

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>

本研究の第 1 章と第 2 章で、cAMP 長時間刺激に応じて p125 タンパク量が増加し、同時に p125 はチロシンリン酸化されることが明らかになった。これは、cAMP 刺激に応答して起こる PI 3-kinase の長期活性化は p125 タンパク質合成を介して起こることを意味している。

当研究室の根建と川崎は p125 のタンパク質合成制御機構について既に検討を加えており、甲状腺細胞 FRTL-5 を cAMP 長時間処理時に PKA 阻害剤 H89、チロシンキナーゼ阻害剤 genistein を加えると p125 のチロシンリン酸化が抑制され、さらに H89、genistein、PI 3-kinase 阻害剤 LY294002、mTOR 阻害剤 rapamycin を cAMP 前処理時に添加後、IGF-I 処理して DNA 合成を測定すると、IGF-I 刺激に依存した DNA 合成の相乗的増強が抑制されることを示している (根建 博士論文, 2000; 川崎 修士論文, 2003)。これらの結果から、阻害された PKA、チロシンキナーゼが p125 のタンパク合成に何らかの役割を果たしている可能性が考えられた。その他にこれまでの研究結果から、p125 を介した PI3-kinase 活性は Akt 活性化を介して IGF-I 受容体基質である p66 Shc のタンパク量を増加させ、その結果 IGF-I シグナルを増強させることが明らかにされている。また本研究による p125 の同定は siRNA を用いた発現抑制や過剰発現を可能にし、直接的な p125 の生理的意義を検討することができるようになった。

本章では、甲状腺細胞 FRTL-5 を用いてまず cAMP 刺激や IGF-I 刺激が p125 の mRNA 量、タンパク質合成に及ぼす影響を検討した。続いて、H89、genistein、LY294002、

rapamycin が p125 のタンパク質合成に与える影響を解析した。次に (1) siRNA を用いた p125 タンパク質の発現抑制が cAMP 前処理後の IGF-I シグナルおよび IGF-I 依存性 DNA 合成の増強に及ぼす影響、(2) p125 の過剰発現が IGF-I 依存的な DNA 合成に及ぼす影響を調べ、cAMP 刺激に誘導される p125 が IGF-I 誘導性増殖を増強して果たす役割を明らかにした。

<結果>

第1節 TSH/cAMPの刺激、IGF-I刺激に応答した p125 量の変動の解析

TSHの刺激濃度およびcAMPの刺激時間に応答した p125 の変動

種々の濃度の TSH を含む培地で FRTL-5 細胞を 24 時間培養したところ、TSH の濃度が上昇するにつれて p125 のタンパク量、チロシンリン酸化量、p125 に結合する p85 の量が増加した。特に 10^{-11}M 以下の濃度に比べて、 10^{-10}M 以上でその増加が顕著だった (Fig. 3-1A)。

次に、Bt₂cAMP を含む培地で種々の時間 FRTL-5 細胞を培養したところ、処理時間に依存して p125 のタンパク量、チロシンリン酸化量、結合する p85 の量が増加し、24 時間後に最大になった (Fig. 3-1B)。同様に処理した細胞から total RNA を調製し、p125 をプローブにした Northern blotting を行い、約 4.4kb の位置にバンドを検出した。p125 タンパク質と同様、処理時間に依存して p125 の mRNA 量は増加し、Bt₂cAMP 処理 8 時間後から 12 時間後に最大となり、その後は一定となった (Fig. 3-1B)。

IGF-I 処理による p125 の変動

FRTL-5 細胞を Bt₂cAMP を含む培地、含まない培地で 24 時間培養し、HBSS を用いて Bt₂cAMP を洗浄除去後、IGF-I を含む培地、含まない培地でさらに 24 時間培養した。p125 のタンパク量、チロシンリン酸化量、結合する p85 量はそれぞれ Bt₂cAMP 処理に応じて増加したが、IGF-I 処理に応じて変化しなかった (Fig. 3-2)。

第2節 cAMP 刺激に応答した p125 の合成誘導機構の解析

FRTL-5 細胞を Bt₂cAMP と H89、genestein、LY294002、rapamycin、PD98059 を含む培地で 24 時間培養して p125 のタンパク量、チロシンリン酸化量、結合する p85 の量を調べた。genistein、LY294002、rapamycin のそれぞれを加えた細胞では、p125 タンパク量、チロシンリン酸化量、結合する p85 の量のいずれも強く抑制された。一方 H89 を処理した細胞では弱い抑制効果を示した。MEK1 阻害剤の PD98059 は cAMP 処理と同時に加えても DNA 合成に影響を与えないことが明らかとなっており、これに加えた細胞では p125 のタンパク量がわずかに減少したが、p125 チロシンリン酸化と結合する p85 の量は変化しなかった (Fig. 3-3)。

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

p125 siRNA 導入によるシグナル分子の変動

p125 を抑制するように設計した siRNA (si-p125) を Lipofectamine2000 を用いて FRTL-5 細胞へ導入した。なお、配列上非特異的な遺伝子発現抑制効果がない siRNA を RNAi のネガティブコントロール (si-N.C.) として使用した。血清を除去して静止期同調培養を行い、Bt₂cAMP を含む培地、含まない培地で 24 時間培養した。siRNA を導入して 4 日後に細胞抽出液を調製した。p125 siRNA 導入によって Bt₂cAMP 処理に応じた p125 のタンパク質発現を強く抑制することができた。この際、Akt のタンパク量は変化しなかったが、473 番目のセリン残基のリン酸化が抑制された。また p66 Shc のタンパク量が減少したが、p52 と p46 の Shc アイソフォームはタンパク量が変化しなかった。この際、 β -actin のタンパク量も p125 siRNA によって減少した (Fig. 3-4)。

p125 siRNA 導入による DNA 合成への影響

si-p125 と si-N.C. を Lipofectamine2000 を用いて FRTL-5 細胞へ導入後、静止期に同調培養した。その後 Bt₂cAMP を含む培地、含まない培地で 24 時間培養した。HBSS を用いて Bt₂cAMP を洗浄除去後、IGF-I を含む培地、含まない培地でさらに 24 時間培養した。IGF-I 処理の最後の 4 時間に ³H 標識されたチミジンを培地に加え、DNA 合成量を測定した。Bt₂cAMP 長時間前処理後に IGF-I 処理を行った際、si-N.C. を導入した細胞では相乗的な DNA 合成の増強が観察されたが、si-p125 を導入した細胞では相乗的な DNA 合成量が抑制された (Fig. 3-5)。

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

まず Flag タグを融合した p125 を発現するプラスミドとインサートが挿入されていない Flag プラスミドを Lipofectamine2000 を用いて FRTL-5 へ導入した。静止期同調培養後 Bt₂cAMP を含む培地、含まない培地で 24 時間培養した。続いて HBSS を用いて Bt₂cAMP を洗浄除去後、IGF-I を含む培地、含まない培地でさらに 24 時間培養した。IGF-I 処理の最後の 4 時間に ³H 標識されたチミジンを培地に加え、DNA 合成量を測定した。Flag-p125 を導入した細胞では、Flag プラスミドを導入した細胞と比較して、IGF-I 単独処理時に DNA 合成が促進された。(Fig. 3-6A)。この際 Flag-p125 タンパク質が発現していることを確認した (Fig. 3-6B)。なお、Bt₂cAMP 前処理後 IGF-I 処理した際には DNA 合成量に Flag-p125 の発現による差は観察されなかった。

<考察>

cAMP 経路の長時間刺激に応答した p125 タンパク質の増加

Fig. 1-3 と Fig. 2-1 より、FRTL-5 細胞を cAMP 処理すると p125 タンパク量が増加することを初めて示すことができた。甲状腺の生理的な刺激ホルモンである、様々な濃度の TSH を用いて処理したところ、p125 のタンパク量は TSH の濃度依存的に増加した (Fig. 3-1A)。特に 10^{-10}M 以上の TSH の濃度では顕著に発現量が増加していることは、生理的条件下の一定濃度以上の TSH の刺激を受けると下流にシグナルを伝達する機構の存在を示している。

次に p125 の cDNA 配列をプローブとした Northern blotting を行ったところ、p125 の mRNA 量は刺激時間に応じて増加し、12 時間後に最大となった (Fig. 3-1B)。p125 タンパク質の発現は mRNA と同様刺激時間に応じて増加したが、24 時間後に最大となった。mRNA が増加した後にタンパク質が増加している結果は、p125 のタンパク量増加には mRNA の合成が必要な可能性を示している。cAMP 刺激によって p125 が発現する可能性を第 1 章にて考察した際、p125 遺伝子の上流には保存された CRE (cyclic AMP responsible element) が存在しないことを述べたが、今後、どのような機構で p125 転写活性が上昇するか検討を進める必要がある。

タンパク量の増加は、タンパク質分解の抑制が原因である場合もあるが、Bt₂cAMP 24 時間処理後薬剤を洗浄除去し、無刺激のままさらに 24 時間培養した細胞でも p125 のタンパク量が増加しなかった (Fig. 3-2) ことから、p125 は安定性の高い分子であり、cAMP 刺激は p125 分解抑制には寄与していないと考えた。

p125 が同定されるまで、cAMP 刺激に応答した p125 チロシンリン酸化が増加する原因として、p125 タンパク量は変化せずチロシンリン酸化が促進される可能性と、p125 タンパク量が増加し、増加したタンパク質をチロシンリン酸化する可能性が想定されていた。cAMP 処理時間に応じて p125 タンパク量の増加とチロシンリン酸化量の増加がよく一致したことから (Fig. 3-1B)、cAMP 刺激に応答した p125 チロシンリン酸化の増加には p125 タンパク量の増加が必要であると結論した。また p125 タンパク量の増加と、様々な時間 cAMP 前処理した際の IGF-I 依存性 DNA 合成の増強と一致したことから、cAMP 刺激による PI 3-kinase の長時間活性化には p125 のタンパク量増加が重要であることが明らかとなった。

p125 の発現制御機構

H89, genistein, LY294002, rapamycin は、cAMP 長時間処理の際に加えると、その後 IGF-I 処理した DNA 合成の相乗的増強が観察されなくなることは既に述べた。この阻害効果が p125 の量の減少によるものか、検討した (Fig. 3-3)。H89, genistein, LY294002、

rapamycin の全てが p125 のタンパク質発現を抑制し、cAMP 刺激による p125 のタンパク質合成にこれら阻害剤が阻害するプロセスが関与していることが示唆された。

本実験と同じ処理をした細胞から RNA を調製し、realtime PCR によって p125 mRNA 量を測定したところ、p125 タンパク量と同様阻害剤によって抑制された。この結果については 2 章の結果と併せ総合討論にて議論したい。

siRNA を用いた p125 の生理的意義の解明

p125 の塩基配列が明らかになったことで p125 の発現抑制が可能となり、このアプローチを使って p125 の下流因子の探索と生理機能への影響を検討した。p125 に対する siRNA (si-p125) を設計し、FRTL-5 細胞へ導入したところ、si-p125 は cAMP 処理に応じた p125 のタンパク質発現を強く抑制することができた (Fig. 3-4)。

p125 発現抑制の際、影響を受けるシグナル分子を検討したが、まず、Akt の 473 番目のセリン残基のチロシンリン酸化が抑制された。このセリン残基は、PDK1 によってリン酸化され、Akt の活性化に欠かせない。PDK1 は PI 3-kinase によって生成される PIP₃ と結合して活性化するので、p125 の発現抑制によって PI 3-kinase の活性化、続く PDK1 の活性化が起こらず、Akt が活性化しないと考えられた。

Akt が活性化すると、3 種存在する Shc アイソフォームの中で p66 Shc のタンパク量が特異的に増加し、IGF-I レセプターによってチロシンリン酸化されることが IGF-I シグナルの増強に重要であることがこれまでに明らかになっている。この結果とよく一致して、p125 発現抑制は p66 Shc の発現を特異的に抑制した。予想していなかったことだが、この際 β -actin のタンパク量が p125 の発現抑制によって減少した。詳細は不明だが、p125 は actin による細胞骨格に影響を及ぼすのかもしれない。

次に cAMP と IGF-I に応答した DNA 合成に対して p125 発現抑制が与える影響を示した (Fig. 3-5)。p125 の発現を抑制すると、cAMP 前処理後の IGF-I 依存性 DNA 合成の増強効果が 1/3 に減少した。この結果は、cAMP 刺激による IGF-I シグナルの増強効果は少なくとも一部が p125 を介した経路によって引き起こされることを示している。なお、p125 の発現抑制は DNA 合成の増強効果を全て抑制することはできなかったが、その理由として p125 を介さない他の経路が働いている可能性がある。本実験から p125 が、これまで探索された cAMP 刺激によって IGF-I シグナルを増強を担う主要な分子と結論した。

p125 強制発現系を用いた p125 の生理的意義の解明

cAMP 刺激によって p125 はタンパク質発現が誘導され、同時にチロシンリン酸化を受けることを本章で示したが、強制発現系によって cAMP 刺激を受けずに p125 タンパク量が増加した際に DNA 合成がどのような影響を受けるか検討した (Fig. 3-6A)。すると、IGF-I

単独処理した細胞に p125 を発現することで DNA 合成が促進された。この p125 タンパク量の増加は、IGF-I 依存性 DNA 合成の相乗的増強を部分的に引き起こしたと考えられる。また有意ではないが、p125 を過剰発現すると無刺激時にも DNA 合成が促進される傾向が観察された。Flag-p125 タンパク質の発現は確認済みだが (Fig. 3-6B)、この際の p125 チロシンリン酸化量を解析することで、p125 に対するチロシンキナーゼの活性が cAMP 依存的吗かどうか明らかにできると考えられる。なお、cAMP 前処理後に IGF-I 処理を行った際には、p125 を強制発現させても DNA 合成能に変化はなかった。これは、cAMP 刺激によって IGF-I シグナルの増強に十分な量の内在性 p125 が発現しているためと考えられる。

本章の結果をまとめると、p125 は cAMP 長時間刺激を受けてタンパク量が増加すると共に、チロシンリン酸化を受けて PI 3-kinase を長期にわたり活性化することが明らかとなった。また p125 を介したシグナルが cAMP による IGF-I 依存性 DNA 合成の相乗的増強に必須であった。この際 Akt と p66 Shc が p125 の下流で機能していることも示すことができた。

A.

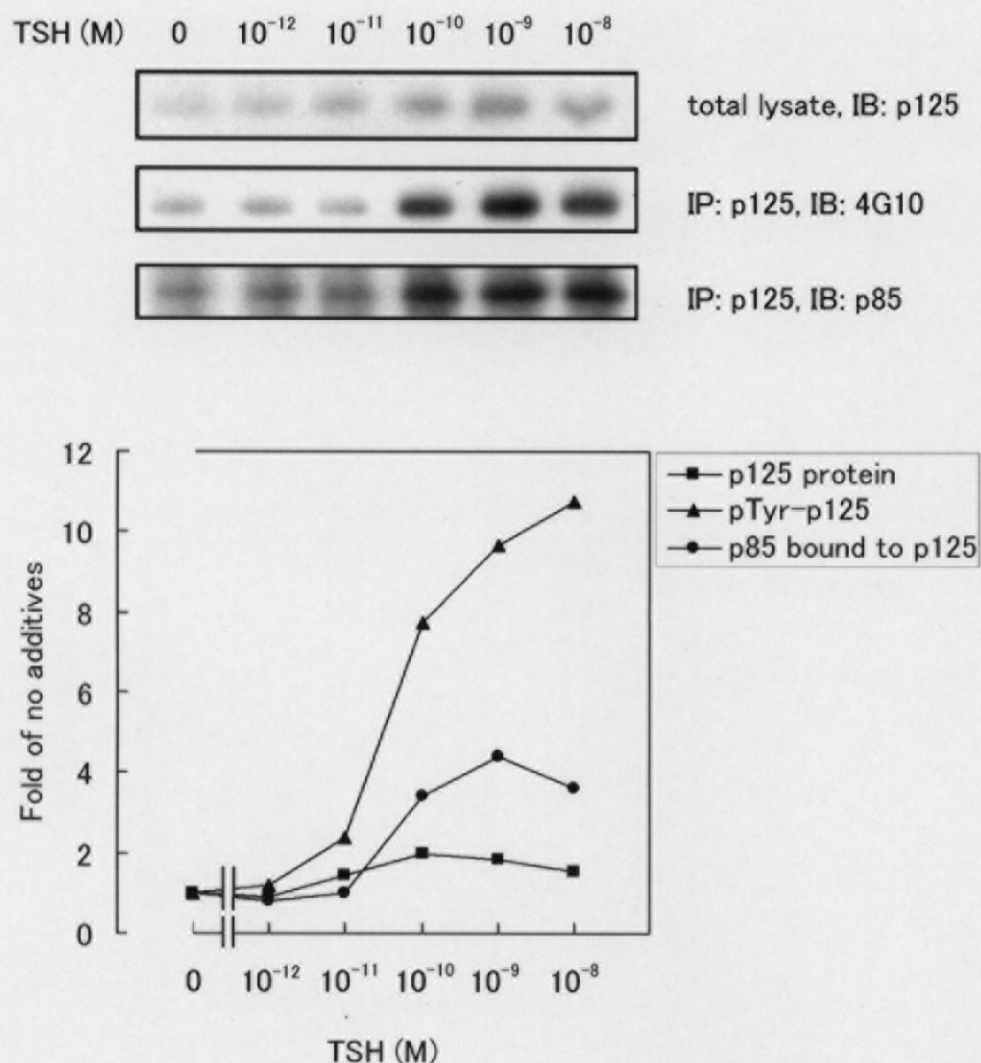


Fig. 3-1 TSH/cAMPの処理濃度や処理時間に応答したp125の発現とチロシンリン酸化およびp85結合量 (続く)

静止期FRTL-5細胞に様々な濃度のTSHを加えて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(A)。

B.

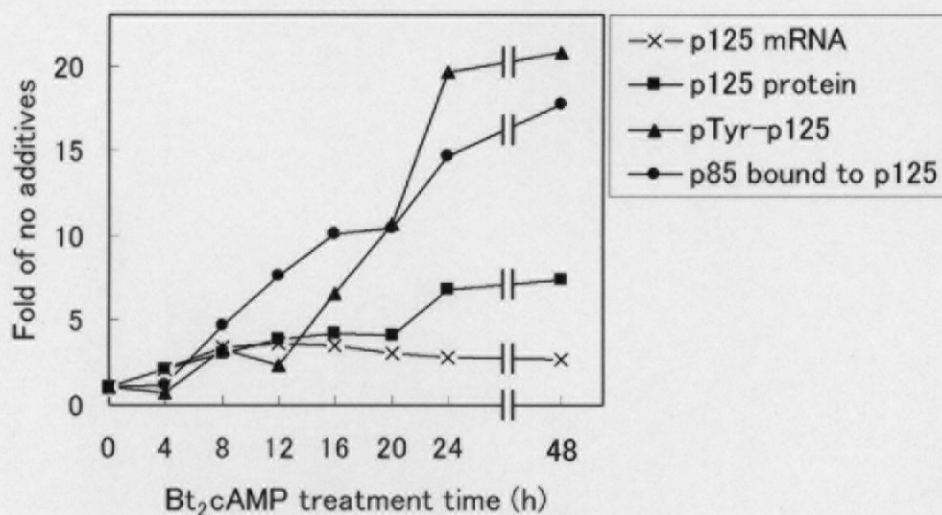
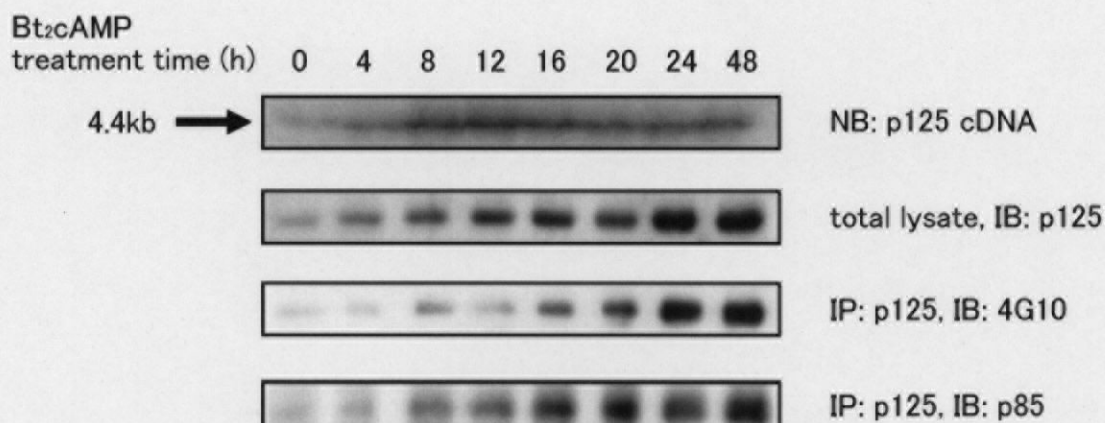


Fig. 3-1 TSH/cAMPの処理濃度や処理時間に応答したp125の発現とチロシンリン酸化およびp85結合量 (続き)

静止期FRTL-5細胞に様々な時間1mM Bt₂cAMPを加えて培養し、RNAを調製、マウスp125 cDNAをプローブに用いてNorthern blottingを行った。また、同様の処理を行った細胞から細胞抽出液を調製し、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した。それぞれ得られたバンドを定量した (B)。

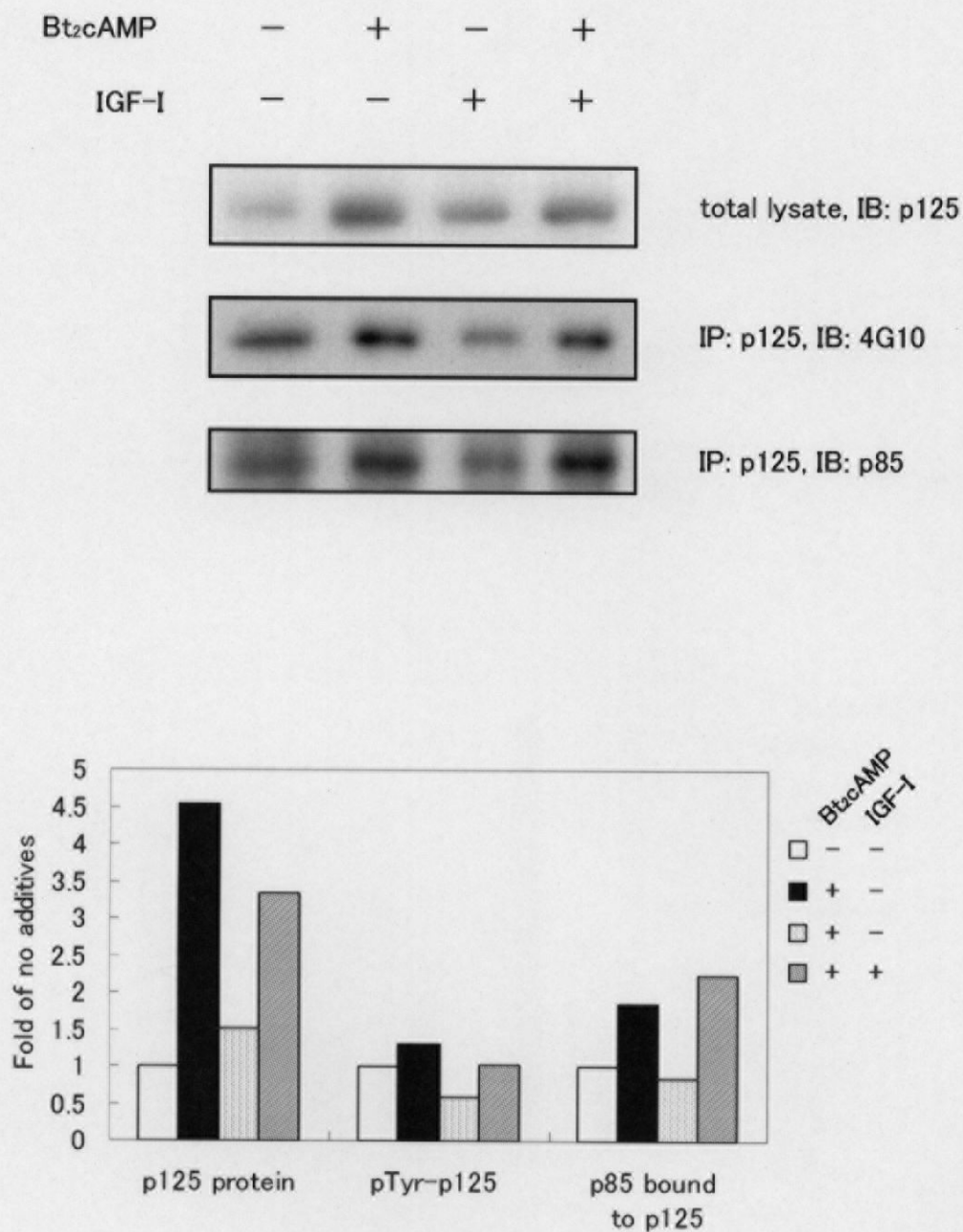


Fig. 3-2 p125にcAMP前処理とIGF-I処理が与える影響

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時間培養し、HBSSで2回洗浄除去後、100ng/ml IGF-Iを加えてさらに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。

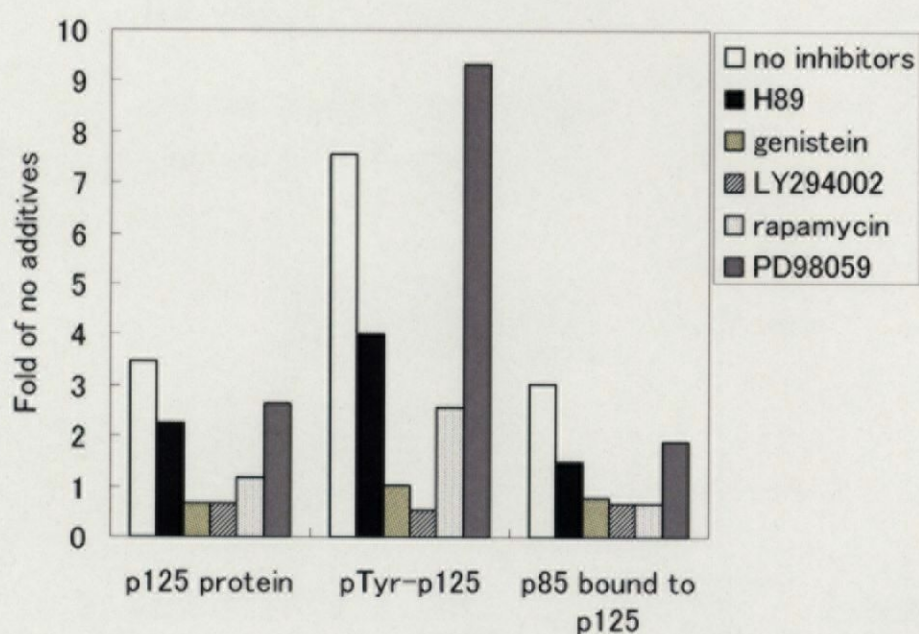
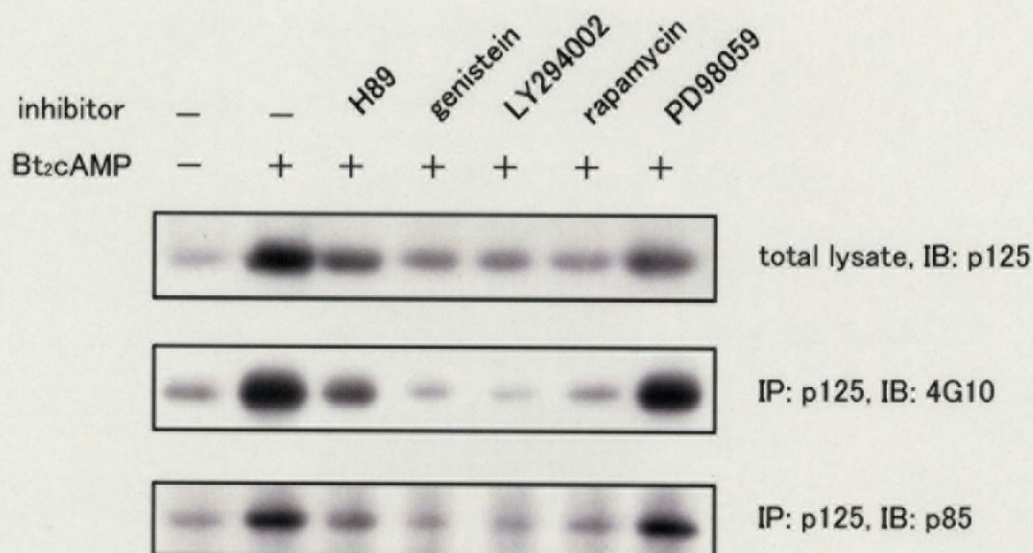
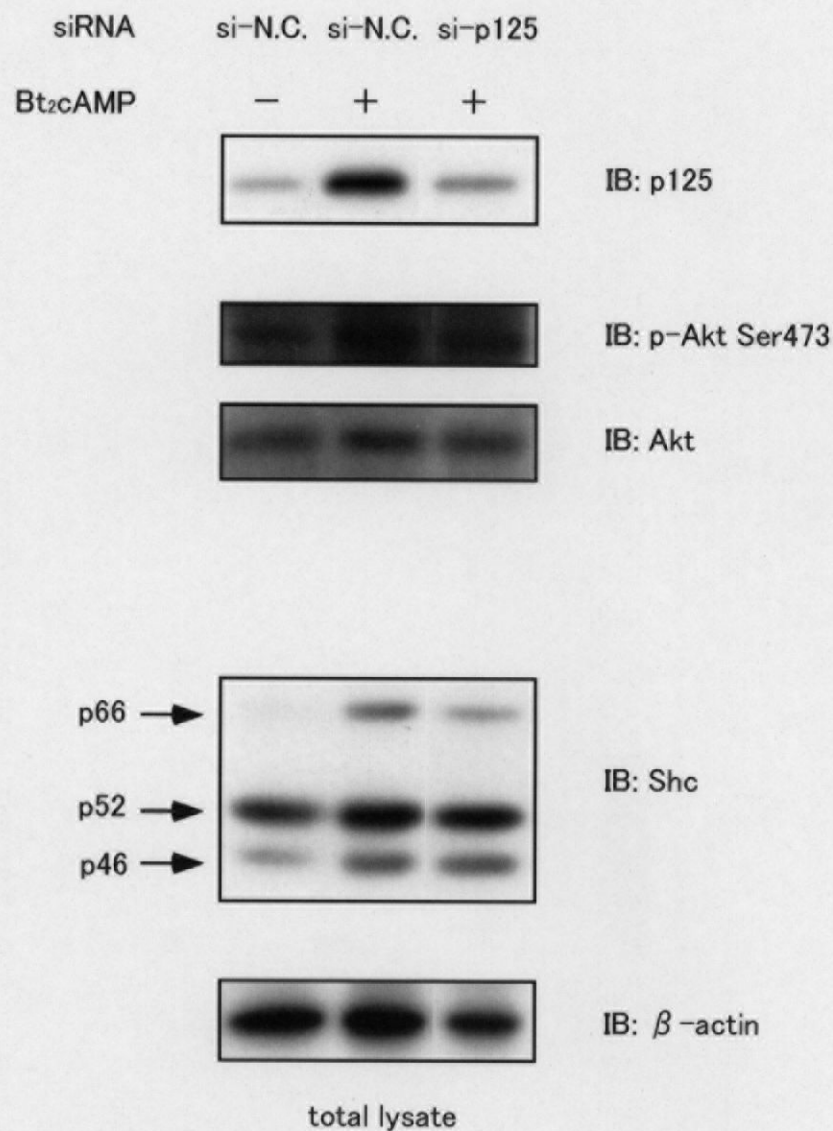


Fig. 3-3 p125タンパク質合成を誘導する機構の解析

静止期FRTL-5細胞を1mM Bt₂cAMPで処理するときに30 μ M H89、30 μ g/ml genistein、50 μ M LY294002、1 μ g/ml rapamycin、20 μ M PD98059のそれぞれで同時に処理して、対照としてBt₂cAMP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。



p125	p-Akt S473	Akt protein	Shc isoforms			β-actin
			p66	p52	p46	
5.65	1.42	1.10	10.96	1.33	2.07	0.99
1.68	1.22	1.10	6.15	1.16	2.34	0.62

Fig. 3-4 内在性p125発現抑制によって生じるシグナル分子への影響

FRTL-5細胞に(株) RNAiのサイトにて設計したp125 siRNA (si-p125) とネガティブコントロールsiRNA (si-N.C.) をそれぞれLipofectamine2000を用いて導入した。静止期同調培養後1mM Bt2cAMPで処理して24時間培養し、細胞抽出液を図に示した抗体を用いてそれぞれimmunoblottingした。得られたバンドを定量し、si-N.C.を導入してBt2cAMP処理しないバンドに対する割合をそれぞれ表に示した。

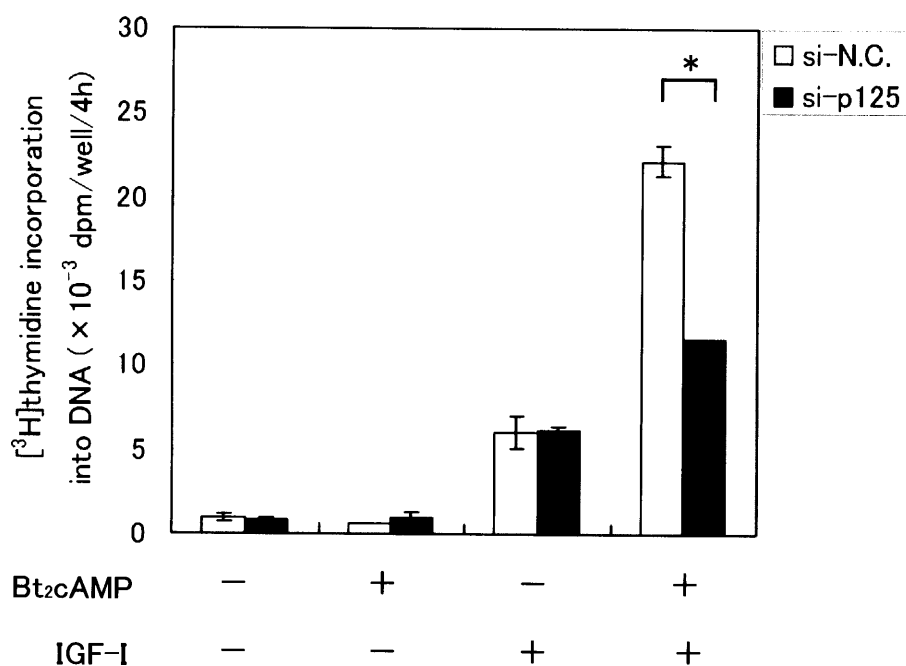
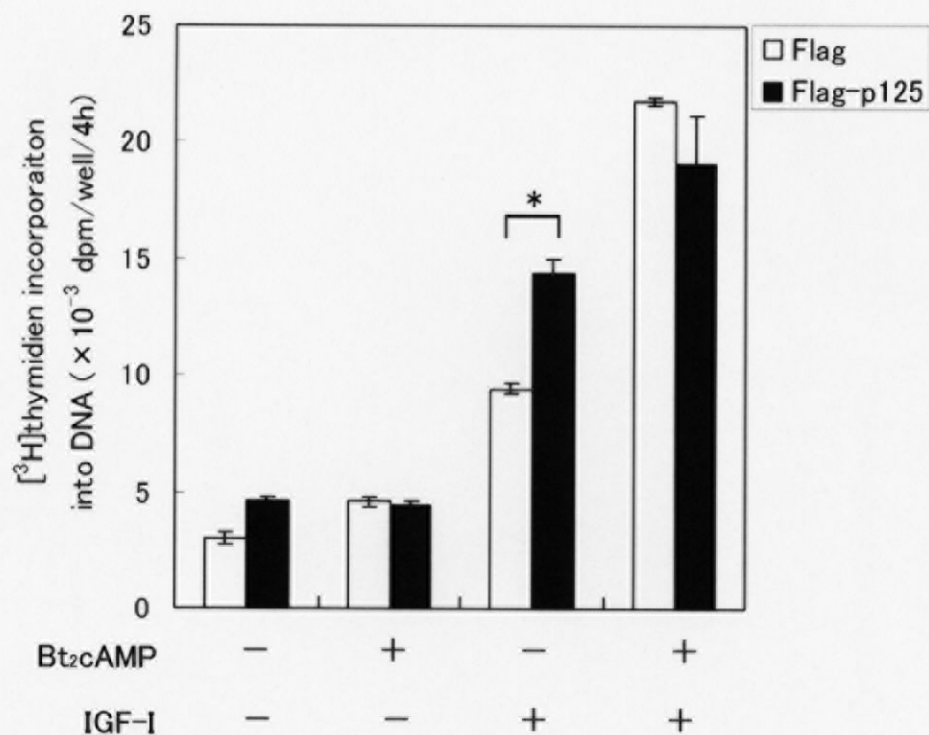


Fig.3-5 p125発現抑制がcAMP経路を介したIGF-I依存的DNA合成増強に及ぼす影響

FRTL-5細胞にp125 siRNA (si-p125) とネガティブコントロールsiRNA (si-N.C.) をそれぞれLipofectamine2000を用いて導入した。静止期同調培養後1mM Bt₂cAMPで処理、あるいは処理しないで24時間培養し、HBSSで2回洗浄除去後、100ng/ml IGF-Iを加えてさらに24時間培養した。IGF-I処理の最終4時間のDNA合成を測定した。mean±S.E.M (n=3)を示した。(*; $P < 0.01$ vs N.C., Student t-test)

A.



B.

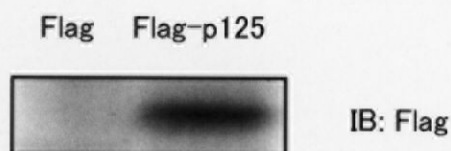


Fig. 3-6 p125強制発現がIGF-I依存性DNA合成の増強に及ぼす影響の解析

FRTL-5細胞にFlag-p125とFlagタグのみを発現するプラスミドをそれぞれLipofectamine2000を用いて導入した。静止期同調培養後1mM Bt₂cAMPを含む、あるいは含まない培地で24時間培養し、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さらに24時間培養した。IGF-I処理の最終4時間のDNA合成を測定した。mean±S.E.M (n=3)を示した (A)。(*)、P<0.005 vs Flag, Student t-test) (A)と同様にFRTL細胞に遺伝子導入を行い、1mM Bt₂cAMPと100ng/ml IGF-Iでそれぞれ処理した後、細胞抽出液を抗Flag抗体を用いてimmunoblottingした (B)。

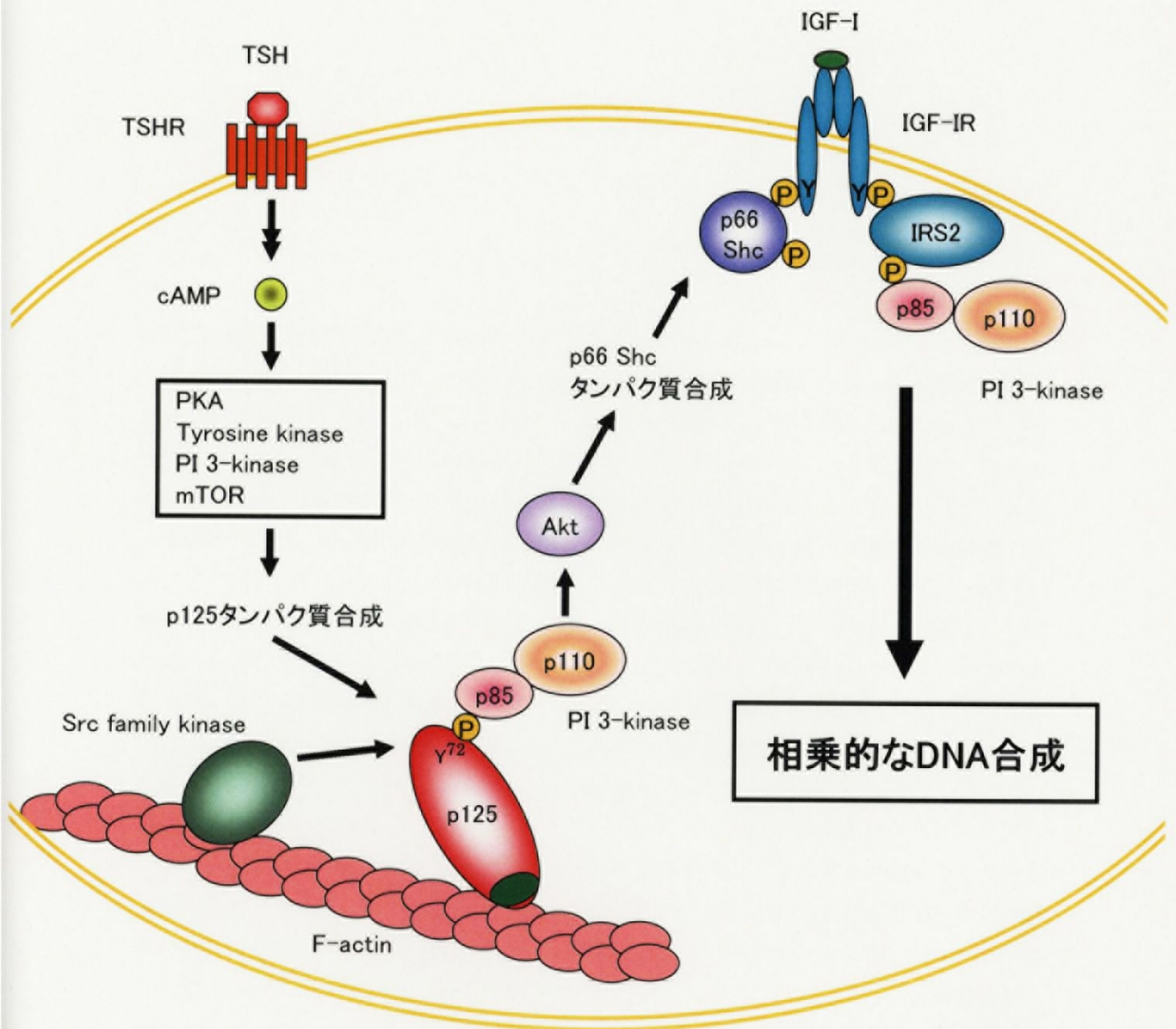


Fig. 3-7 cAMP長時間処理に応答してp125タンパク質が合成され、p125を介したシグナルはAktの活性化、p66 Shcのタンパク量増加を誘導してIGF-I依存的なDNA合成の相乗的増強を担う

cAMP長時間処理によってPKA、チロシンキナーゼ、PI 3-kinase、mTORが活性化され、p125のmRNAとタンパク質合成が起こる。新たに合成されたp125はF-actinに共局在してSrc familyチロシンキナーゼによってチロシンリン酸化され、PI 3-kinaseを長期活性化する。その結果Aktが活性化され、またp66 Shcタンパク量が増加する。これらの機構がIGF-I依存性DNA合成の相乗的増強に貢献している。

総合討論

IGF の生理活性発現機構の特徴

IGF は、多くの細胞の増殖・分化を誘導あるいは細胞死を抑制し、*in vivo*系においても、動物の正常な発生・発達や成長に必須なホルモンであることは広く知られている (Cohen, 2006)。しかし、IGF の生理活性は多種多様であり、特定かつ適当な生理作用が、決まった組織・細胞で発揮されるメカニズムについては、長い間謎であった。最近になり、IGF の特徴の一つは、その生理活性が他の成長因子やホルモンなどによって増強される点であることが明らかになり、この仕組みを使って、正しい組織において最適なタイミングで、発揮すべき特定の IGF 生理活性を発現することが可能となることが示されつつある。この増強の例として、PDGFやFGFとIGF、トロピックホルモンとIGF、ステロイドホルモンとIGFなどの組み合わせが挙げられる。したがって、IGF の生理作用発現機構を明らかにするためには、他の因子と IGF の相乗作用発現機構を解明する必要がある (Chernogubova et al., 2004; Meroni et al., 2002; Meroni et al., 2004; Ongeri et al., 2005; Takahashi et al., 1990)。

一般に、IGF は、細胞膜上の IGF-I レセプターに結合後、レセプターチロシンキナーゼを活性化し、このキナーゼによりインスリンレセプター基質 (IRS) をはじめとした複数種の細胞内基質がチロシンリン酸化され、シグナル伝達の引き金となる。引き続き、IRS のリン酸化チロシン残基を認識して SH2 ドメインを持つさまざまなシグナル分子が結合し、PI 3-kinase 経路、MAP kinase 経路といったシグナル伝達系の活性化を引き起こす結果、広範な生理活性を発現すると考えられてきた。したがって、IGF 活性の増強は、他の因子のシグナルがこの IGF シグナル系と合流して起こると推定される (Benito et al., 1996; Cohen, 2006; Kurmasheva and Houghton, 2006)。

我々は、ラット甲状腺細胞 FRTL-5 細胞をトロピックホルモンである甲状腺刺激ホルモン (TSH) と IGF で処理すると、細胞増殖が相乗的に誘導されることを見出した (Takahashi et al., 1991; Takahashi et al., 1990)。そこで、我々はこの細胞をモデルとして、他の因子と IGF の相乗作用発現機構を解析してきた。この分子機構の検討を進めた結果、FRTL-5 細胞では、TSH などによって cAMP シグナル伝達系をあらかじめ長時間活性化 (cAMP 前処理) すると、IGF-I の細胞増殖活性が増強されることが明らかとなった (Ariga et al.,

2000; Nedachi et al., 2000)。このシステムを用いて cAMP と IGF-I のシグナル合流機構の解明を進め、1) cAMP 前処理に応答して分子質量 125kDa の新規シグナル分子 (p125) がチロシンリン酸化され、これが PI 3-kinase と結合、PI 3-kinase を長時間活性化する、2) cAMP 前処理が、IGF-I 刺激に応答した IRS2 チロシンリン酸化を増強し、IRS2 に結合する PI 3-kinase を著しく、しかし短時間活性化する、3) IGF-I 刺激に応答して長時間チロシンリン酸化が維持される IGF-I レセプターに PI 3-kinase が直接結合し、PI 3-kinase 経路が長時間活性化されることなどが明らかとなった。3つの異なる機構で活性化された PI 3-kinase は連携して、細胞周期進行に重要な CDK の活性化因子、G1 cyclin を著しく増加させると同時に、阻害因子 p27^{kip1} を激減させ、その結果、CDK が著しく活性化、細胞周期が G1 期から S 期へと進行することを突き止めた (福嶋 博士論文, 2005)。

このように、我々は、p125、IRS2、IGF-I レセプターという異なるチロシンリン酸化タンパク質と PI 3-kinase がシグナル分子複合体を形成し、これらを介して増殖誘導における cAMP シグナルと IGF シグナルの合流が起こることを初めて明らかにすることができた。このような機構を介して起こる他の因子による IGF シグナルの増強は、正しい組織・タイミングで、適切な IGF 生理活性を発現するために必須な作用発現調節機構とすることができる (Fig. 総合討論)。

PI 3-kinase の活性化機構の特徴

PI 3-kinase の活性化を介して発現される生理作用もまた多種多様であり、これが合目的に発現され、生体は生命を維持している (Fresno Vara et al., 2004; Lindmo and Stenmark, 2006; Wymann and Marone, 2005)。上述したように、FRTL-5 細胞の増殖誘導過程において、PI 3-kinase の広範な生理作用のうちどの作用が発揮されるかのメカニズムを解明することは、とりもなおさず IGF の生理活性増強機構を明らかにすることに直結すると考えられる。では、どのように PI 3-kinase の活性は制御されているのであろうか？ FRTL-5 細胞を用いた一連の研究成果は、PI 3-kinase の p85 制御サブユニットが、どのような binding partner、特にチロシンリン酸化タンパク質と相互作用するかで、発現される生理活性が決定される可能性を強く示している。

今回本論文で、私は、今まで未知だった p125 を同定し、新しいタイプの PI 3-kinase p85 制御サブユニットのアダプター分子であることを明らかにしてきた。そこで、FRTL-5 細胞において、p125、IRS2、IGF-I レセプターという異なるチロシンリン酸化タンパク質が、どのように PI 3-kinase の特徴的な生理作用を発揮しているのか、考えてみたい。

・ p125 と結合する PI 3-kinase

本研究により、cAMP 経路の長時間刺激は p125 mRNA 発現を誘導し、その結果、p125

タンパク量を増加することが明らかとなった。またその合成には、cAMP-dependent kinase (PKA) とともに cAMP によって活性化される他のシグナル経路、たとえば Rap1、Epac など (Bos et al., 2003; Christensen et al., 2003) 、そして p125 をチロシンリン酸化するキナーゼとは異なるチロシンキナーゼ、PI-3 kinase、mTOR などが関わっている可能性が示された。

一方、p125 をチロシンリン酸化するキナーゼは、分子の特定は難しいが、cAMP 長時間シグナルに応答して上昇するチロシンキナーゼ活性は Src peptide をチロシンリン酸化する、Src 阻害剤 PP1、PP2 は高濃度ながらチロシンリン酸化を抑制する、細胞内に Src と p125 を強制発現させると p125 がチロシンリン酸化されるなどの結果を併せると、Src family kinase である可能性が高い。

また、p125 は C 末端側に存在する coiled-coil ドメインを介して F-actin と結合し、その結果 F-actin に付近に局在するキナーゼによりチロシンリン酸化されることが示唆された。したがって、F-actin がタンパク質間相互作用の足場の役割を果たしていると考えられる。cAMP 処理は PKA と RhoA を介して stress fiber を増加させることが知られている (Kaverina, et al., 2002) ので、F-actin に p125 と結合することとの関連も興味深い。一方、p125 は細胞質にも存在するが、F-actin と共局在しないとチロシンリン酸化されない結果から、細胞質では PI 3-kinase とは結合していないと考えている。

p125 は、おそらくアミノ酸残基 72 番目の YXXM モチーフのチロシン残基がリン酸化されて PI 3-kinase と結合する。PI 3-kinase が結合するのはこの 1 箇所のチロシン残基である可能性が高く、したがって、p125 一分子に対して一分子の PI 3-kinase が結合、誘導される活性は p125 のタンパク量を反映するものと推定される。一方、p125 のドメイン構造予測では、この他に、142 番目と 475 番目のチロシン残基が Src family キナーゼによってチロシンリン酸化される可能性を示した。Src family キナーゼが基質をリン酸化する機構として、自身の SH3 ドメインが基質の Proline-rich domain と結合し、基質をリン酸化、このリン酸化チロシン残基と Src family キナーゼの SH2 ドメインが結合してさらにリン酸化が促進されることが知られているので、このような positive feedback loop を介して、p125 は Src family キナーゼを再活性化する可能性もある (Playford and Schaller, 2004; Roskoski, 2004) 。

p125-PI 3-kinase 複合体の活性は、cAMP 長時間刺激によって上昇し、その後は cAMP 刺激がなくとも一度 p125 が合成されると活性が長時間維持される点が特徴である。p125 が PI 3-kinase を長時間活性化可能なのは、cAMP 刺激した際 p125 が速やかな脱チロシンリン酸化ないしはタンパク質分解を受けないためと考えられる。

p125 による PI 3-kinase の活性化は、Akt 活性化を介して p66 Shc タンパク質を増加、IGF-I シグナルを増強する。更に、p125-PI 3-kinase 複合体の活性化は、細胞を IGF-I に

応答して細胞増殖を誘導する役割を有する。福嶋らの結果からは、細胞周期進行の分子機構においては時期特異的なリボソーム活性を維持し、Cyclin D1 の mRNA の効率的な翻訳を可能とする役割を果たす (福嶋 博士論文, 2005)。

・ IRS と結合する PI 3-kinase

当研究室岡嶋らの研究により、IRS2 の合成量は、cAMP 経路の長時間刺激というトロピック効果によって、増加することがわかっている。一方、IRS2 は IGF-I 受容体にチロシンリン酸化されると速やかに分解され、シグナルが遮断されることになる (岡嶋 博士論文, 2007)。

IGF-I 刺激に応じた IGF-I 受容体と IRS2 の相互作用は共免疫沈降法で確認できないことなどから、IGF-I 刺激に応答した IRS2 のチロシンリン酸化は、短時間の相互作用によって起こると考えられる。また、当研究室の福嶋、岡嶋らは、IRS2 のチロシンリン酸化は、cAMP シグナルに応答して IRS2 と相互作用するタンパク質 (IRS-associated proteins; IRSAPs) 群、例えば、gC1qR、HSP90、Nedd4 などによって増強されることも明らかにしている。このように、IRS2 は、受容体キナーゼとの相互作用を調節することにより、IRS2 のチロシンリン酸化の強度が調節される点が特徴である (福嶋 博士論文, 2005)。

更に福嶋は、IRS2 がチロシンリン酸化され PI 3-kinase と相互作用するのは主に低密度ミクロソーム画分であることを明らかにしている。また、岡嶋は免疫染色によって、FRTL-5 細胞では IRS2 が核周辺にドット状に存在していることを見出している。これまで IRS2 は細胞膜近くの細胞質に存在していると考えられてきたが、細胞内では特定の場所に局在して、シグナルを伝達している可能性が考えられる。

IRS2 には、PI 3-kinase 結合モチーフ YXXM が 5 ヶ所存在する。p125 や IGF-I 受容体との量比を議論するのは難しいが、一つの IRS2 の分子あたりに相互作用する PI 3-kinase 量は他の分子に比較して多い、言い換えれば活性強度が高いと予想される (Thirone et al., 2006)。

一方、先も述べたように、IRS2 は、IGF-I 受容体キナーゼとの相互作用が一過的である上、IRS2 は速やかに分解されるため、IGF-I 刺激に応じたチロシンリン酸化も一過的で、PI 3-kinase の活性化も短時間しか続かない。

ここまで述べてきたように IRS2-PI 3-kinase 複合体の活性は一過的に大きく上昇するが、この活性は、G1 初期の Cyclin D1 の mRNA を一過的に増加させ、ユビキチン化を介した p27^{Kip1} の分解を誘導する (Fuse et al., 2004; 福嶋 博士論文, 2005)。

・ IGF-I 受容体と結合する PI 3-kinase

IGF-I 受容体の合成量は一般に胎児期・成長期に多く、多くの場合、その標的組織が増殖・

分化が誘導される時に最もレベルが高い。反対に、標的組織・細胞の回りに IGF-I が少ない場合に感受性をあげるために up-regulation が起こることが知られている。FRTL-5 細胞の場合には、TSH 処理により受容体の親和性には変化がないが、20%ほど受容体数が減少することが明らかになっている。いずれにしても、受容体に急な大きな変動はないと考えられる。

IGF-I 受容体のチロシンリン酸化は、IGF-I が IGF-I 受容体の細胞外ドメインに結合して受容体の構造が変化する結果、受容体内蔵型チロシンキナーゼが活性化するために起こると考えられている。したがって、IGF-I が結合していれば、IGF-I 受容体は活性化し、自己リン酸化がおこり、脱リン酸化しても IGF-I 受容体が分解されない限り、再び自己リン酸化、チロシンリン酸化が維持される。福嶋らにより、実際、FRTL-5 細胞でも、IRS のチロシンリン酸化は一過的であるのに対して、IGF-I 受容体のチロシンリン酸化は長時間維持されることが明らかにされている。

IGF-I 受容体は、主に細胞膜に存在しており、IGF-I 刺激によって一部は internalization される。

IGF-I 受容体には、p85 PI 3-kinase との結合モチーフである Y¹³¹⁶XXM が存在し、本研究室の中村らにより、IGF-I 受容体は 1316 番目のチロシン残基のリン酸化を介して p85 PI 3-kinase と結合することが、最近明らかにされた。IGF-I 受容体に対して PI 3-kinase の結合が、p125 と同様に 1 対 1 であるので、分子当たりの活性強度は、IRS2 に比較すれば低いと推定される (中村 修士論文, 2007)。

また、IGF-I 受容体との結合が PI 3-kinase 活性化の原因であるため、その活性は IGF-I 受容体のチロシンリン酸化を反映している。中村らは、IGF-I 刺激に応答して IGF-I 受容体が p85 PI 3-kinase と相互作用し、抗 IGF-I 受容体抗体で共免疫沈降される PI 3-kinase 活性は、IGF-I 刺激後長時間維持されることを発見している。

PI 3-kinase の活性化に応答してリン酸化される GSK3 β は、自身がリン酸化され活性が抑制されると、G₁ 期から S 期への細胞周期進行の正の制御因子のひとつ、cyclin D1 を安定化させることが報告されている (Diehl et al., 1998)。福嶋と中村は、IGF-I 受容体に相互作用する PI 3-kinase の長期活性化が、GSK3 β のリン酸化を介して cyclin D1 のタンパク量を維持、G₁ 期から S 期への細胞周期の進行を可能にすることを明らかにすることに成功した。

ここまで述べてきたように、PI 3-kinase の結合タンパク質は、1) 結合タンパク量の合成、2) 結合タンパク質のチロシンリン酸化、3) 結合タンパク質の細胞内局在、4) YXXM モチーフに結合した PI 3-kinase の活性強度、5) PI 3-kinase の活性化時間を使って、異なる生理活性の発現を可能にしている (Table 総合討論)。

PI 3-kinase p85 制御サブユニットと結合する新規アダプター分子 p125 の特徴

本研究により同定、解析した新規 p85 PI 3-kinase のアダプター分子 p125 は、既知の p85 アダプター分子と比較した時に、cAMP 刺激に応答して F-actin と共局在して長時間 PI 3-kinase を活性化する。そしてその結果、p125 を介した PI 3-kinase の生理作用として、DNA 合成が促進される。ここで、p125 の p85 アダプターとしての特色をあらためてまとめてみたい。

チロシンキナーゼ内蔵型受容体やこれらの受容体と直接・間接的に結合する既知の p85 アダプター分子は、受容体がりガンドと結合した後、1 分から 15 分程度でチロシンリン酸化され、PI 3-kinase が活性化する。そして短時間のうちに脱リン酸化を受けて活性を失う。PI 3-kinase 活性化の報告はほとんどがこのような短時間の活性化である。しかし、例外的に既知のアダプター分子による PI 3-kinase の長期活性化がいくつか報告されている。例えば、PDGF 受容体が 24 時間以上 PI 3-kinase を活性化する (Zhang et al., 2003)。また、既に述べたように、FRTL-5 細胞において IGF-I 受容体が長時間 PI 3-kinase を活性化することが明らかにされている。これらの活性化には、リガンドが受容体に結合し続けていることが必要であり、リガンドを洗浄除去すると速やかに活性を失う。一方、序章でも述べたように、細胞内で cAMP は Gs 型の 3 量体 G タンパク質共役型受容体を介して産生される。これらの受容体は G タンパク質の $\beta\gamma$ サブユニットを介して I B 型 PI 3-kinase を活性化することが多数報告されている (Curnock et al., 2002; Katada et al., 1999)。cAMP 刺激に応じた PI 3-kinase の活性化経路としては、Ras が p85 を介さずに p110 に直接結合することが知られている (Rodriguez-Viciano et al., 1996)。しかしこれらは、全て短時間の PI 3-kinase 活性化である。p125 の PI 3-kinase 活性化機構は、長時間の cAMP 刺激に応答して起こり、p85 と結合、PI 3-kinase を長時間活性化することなど、これらの PI 3-kinase 活性化経路とは区別される。

最近、focal adhesion でインテグリンに結合した FAK のリン酸化チロシン残基に p85 が結合し、PI 3-kinase が活性化されることが数多く報告されている。報告されている PI 3-kinase の活性化時間は 15 分～4 時間で (Akagi et al., 2002; Xia et al., 2004; Zeng et al., 2006)、やはり p125 の場合に比較して短い。今回、p125 は F-actin と共局在することを示したが、PI 3-kinase 活性が p125 との結合を介して F-actin に局在する意義、特にこの PI 3-kinase 活性がどのように cyclin D1 の翻訳活性を上昇させるのかは明らかではない。細胞外基質がインテグリンと結合すると、この stress fiber の末端はインテグリンと結合し、FAK や Src などのチロシンキナーゼをリクルートした focal adhesion と呼ばれるタンパク質複合体を形成することが知られている (Cabodi et al., 2004; Diviani et al., 2006)。focal adhesion は抗リン酸化チロシン抗体や、抗 vinculin 抗体によって可視化することができる

(Hotulainen and Lappalainen, 2006)。抗リン酸化チロシン抗体を用いた予備的な実験結果では、p125 は focal adhesion にも存在しており、ここでチロシンリン酸化されていると考えられる。FAK や Src が p125 のチロシンキナーゼでないとすれば、他のチロシンキナーゼが focal adhesion にリクルートされてくるのかもしれない。Focal adhesion において、p85 以外の p125 と結合するタンパク質を同定してどのようなタンパク質複合体を形成しているか解明することにより、F-actin と p125 が結合する意義が明らかになるのではないかと期待している。

PI 3-kinase 活性は細胞増殖、細胞生存シグナル、細胞移動、免疫応答など、様々な生理作用を有し、p85 アダプター分子を含む活性化機構によって調節されている。p125 を介した PI 3-kinase 活性化は cAMP 単独刺激では生理作用をほとんど示さない。IGF-I も同じく単独刺激では DNA 合成の促進能力は弱いのだが、p125 を介した PI 3-kinase 経路のシグナルを受けた時のみ相乗的な DNA 合成の増強が起こる。したがって、このタンパク質は、複数のシグナルを合流させる役割を持った新しいシグナルクロストーク制御タンパク質と考えることができる。

今後の課題

正常甲状腺組織においては、FRTL-5 細胞同様、TSH と IGF-I は協調して細胞増殖に働いている。しかし甲状腺ガンや Graves' 病のような甲状腺の機能亢進では細胞増殖における TSH 依存性の低下や、IGF-I に対する応答性の亢進が起こることが報告されている (Clement et al., 2001)。実際、このような状態の甲状腺組織では p125 のレベルが高いことを確認している (高橋 私信)。この過増殖のメカニズムが p125 高発現を介した PI 3-kinase 経路の異常な活性化であることを明らかにできれば、治療の標的分子となるであろう。

また、本研究で p125 が様々な組織で発現していることを示した。甲状腺以外の組織でも、TSHR、あるいは TSHR と同じ Gs 型の三量体 G タンパク質共役型ホルモン受容体を発現する組織では、p125 を介した PI 3-kinase 活性化機構の存在が期待される。例えば、セルトリ細胞では、Gs 型の follicle-stimulating hormone receptor が発現している。FSH 刺激が cAMP 合成を介して PI 3-kinase を活性化することが明らかになっているが、その機構は不明である (Meroni et al., 2004)。あるいは SH-SY5Y 細胞では cAMP 長時間刺激によって神経線維が伸長するが、この際 PI 3-kinase が活性化することも報告されている (Sanchez et al., 2004)。また、当研究室の長谷川は 3T3-L1 脂肪細胞で p125 の発現を確認し、線維芽細胞から脂肪細胞への分化の過程で p125 タンパク量が変動することを発見した (長谷川 私信)。この場合も、p125 の役割は明らかではなく、今後の研究課題である。また、cAMP 経路の刺激ばかりではなく、血管内皮細胞をビトロネクチンで刺激すると、IGF

刺激に応答して細胞増殖・細胞遊走が起こることが報告されているが、ピトロネクチン処理によって p125 がチロシンリン酸化されることも見出されている (Clemmons 私信)。これらの結果は、p125 が IGF の応答性を上昇させる様々なケースで普遍的に機能している可能性も示している。

本研究では p125 の PI 3-kinase 活性化能を中心に研究を進めてきた。YXXM モチーフや F-actin 結合部位の解析を行ったが、2 つ存在する PH ドメインの機能は未知である。また、PI 3-kinase 活性化能を持たない AFAP-110 と PH ドメインや coiled-coil の相同性が高く、AFAP-110 ではこれらのドメインが cPKC や Src などのタンパク質の結合や、F-actin の構造を変えることが明らかとなっている。したがって、p125 は新たなスキュフォールドタンパク質としての役割を果たしているのかもしれない。IGF シグナル経路に対する機能ばかりではなく、p125 が幅広い生理現象に果たす役割の解明を進める必要がある。

本研究により、PI 3-kinase p85 制御サブユニットの新たなアダプター分子、p125 の同定に成功した。cAMP 刺激に応じてタンパク質が発現誘導され、F-actin と結合して PI 3-kinase を長期活性化する機構はこれまでの PI 3-kinase 活性化機構には例のないものである。この PI 3-kinase 活性化の結果、TSH と IGF-I シグナルのクロストークが起こり、DNA 合成を相乗的に促進する機能が明らかにすることができた。しかし、p125 の研究は端緒についたばかりである。今後は、この分子をコンディショナルノックアウトするようなモデル動物を作出するなどして、p125 の生理的意義を *in vivo* 系も含め総合的に解明できればと考えている。今後の研究の発展に大いに期待したい。

Table 総合討論 cAMP刺激がIGF-I刺激を相乗的に増強し、FRTL-5細胞の増殖が誘導されるために必要なPI 3-kinase活性化機構の比較

結合タンパク	p125	IRS2	IGF-I受容体
タンパク量	cAMP刺激依存的合成	cAMP刺激依存的合成 IGF-I依存的分解	変化なし
チロシンリン酸化	cAMP (12時間以上の刺激)	IGF-I (刺激後すぐ)	IGF-I (刺激後すぐ)
細胞内局在	F-actin付近	核付近のendosome?	細胞膜付近
p85の 結合部位	(Y ⁷² XXMの チロシンリン酸化)	5ヶ所あるYXXMの チロシンリン酸化	Y ¹³¹⁶ XXMの チロシンリン酸化
PI 3-kinase 活性化時間	長時間 (刺激後24時間まで)	短時間 (～15分間程度)	長時間 (刺激がある間)
生理活性	p66Shcの合成誘導 Cyclin D1の翻訳促進	Cyclin D1 mRNA転写 促進 CKI, p27 ^{Kip} 分解促進	Cyclin D1の 安定性の増加

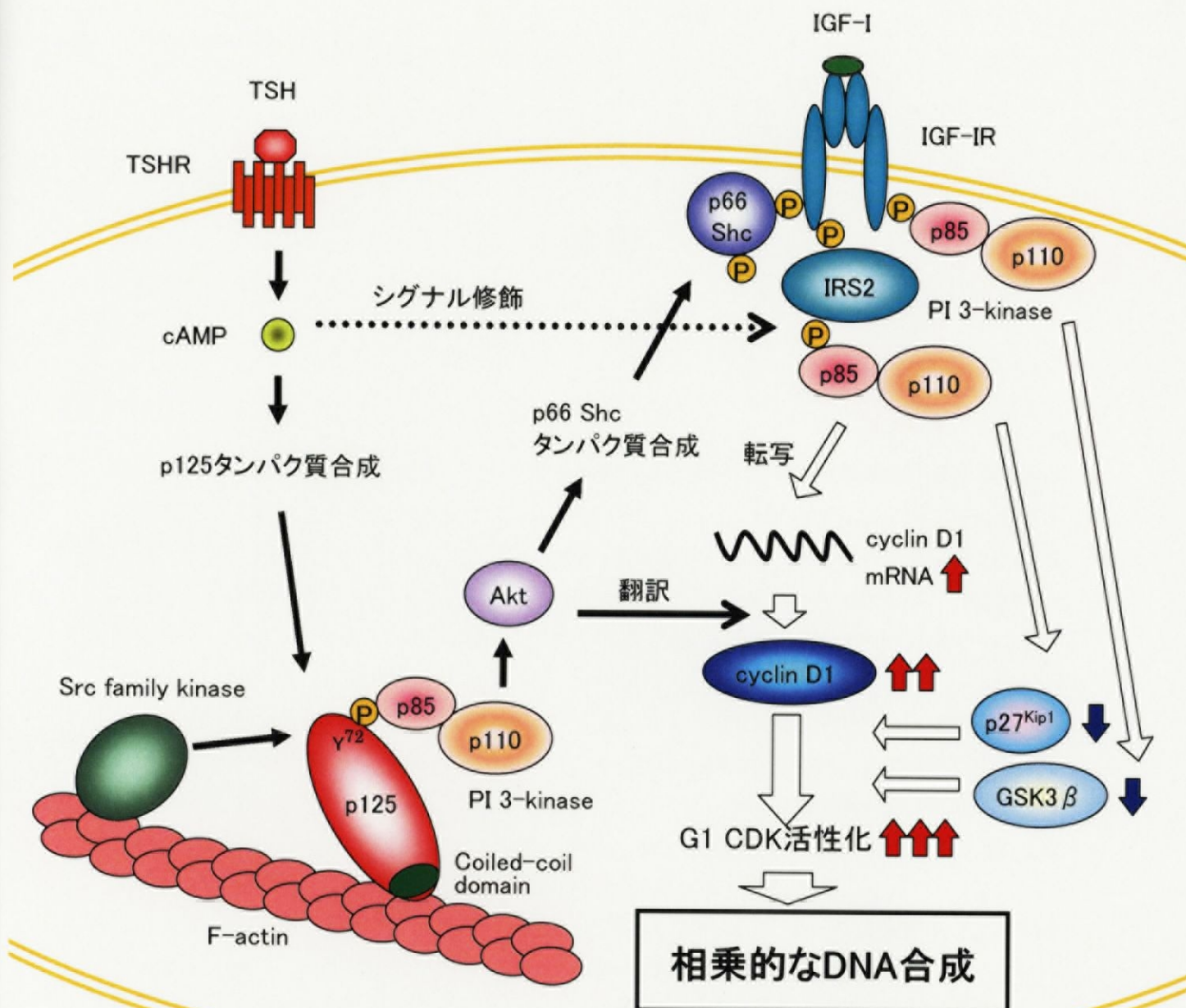


Fig. 総合討論 cAMP長時間処理によってIGF-Iシグナルが増強され、相乗的なDNA合成が誘導される機構の作業仮説

cAMP長時間処理はp125と結合したPI 3-kinaseを長期活性化する。その結果、IGF-Iシグナルの下流に存在する、IGF-I受容体基質p66 Shcのタンパク質合成と細胞周期制御因子cyclin D1の翻訳が促進される。またcAMPからp125を介さずにIRS2を修飾する機構が明らかにされており、IRS2に結合したPI 3-kinaseの活性化を介してcyclin D1の転写とp27Kip1の分解が促進される。そしてIGF-I受容体に直接PI 3-kinaseが結合することも明らかにされており、GSK3 β の活性を抑制してcyclin D1タンパク質を安定化する。これらの機構がIGF-Iシグナルを増強し、結果としてDNA合成が相乗的に増強される。

謝辞

高橋伸一郎助教授（東京大学大学院農学生命科学研究科）には、終始親身に御指導御鞭撻を賜り、お陰様で本研究を完遂することができました。ここに心から厚く御礼申し上げます。また、3年間の指導を通じて研究方法の下地を形作っていただき、本研究においても適切なご助言を賜りました千田和広教授（東京大学大学院農学生命科学研究科）に感謝いたします。そして日々様々な相談に乗って頂いた伯野史彦助手（東京大学大学院農学生命科学研究科）に感謝いたします。

顕微鏡操作を中心に研究方法などご助言を賜りました中川・増田リリア氏（東京大学大学院農学生命科学研究科）に感謝いたします。永田晋治助手（東京大学大学院農学生命科学研究科）には質量分析法のご指導を頂き、感謝いたします。また討論の場を設けて頂いた鈴木幸一氏（国立感染症研究所）に感謝いたします。そして研究室と、本研究の先輩としてご指導頂いた根建拓氏（東北大学先進医工学研究機構）に感謝いたします。

研究室の皆様に感謝いたします。特に、研究テーマが近く、データの解釈から技術的な助言まで頂いた福嶋俊明氏、岡嶋裕志氏、山中大介氏に感謝いたします。

最後に、研究生活を見守り続けてくれた家族に深く感謝いたします。

皆様のお陰で博士論文を完遂することができました。有難う御座いました。

参考文献

- Akagi, T., Murata, K., Shishido, T., and Hanafusa, H. (2002). v-Crk activates the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway by utilizing focal adhesion kinase and H-Ras. *Mol Cell Biol* *22*, 7015-7023.
- Ambesi-Impiombato, F.S., Parks, L.A., and Coon, H.G. (1980). Culture of hormone-dependent functional epithelial cells from rat thyroids. *Proc Natl Acad Sci U S A* *77*, 3455-3459.
- Ariga, M., Nedachi, T., Akahori, M., Sakamoto, H., Ito, Y., Hakuno, F., and Takahashi, S. (2000). Signalling pathways of insulin-like growth factor-I that are augmented by cAMP in FRTL-5 cells. *Biochem J* *348 Pt 2*, 409-416.
- Atwal, J.K., Massie, B., Miller, F.D., and Kaplan, D.R. (2000). The TrkB-Shc site signals neuronal survival and local axon growth via MEK and P13-kinase. *Neuron* *27*, 265-277.
- Bell, A., Gagnon, A., Dods, P., Papineau, D., Tiberi, M., and Sorisky, A. (2002). TSH signaling and cell survival in 3T3-L1 preadipocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* *283*, C1056-1064.
- Boggon, T.J., and Eck, M.J. (2004). Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene* *23*, 7918-7927.
- Bos, J.L., de Bruyn, K., Enserink, J., Kuiperij, B., Rangarajan, S., Rehmann, H., Riedl, J., de Rooij, J., van Mansfeld, F., and Zwartkruis, F. (2003). The role of Rap1 in integrin-mediated cell adhesion. *Biochem Soc Trans* *31*, 83-86.
- Bousquet, C., Guillermet-Guibert, J., Saint-Laurent, N., Archer-Lahlou, E., Lopez, F., Fanjul, M., Ferrand, A., Fourmy, D., Pichereaux, C., Monsarrat, B., *et al.* (2006). Direct binding of p85 to sst2 somatostatin receptor reveals a novel mechanism for inhibiting PI3K pathway. *EMBO J* *25*, 3943-3954.
- Cabodi, S., Moro, L., Baj, G., Smeriglio, M., Di Stefano, P., Gippone, S., Surico, N., Silengo, L., Turco, E., Tarone, G., and Defilippi, P. (2004). p130Cas interacts with estrogen receptor alpha and modulates non-genomic estrogen signaling in breast cancer cells. *J Cell Sci* *117*, 1603-1611.

Chernogubova, E., Cannon, B., and Bengtsson, T. (2004). Norepinephrine increases glucose transport in brown adipocytes via beta3-adrenoceptors through a cAMP, PKA, and PI3-kinase-dependent pathway stimulating conventional and novel PKCs. *Endocrinology* *145*, 269-280.

Chong, Y.P., Ia, K.K., Mulhern, T.D., and Cheng, H.C. (2005). Endogenous and synthetic inhibitors of the Src-family protein tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta* *1754*, 210-220.

Christensen, A.E., Selheim, F., de Rooij, J., Dremier, S., Schwede, F., Dao, K.K., Martinez, A., Maenhaut, C., Bos, J.L., Genieser, H.G., and Doskeland, S.O. (2003). cAMP analog mapping of Epac1 and cAMP kinase. Discriminating analogs demonstrate that Epac and cAMP kinase act synergistically to promote PC-12 cell neurite extension. *J Biol Chem* *278*, 35394-35402.

Clement, S., Refetoff, S., Robaye, B., Dumont, J.E., and Schurmans, S. (2001). Low TSH requirement and goiter in transgenic mice overexpressing IGF-I and IGF-Ir receptor in the thyroid gland. *Endocrinology* *142*, 5131-5139.

Curnock, A.P., Logan, M.K., and Ward, S.G. (2002). Chemokine signalling: pivoting around multiple phosphoinositide 3-kinases. *Immunology* *105*, 125-136.

Defilippi, P., Olivo, C., Venturino, M., Dolce, L., Silengo, L., and Tarone, G. (1999). Actin cytoskeleton organization in response to integrin-mediated adhesion. *Microsc Res Tech* *47*, 67-78.

Demoulin, J.B., Ericsson, J., Kallin, A., Rorsman, C., Ronnstrand, L., and Heldin, C.H. (2004). Platelet-derived growth factor stimulates membrane lipid synthesis through activation of phosphatidylinositol 3-kinase and sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem* *279*, 35392-35402.

Dessauer, C.W., and Nguyen, B.T. (2005). Relaxin stimulates multiple signaling pathways: activation of cAMP, PI3K, and PKCzeta in THP-1 cells. *Ann N Y Acad Sci* *1041*, 272-279.

Di Paolo, G., and De Camilli, P. (2006). Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* *443*, 651-657.

Diviani, D., Baisamy, L., and Appert-Collin, A. (2006). AKAP-Lbc: a molecular scaffold for the integration of cyclic AMP and Rho transduction pathways. *Eur J Cell Biol* *85*, 603-610.

Dombrosky-Ferlan, P.M., and Corey, S.J. (1997). Yeast two-hybrid in vivo

association of the Src kinase Lyn with the proto-oncogene product Cbl but not with the p85 subunit of PI 3-kinase. *Oncogene* *14*, 2019-2024.

Dremier, S., Coulonval, K., Perpete, S., Vandeput, F., Fortemaison, N., Van Keymeulen, A., Deleu, S., Ledent, C., Clement, S., Schurmans, S., *et al.* (2002). The role of cyclic AMP and its effect on protein kinase A in the mitogenic action of thyrotropin on the thyroid cell. *Annals of the New York Academy of Sciences* *968*, 106-121.

Du Villard, J.A., Wicker, R., Crespo, P., Russo, D., Filetti, S., Gutkind, J.S., Sarasin, A., and Suarez, H.G. (2000). Role of the cAMP and MAPK pathways in the transformation of mouse 3T3 fibroblasts by a TSHR gene constitutively activated by point mutation. *Oncogene* *19*, 4896-4905.

Engelman, J.A., Luo, J., and Cantley, L.C. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* *7*, 606-619.

Flynn, D.C., Leu, T.H., Reynolds, A.B., and Parsons, J.T. (1993). Identification and sequence analysis of cDNAs encoding a 110-kilodalton actin filament-associated pp60src substrate. *Mol Cell Biol* *13*, 7892-7900.

Fresno Vara, J.A., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., and Gonzalez-Baron, M. (2004). PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev* *30*, 193-204.

Funaki, M., Katagiri, H., Inukai, K., Kikuchi, M., and Asano, T. (2000). Structure and function of phosphatidylinositol-3,4 kinase. *Cell Signal* *12*, 135-142.

Fuse, M., Tanaka, T., Shibata, T., Yoshida, T., Noguchi, Y., Misawa, N., Yasuda, T., Saito, Y., Kohn, L.D., and Tatsuno, I. (2004). Regulation of geranylgeranyl pyrophosphate synthase in the proliferation of rat FRTL-5 cells: involvement of both cAMP-PKA and PI3-AKT pathways. *Biochem Biophys Res Commun* *315*, 1147-1153.

Gassama-Diagne, A., Yu, W., ter Beest, M., Martin-Belmonte, F., Kierbel, A., Engel, J., and Mostov, K. (2006). Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate regulates the formation of the basolateral plasma membrane in epithelial cells. *Nat Cell Biol* *8*, 963-970.

Gloushankova, N.A., Alieva, N.A., Krendel, M.F., Bonder, E.M., Feder, H.H., Vasiliev, J.M., and Gelfand, I.M. (1997). Cell-cell contact changes the dynamics of lamellar activity in nontransformed epitheliocytes but not in their ras-transformed descendants. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 879-883.

Guappone, A.C., and Flynn, D.C. (1997). The integrity of the SH3 binding motif of AFAP-110 is required to facilitate tyrosine phosphorylation by, and stable complex formation with, Src. *Mol Cell Biochem* 175, 243-252.

Guappone, A.C., Weimer, T., and Flynn, D.C. (1998). Formation of a stable src-AFAP-110 complex through either an amino-terminal or a carboxy-terminal SH2-binding motif. *Mol Carcinog* 22, 110-119.

Hanke, J.H., Gardner, J.P., Dow, R.L., Changelian, P.S., Brissette, W.H., Weringer, E.J., Pollok, B.A., and Connelly, P.A. (1996). Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J Biol Chem* 271, 695-701.

Hotulainen, P., and Lappalainen, P. (2006). Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *The Journal of cell biology* 173, 383-394.

Ihara, S., Oka, T., and Fukui, Y. (2006). Direct binding of SWAP-70 to non-muscle actin is required for membrane ruffling. *Journal of cell science* 119, 500-507.

Inukai, K., Funaki, M., Ogihara, T., Katagiri, H., Kanda, A., Anai, M., Fukushima, Y., Hosaka, T., Suzuki, M., Shin, B.C., *et al.* (1997). p85alpha gene generates three isoforms of regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-Kinase), p50alpha, p55alpha, and p85alpha, with different PI 3-kinase activity elevating responses to insulin. *J Biol Chem* 272, 7873-7882.

Ishizawar, R.C., Tice, D.A., Karaoli, T., and Parsons, S.J. (2004). The C terminus of c-Src inhibits breast tumor cell growth by a kinase-independent mechanism. *J Biol Chem* 279, 23773-23781.

Katada, T., Kurosu, H., Okada, T., Suzuki, T., Tsujimoto, N., Takasuga, S., Kontani, K., Hazeki, O., and Ui, M. (1999). Synergistic activation of a family of phosphoinositide 3-kinase via G-protein coupled and tyrosine kinase-related receptors. *Chem Phys Lipids* 98, 79-86.

Kaverina, I., Krylyshkina, O., and Small, J.V. (2002). Regulation of substrate adhesion dynamics during cell motility. *Int J Biochem Cell Biol* 34, 746-761.

Kimura, T., Van Keymeulen, A., Golstein, J., Fusco, A., Dumont, J.E., and Roger, P.P. (2001). Regulation of thyroid cell proliferation by TSH and other factors: a critical evaluation of in vitro models. *Endocr Rev* 22, 631-656.

Kurmasheva, R.T., and Houghton, P.J. (2006). IGF-I mediated survival pathways in

normal and malignant cells. *Biochimica et biophysica acta* *1766*, 1-22.

Kuruvilla, A., Pielop, C., and Shearer, W.T. (1994). Platelet-activating factor induces the tyrosine phosphorylation and activation of phospholipase C-gamma 1, Fyn and Lyn kinases, and phosphatidylinositol 3-kinase in a human B cell line. *J Immunol* *153*, 5433-5442.

Lennon, G., Auffray, C., Polymeropoulos, M., and Soares, M.B. (1996). The I.M.A.G.E. Consortium: an integrated molecular analysis of genomes and their expression. *Genomics* *33*, 151-152.

Li, X., Lu, S., Miyagi, E., Katoh, R., and Kawaoi, A. (1999). Thyrotropin prevents apoptosis by promoting cell adhesion and cell cycle progression in FRTL-5 cells. *Endocrinology* *140*, 5962-5970.

Lindmo, K., and Stenmark, H. (2006). Regulation of membrane traffic by phosphoinositide 3-kinases. *Journal of cell science* *119*, 605-614.

Lottin-Divoux, S., Jean, D., Le Romancer, M., and Frade, R. (2006). Activation of Epstein-Barr virus/C3d receptor (gp140, CR2, CD21) on human B lymphoma cell surface triggers Cbl tyrosine phosphorylation, its association with p85 subunit, Crk-L and Syk and its dissociation with Vav. *Cell Signal* *18*, 1219-1225.

Luo, J., Field, S.J., Lee, J.Y., Engelman, J.A., and Cantley, L.C. (2005). The p85 regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase down-regulates IRS-1 signaling via the formation of a sequestration complex. *J Cell Biol* *170*, 455-464.

Lupher, M.L., Jr., Andoniou, C.E., Bonita, D., Miyake, S., and Band, H. (1998). The c-Cbl oncoprotein. *Int J Biochem Cell Biol* *30*, 439-444.

Marcoux, N., and Vuori, K. (2003). EGF receptor mediates adhesion-dependent activation of the Rac GTPase: a role for phosphatidylinositol 3-kinase and Vav2. *Oncogene* *22*, 6100-6106.

Meroni, S.B., Riera, M.F., Pellizzari, E.H., and Cigorruga, S.B. (2002). Regulation of rat Sertoli cell function by FSH: possible role of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J Endocrinol* *174*, 195-204.

Meroni, S.B., Riera, M.F., Pellizzari, E.H., Galardo, M.N., and Cigorruga, S.B. (2004). FSH activates phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B signaling pathway in 20-day-old Sertoli cells independently of IGF-I. *J Endocrinol* *180*, 257-265.

Nedachi, T., Akahori, M., Ariga, M., Sakamoto, H., Suzuki, N., Umesaki, K.,

Hakuno, F., and Takahashi, S.I. (2000). Tyrosine kinase and phosphatidylinositol 3-kinase activation are required for cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent potentiation of deoxyribonucleic acid synthesis induced by insulin-like growth factor-I in FRTL-5 cells. *Endocrinology* *141*, 2429-2438.

Ongeri, E.M., Verderame, M.F., and Hammond, J.M. (2005). Follicle-stimulating hormone induction of ovarian insulin-like growth factor-binding protein-3 transcription requires a TATA box-binding protein and the protein kinase A and phosphatidylinositol-3 kinase pathways. *Mol Endocrinol* *19*, 1837-1848.

Playford, M.P., and Schaller, M.D. (2004). The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology. *Oncogene* *23*, 7928-7946.

Qian, Y., Baisden, J.M., Westin, E.H., Guappone, A.C., Koay, T.C., and Flynn, D.C. (1998). Src can regulate carboxy terminal interactions with AFAP-110, which influence self-association, cell localization and actin filament integrity. *Oncogene* *16*, 2185-2195.

Qian, Y., Gatesman, A.S., Baisden, J.M., Zot, H.G., Cherezova, L., Qazi, I., Mazloun, N., Lee, M.Y., Guappone-Koay, A., and Flynn, D.C. (2004). Analysis of the role of the leucine zipper motif in regulating the ability of AFAP-110 to alter actin filament integrity. *J Cell Biochem* *91*, 602-620.

Rivas, M., and Santisteban, P. (2003). TSH-activated signaling pathways in thyroid tumorigenesis. *Mol Cell Endocrinol* *213*, 31-45.

Rodriguez-Viciano, P., Marte, B.M., Warne, P.H., and Downward, J. (1996). Phosphatidylinositol 3' kinase: one of the effectors of Ras. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* *351*, 225-231; discussion 231-222.

Roof, D.J., Hayes, A., Adamian, M., Chishti, A.H., and Li, T. (1997). Molecular characterization of abLIM, a novel actin-binding and double zinc finger protein. *The Journal of cell biology* *138*, 575-588.

Rordorf-Nikolic, T., Van Horn, D.J., Chen, D., White, M.F., and Backer, J.M. (1995). Regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase by tyrosyl phosphoproteins. Full activation requires occupancy of both SH2 domains in the 85-kDa regulatory subunit. *J Biol Chem* *270*, 3662-3666.

Roskoski, R., Jr. (2004). Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun* *324*, 1155-1164.

Roskoski, R., Jr. (2005). Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* *331*, 1-14.

- Sambrook, J., Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York.
- Sanchez, S., Jimenez, C., Carrera, A.C., Diaz-Nido, J., Avila, J., and Wandosell, F. (2004). A cAMP-activated pathway, including PKA and PI3K, regulates neuronal differentiation. *Neurochem Int* *44*, 231-242.
- Sarmay, G., Angyal, A., Kertesz, A., Maus, M., and Medgyesi, D. (2006). The multiple function of Grb2 associated binder (Gab) adaptor/scaffolding protein in immune cell signaling. *Immunol Lett* *104*, 76-82.
- Shah, B.H., Neithardt, A., Chu, D.B., Shah, F.B., and Catt, K.J. (2006). Role of EGF receptor transactivation in phosphoinositide 3-kinase-dependent activation of MAP kinase by GPCRs. *J Cell Physiol* *206*, 47-57.
- Small, J.V., Rottner, K., Kaverina, I., and Anderson, K.I. (1998). Assembling an actin cytoskeleton for cell attachment and movement. *Biochimica et biophysica acta* *1404*, 271-281.
- Soltoff, S.P., Rabin, S.L., Cantley, L.C., and Kaplan, D.R. (1992). Nerve growth factor promotes the activation of phosphatidylinositol 3-kinase and its association with the trk tyrosine kinase. *J Biol Chem* *267*, 17472-17477.
- Songyang, Z., Shoelson, S.E., Chaudhuri, M., Gish, G., Pawson, T., Haser, W.G., King, F., Roberts, T., Ratnofsky, S., Lechleider, R.J., and et al. (1993). SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* *72*, 767-778.
- Sotsios, Y., and Ward, S.G. (2000). Phosphoinositide 3-kinase: a key biochemical signal for cell migration in response to chemokines. *Immunol Rev* *177*, 217-235.
- Suh, J.M., Song, J.H., Kim, D.W., Kim, H., Chung, H.K., Hwang, J.H., Kim, J.M., Hwang, E.S., Chung, J., Han, J.H., *et al.* (2003). Regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase, Akt/protein kinase B, FRAP/mammalian target of rapamycin, and ribosomal S6 kinase 1 signaling pathways by thyroid-stimulating hormone (TSH) and stimulating type TSH receptor antibodies in the thyroid gland. *J Biol Chem* *278*, 21960-21971.
- Takahashi, S., Conti, M., Prokop, C., Van Wyk, J.J., and Earp, H.S., 3rd (1991). Thyrotropin and insulin-like growth factor I regulation of tyrosine phosphorylation in FRTL-5 cells. Interaction between cAMP-dependent and growth factor-dependent signal transduction. *J Biol Chem* *266*, 7834-7841.
- Takahashi, S., Conti, M., and Van Wyk, J.J. (1990). Thyrotropin potentiation of

insulin-like growth factor-I dependent deoxyribonucleic acid synthesis in FRTL-5 cells: mediation by an autocrine amplification factor(s). *Endocrinology* *126*, 736-745.

Thamilselvan, V., Patel, A., van der Voort van Zyp, J., and Basson, M.D. (2004). Colon cancer cell adhesion in response to Src kinase activation and actin-cytoskeleton by non-laminar shear stress. *J Cell Biochem* *92*, 361-371.

Thirone, A.C., Huang, C., and Klip, A. (2006). Tissue-specific roles of IRS proteins in insulin signaling and glucose transport. *Trends Endocrinol Metab* *17*, 72-78.

Vadlamudi, R.K., Li, F., Adam, L., Nguyen, D., Ohta, Y., Stossel, T.P., and Kumar, R. (2002). Filamin is essential in actin cytoskeletal assembly mediated by p21-activated kinase 1. *Nat Cell Biol* *4*, 681-690.

Vella, V., Sciacca, L., Pandini, G., Mineo, R., Squatrito, S., Vigneri, R., and Belfiore, A. (2001). The IGF system in thyroid cancer: new concepts. *Mol Pathol* *54*, 121-124.

Velling, T., Nilsson, S., Stefansson, A., and Johansson, S. (2004). beta1-Integrins induce phosphorylation of Akt on serine 473 independently of focal adhesion kinase and Src family kinases. *EMBO Rep* *5*, 901-905.

Weber, M.M., Fottner, C., and Wolf, E. (2000). The role of the insulin-like growth factor system in adrenocortical tumorigenesis. *Eur J Clin Invest* *30 Suppl 3*, 69-75.

Woodgett, J.R. (2005). Recent advances in the protein kinase B signaling pathway. *Curr Opin Cell Biol* *17*, 150-157.

Wu, H., Windmiller, D.A., Wang, L., and Backer, J.M. (2003). YXXM motifs in the PDGF-beta receptor serve dual roles as phosphoinositide 3-kinase binding motifs and tyrosine-based endocytic sorting signals. *J Biol Chem* *278*, 40425-40428.

Wymann, M.P., and Marone, R. (2005). Phosphoinositide 3-kinase in disease: timing, location, and scaffolding. *Curr Opin Cell Biol* *17*, 141-149.

Wymann, M.P., Zvelebil, M., and Laffargue, M. (2003). Phosphoinositide 3-kinase signalling--which way to target? *Trends Pharmacol Sci* *24*, 366-376.

Xia, H., Nho, R.S., Kahm, J., Kleidon, J., and Henke, C.A. (2004). Focal adhesion kinase is upstream of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt in regulating fibroblast survival in response to contraction of type I collagen matrices via a beta 1 integrin viability signaling pathway. *J Biol Chem* *279*, 33024-33034.

Yeh, M., Gharavi, N.M., Choi, J., Hsieh, X., Reed, E., Mouillesseaux, K.P., Cole, A.L., Reddy, S.T., and Berliner, J.A. (2004). Oxidized phospholipids increase interleukin

8 (IL-8) synthesis by activation of the c-src/signal transducers and activators of transcription (STAT)3 pathway. *J Biol Chem* 279, 30175-30181.

Yu, C.F., Liu, Z.X., and Cantley, L.G. (2002). ERK negatively regulates the epidermal growth factor-mediated interaction of Gab1 and the phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 277, 19382-19388.

Yu, J., Zhang, Y., McIlroy, J., Rordorf-Nikolic, T., Orr, G.A., and Backer, J.M. (1998). Regulation of the p85/p110 phosphatidylinositol 3'-kinase: stabilization and inhibition of the p110alpha catalytic subunit by the p85 regulatory subunit. *Mol Cell Biol* 18, 1379-1387.

Zeng, Z.Z., Jia, Y., Hahn, N.J., Markwart, S.M., Rockwood, K.F., and Livant, D.L. (2006). Role of focal adhesion kinase and phosphatidylinositol 3'-kinase in integrin fibronectin receptor-mediated, matrix metalloproteinase-1-dependent invasion by metastatic prostate cancer cells. *Cancer Res* 66, 8091-8099.

Zhang, S.X., Gozal, D., Sachleben, L.R., Jr., Rane, M., Klein, J.B., and Gozal, E. (2003). Hypoxia induces an autocrine-paracrine survival pathway via platelet-derived growth factor (PDGF)-B/PDGF-beta receptor/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling in RN46A neuronal cells. *FASEB J* 17, 1709-1711.

有賀美也子 (2000) 博士論文

岡嶋裕志 (2007) 博士論文

川崎千枝 (2003) 修士論文

中村祐作 (2007) 修士論文

根建拓 (2000) 博士論文

福嶋俊明 (2005) 博士論文