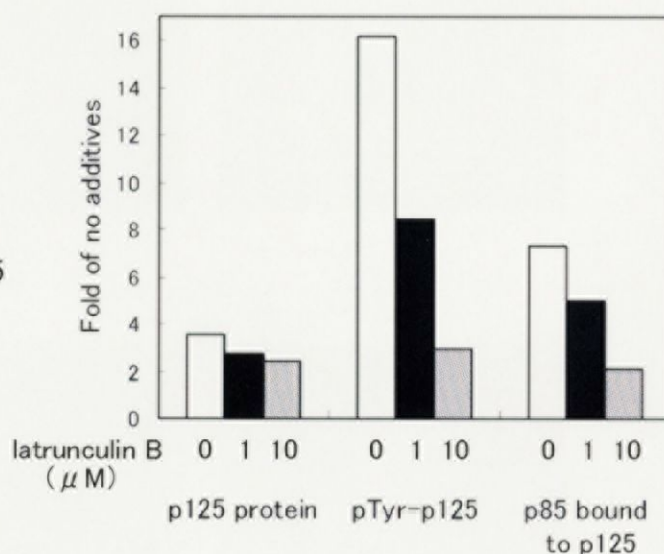
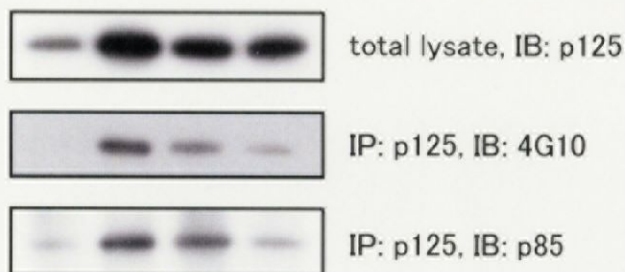


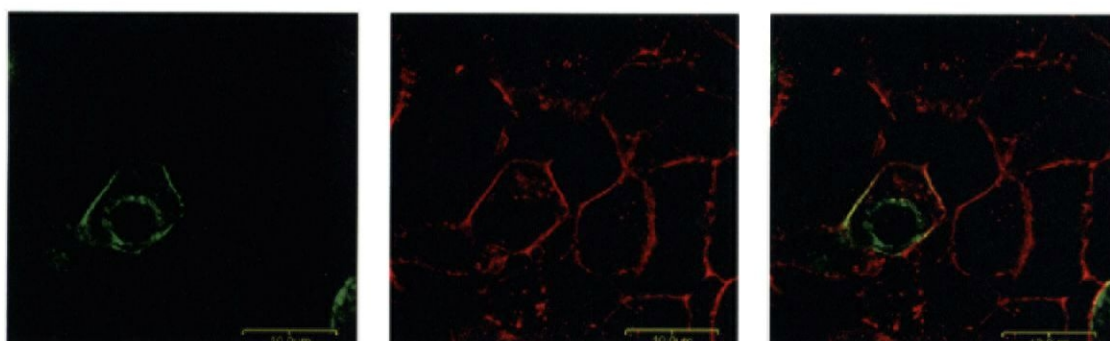
Fig. 2-5 FRTL-5細胞においてactin重合阻害剤latrunculin Bが与える影響

静止期FRTL-5細胞を1mM Bt<sub>2</sub>cAMPを含む培地に10  $\mu$ M latrunculin Bを同時加えて24時間培養し、抗p125抗体を用いて免疫染色を行なった。抗体反応液にはCanGet Signalを用い、二次抗体の抗ラビットIgG-FITC抗体を反応させる時にPhalloidin-TRITCを加えた。共焦点顕微鏡FL-500を用いて観察を行った(A)。

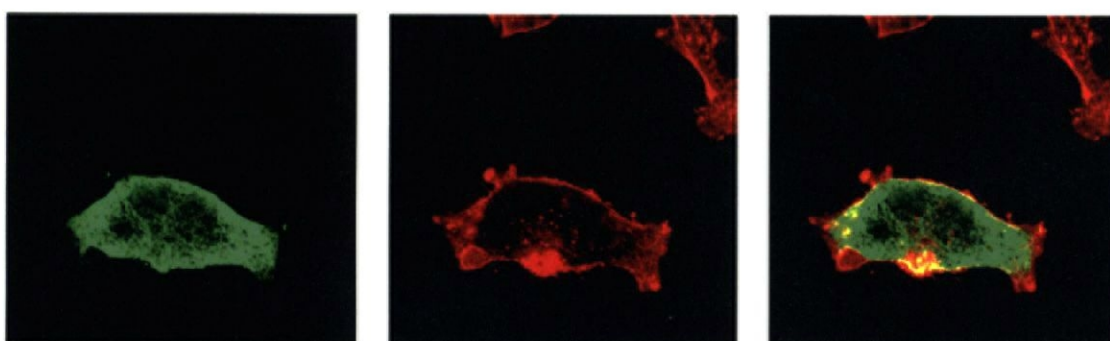
静止期FRTL-5細胞を1mM Bt<sub>2</sub>cAMPを含む培地に、1  $\mu$ M、10  $\mu$ Mのlatrunculin Bを同時に加えて、対照としてBt<sub>2</sub>cAMP処理しない細胞と共に24時間培養し、抗p125抗体を用いて免疫沈降した。沈降物を細胞抽出液とともに図に示した抗体を用いてimmunoblottingし、得られたバンドを定量した(B)。



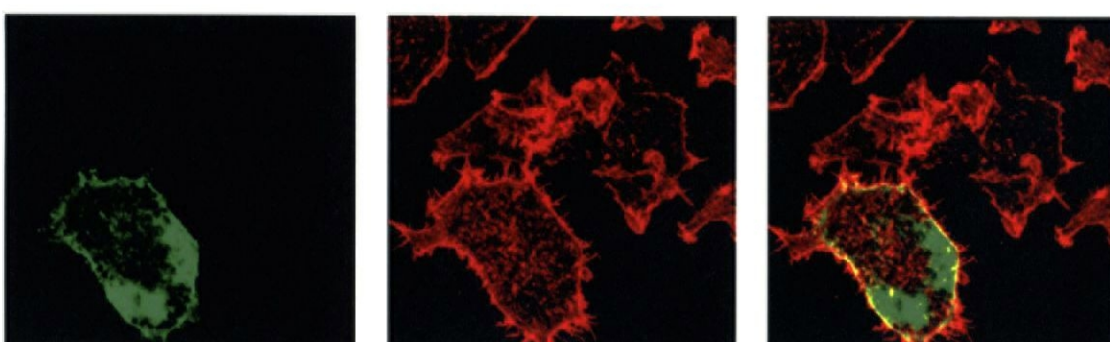
myc-full length p125



1-185 a.a.



654-843 a.a.



anti-myc

F-actin

merge

Fig. 2-6 FRTL-5細胞におけるmyc-p125欠失変異体の細胞内局在の観察

FRTL-5細胞にmyc-p125全長あるいは二種類の欠失変異体を発現するプラスミドをDEAE-dextran法にて導入した。静止期同調培養後1mM Bt<sub>2</sub>cAMPで処理して24時間培養し、抗myc 9E10抗体を用いて免疫染色を行なった。抗体反応液にはCanGet Signalを用い、二次抗体の抗マウスIgG-FITC抗体を反応させる時にPhalloidin-TRITCを加えた。共焦点顕微鏡FL-500を用いて観察を行った。

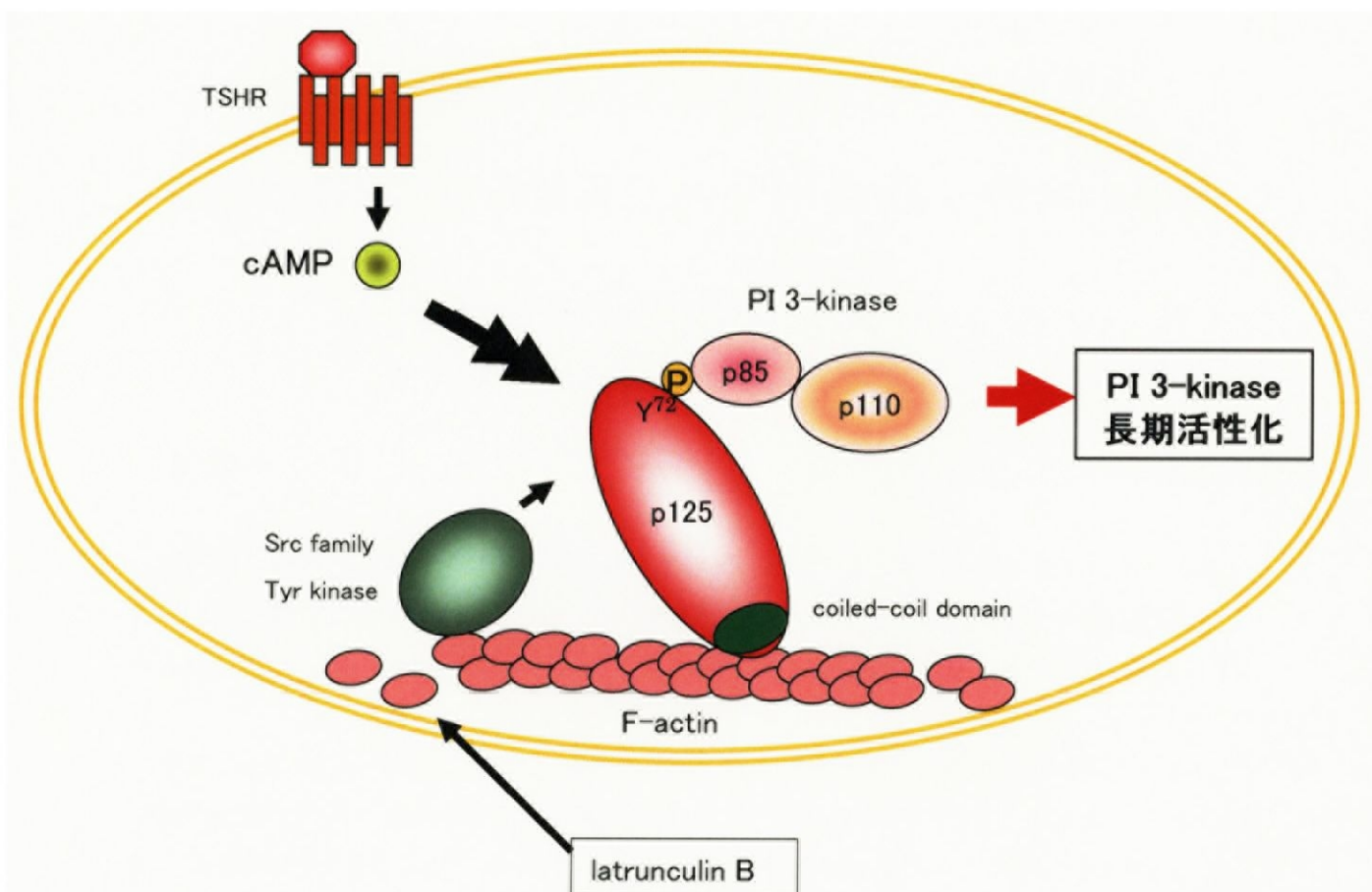


Fig. 2-7 p125はC末端側でF-actinと共局在し、N末端側のチロシンリン酸化を介してp85と結合する

p125はcoiled-coilドメインを介してF-actinに局在し、そこでSrc familyキナーゼによってYXXMモチーフがチロシンリン酸化される。p85がp125のリン酸化チロシン残基を認識してPI 3-kinaseが活性化される。latrunculin BはF-actinの形成を阻害するため、p125とチロシンキナーゼは共局在できず、その結果p125はチロシンリン酸化が抑制されてp85と結合できない。