

博士論文

インスリン受容体基質の細胞内配置が
インスリン様成長因子の活性発現に果たす
役割の解明

米山 鷹介

目次

論文要旨		1
第一章	序	6
図表		19
第二章	材料と方法	24
第三章	AP-1A 複合体による IRS-1 の細胞内小胞への配置機構とその生理的意義の解明	
緒言		43
結果		43
考察		50
図表		55
第四章	細胞膜上に配置する IRS-1 と AP-2 複合体の相互作用機構とその生理的意義の解明	
緒言		65
結果		66
考察		74
図表		81

第五章	IRS 分子種の細胞内配置を決定するタンパク質 相互作用ネットワークの網羅的解析	
緒言		92
結果		93
考察		97
図表		102
第六章	総合討論	106
図表		121
参考文献		122
本研究の内容に関わる論文		135
謝辞		136

論文要旨

インスリンは、糖・脂質などの同化反応を促進し、動物の物質代謝の制御に重要な役割を果たしている。一方、インスリン様成長因子 (IGF) は、多くの細胞の増殖・分化を誘導、細胞死を抑制し、動物の成長や発達に必須な役割を担っている。これらのホルモンは細胞膜上の特異的受容体に結合すると内蔵されたチロシンキナーゼを活性化し、インスリン受容体基質 (IRS) をチロシンリン酸化する。このリン酸化 IRS を認識して phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase) などのシグナル分子が結合し下流シグナル経路が活性化される結果、広範な生理活性が誘導される。従来、インスリン/IGF の受容体は細胞膜上で活性化されるため、IRS も細胞膜近傍でチロシンリン酸化され下流シグナルを伝達すると考えられてきた。しかし、我々や他のグループは、IRS の分子種の一つである IRS-1 が細胞膜ばかりでなく、細胞内の小胞構造へも存在していることを見出した。インスリン/IGF 受容体が、リガンド依存的に細胞内へインターナリゼーションすることを併せると、細胞膜だけでなく、細胞内小胞もシグナル伝達を仲介する場として機能し得る可能性が考えられる。しかし、IRS-1 の細胞内配置を制御する分子メカニズムや、IRS-1 が細胞内小胞と細胞膜、それぞれの存在部位においてどのような役割を担っているかについてほとんど明らかにされていない。

細胞の置かれた状態に応答して起こるインスリン/IGF のシグナル伝達・生理活性の増強あるいは抑制機構を解析している過程で、我々は IRS が他の多くのタンパク質と複合体を形成しており、これらを介してインスリン/IGF シグナル・活性の修飾が起こることを見出した。更に、IRS と相互作用する分子群の網羅的解析により、IRS-1 がクラスリン被覆小胞のアダプター分子である adaptor protein (AP)-1A および AP-2 複合体のサブユニット、 μ 1A および μ 2 と相互作用することを発見した。それぞれの複合体はクラスリン被覆小胞で運搬される積荷タンパク質と直接結合して、特に AP-1A 複合体はエンドソームとトランスゴルジ網の間の輸送を、AP-2 複合体は細胞膜からのエンドサイトーシスを担っていると考えられている。そこで本研究では、IRS-1 が AP-1A/AP-2 複合体と相互作用することに着目し、IRS-1 が細胞内小胞と細胞膜へ配置

される分子機構とそれぞれの部位で IRS-1 が IGF の活性発現に果たす役割を明らかにすることを目的とした。

AP-1A 複合体が IRS-1 の細胞内小胞への配置に果たす役割

まず、内在性 IRS-1 が発現しており、IGF 刺激によって細胞増殖が誘導される L6 筋芽細胞を用いて、*in vitro* pull-down 法や免疫沈降法により、IRS-1 が μ 1A を介して AP-1A 複合体と相互作用することを確認した。AP-1A 複合体はチロシン残基を含む 4 アミノ酸残基からなるモチーフ (Yxx Φ モチーフ) を認識することが明らかにされているが、IRS-1 はこのモチーフを複数有していた。そこで、IRS-1 のチロシン残基をアラニン残基に置換し、 μ 1A との結合に必要なモチーフを調べた結果、IRS-1 の中央領域に存在する 3 ヶ所の Yxx Φ モチーフが μ 1A 結合部位として機能していることを見出した。次に、RNAi 法により AP-1A 複合体を発現抑制したところ、細胞内小胞画分に存在する IRS-1 量が減少し、AP-1A 複合体が IRS-1 の小胞画分への配置に重要な役割を果たしていることが示唆された。続いて、GFP を融合した IRS-1 を細胞内に発現させ、免疫蛍光染色と生細胞イメージングによって IRS-1 の細胞内配置を調べた結果、野生型 IRS-1 は後期エンドソームマーカーである cation-independent-mannose 6-phosphate receptor (CI-MPR) 陽性エンドソームから CI-MPR 陰性の小胞へ輸送されたのに対し、AP-1A 複合体の結合部位のチロシン残基をアラニン残基に置換した IRS-1 変異体 (IRS-1 Δ AP) は、CI-MPR 陽性エンドソームからの輸送が阻害されて後期エンドソームに蓄積した。以上より、IRS-1 は AP-1A 複合体と相互作用して後期エンドソームから周辺の小胞へ輸送されることが明らかとなった。

AP-1A 複合体による IRS-1 の細胞内小胞への配置が IGF シグナルおよび細胞増殖誘導に果たす役割

続いて、AP-1A 複合体を発現抑制した L6 筋芽細胞について、DNA 合成量を測定した。その結果、対照細胞と比較して IGF-I 依存的な DNA 合成が抑制された。更に、IRS-1 Δ AP 変異体を発現する細胞を用いた解析の結果、IRS-1 と AP-1A 複合体の相互作用を阻害すると、IGF-I 依存的な IRS-1 のチロシンリン酸化および PI 3-kinase との結合量、

下流分子である Akt のリン酸化の抑制を反映して、IGF-I で誘導される細胞増殖が抑制された。以上の結果から、AP-1A 複合体によって IRS-1 が細胞内小胞へ輸送されることが、IGF による細胞増殖誘導に必要であることが明らかとなった。

細胞膜上に配置する IRS-1 が AP-2 複合体の細胞膜への集積に果たす役割

次に、AP-2 複合体と IRS-1 の相互作用について検討した。*in vitro* pull-down 法や免疫沈降法により、IRS-1 が $\mu 2$ を介して AP-2 複合体と相互作用することを確認した。また、Yxx Φ モチーフに点変異を導入した IRS-1 を用いた結合実験から、 $\mu 2$ が $\mu 1A$ と同一の Yxx Φ モチーフを認識して IRS-1 と結合することが明らかとなった。次に、IRS-1 と AP-2 複合体が相互作用する細胞内部位について検討した。細胞の接着面を選択的に励起できる全反射顕微鏡を用いた検討の結果、IRS-1 と AP-2 複合体は細胞膜を裏打ちするアクチン繊維 (F-アクチン) 上で共局在することを見出した。さらに、AP-2 複合体を発現抑制しても IRS-1 の細胞膜裏打ち F-アクチンへの局在に変化は認められず、IRS-1 Δ AP 変異体も細胞膜裏打ち F-アクチンへ局在したことから、AP-2 複合体との相互作用は IRS-1 の細胞膜への配置に必要なことが明らかとなった。一方、IRS-1 を発現抑制すると、AP-2 複合体が細胞膜裏打ち F-アクチン上から消失した。他の結果も併せ、細胞膜上において IRS-1 が F-アクチンを足場として AP-2 複合体の細胞内配置を決定していると結論した。

細胞膜上の IRS-1/AP-2 複合体が IGF-I 受容体のインターナリゼーションに果たす役割

IRS-1 は積荷タンパク質を認識する $\mu 2$ サブユニットに直接結合することから、IRS-1 が AP-2 複合体の他の積荷タンパク質輸送を競合的に抑制する可能性が考えられる。そこで、IRS-1 が AP-2 複合体を介したクラスリン依存的な受容体エンドサイトーシスに及ぼす影響について調べた。まず、AP-2 複合体の代表的な積荷タンパク質であるトランスフェリン受容体の細胞内分布とトランスフェリンの細胞内取り込み量について検討したが、IRS-1 の過剰発現細胞でも、対照細胞と有意な差異は観察されなかった。これに対して、IRS-1 の過剰発現が、IGF-I 受容体 (IGF-IR) のインターナリゼーション

を変化させることを発見した。まず、対照細胞では、IGF-I 長時間処理によって細胞膜上のチロシンリン酸化 IGF-IR 量 (IGF-IR チロシンキナーゼ活性の指標) が減少し、このリン酸化 IGF-IR の減少は AP-2 複合体の発現抑制によって阻害された。この結果は、活性化型 IGF-IR が、IGF-I 刺激に応答して時間をかけて、AP-2 複合体依存的にインターナリゼーションされることを示している。一方、IRS-1 を過剰発現した細胞では、IGF-I 長時間処理後もチロシンリン酸化 IGF-IR が細胞膜から細胞内へインターナリゼーションされずに細胞膜上に蓄積していたのに対して、IRS-1 を発現抑制すると、IGF-I 短時間処理で IGF-IR のインターナリゼーションが誘導された。更に、IRS-1 Δ AP 変異体を発現する細胞を用いた解析から、IRS-1 の過剰発現による IGF-IR のインターナリゼーションの阻害には AP-2 複合体との相互作用が必要であることが明らかとなった。他の結果も併せ、IRS-1 は、細胞膜で AP-2 複合体を F-アクチン上へリクルートし、AP-2 複合体による IGF-IR のインターナリゼーションを阻害する、いわば「エンドサイトーシス調節タンパク質」として機能していると結論した。

異なる細胞内部位へ配置する IRS 分子種が形成するタンパク質相互作用ネットワーク

IRS-1 は小胞構造へ配置される一方、他の IRS 分子種である IRS-2 は主に細胞質へ、IRS-3 は核に配置されることが明らかとなっており、このような分子種によって配置される細胞内部位の違いによって、シグナル伝達や生理作用に対して分子種ごとの特有の機能が発揮されるという仮説が予想される。この仮説を検証するために、生細胞の状態で目的タンパク質の近傍に位置する分子をビオチン標識することができる BioID 法を用いて、IRS の近傍に存在する分子群を網羅的に解析した。同定された分子の機能や細胞内局在から、BioID 法によって各 IRS 分子種の細胞内配置を良く反映した形で近傍分子を同定できることが示された。特に、IRS-1 の近傍にはアクチン細胞骨格やエンドソーム結合性アクチン関連因子が存在することを見出し、IRS-1 の細胞内配置にはアクチン結合タンパク質が密接に関与していることが明らかとなった。

本研究により私は、クラスリンアダプターである AP-1A 複合体と AP-2 複合体が、

IRS-1 内の同じモチーフを介して相互作用をするにも関わらず、その相互作用の生理的意義が全く異なることを発見した。すなわち、IRS-1 は AP-1A 複合体の積荷タンパク質として細胞内小胞に輸送され、IGF-IR から下流シグナル経路に IGF の情報を伝達することにより、IGF 誘導性の細胞増殖を誘導する。これに対して、細胞膜裏打ち F-アクチン上で IRS-1 は AP-2 複合体と相互作用し、AP-2 複合体による IGF-IR のインターナリゼーションを調節することを、初めて明らかにすることができた。私は、本研究の成果から、細胞内小胞と細胞膜という異なる細胞部位への IRS-1 の配置が調節されることによって、IGF のシグナル伝達や活性発現が緻密に制御されるというインスリン様活性の新しい制御機構を提案したい。今後、今回発見された制御機構の観点から、インスリン／IGF の活性異常を起因とする糖尿病や成長異常、がんなどの疾病の発症機構が明らかにされるものと期待している。

第一章 序論

1. インスリンとインスリン様成長因子の生理活性

インスリンとインスリン様成長因子 (insulin-like growth factor; IGF) をはじめとするインスリン様ペプチドは、個体の代謝、成長、寿命など多岐にわたる生命現象を制御しているペプチドホルモンである(Nakae et al., 2001)。哺乳類では、インスリンと二つのIGF 分子種 (IGF-I と IGF-II) の存在が明らかにされている。インスリンと IGF は、構造をはじめ類似点が多いが、生合成および分泌の制御や生理活性など異なる性質を有している。

インスリンは、血中の糖やアミノ酸の濃度の上昇、摂食刺激に応答して膵臓ランゲルハンス β 細胞から一過的に分泌されるペプチドホルモンである。標的細胞が血中の糖を細胞内に取り込むことで生じる血糖の降下作用などの糖代謝に関わる活性のみならず、脂肪代謝やタンパク質代謝などの同化反応を促進する広範な代謝制御活性を発揮する。血中では遊離型で存在しており、肝臓や筋肉、脂肪といった様々な臓器を標的器官としている(Cheatham and Kahn, 1995)。

一方、IGF はタンパク質などの同化反応の促進に加えて、様々な細胞の増殖や分化の誘導に重要であり、胎生期から生涯にわたって広範な組織の発達や個体成長に重要な役割を担っている成長因子である。IGF-I と IGF-II は、いずれもアミノ酸配列および高次構造がプロインスリンと類似しているが、その生合成および分泌調節機構は大きく異なっている。IGF-I は肝臓をはじめとした様々な臓器で合成される。成長ホルモンやインスリン、または栄養状態に応じて合成と分泌が調節され、血中濃度の急激な変動はない。一方 IGF-II は、特にマウスにおいて、胎生期から出生前までに発現が高く維持されており、胎生期の個体発生や成長に重要であると考えられている。さらに、インスリンと異なり、IGF は体液中で六種類の特異的な結合タンパク質 IGFBP (insulin-like growth factor-binding protein) と結合して存在している。それぞれの IGFBP は、異なる様式で血中での IGF の安定性やクリアランス、活性修飾などを担っており、IGFBP から遊離した IGF が標的細胞に作用すると考えられている。IGFBP の IGF 結合活性は、キナーゼ

によるリン酸化、セリンプロテアーゼによる分解、細胞外マトリクスとの相互作用などを介して調節されている(Jones and Clemmons, 1995)。

細胞レベルでは、インスリン／IGF が細胞膜上のそれぞれの特異的な受容体に結合することで、後述するような下流のシグナル伝達経路が活性化され、細胞増殖や分化の誘導、細胞死の抑制、細胞運動の活性化、物質代謝における同化反応の促進や異化反応の抑制、糖やアミノ酸の膜透過の促進など、広範な生理活性が発現する。培養細胞を用いた解析により、IGF はインスリンと同様に糖・アミノ酸の膜透過の促進、RNA 合成、タンパク質合成の促進などの同化促進作用を持つことが明らかになっている。また、IGF はインスリンでは弱いと考えられている細胞増殖や分化の誘導活性、細胞死の抑制活性などが強い点の特徴である(Jones and Clemmons, 1995; Taniguchi et al., 2006)。

2. インスリン／IGF のシグナル伝達経路

インスリン／IGF の受容体

これまでにインスリン／IGF と結合する受容体として、哺乳類ではインスリン受容体 (insulin receptor; IR)、IGF-I 受容体 (IGF-I receptor; IGF-IR)、IGF-II 受容体 (IGF-II receptor; IGF-IIR) の三種類の存在が報告されている(Gronborg et al., 1993; Morgan et al., 1987; Ullrich and Schlessinger, 1990)。また、IR に構造が類似した第四の受容体の候補として IR-related receptor の存在が知られているが、内因性リガンドは未知でオーファン受容体である(Shier and Watt, 1989)。主にノックアウトマウスの表現型解析から、インスリンや IGF の受容体として、IR と IGF-IR が主要な受容体として機能していると考えられている(Nakae et al., 2001)。IR と IGF-IR はチロシンキナーゼ内蔵型の受容体に分類されるが、他の受容体チロシンキナーゼと異なり、リガンドが結合する α サブユニットとチロシンキナーゼドメインを有する β サブユニットがジスルフィド結合したユニットが、ジスルフィド結合で会合したヘテロ四量体の状態で膜上に存在している。さらに、IR の α/β サブユニットダイマーと IGF-IR の同ダイマーが会合したハイブリット受容体も存在する。このハイブリット受容体はインスリンに比べ IGF-I に対して高い親和性を示すことが明らかとなっている(Belfiore et al., 2009)。インスリンや IGF がそれぞれの特異的受容体の細胞外領域に結合すると、コンフォメーション変化が起こり、キナーゼドメイ

ンの活性化ループが自己リン酸化される。このリン酸化によって、ATP (adenosine triphosphate) や基質タンパク質が活性化ループに結合できるようになる(Hubbard, 1997; Hubbard et al., 1994; Munshi et al., 2003; Munshi et al., 2002)。さらに、膜貫通ドメイン直下のチロシン残基がリン酸化されると、このリン酸化チロシン残基と近くのアミノ酸残基を認識して、後述するような種々の基質タンパク質がリクルートされる(Yenush and White, 1997)。そして、受容体チロシンキナーゼが細胞内基質をリン酸化することで、下流シグナル経路を活性化すると考えられている。一方、IGF-IIR はチロシンキナーゼドメインを持たず、コラーゲン結合ドメイン様領域のリピート構造を細胞外に有する単量体として膜上に存在している。また、IGF-IIR はカチオン非依存性マンノース 6 リン酸受容体 (cation-independent mannose 6-phosphate receptor; CI-MPR) としても機能しており、リソソーム酵素をゴルジ体のトランス面に相当する *trans*-Golgi network (TGN) とエンドソームの間で循環輸送していることが知られている(Morgan et al., 1987)。IGF-IIR のノックアウトマウスは血中 IGF 濃度の上昇に伴って過成長の表現型を呈することから、IGF-IIR は、シグナル伝達よりも主に血中 IGF のクリアランスを担っていると考えられている(Lau et al., 1994; Wang et al., 1994)。

IR/IGF-IR の細胞内基質とそれに結合するシグナル分子

リガンドの結合によって活性化された IR や IGF-IR は、インスリン受容体基質(insulin receptor substrates; IRSs) や Shc (Src homology 2 domain containing) などの細胞内基質をチロシンリン酸化する (Fig. 1-1)。IRS や Shc は PTB (phosphotyrosine binding) ドメインを介して、IR/IGF-IR の膜貫通ドメイン直下に存在するリン酸化チロシン残基を認識して受容体に結合し、チロシンリン酸化される。チロシンリン酸化された IRS や Shc に、リン酸化チロシン残基を認識する SH2 (Src homology 2) ドメインを有する Grb2 (growth factor receptor bound protein 2) や PI 3-kinase (phosphatidylinositol 3-kinase) の p85 制御サブユニットが結合することで下流シグナル経路が活性化する(Taniguchi et al., 2006)。その他にも、脱リン酸化酵素 SHP2 (SH2 domain containing tyrosine phosphatase 2) やチロシンキナーゼ Fyn など、チロシンリン酸化された IRS にリクルートされることが知られている。なお、IRS の詳しい性質については後述する。

インスリン／IGF の下流シグナル伝達経路

IRS や Shc に結合した Grb2 は、自身の SH3 (Src homology 3) ドメインを介して GEF (guanine nucleotide exchange factor) である Sos (son of sevenless gene) と会合し、細胞膜に局在する small GTPase の Ras を活性化する。活性化された Ras は、MAPKKK (mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase kinase) である Raf を活性化し、これが MAPKK である MEK (MAPK/Erk kinase)、最終的に MAP kinase である Erk1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2) をリン酸化によって活性化する。活性化された Erk1/2 は核内に移行し、標的転写因子群をリン酸化することで下流遺伝子の発現が調節され、細胞増殖などが誘導される (Fig. 1-1) (Myers et al., 1994; Skolnik et al., 1993a; Skolnik et al., 1993b)。

一方、PI 3-kinase p85 制御サブユニットが IRS に結合することにより、p110 触媒サブユニットが活性化される。PI 3-kinase は細胞膜中の PI(4,5)P₂ (phosphatidylinositol (4, 5) diphosphate) を基質として、イノシトール環の D-3 位をリン酸化することで PI(3,4,5)P₃ (phosphatidylinositol (3, 4, 5) triphosphate) を産生する (Backer et al., 1992; Myers et al., 1992)。その結果、セリン／スレオニンキナーゼである Akt が PH (pleckstrin homology) ドメインを介して PI(3,4,5)P₃ を認識して細胞膜にリクルートされる。さらに、PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase 1) が細胞膜の PI(3,4,5)P₃ に結合し、Akt の活性化ループに位置する Thr308 をリン酸化する。また、インスリンや IGF で活性化された受容体チロシンキナーゼによって、mTOR (mammalian target of rapamycin) complex 2 が活性化され、Akt の疎水性モチーフに位置する Ser473 をリン酸化する。この 2 ヶ所のリン酸化によって Akt は活性化される (Dummler and Hemmings, 2007)。Akt は様々な Akt 基質をリン酸化することで、細胞の広範な生理機能を制御している (Manning and Cantley, 2007)。Akt 基質の中には、糖新生やアポトーシスに関与する遺伝子群の発現を制御する転写因子 FoxO1 (Forkhead box O1) や、細胞の成長やタンパク質合成を促進する mTOR complex 1 の上流制御因子 TSC2 (tuberous sclerosis complex 2)、脂肪組織や骨格筋においてインスリン応答性の糖輸送担体 Glut4 (glucose transporter 4) の細胞内輸送を制御する AS160 (Akt substrate 160) などが含まれる。他の Akt 基質の機能についての説明は省くが、Akt は多数の Akt 基質のリン酸化を介して、インスリンや IGF の多様な生理活性を仲

介していることが明らかとなっている (Fig. 1-1)。

上述のような細胞内シグナルの調節によって、インスリンや IGF の特定の生理作用が正しい標的組織に正しいタイミングで適切に発現することが、動物個体における正常な物質代謝の維持や個体成長に必須である。一方、細胞内シグナル伝達は何らかの原因によって抑制され、インスリン/IGF の生理活性が発現しにくくなる、いわゆるインスリン/IGF 抵抗性は、II 型糖尿病や成長遅滞などの主な発症要因と考えられている (Jones and Clemmons, 1995; Taniguchi et al., 2006)。臨床上の重要性から、インスリン/IGF 抵抗性の発生機序の解明は鋭意進められてきたものの、IRS のチロシンリン酸化と下流シグナルおよび生理活性の変動が相関しないなど、既知のシグナル伝達機構では説明できない現象が山積している。したがって、インスリン/IGF の細胞内シグナルがどのように調節されているかを解明することは、インスリンや IGF の生理作用の発現を正確にコントロールする基本的なメカニズムを明らかにするのみならず、臨床的にも大きな意義がある。

3. IRS の構造と生理機能

前述のように、IR/IGF-IR によってチロシンリン酸化される細胞内基質は複数存在するが、培養細胞における RNAi (RNA interference) 法やノックアウトマウスを用いた研究から、インスリンや IGF の生理活性、特に成長や代謝に関わる生理活性には、IRS ファミリータンパク質が重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。現在までに、哺乳類の IRS として六種類 (IRS-1-6) が同定されている (Taniguchi et al., 2006)。IRS-1 と IRS-2 は広範な組織で発現しており、IRS-4 の発現は胎児組織や培養細胞に限られている (Uchida et al., 2000)。他の IRS と比較して C 末端領域が短い IRS-3 は、マウスにおいて主に脂肪組織と脳に発現が確認されているが、ヒトの相同分子の発現は現在までに報告がない (White, 2002)。IRS-5 と IRS-6 に関しては、発現組織の分布やシグナル伝達における機能が他の IRS と比較して限定されていると考えられている (Cai et al., 2003)。現在までに、内在性 IRS-5/-6 がチロシンリン酸化されることを示す報告はない。一方、IRS-1/-2/-3/-4 に関しては、ノックアウトマウスを用いた研究を含め、IRS 分子種の中で

も最も機能解析が進んでいる。

IRS は、N 末端の PH ドメインおよび PTB ドメインと、多数のチロシンリン酸化サイトを有した C 末端領域から構成されている点が特徴である (Fig. 1-2)。PTB ドメインは、活性化された IR/IGF-IR 分子内のリン酸化された NPXY モチーフ (X: 任意のアミノ酸) に結合し、受容体による IRS のチロシンリン酸化を促す役割を有する (Myers and White, 1996)。PH ドメインはリン脂質に親和性があることから、IRS を細胞膜へリクルートする働きや、他の結合タンパク質との相互作用を担うと考えられている (Burks et al., 1998)。C 末端領域に複数存在する YMXM モチーフ (X: 任意のアミノ酸) と YV/IN モチーフはチロシンリン酸化されると、それぞれ PI 3-kinase p85 制御サブユニットおよび Grb2 の結合部位となる (Backer et al., 1992; Skolnik et al., 1993b)。PH ドメインと PTB ドメインは IRS 分子種間で高度に保存されているが、C 末端領域の保存性は低い。我々や他のグループは、IRS 分子種の細胞内局在を比較し、IRS-1 は主に細胞内小胞構造に、IRS-2/-4 は細胞質に、IRS-3 は主に核に局在することを明らかにしている (Fig. 1-3C) (Anai et al., 1998; Kabuta et al., 2002; Kabuta et al., 2008)。C 末端領域の差異に加えて、このような細胞内局在の違いによって、IRS 分子種ごとの機能の差異が生じていると考えられている。

IRS のノックアウトマウスを用いた研究から、特に IRS-1 と IRS-2 がインスリン/IGF の物質代謝や成長に関わる生理活性に重要な基質として機能していることが明らかとなった。IRS3^{-/-}マウスと IRS4^{-/-}マウスは成長や糖代謝に大きな変化は認められない (Fantin et al., 2000; Liu et al., 1999)。一方、IRS1^{-/-}マウスは成長遅滞を呈し、同時に末梢組織はインスリンに対する感受性が低下したインスリン抵抗性となるが、インスリン分泌量が補償的に増加しているため、糖尿病症状は進行しない (Araki et al., 1994; Kadowaki et al., 1996)。これに対して、IRS2^{-/-}マウスは、筋肉や肝臓などの標的組織においてインスリン抵抗性を示し、膵臓からのインスリン分泌量も低下することから糖尿病症状と肥満が進行する (Kubota et al., 2000; Withers et al., 1998)。また、骨格筋由来の培養細胞などを用いた解析からも、IRS-1 と IRS-2 がインスリン/IGF 依存的な下流シグナル分子の活性化に必要であることが示されている (Bruning et al., 1997; Formisano et al., 2000; Rose et al., 1994; Wang et al., 1993; Waters et al., 1993)。一連の結果は、IRS 分子種の中でも IRS-1 と IRS-2 がインスリン/IGF シグナル伝達経路において主要な仲介分子として機

能していることを示している。

4. IRS が配置されている細胞内部位と PI 3-kinase の活性化部位

インスリンや IGF の刺激に応答して PI 3-kinase は活性化されるが、PI 3-kinase は他の成長因子やサイトカインによっても活性化される。脂肪細胞を例にすると、インスリンと PDGF (platelet-derived growth factor) はともに PI 3-kinase を活性化するが、糖の膜透過促進活性はインスリンの方がはるかに強い。これらのことから、インスリンと PDGF は同じ PI 3-kinase を活性化するが、インスリンと PDGF それぞれが持つ生理活性を発揮するための特異的な機構の存在が示唆される。この疑問を解決するためのアプローチの一つとして、PI 3-kinase の細胞内局在の違いが検討されている。他の研究グループの報告では、超遠心分離による細胞内分画法を用いて、細胞抽出液から細胞質、細胞膜、そしてエンドソームやゴルジ体などの膜器官を含むマイクロソーム (LDM; low-density microsome) に分画し、PI 3-kinase の活性化を各画分で解析している(Heller-Harrison et al., 1995; Inoue et al., 1998; Ricort et al., 1996)。その結果、脂肪細胞において、PDGF によってチロシンキナーゼ内蔵型の PDGF 受容体が細胞膜画分で活性化し、チロシンリン酸化された PDGF 受容体に PI 3-kinase が結合することから、PI 3-kinase の活性は主に細胞膜画分に検出された。それに対して、インスリンによる IR のチロシンリン酸化は主に細胞膜画分に検出されたが、チロシンリン酸化 IRS は細胞膜画分には少なく、その多くがマイクロソーム画分に認められた (Fig. 1-3A)。また、当研究室の株田らは、GFP (green fluorescent protein) を融合した IRS の細胞内局在を解析し、IRS-1 が細胞内小胞構造に局在することを明らかにした (Fig. 1-3C) (Kabuta et al., 2008)。さらに、インスリン依存的な IRS-1 結合性 PI 3-kinase の活性化は、PDGF の場合とは異なり、細胞膜画分ではなく主にマイクロソーム画分と細胞質画分に検出される (Fig. 1-3B)。加えて、インスリン抵抗性を誘導する酸化ストレスや高インスリン血症などの状態では、マイクロソーム画分の IRS-1 や IRS-1 結合性 PI 3-kinase の活性が低下することも報告されている(Anai et al., 1998; Clark et al., 2000; Tirosh et al., 1999)。これらの知見から、IRS-1 がマイクロソームに配置していることはインスリンや IGF のシグナル伝達に重要な役割を持つことが示唆されている。

IRS-1 は膜貫通ドメインをもたない細胞質型のタンパク質であり、小胞構造へ相互作用するような翻訳後修飾なども報告されておらず、IRS-1 が細胞内小胞に配置される分子機構やその生理的意義はほとんど明らかにされていない。さらに、マイクロソーム画分の IRS-1 が多くチロシンリン酸化されるものの、一部は細胞膜画分にも存在することから、細胞膜と細胞内小胞のどちらに配置された IRS-1 がインスリン／IGF のシグナルを IR/IGF-IR から下流へ伝達しているのかについて統一的な見解に至っていないのが現状である。

5. インスリン／IGF シグナルの下方制御機構

インスリン／IGF で標的細胞を長時間処理すると、下流シグナルの活性が徐々に低下することは古くから知られている。このようなインスリン／IGF シグナルのダウンレギュレーション（下方制御）は、IR/IGF-IR のインターナリゼーションと IRS タンパク質の分解が重要な役割を担っていると考えられている(Taniguchi et al., 2006)。これらの下方制御機構によって、インスリン／IGF に対する脱感作やシグナル伝達の終結が誘導され、シグナル伝達が可能となっている。

IR や IGF-IR は、細胞膜上でそれぞれの特異的リガンドが結合することで活性化すると、細胞内へインターナリゼーションされることが知られている (Fig. 1-4)。これは、細胞膜上の活性化した受容体の数を減少させることで、シグナルを下方制御する役割がある。点変異体を用いた解析から、IR/IGF-IR の膜直下に存在する NPXY モチーフのチロシンリン酸化がインターナリゼーションに必要であることが示されている(Hsu et al., 1994)。さらに、近年 IR/IGF-IR のユビキチン化もインターナリゼーションに重要な役割を担っていることが明らかにされつつある(Girnita et al., 2013)。IR/IGF-IR のインターナリゼーションには、被覆タンパク質であるクラスリンやカベオラ依存的な経路が関与しており、受容体のリン酸化やユビキチン化を識別して種々のアダプター分子がリクルートされることで、受容体が被覆小胞に取り込まれると考えられている。インターナリゼーションした IR/IGF-IR は初期エンドソームに運搬された後、エンドソーム内の酸性環境によってリガンドが受容体から解離する。初期エンドソームに輸送された受容体は後期エンドソームを経てリソソームに運搬されて分解されるか、回収エンド

ソームを経て細胞膜へ運搬されてリサイクルされる。一方、他の受容体チロシンキナーゼや GPCR (G protein coupled receptor) のインターナリゼーションには、シグナル伝達を下方制御する役割に加えて、エンドソームにおいても活性が維持された状態で下流分子を積極的に活性化する役割があることも報告されている (Sorkin and von Zastrow, 2009)。したがって、インターナリゼーションされた IR/IGF-IR も、インスリン/IGF のシグナル経路の活性化に関与している可能性も考えられる。

上述したように、IRS のチロシンリン酸化は、下流シグナル経路を活性化する役割を有する。一方、IRS にはインスリン/IGF の刺激に応答してリン酸化される多数のセリン/スレオニン残基も存在する (Fig. 1-4)。インスリン/IGF で細胞を処理すると、下流シグナル経路を構成する Erk1/2、S6 kinase などの様々なキナーゼによって、IRS のセリン/スレオニン残基がリン酸化されることが明らかとなっている (Copps and White, 2012)。セリン/スレオニンリン酸化された IRS は、IR/IGF-IR との親和性が低下する、細胞内小胞から細胞質へリリースされる、あるいは E3 リガーゼによるユビキチン化を受けてプロテアソームによって分解されることで、下流シグナルが下方制御されると考えられている。また、インスリン抵抗性を誘導する酸化ストレスや遊離脂肪酸、TNF α (tumor necrosis factor α) などの炎症性サイトカインによって活性化される JNK (c-Jun N-terminal kinase)、IKK β (IkB kinase β)、PKC (protein kinase C) などのキナーゼによっても IRS のセリン/スレオニン残基がリン酸化され、IRS のシグナル伝達活性が抑制される。これらのことから、IRS のセリン/スレオニンリン酸化はインスリン/IGF シグナルの下方制御として機能するだけでなく、他の因子のシグナルとのクロストーク機構としても稼働していると言える。

6. AP-1A/AP-2 複合体の機能

先に述べたように、IRS-1 は主に細胞内小胞へ局在することが明らかとなっているが、その分子機構についてはほとんど理解が進んでいない。我々のグループでは IRS と相互作用するタンパク質を yeast two-hybrid 法によるスクリーニングや IRS と共沈降されるタンパク質を質量分析法によって網羅的に同定する過程で、IRS には様々な機能を持った分子が IRS のチロシンリン酸化非依存的に結合していることを見出した (Fukushima et

al., 2010; Hakuno et al., 2007)。中でも、IRS-1 をベイトとした yeast two-hybrid 法によって、クラスリン被覆小胞のアダプター分子である AP-1A 複合体および AP-2 複合体のサブユニット、 $\mu 1A$ と $\mu 2$ を同定した (Fig. 1-5A)。

AP (adaptor protein) 複合体は、クラスリン依存的な膜輸送において積荷タンパク質の選別輸送を担うヘテロ四量体である (Nakatsu and Ohno, 2003; Traub and Bonifacio, 2013)。現在までに哺乳類では AP-1A 複合体と AP-2 複合体に加えて、AP-1B 複合体、AP-3 複合体、AP-4 複合体の機能解析が精力的に行われおり、それぞれの複合体が担っている輸送経路が異なっていることが明らかになっている (Fig. 1-5B)。AP-1A 複合体はゴルジ体のトランス面に相当する TGN とエンドソームの間の輸送を担っていると考えられている。一方、AP-2 複合体は細胞膜からのクラスリン依存的なエンドサイトーシスを担っている唯一の AP 複合体である。AP-3 複合体と AP-4 複合体は、それぞれリソソームとエンドソーム/TGN 間の輸送に関与すると考えられている。また、AP-1B 複合体は、AP-1A 複合体の $\mu 1A$ サブユニットが上皮細胞特異的な $\mu 1B$ サブユニットに置き換わった形で複合体が構成されており、主に側方膜に分布する積荷タンパク質の輸送を担っていると考えられている。

AP 複合体が積荷タンパク質をクラスリン被覆小胞に取り込むメカニズムは、主に TGN 膜上の AP-1A 複合体と細胞膜上の AP-2 複合体について、生化学的かつ構造生物学的な研究によって明らかにされている (Fig. 1-5C) (Jackson et al., 2010; Ren et al., 2013)。ドナー膜に複合体がリクルートされる際、AP-1A 複合体は Arf1-GTPase 依存的に TGN 上へリクルートされ、PI4P (phosphatidylinositol 4 phosphate) と結合する。一方、AP-2 複合体は細胞膜上の PI(4,5)P₂ と結合する。ドナー膜にリクルートされた AP 複合体は、膜貫通型積荷タンパク質の細胞質領域に存在する短いシグナルモチーフを認識する。代表的なシグナルモチーフとして、チロシン残基を含む NPXY モチーフと Yxx Φ モチーフ (x: 任意のアミノ酸、 Φ : 分子量の大きい疎水性アミノ酸)、二つのロイシン残基を含む [DE]xxxL[LI]モチーフが挙げられる。構造生物学的な解析から、Yxx Φ モチーフは $\mu 1A/\mu 2$ により認識される一方、[DE]xxxL[LI]モチーフは主に γ - $\sigma 1/\alpha$ - $\sigma 2$ によって認識されることが示されている (Kelly et al., 2008; Ohno et al., 1995)。NPXY モチーフについては AP-2 複合体の相互作用が生化学的に示されているが、認識するサブユニットは未だ明

らかとなっていない(Boll et al., 2002)。いずれのシグナルモチーフを認識する際も、AP 複合体はドナー膜との相互作用を介して大きなコンフォメーション変化を行って、積荷タンパク質と結合する。積荷タンパク質を認識した AP 複合体は様々なアクセサリー分子をリクルートしながら、重鎖と軽鎖からなるクラスリントリスケリオンと結合し、クラスリン被覆小胞を形成する。最終的に形成された小胞は、その根元を Dynamin GTPase によって切断される。ドナー膜から小胞がリリースされると、小胞から AP 複合体やクラスリンは素早く解離し、次のラウンドの被覆小胞形成にリサイクルされる。このように、AP 複合体はクラスリン被覆小胞の形成過程において、積荷タンパク質の選別を行うと同時に、小胞形成に必要なマシナリーをリクルートする、極めて重要なアダプター分子として認知されている(McMahon and Boucrot, 2011)。

7. 本研究の目的と本論文の構成

以上のような背景から、私は、IRS-1 が AP-1A/AP-2 複合体と相互作用することに着目し、IRS-1 が細胞内小胞と細胞膜へ配置される分子機構とそれぞれの部位で IRS-1 が IGF の活性発現に果たす役割を明らかにすることを目的として本研究に着手した。

本論文の構成は以下の通りである。

第二章

本研究で用いた材料と方法について記述した。

第三章

前述したように、インスリンや IGF の受容体は細胞膜上で活性化されるにも関わらず、IRS-1 は細胞膜に加えて細胞内小胞にも豊富に存在し、IRS-1 結合性 PI 3-kinase 活性も細胞内小胞で認められる。さらに、インスリン抵抗性の状態では細胞内小胞の IRS-1 量が減少することも報告されている。これらを併せると、細胞内小胞に存在する IRS-1 はインスリン/IGF の活性発現に重要な役割を果たしていると推定される。しかし、IRS-1 には膜貫通ドメインや、膜と相互作用する機能的なドメインおよび翻訳後修飾は報告されておらず、IRS-1 が細胞内小胞へ配置される分子機構はほとんど明らかになっていな

い。そこで第三章では、IRS-1 と結合するタンパク質として同定されたクラスリン被覆小胞のアダプターである AP-1A 複合体の構成サブユニット、 μ 1A に着目し、TGN とエンドソームの間の輸送を担っている AP-1A 複合体が、IRS-1 の細胞内小胞への配置に果たす役割とその生理的意義について検討した。

第四章

第四章では、IRS-1 と結合する分子として同定された AP-2 複合体の構成サブユニット、 μ 2 との相互作用が、IRS-1 の細胞内小胞への配置や IGF による細胞増殖誘導に果たす役割を検討した。その結果、AP-1A 複合体とは異なり、AP-2 複合体は IRS-1 の細胞内配置に関与しないことが示唆された。そこで、IRS-1 が AP-2 複合体の積荷タンパク質を認識する μ 2 に結合することから、積荷タンパク質のエンドサイトーシスに競合的に働く可能性を検討することにした。そのために、特に細胞膜に焦点を絞り、IRS-1 と AP-2 複合体が相互作用する分子機構と IGF-IR を含む積荷タンパク質のエンドサイトーシスに IRS-1 が果たす役割について解析した。

第五章

第三章と第四章において、細胞内小胞と細胞膜に配置された IRS-1 が、それぞれ AP-1A 複合体と AP-2 複合体と相互作用することによって、IGF シグナル伝達や生理作用の発現に果たす役割が明らかとなった。一方、インスリン／IGF のシグナル伝達は IRS-1 以外の IRS 分子種によっても仲介されることは前述したとおりである。IRS-1 とは異なり、IRS-2 は主に細胞質に、IRS-3 は核に配置されていることから、このような分子種によって配置される細胞内部位の違いによって、シグナル伝達や生理作用に対して分子種ごとの特有の機能が発揮されるという仮説が予想される。そこで、第五章では、この仮説を証明するために、生細胞の状態では IRS の近傍に位置する分子をビオチン標識することができる BioID 法を用いて、IRS の近傍に存在する分子群を網羅的に解析した。そして、IRS 分子種間で同定された分子の細胞内配置や機能を比較解析することで、IRS 分子種がそれぞれの細胞内部位で形成しているタンパク質相互作用ネットワークについて検証した。

第六章

最後に、本研究で得られた知見と、現在までの報告に基づき、インスリン／IGF の生理活性発現やその調節において、細胞内小胞と細胞膜に配置された IRS-1 が果たす役割について、総合的に議論した。

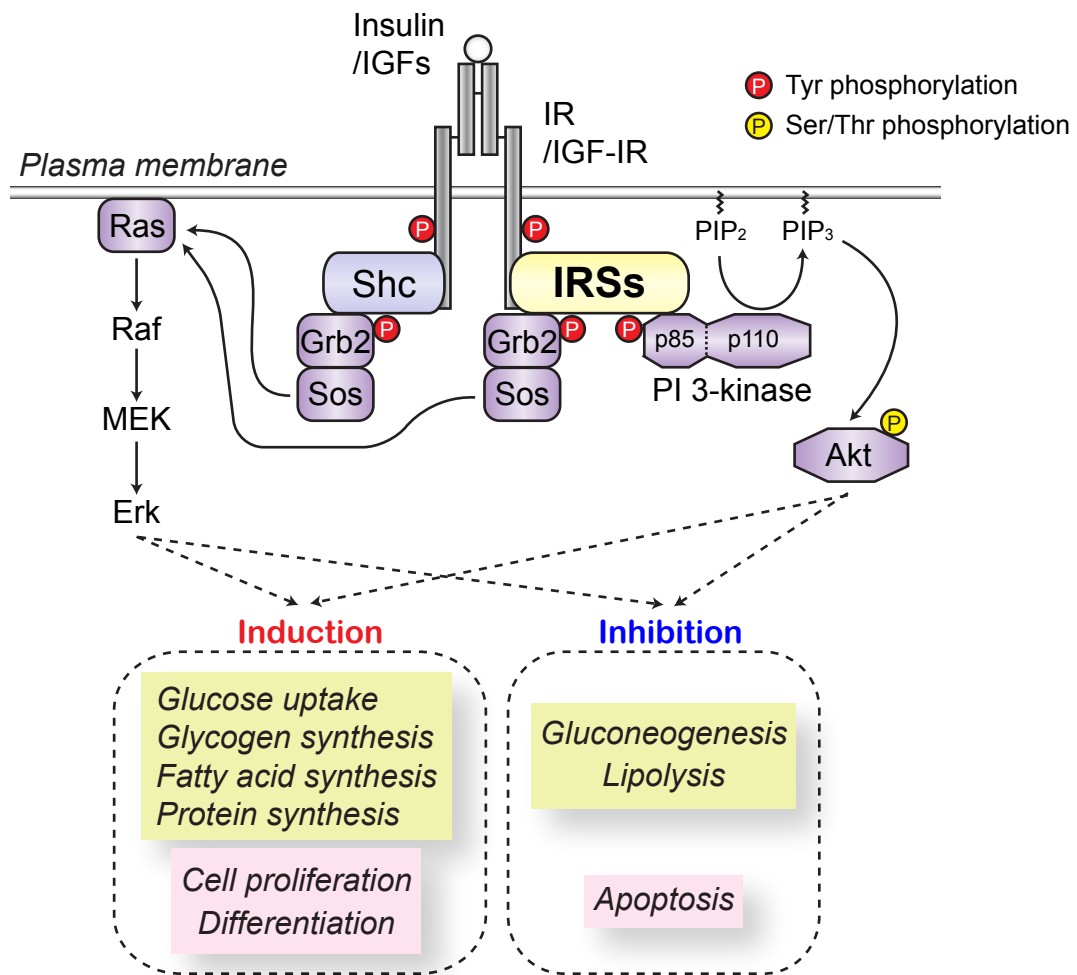


Fig. 1-1 現在受け入れられているインスリン／IGFの細胞内シグナル伝達概念図

インスリンやIGFがそれぞれ特異的な受容体（インスリン受容体(IR)、IGF-I受容体(IGF-IR)）に結合すると、内蔵されたチロシンキナーゼが活性化され、IRSやShcなどの細胞内基質をチロシンリン酸化する。IRSやShcのリン酸化チロシン残基を認識してSH2ドメインを有するPI 3-kinase p85制御サブユニットやGrb2などが結合する。IRSに結合して活性化したPI 3-kinaseは細胞膜上のPI(4,5)P₂をリン酸化してPI(3,4,5)P₃を生成する。PI(3,4,5)P₃を認識してAktやPDK1が膜上へ移行し、PDK1とmTORC2によるリン酸化を受けてAktが活性化される。活性化されたAktは様々な基質をリン酸化する。IRSやShcに結合したGrb2はSosと会合し、膜上のRasを活性化する。活性化されたRasはRafを活性化し、これがMEK、最終的にErkをリン酸化する。これらの経路の活性化を介して、タンパク質合成の促進、糖取り込みやグリコーゲン合成の促進、脂肪酸合成の促進、糖新生や脂肪分解の抑制などの代謝に関わる活性や、細胞増殖や細胞分化の促進、アポトーシスの抑制などの広範な生理活性が発現すると考えられている。

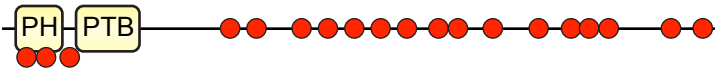
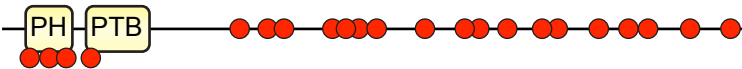
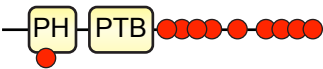
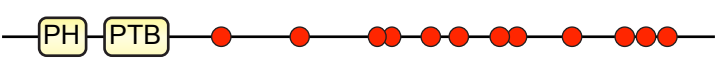
	Structure	● Potential Tyr phosphorylation sites	Molecular weight/kDa
IRS-1		19	180
IRS-2		22	185
IRS-3		9	60
IRS-4		12	180

Fig. 1-2 主なIRSファミリータンパク質の構造

脊椎動物で同定されているIRSファミリータンパク質（IRS-1, -2, -3, -4）の二次構造を示した。また、各IRSにおけるリン酸化され得るチロシン残基（赤丸）の位置と数、およびSDS-PAGEの泳動度から見積もられる各IRSの分子質量を示した。IRSは、N末端のPHおよびPTBドメインと、受容体チロシンキナーゼによってリン酸化される多数のチロシン残基を有するC末端領域から構成される。

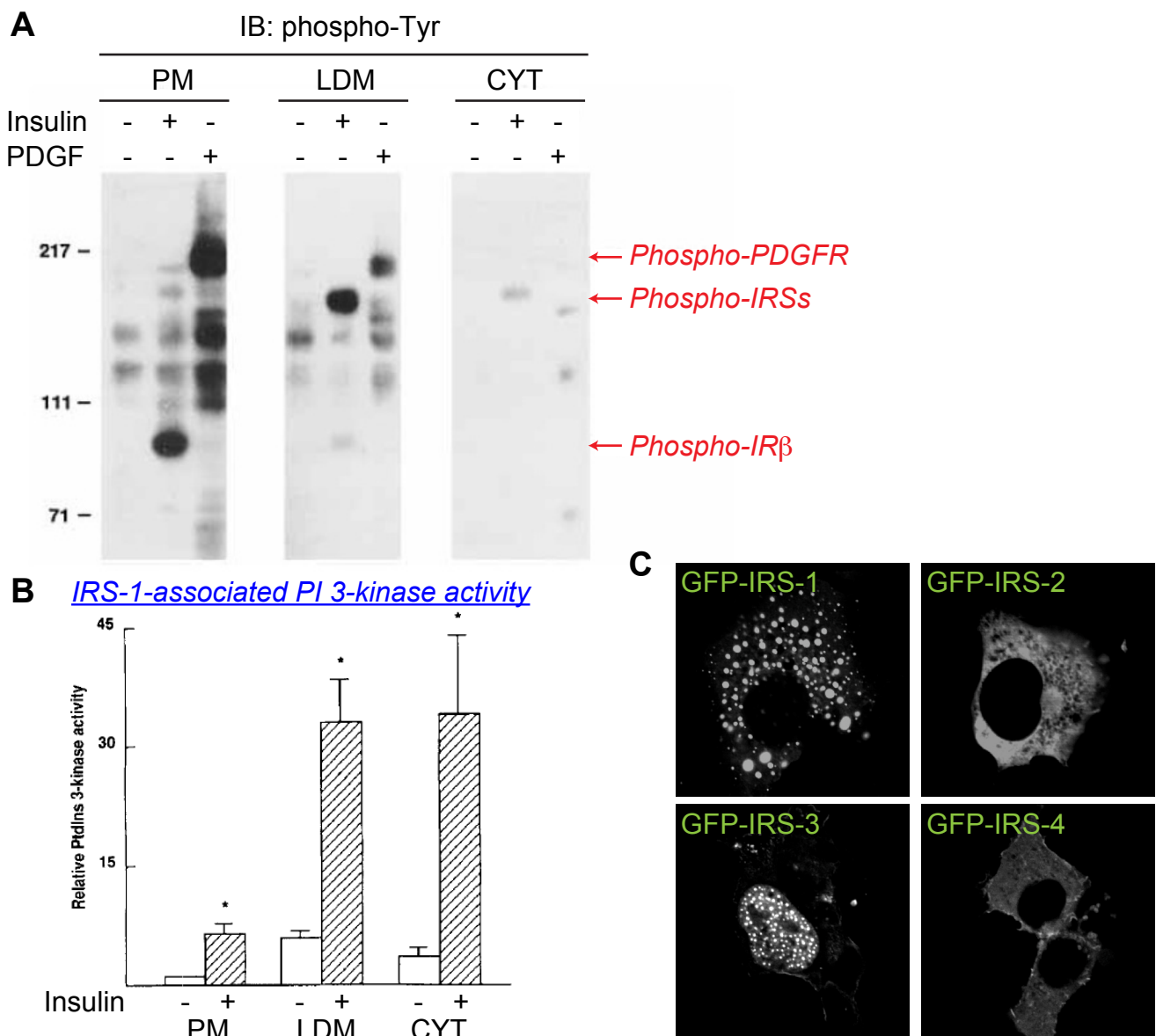


Fig. 1-3 IRSとPI 3-kinaseの活性化の細胞内部位

A チロシンリン酸化されたインスリン受容体、IRS、およびPDGF受容体の細胞内分布。3T3-L1脂肪細胞をインスリンまたはPDGFで処理した。細胞内分画法によって細胞膜（PM; plasma membrane）、マイクロソーム（LDM; low-density microsome）、細胞質（CYT; cytosol）の三画分に分画し、抗phospho-Tyr抗体を用いたimmunoblottingに供した。

B IRS-1結合性PI 3-kinaseの細胞内分布。インスリンで処理した3T3-L1脂肪細胞を細胞内分画法によって分画し、抗IRS-1抗体を用いて免疫沈降した。さらに沈降物を*in vitro* PI 3-kinase assayに供した。

C IRSファミリータンパク質の細胞内局在。N末端にGFPを融合した各IRSをCOS-7細胞に発現させ、共焦点顕微鏡を用いて観察した。

図に示したデータは以下の論文の図を一部改変して掲載した。

A,B: Ricort *et al.*, 1996 Eur J Biochem.

C: Kabuta *et al.*, 2002 J Biol Chem.

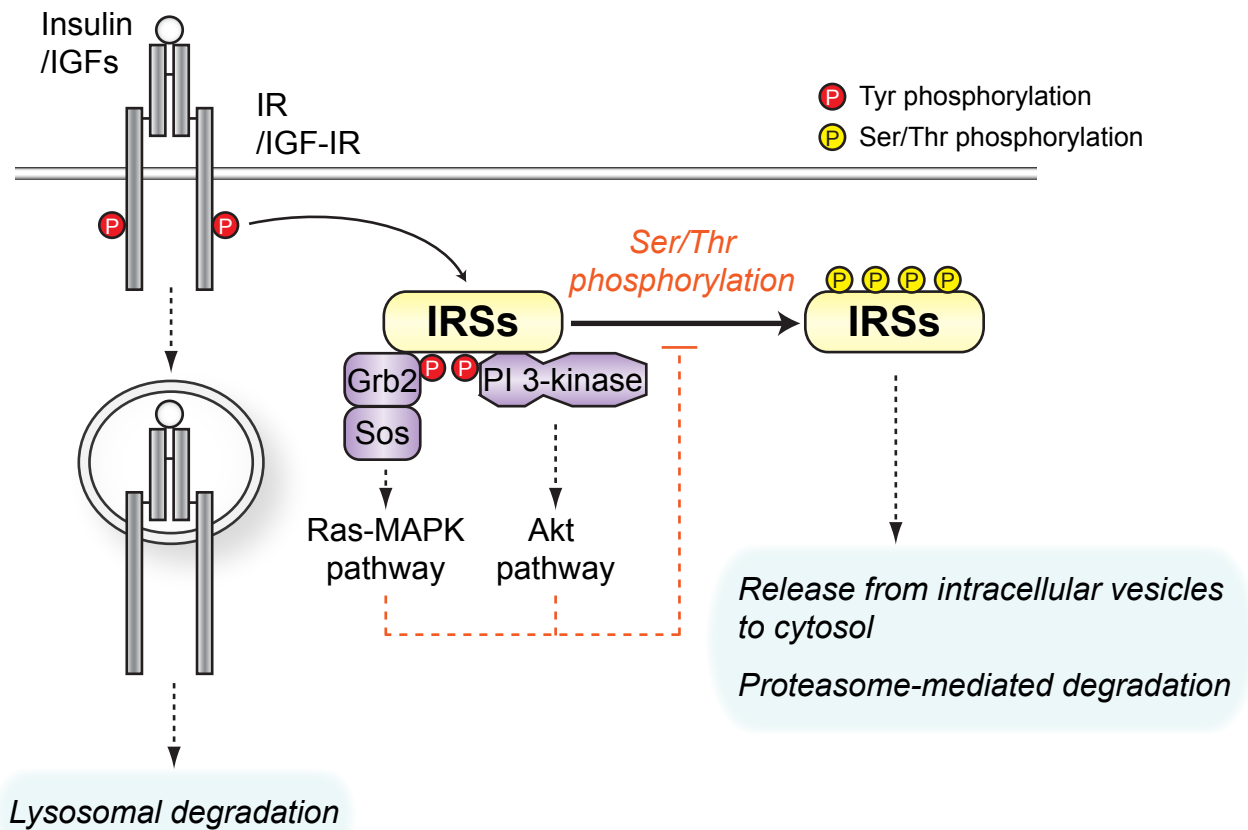


Fig. 1-4 インスリン/IGFシグナルの下方制御機構

インスリン/IGFシグナル伝達経路における主要な二つの下方制御機構を示した。IRやIGF-IRはリガンドの結合依存的にチロシンリン酸化されると、細胞内へクラスリンやカベオラといった被覆タンパク質によってインターナリゼーションされる。この機構によって、細胞膜上の活性化したIRやIGF-IRが減少する。一方IRSは、MAPK経路やAkt経路を構成する種々のキナーゼによってセリン／スレオニンリン酸化されると、細胞内小胞から細胞質へリリースされる、あるいはユビキチン化され、プロテアソームによって分解される。これらの機構によってIRSを介したシグナル伝達が抑制されると考えられている。

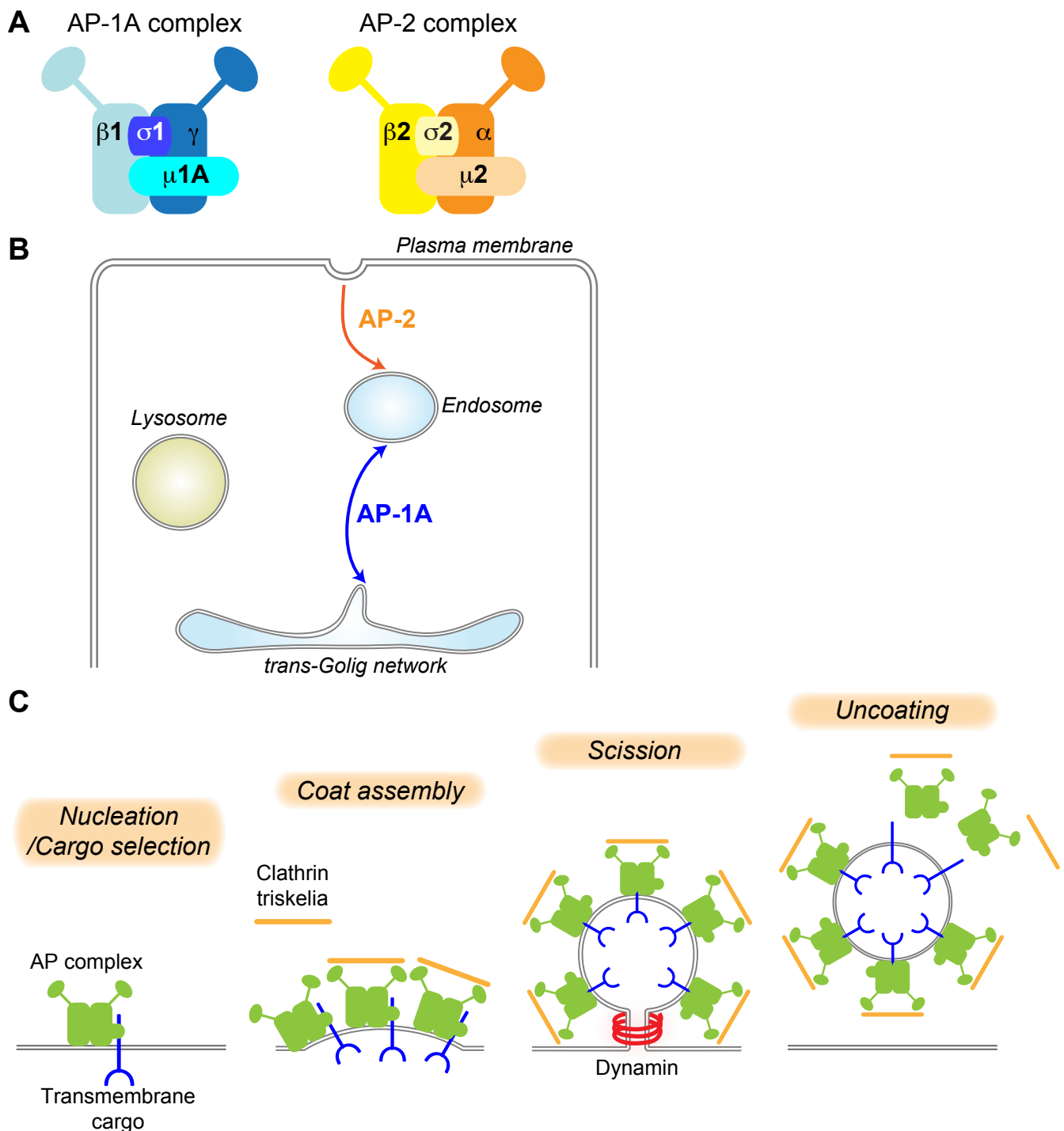


Fig. 1-5 AP-1A/AP-2複合体の構造と輸送経路

A AP-1A/AP-2複合体は4つのサブユニットからなるヘテロ四量体である。AP-1A複合体は γ , $\beta 1$, $\mu 1A$, $\sigma 1$ から、AP-2複合体は α , $\beta 2$, $\mu 2$, $\sigma 2$ から構成される。IRS-1結合タンパク質として同定された $\mu 1A$ と $\mu 2$ は積荷タンパク質のYxx Φ モチーフを認識するサブユニットである。

B AP-1A複合体はトランスゴルジ網とエンドソームの間の両方向性の輸送を担っている。AP-2複合体は細胞膜からのエンドサイトーシスを担っている。

C クラスリン被覆小胞の形成過程の模式図を示した。まず、積荷タンパク質の細胞質領域に存在する特定のモチーフと膜上の特定のイノシトールリン脂質を認識することで、AP複合体が膜上へリクルートされる（Nucleation/Cargo selection）。AP複合体を介してクラスリンがリクルートされ、クラスリン被覆小胞が形成される（Coat assembly）。Dynaminによって被覆小胞の根元で膜が切断され、小胞が膜から解離する（Scission）。膜から解離した被覆小胞から、AP複合体やクラスリンは速やかに解離し、新しい小胞形成サイクルへ利用される（Uncoating）。

第二章 材料と方法

1. DNA の取り扱い

1) 大腸菌の培養

本研究の DNA の取り扱いでは、表 1 に示した大腸菌株を用いた。プラスミド DNA の回収には TOP10 を、プラスミドの構築には DH5 α を用いた。大腸菌は LB 培地（1% polypepton, 0.5% yeast extract, 1% NaCl）で培養した。ベクターの持つ抗生物質耐性マーカーにより、ampicillin（終濃度 50 $\mu\text{g/ml}$ ）、あるいは kanamycin（液体培地：50 $\mu\text{g/ml}$ 、固体培地：15 $\mu\text{g/ml}$ ）を培地に加えた。固体培地（プレート）として使用する際には、寒天を 1.5%添加した。

表 1. DNA の取り扱いで用いた大腸菌株とその遺伝子型

菌株	遺伝子型
TOP10	F ⁻ , <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsd</i> RMS- <i>mcr</i> BC), ϕ 80 <i>lac</i> Z Δ M15 Δ <i>lac</i> X74, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (Str ^R), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>
DH5 α	F ⁻ , ϕ 80 <i>lac</i> Z Δ M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>

2) DNA の組換え実験

DNA の制限酵素による切断、結合、平滑末端化、アガロース電気泳動、大腸菌の形質転換などの操作は、標準的なプロトコルに従って行った(Sambrook et al., 1989)。

3) プラスミドへの部位特異的変異導入

目的の変異が入った相補的プライマー1 組を用意した。以下、ポリメラーゼとして Pyrobest (Takara) を使用し、2 通りの方法で点変異体を作製した。ベクターに挿入された配列の全長をシーケンスして、目的の変異が入っていることを確認した。

(i) 10 \times Pyrobest buffer 2 μl , template DNA 2–20 ng, primer 50 ng, 2.5 mM dNTP mixture 0.4 μl , Pyrobest (5 U/ml) 0.2 μl に水を終量 20 μl になるように加えた。混合物を 90 $^{\circ}\text{C}$ 、30 秒

間反応させた後、[95°C、30 sec ; 55°C、1 min ; 68°C、2 min/kb of plasmid length] の条件で 16 サイクル反応させた。反応産物に *DpnI* (20,000 units/ml) を 0.4 μ l 加えて、37°C で 1 時間反応させた。反応産物 5 μ l を DH5 α に形質転換し、プラスミドを回収した。

(ii) 5'端および 3'端に設計したプライマーと変異導入部位に設計したプライマーを用いて、2 つの断片を PCR (polymerase chain reaction) により増幅した。2 つの PCR 産物をアガロース電気泳動で分離後、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて精製した。それぞれの PCR 産物と、5'および 3'側のプライマーを混合し、PCR により増幅した。増幅した断片を目的のベクターに挿入した。

4) 用いたプラスミド

本研究で使用したプラスミドを実験の用途別に記す。

表 2. 大腸菌リコンビナントタンパク質の発現に用いたプラスミド

#	Construct	Insert	Mutation	Tag	Vector type
1	pGEX- μ 1A WT	Mouse μ 1A	WT	GST	pGEX-5X-3
2	pGEX-N- μ 1A	Mouse μ 1A	Amino Acids 1-145	GST	pGEX-5X-3
3	pGEX-C- μ 1A	Mouse μ 1A	Amino Acids 160-423	GST	pGEX-5X-3
4	pGEX- μ 2 WT	Mouse μ 2	WT	GST	pGEX-5X-3

WT: wild-type, GST: glutathione *S*-transferase

表 3. 培養細胞でのタンパク質の発現に用いたプラスミド

#	Construct	Insert	Mutation	Tag	Vector type
1	pEGFP-IRS-1	Rat IRS-1	WT	EGFP	pEGFP-C1
2	pEGFP-IRS-1 1-255	Rat IRS-1	Amino Acid 1-255	EGFP	pEGFP-3
3	pEGFP-IRS-1 256-443	Rat IRS-1	Amino Acid 256-443	EGFP	pEGFP-C1
4	pEGFP-IRS-1 443-663	Rat IRS-1	Amino Acid 443-663	EGFP	pEGFP-C1
5	pEGFP-IRS-1 663-859	Rat IRS-1	Amino Acid 663-859	EGFP	pEGFP-C1
6	pEGFP-IRS-1 860-1235	Rat IRS-1	Amino Acid 860-1235	EGFP	pEGFP-C1

7	pEGFP-IRS-1 Δ 443-663	Rat IRS-1	Amino Acid Δ 443-663	EGFP	pEGFP-3
8	pEGFP-IRS-1 Y460A	Rat IRS-1	Y460A	EGFP	pEGFP-3
9	pEGFP-IRS-1 Y546A	Rat IRS-1	Y546A	EGFP	pEGFP-C1
10	pEGFP-IRS-1 Y608A	Rat IRS-1	Y608A	EGFP	pEGFP-3
11	pEGFP-IRS-1 Y628A	Rat IRS-1	Y628A	EGFP	pEGFP-C1
12	pEGFP-IRS-1 Y658A	Rat IRS-1	Y658A	EGFP	pEGFP-C1
13	pEGFP-IRS-1 Y2A	Rat IRS-1	Y460A, Y546A	EGFP	pEGFP-3
14	pEGFP-IRS-1 Y608A Y628A	Rat IRS-1	Y608A, Y628A	EGFP	pEGFP-3
15	pEGFP-IRS-1 Y608A Y658A	Rat IRS-1	Y608A, Y658A	EGFP	pEGFP-3
16	pEGFP-IRS-1 Y628A Y658A	Rat IRS-1	Y628A, Y658A	EGFP	pEGFP-C1
17	pEGFP-IRS-1 Y3A	Rat IRS-1	Y608A, Y628A, Y658A	EGFP	pEGFP-3
18	pEGFP-IRS-1 Y5A	Rat IRS-1	Y460A, Y546A, Y608A, Y628A, Y658A	EGFP	pEGFP-3
19	pFLAG-IRS-1	Rat IRS-1	WT	FLAG	pFLAG- CMV
20	pFLAG-IRS-2	Human IRS-2	WT	FLAG	pFLAG- CMV
21	pMycBioID-IRS-1	Rat IRS-1	WT	Myc	pcDNA3.1- mycBioID
22	pMycBioID-IRS-2	Human IRS-2	WT	Myc	pcDNA3.1- mycBioID
23	pMycBioID-IRS-3	Rat IRS-3	WT	Myc	pcDNA3.1- mycBioID

24	pIGF-IR-EGFP	Human	WT	EGFP	pEGFP-N1
		IGF-IR			
25	pIGF-IR-mRFP	Human	WT	mRFP	pCS2-mRFP
		IGF-IR			
26	pIGF-IR-FLAG	Human	WT	FLAG	pCMV-
		IGF-IR			CFLAG
27	pLCa-mRFP	Rat LCa	WT	mRFP	pCS2-mRFP

EGFP: enhanced GFP, mRFP: monomeric red fluorescent protein

表 4. レトロウイルスを用いたタンパク質の発現に用いたプラスミド

#	Construct	Insert	Mutation	Tag	Vector type
1	pMXs-Neo- μ 1A-Myc	Mouse μ 1A	Myc insertion (Amino Acid 230-231)	Myc	pMXs-Neo
2	pMXs-Neo-Myc-IRS-1	Rat IRS-1	WT	Myc	pMXs-Neo
3	pMXs-Neo-Myc-IRS-1 Δ APBR	Rat IRS-1	Amino Acid Δ 443-663	Myc	pMXs-Neo
4	pMXs-Neo-Myc-IRS-1	Rat IRS-1	Y608A, Y628A, Y3A Y658A	Myc	pMXs-Neo
5	pMXs-Neo-Myc-IRS-1 CAAX	Rat IRS-1	Addition of CKCVLS to the C-terminus	Myc	pMXs-Neo
6	pMXs-Neo-FLAG-IRS-1	Rat IRS-1	WT	FLAG	pMXs-Neo
7	pMXs-Neo-GFP-IRS-1	Rat IRS-1	WT	EGFP	pMXs-Neo
8	pMXs-Neo-GFP-IRS-1 Δ APBR	Rat IRS-1	Amino Acid Δ 443-663	EGFP	pMXs-Neo
9	pMXs-Neo-GFP-IRS-1 Y3A	Rat IRS-1	Y608A, Y628A, Y658A	EGFP	pMXs-Neo

2. 抗体

1) 抗 IRS-1 抗体 の 作製

マウス IRS-1 の C 末端配列 (NH₂-PRSEDLSNYASINFWKWPEDRQ-COOH) のペプチドを抗原としてウサギに免疫し、IRS-1 に対する抗血清を当研究室で作製した。抗血清から抗原ペプチドを吸着させたアフィニティーカラムを用いて、抗体を精製した。

2) 本研究で使用した市販抗体

本研究で使用した市販抗体（一次抗体）を表 5 に記す。

表 5. 本研究で使用した一次抗体

#	Antibody	Species	Source
1	Anti-GFP (B-2)	Mouse	Santa Cruz
2	Anti-Myc (9E10)	Mouse	Millipore
3	Anti-FLAG (M2)	Mouse	Sigma
4	Anti-γ-adaptin	Rabbit	Santa Cruz
5	Anti-γ-adaptin	Mouse	BD Transduction Laboratories
6	Anti-μ1A	Mouse	BD Transduction Laboratories
7	Anti-α-adaptin (C-8)	Mouse	Santa Cruz
8	Anti-μ2	Mouse	BD Transduction Laboratories
9	Anti-clathrin heavy chain	Mouse	Santa Cruz
10	Anti-clathrin heavy chain (X22)	Mouse	Abcam
11	Anti-α-tubulin	Mouse	Sigma
12	Anti-β-actin	Mouse	Sigma
13	Anti-EEA1	Goat	Santa Cruz
14	Anti-Rab11	Mouse	BD Transduction Laboratories
15	Anti-transferrin receptor	Mouse	Life Technologies
16	Anti-CI-MPR	Goat	Santa Cruz
17	Anti-LDH-A	Goat	Santa Cruz

18	Anti-TGN38	Mouse	BD Transduction Laboratories
19	Anti-IGF-IR β	Rabbit	Santa Cruz
20	Anti-phospho-IGF-IR β (Tyr1131) /IR β (Tyr1146)	Rabbit	Cell Signaling Technology
21	Anti-phospho-Akt (Ser473)	Rabbit	Cell Signaling Technology
22	Anti-Akt	Rabbit	Cell Signaling Technology
23	Anti-phospho-Erk1/2 (Thr202/Tyr204)	Rabbit	Cell Signaling Technology
24	Anti-Erk1/2	Rabbit	Cell Signaling Technology
25	Anti-phospho-tyrosine (4G10)	Mouse	Sigma
26	Anti-p85 PI 3-kinase	Rabbit	Millipore
27	Anti-Filamin A (PM6/317)	Mouse	Millipore
28	Anti-Filamin A (C-end)	Rabbit	Abcam
29	Anti-HSP90	Mouse	Santa Cruz
30	Anti-IRS-2	Rabbit	Santa Cruz
31	Anti-Grb2	Rabbit	Upstate Biotechnology

3) 本研究で使用した二次抗体

Immunoblotting には、HRP (horseradish peroxidase)-conjugated anti-mouse IgG と HRP-conjugated anti-rabbit IgG (いずれも GE Healthcare)、HRP-conjugated anti-goat IgG (Millipore)を使用した。免疫蛍光染色には各種 Alexa Fluor conjugated-secondary antibody (Life Technologies) を使用した。

3. 細胞培養

1) 細胞培養のための培地

・ 10% CS/DMEM 培地

10% calf serum (CS; ニチレイ), 10 g/L Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; 日水製薬), 1.4 g/L NaHCO₃, 3.5 g/L D(+)-glucose, 50 IU/ml penicillin, 50 μ g/ml streptomycin

- 10% FBS/DMEM 培地

10% fetal bovine serum (FBS; ニチレイ), 10 g/L DMEM, 1.4 g/L NaHCO₃, 3.5 g/L D(+)-glucose, 50 IU/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin

- 無血清培地

0.1% bovine serum albumin (BSA; nacalai tesque) , 10 g/L DMEM, 1.4 g/L NaHCO₃, 50 IU/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin

- トリプシン溶液

9.6 g/L Dulbecco's PBS (日水製薬), 0.25% trypsin (nacalai tesque), 0.02% EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid, disodium salt, dehydrate), 50 IU/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin

- HBSS

9.8 g/L Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS; 日水製薬), 0.30 g/L NaHCO₃

2) 用いた細胞株

- L6 (ATCC #CRL-1458) : ラット骨格筋由来の筋芽細胞である。矢ヶ崎一三博士（東京農工大学農学部）よりご供与いただいた。

- HEK293T (ATCC #CRL-11268) : SV40 large T antigen を高発現した Human Embryonic Kidney 293 細胞である。塩田邦郎博士（東京大学大学院農学生命科学研究科）よりご供与いただいた。

- Plat-E : レトロウイルスのパッケージングのための細胞である。北村俊雄博士（東京大学医科学研究所）よりご供与いただいた。

3) 培養方法

L6 筋芽細胞は 10% FBS/DMEM 培地を用いて培養した。HEK293T 細胞は 10% CS/DMEM 培地を用いて培養した。Plat-E 細胞は終濃度 1 µg/ml の puromycin (Clontech) と 10 µg/ml の blasticidin (InvivoGen) を加えた 10% FBS/DMEM 培地を用いて培養した。細胞は、100 mm culture dish (IWAKI) に培地を 5 ml 入れ、37°C、湿度 100%、CO₂ 濃度 5%の条件下で培養した。培地は 2 日おきに交換した。細胞継代は次のように行った。

すなわち、細胞密度が subconfluent に達した後、培地を除いてトリプシン溶液を 3 ml 加え、37℃で 2-3 分間インキュベートすることで細胞を dish から剥離した。培地を 7 ml 加え細胞を回収し、5 分間 1,000 rpm で遠心した後、細胞を培地で懸濁した。この懸濁液を培地で 1:10 に希釈して dish に播種した。

4) 細胞の処理

- Human recombinant IGF-I : アステラス製薬株式会社よりご供与いただいた。無血清培地で細胞を 16 時間培養後、0.3 M CH₃COOH に溶解した IGF-I を無血清培地で希釈して終濃度 10-100 ng/ml となるように培地に添加した。

- Transferrin from human serum, Alexa Fluor 546 conjugate (Life Technologies): 無血清培地で細胞を 30 分間培養後、終濃度 25 µg/ml の Alexa Fluor 546-transferrin を培地に加え、さらに 30 分間培養することで細胞内に取り込ませた。

- Latrunculin B (Sigma) : Dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解後、終濃度 10 µM に希釈して 20 分間培養することで処理した。

4. 遺伝子導入

1) リン酸カルシウム法を用いたプラスミドの導入

トランスフェクション前日に、100 mm dish に 1×10^6 個の HEK293T 細胞を播種した。DNA 溶液 (2×Hebs (42 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineerhanesulfonic acid (HEPES) , 290 mM NaCl, pH7.1) 500 µl, 70 mM Na₂HPO₄ 10 µl, 各 plasmid 10 µg) を 950 µl 調製した。次に、2.5 M CaCl₂ を 50 µl 加えて 1 分間混合した後、1 ml の 10% CS/DMEM 培地を加えた。この溶液を dish に加えて 3 時間培養後、10% CS/DMEM 培地で培地交換を行い、翌日実験に用いた。

2) Lipofectamine 2000 を用いたプラスミドの導入

L6 筋芽細胞へのプラスミドの導入は、Lipofectamine 2000 (Life Technologies) の添付のプロトコルに従って行った。

5. RNAi 法

1) Lipofectamine RNAiMAX を用いた small interfering RNA (siRNA) の導入

本研究で使用した siRNA の配列を表 6 に記す。siRNA の配列は株式会社 RNAi の設計システム Enhanced siDirect により設計し、同社より siRNA を購入した。L6 筋芽細胞への siRNA の導入は、Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies) の添付のプロトコルに従って reverse transfection 法によって行った。siRNA 導入後 48-72 時間培養し、実験に用いた。

表 6. 本研究で使用した siRNA の配列

siRNA	Sequence
Control	5'-GUACCGCACGUCAUUCGUAUC-3'
IRS-1	5'-CAAUGAGUGUGCAUAAACUUC-3'
μ1A (#1)	5'-CAGACGGAGAAUUCGAACUCA-3'
μ1A (#2)	5'-CUUGUGUGUCGCUAGUAUUCU-3'
γ-adaptin (#1)	5'-CUUCUCAUGACCAAUUGUAUC-3'
γ-adaptin (#2)	5'-GCAUGGUGUAUAGGUGAAUAU-3'
μ2 (#1)	5'-CGAAGUGGCAUUUACGAAACC-3'
μ2 (#2)	5'-CUGCUUUGGGAUAGUAUGAGC-3'

2) レトロウイルスを用いた short hairpin RNA (shRNA) の導入

レトロウイルスを用いた RNAi 法のために、shRNA の配列を添付のプロトコルに従って pSIREN-RetroQ ベクター (Clontech) へクローニングした。本研究で使用した shRNA の配列を表 7 に記す。レトロウイルスの作製と感染の方法は「6. レトロウイルスの作製と感染」の項を参照されたい。

表 7. 本研究で使用した shRNA の配列

shRNA	Sequence
Luciferase	5'-TGCGTTGCTAGTACCAAC-3'

IRS-1 (#1)	5'-GATCAGGCTATCTTCCTT-3'
IRS-1 (#2)	5'-CAGCAAGACCATCAGCTTT-3'
Filamin A (#1)	5'-CAGAATTCACCTGTGGAGA-3'
Filamin A (#2)	5'-TCGCCAACAAGACTACCTA-3'

6. レトロウイルスの作製と感染

1) レトロウイルスの作製

pMXs-Neo に目的遺伝子を組み込んだプラスミド、あるいは pSIREN-RetroQ に目的の shRNA の配列を組み込んだプラスミドを、Lipofectamine 2000 を用いて Plat-E 細胞へ導入した。導入 24 時間後、培養上清を廃棄して新しい培地を加えた。導入 48 時間後から 24 時間おきに培養上清を回収し、孔径 0.45 μm のメンブレンフィルターに通したものを感染実験に用いた。

2) レトロウイルスの感染

レトロウイルスを含む培養上清と培地を 1:1 の割合で混合し、polybrene を終濃度 2 $\mu\text{g/ml}$ となるように加えた。この混合液中で L6 筋芽細胞を 24 時間培養することで、レトロウイルスを感染させた。感染 48 時間後から、レトロウイルスベクターに挿入されている耐性マーカー遺伝子に応じて、G418 (400 $\mu\text{g/ml}$; nacalai tesque) あるいは puromycin (2.5 $\mu\text{g/ml}$) を加えた培地で約 1 週間培養し、レトロウイルスに感染した細胞を選択した。安定発現株を取得する場合は、コロニーを形成した細胞塊を、トリプシン溶液をしみ込ませた濾紙を用いて剥がし、各クローンにおける外来遺伝子産物の発現を immunoblotting で確認した。最低 3 クローンを樹立し、クローン間で同様の結果を得られることを確認した後、実験に用いた。

7. SDS-PAGE、CBB 染色、銀染色、および Immunoblotting 分析

1) 用いたバッファーと染色液の組成

・泳動用バッファー:

50 mM Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane) -HCl, 380 mM glycine, 2 mM EDTA, 0.1% SDS (sodium dodecyl sulfate), pH 8.75

- 転写バッファー:

25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol

- TBS:

20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.6

- TBS-T:

20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% Tween 20, pH 7.6

- Blocking buffer A:

3% BSA, 20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.6

- CBB 溶液

0.25% Coomassie brilliant blue (CBB) R-250, 40% methanol, 7% acetic acid

- 脱染液

1% acetic acid, 49% methanol

2) SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis)、CBB 染色、および銀染色

標準的なプロトコルに基づいて、7～15% SDS-PAGE をミニ泳動槽 (ATTO) を用いて、30 mA 定電流下で約 2 時間行った。CBB 染色は以下の方法で行った。すなわち、SDS-PAGE を行ったアクリルアミドゲルを CBB 溶液に 1 時間浸した後、脱染液に浸して脱染した。アクリルアミドゲルの銀染色は、SilverQuest Silver Staining Kit (Life Technologies) を用いて添付のプロトコルに従って行った。

3) Immunoblotting に使用した抗体の希釈

一次抗体は blocking buffer A に NaN_3 を終濃度 0.025% 加えたものを用いて希釈した。市販の一次抗体は添付のプロトコルに従って推奨された希釈倍率で希釈した。抗 IRS-1 抗体は同バッファーで 1:2000 に希釈した。二次抗体や streptavidin-HRP conjugate (GE Healthcare) は、0.5% skim milk/TBS-T を用いて、添付のプロトコルに従って推奨された希釈倍率で希釈した。

4) Immunoblotting

SDS-PAGE に続いて、Trans Blot Cell (Bio Rad) を用いて 220 mA、10 時間の条件で PVDF (polyvinylidene fluoride) 膜にタンパク質を転写した。その後、PVDF 膜を TBS

で洗浄し、blocking buffer A に浸して室温で 1 時間ブロッキングを行った。希釈した一次抗体を用いて、転写した PVDF 膜を 4°C で一晩インキュベートした後、TBS-T で 3 回洗浄した。続いて、希釈した二次抗体を用いて PVDF 膜を室温で 1 時間インキュベートした後、TBS-T で 3 回洗浄した。ビオチン化タンパク質の検出には、転写した PVDF 膜を希釈した streptavidin-HRP を用いて室温で 1 時間インキュベートした後、TBS-T で 3 回洗浄した。最後に、Enhanced chemiluminescence kit (PerkinElmer) を用いて、添付のプロトコルに従って X 線フィルム (FUJIFILM) に露光し、タンパク質を検出した。

5) バンド強度の定量

Immunoblotting によって得られたバンドの強度は、X 線フィルムをスキャナーで画像として取り込んだ後、ImageJ によって測定した。得られた値から、各バンドの強度の平均値と標準誤差を求めた。

8. Pull-down アッセイ

1) GST 融合タンパク質の精製

GST 融合タンパク質の発現には、大腸菌 BL21 [F^- , *ompT*, *hsdS_B* ($r_B^-m_B^-$), *gal*, *dcm*] を用いた。大腸菌を終濃度 50 $\mu\text{g/ml}$ となるように ampicillin を加えた LB 培地で 37°C で $\text{OD}_{600} = 0.6-0.8$ に達するまで培養した。さらに 26°C に移して一晩培養した後、菌体を遠心回収した。菌体重量の 10 倍体積に相当する PBS+T+PI (PBS(-) (10 mM phosphate buffer, 200 mM NaCl, 3.6 mM KCl, pH 7.4), 1% Triton X-100, 100 KIU/ml aprotinin, 10 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin, 5 $\mu\text{g/ml}$ pepstatin, 20 $\mu\text{g/ml}$ PMSF (phenyl methyl sulfonyl fluoride)) 中で菌体を懸濁し、氷上にて超音波破碎を 1 分間ずつ数回に分けて行った。その後、4°C、10,000 $\times g$ で 15 分間遠心し、上清を回収した。あらかじめ PBS+T [PBS(-), 1% Triton X-100] で平衡化した Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare) を加えて、4°C で 1.5 時間混和した。ゲル担体を PBS+T で 3 回洗浄した。サンプルの一部に 3 \times Laemmli's buffer solution (30 mM Tris-HCl, 9% SDS, 15% glycerol, 6% 2-mercaptoethanol, 0.05% bromophenol blue) を加えて 95°C で 5 分間煮沸後、SDS-PAGE および CBB 染色に供し、精製したタンパク質の純度と量を確認した。

2) Pull-down アッセイ

培地を吸引除去し、PBS(-) で細胞を洗浄した。Lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 100 KIU/ml aprotinin, 500 μ M Na₃VO₄, 10 μ g/ml leupeptin, 5 μ g/ml pepstatin, 20 μ g/ml PMSF, 10 μ g/ml PNPP (*p*-nitrophenylphosphate), pH 7.4) を加えて掻きとり、ピペッティング後、4°C、16,100 \times g で 10 分間遠心して上清を回収した。BCA Protein Assay Kit (Pierce) を用いてタンパク質濃度を測定し、lysis buffer を用いて細胞抽出液を濃度 1 mg/ml、全量 1 ml となるよう調整した。細胞抽出液に、精製した GST 融合タンパク質をゲル担体に結合させた状態で 100 pmol 加えて、4°C で 1.5 時間インキュベートした。ゲル担体を lysis buffer で 3 回洗浄し、3 \times Laemmli's buffer solution を加え、95°C で 5 分間煮沸してサンプルとした。

9. 免疫沈降

1) IRS-1 と AP-1A 複合体の共免疫沈降

L6 筋芽細胞を PBS(-)で洗浄した後、buffer A (150 mM NaCl, 10 mM HEPES, 1 mM EGTA (ethylene glycol tetraacetic acid), 0.1 mM MgCl₂, 100 KIU/ml aprotinin, 500 μ M Na₃VO₄, 10 μ g/ml leupeptin, 5 μ g/ml pepstatin, 20 μ g/ml PMSF, 10 μ g/ml PNPP, pH 7.4) + 0.5 % Triton X-100 を加えて、氷上で 30 分間静置して溶解した。細胞を回収した後、16,100 \times g で 15 分間遠心した。Buffer A + 0.5% Triton X-100 を用いて細胞抽出液を濃度 1 mg/ml、全量 1 ml となるよう調整した。あらかじめ抗 IRS-1 抗体を吸着させた nProtein A Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare) を加え、4°C で一晩インキュベートした。ゲル担体を buffer A + 0.1% Triton X-100 で 5 回洗浄し、3 \times Laemmli's buffer solution を加え、95°C で 5 分間煮沸してサンプルとした。

2) 抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降

細胞を PBS(-)で洗浄した後、lysis buffer を加えて掻きとり、ピペッティング後、4°C、16,100 \times g で 10 分間遠心して上清を回収した。Lysis buffer を用いて細胞抽出液を濃度 1 mg/ml、全量 1 ml となるよう調整した。あらかじめ lysis buffer で平衡化した Anti-FLAG M2 Affinity Gel (Sigma) を加え、4°C で 2 時間インキュベートした。ゲル担体を lysis buffer

で5回洗浄し、3× Laemmli's buffer solution を加え、95℃で5分間煮沸してサンプルとした。

3) その他の免疫沈降

細胞抽出液を2)の方法で調製した。抗体を1 µl 加えて、4℃で一晩インキュベートした。マウスモノクローナル抗体を用いた場合には Protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare)、ラビットポリクローナル抗体を用いた場合は nProtein A Sepharose 4 Fast Flow をそれぞれ lysis buffer で平衡化した後に加え、さらに2時間インキュベートした。ゲル担体を lysis buffer で3回洗浄し、3×Laemmli's buffer solution を加え、95℃で5分間煮沸してサンプルとした。

10. 細胞内分画法

TES buffer (20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 255 mM sucrose, 500 µM Na₃VO₄, 10 µg/ml leupeptin, 5 µg/ml pepstatin, 20 µg/ml PMSF, 100 KIU/ml aprotinin, 10 µg/ml PNPP, pH 7.4) で細胞を洗浄後、TES buffer を加えて細胞を掻きとった。続いて 27 gauge の針を付けた注射筒を用いて 20 回ピペッティングし、細胞を破碎した。10,000 ×g、4℃で15分間遠心して上清 (A) と沈殿物 (B) を取得した。以降の超遠心操作は超遠心機 Optima TLX (BECKMAN COULTER) とローター TLA-55 (BECKMAN COULTER) を用いて 4℃で行った。上清 (A) を 48,000 ×g で 20 分間遠心し、沈殿物として high-density microsomal (HDM) 画分を得た。上清をさらに 186,000 ×g で 80 分間遠心し、沈殿物として low-density microsome (LDM) 画分を得た。この際、回収した上清を cytosol (CYT) 画分とした。次に、一度目の遠心で得られた沈殿物 (B) を TES buffer で再懸濁した後、sucrose cushion (20 mM Tris-HCl, 1.12 M sucrose, 1 mM EDTA, pH 7.4) に上層し、101,000 ×g、4℃で70分間遠心した。得られた中間層を回収した後、48,000 ×g、4℃でさらに45分間遠心し、沈殿物として plasma membrane (PM) 画分を得た。各画分の沈殿物は RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 100 KIU/ml aprotinin, 500 µM Na₃VO₄, 10 µg/ml leupeptin, 5 µg/ml pepstatin, 20 µg/ml PMSF, 10 µg/ml PNPP, pH 8.0) に懸濁した。それぞれの画分において、各処理間でタンパク質濃度を合

わせた後、3× Laemmli's buffer solution を加えて 95℃で 5 分間煮沸して、サンプルとした。

11. 細胞膜タンパク質のビオチン標識と単離

PBS(+) (PBS(-), 0.1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2) で細胞を洗浄後、EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce) を終濃度 0.5 mg/ml で溶解した PBS(+) 中で、4℃で 30 分間インキュベートした。50 mM glycine/PBS(+) で細胞を 5 分間インキュベートすることを 2 回繰り返し、残存する NHS-LC-biotin を不活化した。細胞を PBS(-) で洗浄した後、buffer B (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 100 KIU/ml aprotinin, 500 μM Na_3VO_4 , 10 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin, 5 $\mu\text{g/ml}$ pepstatin, 20 $\mu\text{g/ml}$ PMSF, 10 $\mu\text{g/ml}$ PNPP, pH 7.4) を加えて細胞を回収した。超音波破碎後、4℃、16,100 ×g で 10 分間遠心して上清を回収した。Buffer B であらかじめ平衡化した Streptavidin Agarose (Pierce) を上清に加え、4℃で一晩インキュベートした。ゲル担体を buffer B で 5 回洗浄し、3× Laemmli's buffer solution を加え、95℃で 5 分間煮沸してサンプルとした。

12. BioID 法

1) IRS の近傍に位置するタンパク質のビオチン化標識とビオチン化タンパク質の単離

BioID (proximity-dependent biotin identification) 法は Roux らの方法に改良を加えて行った(Roux et al., 2012)。

E. coli 由来タンパク質ビオチンリガーゼの改良型である BirA*を融合した IRS を発現する HEK293T 細胞を、終濃度 50 μM となるようにビオチンを添加した 10% CS/DMEM で 24 時間培養した。PBS(-)で 3 回細胞を洗浄した後、buffer C (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 0.4% SDS, 5 mM EDTA, 1mM dithiothreitol, 100 KIU/ml aprotinin, 500 μM Na_3VO_4 , 10 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin, 5 $\mu\text{g/ml}$ pepstatin, 20 $\mu\text{g/ml}$ PMSF, 10 $\mu\text{g/ml}$ PNPP, pH 7.4) を加えて細胞を回収し、室温で超音波破碎した。Triton X-100 を終濃度 2%となるように加えて、さらに超音波破碎した。氷冷した 50 mM Tris-HCl, pH7.4 を等量加え、氷上で超音波破碎した後、4℃、16,100 ×g で 15 分間遠心して上清を回収した。Buffer C であらかじめ平

衡化した Streptavidin Agarose を上清に加え、4℃で一晩インキュベートした。ゲル担体を遠心回収し、2% SDS/H₂O で再懸濁して、室温で 8 分間洗浄した。この作業をもう 1 回繰り返した後、0.1% deoxycholate, 1% Triton X-100, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM HEPES, pH7.5 で 1 回、250 mM LiCl, 0.5% NP-40, 0.5% deoxycholate, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH8.1 で 1 回、50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH7.4 で 2 回洗浄した。ゲル担体の一部に 3× Laemmli's buffer solution を加え、95℃で 5 分間煮沸して銀染色と immunoblotting 用のサンプルとした。また、以降のトリプシン消化のために、ゲル担体は 50 mM NH₄HCO₃ で 2 回洗浄した。

2) 質量分析法によるタンパク質の同定

ゲル担体から 3× Laemmli's buffer solution を用いて溶出したサンプルは、SDS-PAGE に供した後、銀染色を行ってタンパク質を可視化した。バンドを含むゲル小片をカミソリで切り出した後、SilverQuest Silver Staining Kit に付属されているバッファーを用いて脱染した。脱染したゲルに含まれるタンパク質は、理化学研究所・吉田化学遺伝学研究室との共同研究により、LC-MS/MS によって決定した。

ラージスケールの網羅的解析には、ゲル担体に結合するタンパク質を直接トリプシンで消化したサンプルを用いた。TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphine) を終濃度 50 mM となるようにゲル担体溶液に加え、37℃で 30 分間還元処理した。50 mM NH₄HCO₃ で 10 分間洗浄した後、iodoacetamide を終濃度 20 mM となるように加え、遮光した条件のもと 37℃で 40 分間反応させ、タンパク質をアルキル化した。50 mM NH₄HCO₃ で 1 分間洗浄した後、Trypsin Gold (Promega) を 2 µg 加え、37℃で一晩インキュベートした。トリプシン消化したサンプルは、吉田化学遺伝学研究室との共同研究により、LC-MS/MS によって決定した。MSCOT 上でリストアップされた分子のうち、2 ペプチド以上同定された分子を解析対象とした。

13. 免疫蛍光染色

1) 抗体と蛍光プローブの希釈

一次抗体、二次抗体ともに、blocking buffer B (3% BSA/PBS(-), 0.025% NaN₃) を用い

て添付のプロトコルに従って推奨された希釈倍率で希釈した。核の染色には、DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) (Sigma) を終濃度 0.5 $\mu\text{g/ml}$ となるように、アクチン繊維の染色には、TRITC (tetramethylrhodamine isothiocyanate)-conjugated phalloidin (Sigma) を終濃度 0.5 $\mu\text{g/ml}$ となるように、二次抗体希釈液に添加して用いた。Streptavidin Alexa Fluor 488 conjugate (Life Technologies) は終濃度 1 $\mu\text{g/ml}$ となるように二次抗体希釈液に添加して用いた。

2) 一般的な免疫蛍光染色

細胞をカバーガラス (MATSUNAMI) の上に播種した。培地を吸引除去した後、4% paraformaldehyde/PBS(-)を加え、室温で 15-20 分間静置することで細胞を固定した。PBS(-)で 3 回洗浄した後、0.25% Triton X-100/PBS(-)を加え、室温で 5 分間静置することで透過化処理を行った。PBS(-)で 3 回洗浄した後、blocking buffer B を加え、室温で 1 時間インキュベートした。Blocking buffer B を除き、希釈した一次抗体を加え、4°Cで一晩インキュベートした。PBS(-)で 3 回洗浄した後、希釈した二次抗体および蛍光色素を加え、室温で 1 時間インキュベートした。PBS(-)で 3 回洗浄した後、カバーガラスをスライドガラス (MATSUNAMI) に VECTASHIELD Mounting Medium (Vector Laboratories) を用いてマウンティングした。

3) γ -adaptin の免疫蛍光染色

Anti- γ -adaptin antibody (BD Transduction Laboratories) を用いた免疫蛍光染色の場合は、メタノール固定を行った。すなわち、培地を吸引除去した後、-80°Cに冷やしたメタノールを加え、-20°Cで 4 分間インキュベートした。PBS(-)で 3 回洗浄した後、blocking buffer B を加え、室温で 1 時間インキュベートした。以降、2) と同様の手順で免疫蛍光染色を行った。

14. 蛍光顕微鏡と画像解析

1) 共焦点顕微鏡を用いた観察と解析

固定したサンプルの観察には共焦点顕微鏡 FV-1200 (Olympus) を用いた。取得した画

像は FIUOVIEW Ver.4.1 (Olympus) と Photoshop CS3 (Adobe) を用いて解析した。蛍光強度の測定は ImageJ を用いて行った。対象細胞をゲーティングして、領域内の蛍光シグナル強度を測定した後、細胞のない領域をゲーティングしてバックグラウンドの蛍光シグナル強度を測定した。対象領域のシグナル強度からバックグラウンドのシグナル強度を引いた値を測定し、平均値と標準誤差を求めた。定量的な共局在の解析は、FIUOVIEW Ver.4.1 を用いて、各画像から Pearson's coefficient を求めることで行った。

2) タイムラプスイメージング

HEK293T 細胞を、Collagen Type I (Koken) でコートしたガラスボトムディッシュ (MATSUNAMI) に播種した。プラスミドを導入した後、電動ステージおよび湿度 100% と 5% の CO₂ を保つチャンバーを搭載した倒立顕微鏡 IX81 (Olympus) を用いて、経時的に細胞を観察した。取得した画像は、Metamorph software (Molecular Devices) を用いて解析した。

3) 全反射顕微鏡を用いた観察と解析

固定したサンプルの全反射顕微鏡画像の取得には、Cascade II EMCCD camera (Roper Scientific) と開口数 1.46 の 100 倍対物レンズを搭載した True MultiColor Laser TIRF Leica AM TIRF MC (Leica) を用いた。取得した画像は、LAS AF Lite Ver.3.x (Leica) と Photoshop CS3 を用いて解析した。全反射顕微鏡を用いた実験は、物質・材料研究機構 ナノテクノロジー融合ステーションにて、行わせていただいた。

15. 細胞増殖の解析

1) DNA 合成の測定

2.0×10^4 個の L6 筋芽細胞を 48-well plate (IWAKI) に播種した。HBSS で 3 回洗浄後、無血清培地で 12 時間培養し、IGF-I を添加した無血清培地に交換してさらに 12 時間培養した。[Methyl-³H]thymidine (1 mCi/ml; GE Healthcare) を 0.3 μ Ci/well となるように加え、4 時間培養することで新規合成された DNA を標識した。1M ascorbic acid を加えて反応を停止し、PBS(-)で 2 回洗浄した。さらに、10% trichloroacetic acid で 2 回洗浄した。

DNA を含む沈殿物を 0.2 NaOH, 0.1% SDS で溶解し、クリアゾル II (nacalai tesque) と混合した後、その放射活性を液体シンチレーションカウンター (Hitachi-Aloka Medical) を用いて測定した。

2) 計数による細胞増殖の測定

4.0×10^4 個の L6 筋芽細胞を 35 mm dish (IWAKI) に播種した。終濃度 100 ng/ml の IGF-I を添加した 1% FBS を含む DMEM 培地で細胞を培養した。トリプシン溶液で細胞を剥離した後、トリパンプルー溶液 (Sigma) で死細胞を染色した。血球計算板を用いて、トリパンプルー非染色細胞数を各 dish あたり 3 回計数し、その平均値を dish ごとの細胞数とした。培地交換と細胞計数を毎日行い、計数結果をもとにグラフを作成した。

16. アミノ酸配列の種間比較

ClustalX2 を用いて、種々の脊椎動物の IRS-1 のアミノ酸配列を比較した。ClustalX2 の結果は EMBL ウェブサイトで利用可能な Boxshade を用いて、色付けした。以下、配列比較を行った各生物種の IRS-1 配列のアクセッション番号を示す。*Rattus norvegicus* – NP_037101.1, *Mus musculus* – NP_034700.2, *Homo sapiens* – NP_005535.1, *Pan troglodytes* – XP_001134895.1, *Canis familiaris* – XP_543274.2, *Bos Taurus* – XP_581382.2, *Gallus gallus* – XP_426682.2, *Danio rerio* – XP_687702.3, *Xenopus laevis* – NP_001084092.1

17. 統計解析

データは平均値±標準誤差 (Means ± SE) で表した。2 群間の比較は、Student's *t* 検定を用いて行った。2 群以上の比較は ANOVA (analysis of variance) および *post hoc* 検定として Tukey 検定を用いて行った。本研究では 0.05 未満の *P* 値を統計的な有意差として扱った。

第三章 AP-1A 複合体による IRS-1 の細胞内小胞への配置機構とその生理的意義の解明

緒言

第一章で詳述したように、IRS-1 が細胞内小胞へ配置される分子機構や、それがインスリン/IGF シグナル伝達や生理作用の発現に果たす役割は、ほとんどわかっていない。一方、我々のグループは yeast two-hybrid 法を用いたスクリーニングによって、IRS-1 と結合するタンパク質として AP-1A 複合体の μ 1A サブユニットを同定した (Fig. 3-1)。AP-1A 複合体は、TGN とエンドソームの間で積荷タンパク質の選別輸送を担っており、 μ 1A は Yxx Φ タイプの積荷タンパク質を認識するサブユニットとして機能している。そこで本章では、AP-1A 複合体が IRS-1 を細胞内小胞へ配置する分子機構を検討した。さらに、IGF-I によって細胞増殖が亢進することが知られている L6 筋芽細胞を用いて、AP-1A 複合体による IRS-1 の細胞内配置の制御が、IGF によって誘導される細胞増殖に果たす役割を検討した。

結果

AP-1A 複合体の μ 1A サブユニットは IRS-1 と相互作用する

以前当研究室により yeast two-hybrid 法で単離された cDNA は、 μ 1A のアミノ酸残基番号 164-423 に相当する C 末端領域をコードしており、全長の μ 1A と IRS の相互作用は調べられていない。そこでまず、IRS-1 と μ 1A の相互作用を pull-down アッセイによって検討した。 μ 1A は、AP-1A 複合体本体を構成する β -adaptin と相互作用する N 末端ドメイン (N- μ 1A) と Yxx Φ タイプの積荷を認識する C 末端ドメイン (C- μ 1A) で構成されている (Fig. 3-1B、左)。まず、GST を融合した μ 1A 全長、N- μ 1A (μ 1A のアミノ酸残基番号 1-145)、C- μ 1A (μ 1A のアミノ酸残基番号 160-423) を、大腸菌発現系を用いて精製した (Fig. 3-1B、右)。L6 筋芽細胞から抽出液を調製し、精製した GST- μ 1A あるいは GST のみと混合して、pull-down アッセイに供した。その結果、IRS-1 は μ 1A 全

長と C- μ 1A に結合することが明らかとなった (Fig. 3-1C)。

次に、内在性 IRS-1 が細胞内で AP-1A 複合体と相互作用しているかを調べるために、L6 筋芽細胞を用いて共免疫沈降実験を行った。その結果、AP-1A 複合体の γ -adaptin が IRS-1 と共沈降することがわかった (Fig. 3-1D)。以上の結果から、IRS-1 は細胞内で μ 1A を介して AP-1A 複合体と結合していることが示された。

AP-1A 複合体の発現抑制によって、細胞内小胞画分の IRS-1 量が減少する

細胞内小胞への IRS-1 の配置に対して、IRS-1 が AP-1A 複合体と相互作用することの役割を検討するために、L6 筋芽細胞に siRNA を導入して AP-1A 複合体のサブユニットを発現抑制した。AP-1A 複合体は四量体の形で細胞内に存在しており、いずれのサブユニットが欠損しても複合体に組み込まれなかった残りのサブユニットが不安定化することが知られている (Meyer et al., 2000)。 μ 1A または γ -adaptin に対する siRNA を L6 筋芽細胞に導入したところ、各サブユニットのタンパク質レベルが低下していることが確認できた (Fig. 3-2A)。また、細胞内分画法によって L6 筋芽細胞の細胞内膜成分を分画したところ、細胞膜 (PM) 画分には IRS-1 はほとんど検出されないのに対して、AP-1A 複合体やいくつかのエンドソームマーカータンパク質 (Rab11、CI-MPR など) が含まれる low-density microsome (LDM) 画分に大部分の IRS-1 が存在することがわかった (Fig. 3-2B)。加えて、IGF-I 刺激に応答して、LDM 画分に存在する IRS-1 が減少し、細胞質 (CYT) 画分の IRS-1 が増加した。これは、インスリン刺激した脂肪細胞で観察された先行研究の挙動と一致している (Heller-Harrison et al., 1995)。一方 μ 1A または γ -adaptin を発現抑制すると、全体の IRS-1 量には変化は見られないが (Fig. 3-2A)、LDM 画分に存在する IRS-1 量が減少し、CYT 画分に存在する IRS-1 量が増加することがわかった (Fig. 3-2C and D)。PM 画分に存在する IRS-1 量は対照細胞と μ 1A/ γ -adaptin を発現抑制した細胞ともにほとんど検出されなかったことから (Fig. 3-2C)、AP-1A 複合体は IRS-1 の細胞膜への配置に関与していないと考えられた。

AP-1A 複合体の発現抑制によって、IGF-I 依存的な DNA 合成が抑制される

次に、AP-1A 複合体の発現抑制が IGF-I によって誘導される細胞増殖に与える影響を

調べた。 $\mu 1A$ または γ -adaptin を発現抑制した L6 筋芽細胞を血清除去培地で培養後、IGF-I で刺激して、細胞増殖の指標として DNA 合成を測定した。対照細胞において、IGF-I 刺激に応答して DNA 合成が 4-5 倍増加した (Fig. 3-3A、左)。これに対して、異なる 2 種類の $\mu 1A$ に対する siRNA の導入によって、IGF-I 依存的な DNA 合成が 60-70% までに低下することがわかった。 γ -adaptin を発現抑制した細胞においても同様な結果が得られた (Fig. 3-3A、右)。

さらに siRNA による発現抑制の効果が特異的であることを示すために、レスキュー実験を行った。まず、Myc epitope を挿入したマウス由来 $\mu 1A$ ($\mu 1A$ -Myc; Fig. 3-3B) を恒常的に発現する L6 筋芽細胞を樹立した (Folsch et al., 2001)。この細胞について、抗 Myc 抗体を用いた免疫沈降によって内在性 γ -adaptin が共沈降されてくる (Fig. 3-3C)、抗 γ -adaptin 抗体を用いた免疫染色によって $\mu 1A$ -Myc が内在性 γ -adaptin と共局在する (Fig. 3-3D) ことから、 $\mu 1A$ -Myc が内在性 AP-1A 複合体へ組み込まれていることを確認した。マウス $\mu 1A$ の塩基配列には、ラット $\mu 1A$ に対する siRNA の標的配列と 3 ヶ所のミスマッチが存在し、ラット由来の L6 筋芽細胞にラット $\mu 1A$ に対する siRNA を導入しても、 $\mu 1A$ -Myc (マウス由来) は発現抑制されないことが予想された。実際、 $\mu 1A$ -Myc の発現はラット $\mu 1A$ に対する siRNA によって抑制されないことから、 $\mu 1A$ -Myc は siRNA 耐性のレスキューコンストラクトとして機能することがわかった (Fig. 3-3E)。

この細胞を用いて IGF-I 依存性 DNA 合成を測定した。その結果、 $\mu 1A$ に対する siRNA を導入したベクター発現細胞と比較して、 $\mu 1A$ に対する siRNA を導入した $\mu 1A$ -Myc 発現細胞における IGF-I 依存的な DNA 合成が回復した (Fig. 3-3F)。これらのことから、AP-1A 複合体が IGF-I による細胞増殖誘導に何らかの役割を担っていることが示された。

IRS-1 内に存在する 3 ヶ所の Yxx Φ モチーフが $\mu 1A$ との結合に必要である

IGF-I による細胞増殖誘導において、IRS-1 と AP-1A 複合体との相互作用が持つ役割を詳細に解析するために、IRS-1 内の AP-1A 複合体が結合する部位を絞り込んだ。GFP を融合した IRS-1 領域欠損変異体と GST- $\mu 1A$ を用いて、pull-down アッセイを行ったところ、アミノ酸残基番号 443-663 に相当する領域を含む IRS-1 変異体 (443-664) が $\mu 1A$ と結合し、この領域を欠損した IRS-1 変異体 ($\Delta 443$ -663) は結合しなかったことから、

この領域に $\mu 1A$ が結合する部位が含まれると結論した (Fig. 3-4A)。以降、アミノ酸残基番号 443-663 に相当する領域を AP-1A binding region (APBR) と呼ぶことにする。この APBR にはアミノ酸残基番号 460-463 に存在する YICM、546-549 に存在する YECM、608-611 に存在する YMPM、628-631 に存在する YMPM、658-661 に存在する YMMM、という 5 ヶ所の $Yxx\Phi$ モチーフが含まれていた (いずれのアミノ酸番号もラット IRS-1 のアミノ酸残基番号に相当する)。そこで、これらの $Yxx\Phi$ モチーフのチロシン残基をアラニン残基に置換した IRS-1 変異体を作製し、 $\mu 1A$ との結合を解析した (Fig. 3-4B)。その結果、5 ヶ所全ての $Yxx\Phi$ モチーフのチロシン残基をアラニン残基に置換した変異体 (Y5A) は $\mu 1A$ とほとんど結合しなかった。1 ヶ所のみの変異によって $\mu 1A$ との結合はほとんど変化しなかったが、608 番目、628 番目、658 番目のチロシン残基をアラニン残基に置換した IRS-1 変異体 (Y3A) はほとんど $\mu 1A$ と結合しなかった。また、608 番目と 658 番目のチロシン残基をアラニン残基に置換した IRS-1 変異体 (Y608A, Y658A) の $\mu 1A$ との結合は、わずかに減弱していた (Fig. 3-4C)。これらのことから、IRS-1 の 608 番目、628 番目、658 番目のチロシン残基を含む 3 ヶ所の $Yxx\Phi$ モチーフに $\mu 1A$ が結合することが明らかとなった。さらに、種々の脊椎動物における IRS-1 アミノ酸配列を比較したところ、当該 $Yxx\Phi$ モチーフとその周辺配列は種間で高度に保存されていたことから、 $\mu 1A$ と IRS-1 の相互作用は脊椎動物で保存されたものである可能性が考えられた (Fig. 3-4D)。

$\mu 1A$ との結合を欠損した IRS-1 変異体は、細胞内での輸送に異常を生じる

次に、IRS-1 が輸送タンパク質である AP-1A 複合体と相互作用することから、どのように IRS-1 が細胞内で輸送されているかを検討した。そのために、細胞内で新規合成された IRS-1 の動態を、GFP を融合した IRS-1 を発現させた細胞のタイムラプスイメージングによって観察した。GFP-IRS-1 を発現するプラスミドを HEK293T 細胞に導入し、GFP の蛍光シグナルが観察された直後から画像を経時的に取得した。Fig. 3-5A に示すように、プラスミドを導入して 6 時間後、野生型 (WT) GFP-IRS-1 は発現初期において核近傍に局在する様子が観察された。この構造は次第に大きくなり、プラスミド導入 12 時間後には細胞質中へ小さな小胞様構造となって拡散していった。一方、GFP-IRS-1

Δ APBR 変異体は発現初期に核近傍に局在するが、プラスミド導入 12 時間後でもほとんどの構造は拡散することなく核近傍に蓄積されていた。

μ 1A との結合を欠損した IRS-1 変異体は、CI-MPR 陽性小胞からの輸送が阻害される

さらに、 μ 1A との結合を欠損した IRS-1 変異体の局在について、固定した細胞を免疫蛍光染色によって詳細に調べた。L6 筋芽細胞において、GFP-IRS-1 WT は細胞質で斑点状の小胞構造へ局在した (Fig. 3-5B、上段)。それに対して GFP-IRS-1 Δ APBR および Y3A 変異体は、生細胞イメージングで見られたように、核近傍へ蓄積して局在していた (Fig. 3-5B、上から二、三段目)。これらの変異体は、主に TGN と後期エンドソームに局在することが知られている CI-MPR が陽性の構造に観察された。 μ 1A との結合に関与しない 460 番目と 546 番目のチロシン残基を含む Yxx Φ モチーフに変異を導入した IRS-1 変異体 (Y2A) は、WT と同様 CI-MPR 陽性構造とは共局在せず、斑点状の小胞構造へ局在した (Fig. 3-5B、下段)。また、GFP-IRS-1 Δ APBR および Y3A 変異体は、TGN マーカーである TGN38 とは共局在しなかったことから (Fig. 3-5C and D)、これらの変異体が集積している構造は後期エンドソームであると考えられた。

次に、合成・輸送過程における IRS-1 と CI-MPR の局在を比較解析した。GFP-IRS-1 を発現するプラスミドを細胞に導入後、細胞を経時的に固定し、抗 CI-MPR 抗体を用いて免疫蛍光染色した。その結果、IRS-1 WT は発現後ごく初期において CI-MPR 陽性構造上に観察され、その後 CI-MPR を含まない周辺の小胞構造へ拡散していく様子が観察された (Fig. 3-5E and F)。一方、IRS-1 Δ APBR 変異体は観察過程において常に CI-MPR 陽性構造に局在しており、IRS-1 WT のような拡散の様子は観察されなかった。以上の結果から、AP-1A 複合体との結合が欠損すると、IRS-1 は CI-MPR 陽性の後期エンドソームに集積してしまい、周辺の小胞構造への輸送が阻害されていると考えられた。

μ 1A との結合を欠損した IRS-1 変異体は、IGF-I 依存的なチロシンリン酸化と PI 3-kinase との相互作用が抑制される

IRS-1 Δ APBR および Y3A 変異体の細胞内配置に異常が観察されたことから、これら

の変異体が IGF-I シグナル伝達や細胞増殖誘導に与える影響について検討した。この解析のために、私は IRS-1 変異体を用いたレスキュー実験を行うことにした。すなわち、L6 筋芽細胞において内在性 IRS-1 を発現抑制した後、種々の IRS-1 変異体を発現させて、IRS-1 変異体の影響を解析する実験系である。まず、レトロウイルスを用いて IRS-1 に対する shRNA を L6 筋芽細胞に発現させ、内在性 IRS-1 を発現抑制した (Fig. 3-6A)。ルシフェラーゼに対する shRNA を発現する対照細胞と比較して、IRS-1 を発現抑制した細胞では、IGF-I 依存的な Akt のリン酸化が減少し、Erk1/2 のリン酸化にはほとんど変化が見られなかった。さらに、IGF-I 依存的な DNA 合成と細胞増殖も、IRS-1 の発現抑制によって抑制されることがわかった (Fig. 3-6B and C)。

次に、Fig. 3-7A に示す Myc タグを融合した IRS-1 変異体を、IRS-1 に対する shRNA を発現する細胞にレスキュー発現させた (Fig. 3-7B)。IRS-1 に対する shRNA の配列 2 番 (shIRS-1 (#2)) は IRS-1 の 3'非翻訳領域 (3' UTR, 3' untranslated region) を標的にしている。一方、Myc-IRS-1 変異体のコンストラクトは 3'UTR を含まないため、shRNA による発現抑制を受けずに発現が可能となる。まず、IRS-1 の発現抑制によって観察された IGF-I 依存的な細胞増殖の阻害が、Myc-IRS-1 WT の発現 (shIRS-1 + Myc-IRS-1 WT) によって対照細胞 (shLuc + Vector) 程度まで回復することを確認した (Fig. 3-8A)。次に、Myc-IRS-1 ΔAPBR および Y3A 変異体を発現した細胞の IGF シグナルを解析した。その結果、Myc-IRS-1 WT 発現細胞と比較して両変異体の発現細胞において、IGF-I 依存的な IRS-1 変異体のチロシンリン酸化と p85 PI3-kinase との結合量が減少することがわかった (Fig. 3-7D and F)。IGF-IR の自己チロシンリン酸化は、いずれの IRS-1 変異体の発現によっても変化が認められなかったことから (Fig. 3-7E)、IRS-1 ΔAPBR および Y3A のチロシンリン酸化の減少には IGF-IR の活性は関与していないと考えられた。さらに、Akt と Erk1/2 のリン酸化も検討した結果 (Fig. 3-7F)、Erk1/2 のリン酸化にはいずれの IRS-1 変異体の発現によっても変化が観察されなかった。一方、IGF-I 依存的な Akt のリン酸化は、Myc-IRS-1 WT の発現細胞ではベクターのみの発現細胞と比較して上昇するが、Myc-IRS-1 ΔAPBR および Y3A 変異体の発現細胞ではベクター発現細胞と同程度であることがわかった。一連の結果から、AP-1A 複合体との結合が阻害されると、IGF-IR による IRS-1 のチロシンリン酸化や Akt のリン酸化が減弱することが考えられた。

IRS-1 が CI-MPR 陽性小胞へ誤って蓄積することによって、IGF-I 依存的な IRS-1 のチロシンリン酸化と PI 3-kinase との相互作用が抑制される

しかし、IRS-1 の 608、628、658 番目のチロシン残基は IR や IGF-IR によってリン酸化され、PI 3-kinase の結合部位としても機能するため(Myers et al., 1996; Sun et al., 1993)、上述の減弱は単に APBR 内のチロシン残基が欠失したことによる可能性も考えられる。そこで、IRS-1 のチロシンリン酸化と PI 3-kinase との結合の減弱は、IRS-1 変異体が正しい細胞内部位に配置されないことが原因か、あるいはチロシン残基の欠失が原因かを調べるために、CI-MPR 陽性小胞へ局在する IRS-1 変異体を作製した (Fig. 3-7A)。H-Ras の C 末端配列、C181-MS-C184-K-C186-VLS はいわゆる CAAX モチーフ (CVLS) を含んでいる(Choy et al., 1999)。H-Ras は小胞体からゴルジ体へ輸送される過程で、186 番目のシステイン残基のファルネシル化に加えて、181 番目と 184 番目のシステイン残基がパルミトイル化されることによって、細胞膜にアンカーされる。一方、181 番目のシステイン残基を欠損した H-Ras 変異体は細胞膜に輸送されずにゴルジ体を含む核周縁領域に留まることが知られている(Roy et al., 2005)。そこで CI-MPR 陽性小胞へ強制的に局在させる IRS-1 変異体として、IRS-1 CAAX 変異体を作成した。この変異体には、181 番目のシステイン残基を含まない H-Ras の部分配列、CKCVLS がその C 末端に付加されている。免疫蛍光染色の結果、IRS-1 ΔAPBR および Y3A 変異体のように、IRS-1 CAAX 変異体は CI-MPR を含む核周縁の小胞に局在した (Fig. 3-7C)。

IRS-1 WT を発現する細胞と比較して、IRS-1 CAAX 変異体を発現する細胞では、IRS-1 のチロシンリン酸化と p85 PI 3-kinase との結合量が減少することがわかった (Fig. 3-7D and F)。さらに、IRS-1 CAAX 変異体を発現する細胞の Akt のリン酸化も、ベクターのみの発現細胞と同程度であった (Fig. 3-7F)。これらの結果から、AP-1A 複合体による輸送が阻害され、IRS-1 が CI-MPR 陽性小胞へ誤って蓄積することが、IRS-1 のチロシンリン酸化と PI 3-kinase との結合を減弱させるのに十分であることが示された。

IRS-1 と AP-1A 複合体との結合は、IGF-I 依存的な細胞増殖に必要である

次に、IRS-1 変異体の発現細胞を用いて、DNA 合成と細胞増殖を調べた。前述の IRS-1 のチロシンリン酸化と Akt のリン酸化の挙動と一致して、ベクターのみ、または他の

IRS-1 変異体の発現細胞と比較して IRS-1 WT の発現細胞においてのみ、IGF-I によって誘導される DNA 合成が亢進した (Fig. 3-8B)。加えて、IRS-1 WT の発現細胞では IGF-I によって細胞増殖が亢進した一方、ベクターのみ、または他の IRS-1 変異体の発現細胞では IGF-I によって増殖は亢進しなかった (Fig. 3-8C)。これらの結果は、IRS-1 と AP-1A 複合体の相互作用が IGF-I に応答した細胞増殖に必要であることを示している。

考察

生化学的な分画法を用いたこれまでの研究から、細胞内小胞に存在する IRS-1 がインスリンや IGF のシグナル伝達や生理活性の発現に重要であることが示唆されていた (Clark et al., 2000; Heller-Harrison et al., 1995; Kelly and Ruderman, 1993; Kublaoui et al., 1995; Tirosh et al., 1999)。しかし、序論や本章の緒言でも述べたように、細胞内小胞に IRS-1 が配置されるための具体的な分子メカニズムはほとんどわかっておらず、細胞内小胞の IRS-1 が持つ役割について詳しい検討は行われていない。本研究では、IRS-1 の細胞内小胞への配置を決定する分子の一つとして、AP-1A 複合体を同定した。さらに、AP-1A 複合体との相互作用を欠損すると、IGF-I 依存的な IRS-1 のチロシンリン酸化や細胞増殖が抑制されることから、IGF シグナル伝達および細胞増殖誘導において AP-1A 複合体が IRS-1 の細胞内配置を制御する重要な分子であることが明らかとなった。

AP-1A 複合体による IRS-1 の細胞内配置の制御

AP-1A 複合体はクラスリン被覆小胞の代表的なアダプター分子の一つであり、積荷タンパク質として膜貫通タンパク質の細胞質領域を認識する例が多数報告されている。本研究により、AP-1A 複合体が、膜貫通タンパク質ではなく細胞質タンパク質である IRS-1 の細胞内小胞への配置を制御することが明らかとなった。IRS-1 は YxxΦモチーフを介してμ1A の積荷タンパク質を認識する C 末端ドメインと結合する。μ1A は YxxΦモチーフに直接結合することから、IRS-1 も典型的な膜貫通型の積荷タンパク質と同様な相互作用様式でμ1A によって認識されると考えられる (Ohno et al., 1995)。また、AP-1A 複合体のサブユニットを発現抑制すると LDM 画分の IRS-1 量が減少することから、IRS-1

の細胞内小胞への配置には AP-1A 複合体との相互作用が必要であることが示唆された。AP-1A 複合体との結合が欠損した IRS-1 変異体 (Δ APBR, Y3A) を用いた解析から、新規合成された IRS-1 WT は核周縁の CI-MPR 陽性小胞から CI-MPR 陰性の小胞構造へ分配されるが、 Δ APBR、Y3A 変異体はこの過程が著しく阻害され、CI-MPR 陽性小胞へ蓄積することがわかった。CI-MPR は主に TGN と後期エンドソームに局在することが知られているが(Hille-Rehfeld, 1995)、 Δ APBR、Y3A 変異体は TGN マーカーの TGN38 とは共局在しなかったことから、IRS-1 は AP-1A 複合体によって CI-MPR 陽性の後期エンドソームから CI-MPR 陰性のエンドソームへ輸送されることが考えられた。

一般的に、AP 複合体は膜貫通型の積荷タンパク質と一過性の相互作用を介して結合する(Kural et al., 2012)。一方、IRS-1 と AP-1A 複合体が共免疫沈降されることから、IRS-1 は AP-1A 複合体と比較的安定な相互作用を形成しており、これによって細胞質タンパク質である IRS-1 を AP-1A 複合体がクラスリン被覆小胞内へパッキングすることが可能になっているのかもしれない。IRS-1 が局在する細胞内小胞について様々な内在性エンドソームマーカーを用いた免疫蛍光染色によって検討したが、IRS-1 は一般的な初期エンドソーム (EEA1)、回収エンドソーム (Rab11 や TfR)、リソソームには観察されていない (データは示さない)。細胞内に取り込まれたトランスフェリンと IRS-1 が一部共局在することを見出しているが (第四章、Fig. 4-2B)、残りの IRS-1 が存在する小胞構造は未だ同定できていないのが現状である。AP-1A 複合体による輸送の方向性は、TGN あるいはポスト TGN 区画からエンドソームへ輸送する順行性輸送と、エンドソームから TGN へ輸送する逆行性輸送の両方向が報告されており、積荷タンパク質の種類によってその方向性が異なると考えられている(Canuel et al., 2008; Foote and Nothwehr, 2006; Hirst et al., 2012; Lubben et al., 2007; Meyer et al., 2000)。CI-MPR 陽性の後期エンドソームから輸送されることから、IRS-1 は AP-1A 複合体の順行性輸送によって特定の細胞に配置されていると予想される。今後、内在性 IRS-1 が配置される細胞内小胞を同定することによって、AP-1A 複合体による IRS-1 の具体的な輸送経路の解明が期待される。

他の膜輸送系が IRS-1 の細胞内小胞への配置に果たす役割

IRS-1 の細胞内小胞への配置には、IR や IGF-IR との相互作用を介した細胞膜からイ

インターナリゼーションも寄与する可能性が考えられる。IRS-1 の N 末端に存在する PH ドメインや PTB ドメインは、活性化した IR/IGF-IR やイノシトールリン脂質と相互作用することが報告されている(Backer et al., 1997; Razzini et al., 2000; Takeuchi et al., 1998)。PH ドメインまたは PH-PTB ドメインを欠損した IRS-1 変異体は全長 IRS-1 と同様に小胞構造へ局在したことから (データは示さない)、受容体との相互作用は IRS-1 の細胞内小胞への配置に関与しないと考えられる。また、AP-1A 複合体は TGN とエンドソームの間の輸送に加えて細胞膜からのファゴサイトーシスに関与することが近年報告されている(Lefkir et al., 2004; Marion et al., 2012)。しかし、AP-1A 複合体の発現抑制によって IRS-1 は細胞膜画分に蓄積しないこと、IRS-1 Δ APBR, Y3A 変異体も細胞膜へ蓄積しないことから、AP-1A 複合体による細胞膜からの輸送は IRS-1 の細胞内小胞への配置に影響していないと考えられる。

さらに、AP-1A 複合体以外の分子との相互作用を介して、IRS-1 の細胞内小胞への配置が制御されている可能性もある(Fukushima et al., 2010)。これまでに AP-3 複合体の $\sigma 3$ が IRS-1 結合タンパク質として報告されている(VanRenterghem et al., 1998)。L6 筋芽細胞において、AP-3 複合体をタンパク質レベルで検出できなかったため (データは示さない)、本研究では AP-3 複合体の関与を実験的に検証できなかった。AP-1A 複合体との相互作用が阻害された結果、IRS-1 が AP-1A 複合体以外の分子による輸送を介して CI-MPR 陽性の小胞構造へ配置された可能性は否定できず、今後、他の分子の IRS-1 の細胞内配置に対する寄与についても検討していく必要がある。なお、本研究の第四章で解析した AP-2 複合体は $\mu 1A$ と同一の部位を介して IRS-1 と相互作用するが、AP-2 複合体を発現抑制しても IRS-1 の細胞内小胞への配置に変化は見られなかったため、AP-2 複合体は IRS-1 の細胞内配置を制御していないと結論した (第四章、Fig. 4-2B)。

AP-1A 複合体によって配置される IRS-1 の細胞内小胞と IGF-IR のインターナリゼーションとの関係

生化学的分画法を用いたこれまでの報告において、IRS-1 が豊富に存在する細胞内小胞がシグナルを伝達する活性を持つ細胞内部位であることが示唆されていた(Clark et al., 1998; Clark et al., 2000; Inoue et al., 1998; Takano et al., 2001)。しかしながら、IRS-1 の

一部は細胞質にも存在していることから、細胞内小胞に存在する IRS-1 の役割を細胞質と分別して解析することが難しかった。本研究では、AP-1A 複合体との相互作用を欠損した IRS-1 変異体を用いることで、この問題をより明確に明らかにした。CI-MPR 陽性小胞へ局在する IRS-1 Δ APBR, Y3A 変異体では、IGF-I 依存的な IRS-1 のチロシンリン酸化および PI 3-kinase との相互作用が抑制された。さらに、IR や IGF-IR のリガンド結合依存的なインターナリゼーションが下流シグナル伝達に必須であることが報告されている(Burgess et al., 1992; Di Fiore and De Camilli, 2001; Hsu et al., 1994; Romanelli et al., 2007)。これらの結果を併せると、AP-1A 複合体によって輸送された特定の小胞において、IRS-1 はインターナリゼーションした IGF-IR と会合するために、AP-1A 複合体による細胞内小胞への輸送が阻害されると IGF-IR による IRS-1 のチロシンリン酸化が抑制されると考えている。

AP-1A 複合体による IRS-1 の細胞内配置の制御が IGF シグナル伝達に果たす役割

構造生物学的な解析から、AP 複合体の μ サブユニットはリン酸化された Yxx Φ モチーフには結合できないことが示されている(Ohno et al., 1995)。本研究から、AP-1A 複合体が結合する IRS-1 の Yxx Φ モチーフはチロシンリン酸化されて PI 3-kinase と結合する部位と重複していることが明らかとなった。CI-MPR 陽性小胞に配置された IRS-1 はチロシンリン酸化されないことから、IGF-IR と IRS-1 が相互作用するのは CI-MPR 陰性の小胞であることが示唆される。したがって、AP-1A 複合体によって IRS-1 が輸送される細胞内小胞は、インターナリゼーションされた IGF-IR と IRS-1 が会合するシグナリングエンドソームとして機能する可能性が高い。そして、AP-1A 複合体が IRS-1 をシグナリングエンドソームへ輸送した後に解離し、IGF-I 刺激に応答して IRS-1 が IGF-IR によってチロシンリン酸化され、PI 3-kinase が IRS-1 に結合、活性化されるという、細胞内小胞での局所シグナル伝達メカニズムの存在を想定している (Fig. 3-9)。

AP-1A 複合体による IRS-1 の細胞内配置の制御がインスリン/IGF の生理作用の発現に果たす役割

さらに、本研究では PI 3-kinase の下流分子である Akt の IGF-I 依存的なリン酸化が

IRS-1 Δ APBR, Y3A 変異体の発現細胞において抑制されることを見出した。Akt は複数の基質のリン酸化を介して細胞増殖を誘導することが知られている (Manning and Cantley, 2007)。これらのことから、インターナリゼーションした IGF-IR と細胞内小胞に配置された IRS-1 を介した局所的なシグナルが、シグナリングエンドソーム上で Akt を活性化し、その結果下流シグナル経路と細胞増殖が活性化されるのかもしれない。さらに、細胞内小胞に存在する IRS-1 量とインスリンによって誘導される糖取り込み活性が相関することから (Clark et al., 2000; Ricort et al., 1996; Tirosh et al., 1999)、細胞内小胞に存在する IRS-1 は細胞増殖以外のインスリン/IGF 活性にも重要な役割を果たしている可能性がある。

本研究によって、私は、AP-1A 複合体が IRS-1 の細胞内小胞への配置に必須な分子であり、AP-1A 複合体による IRS-1 の細胞内配置の制御が IGF シグナル伝達と細胞増殖誘導に重要なメカニズムであると結論した。

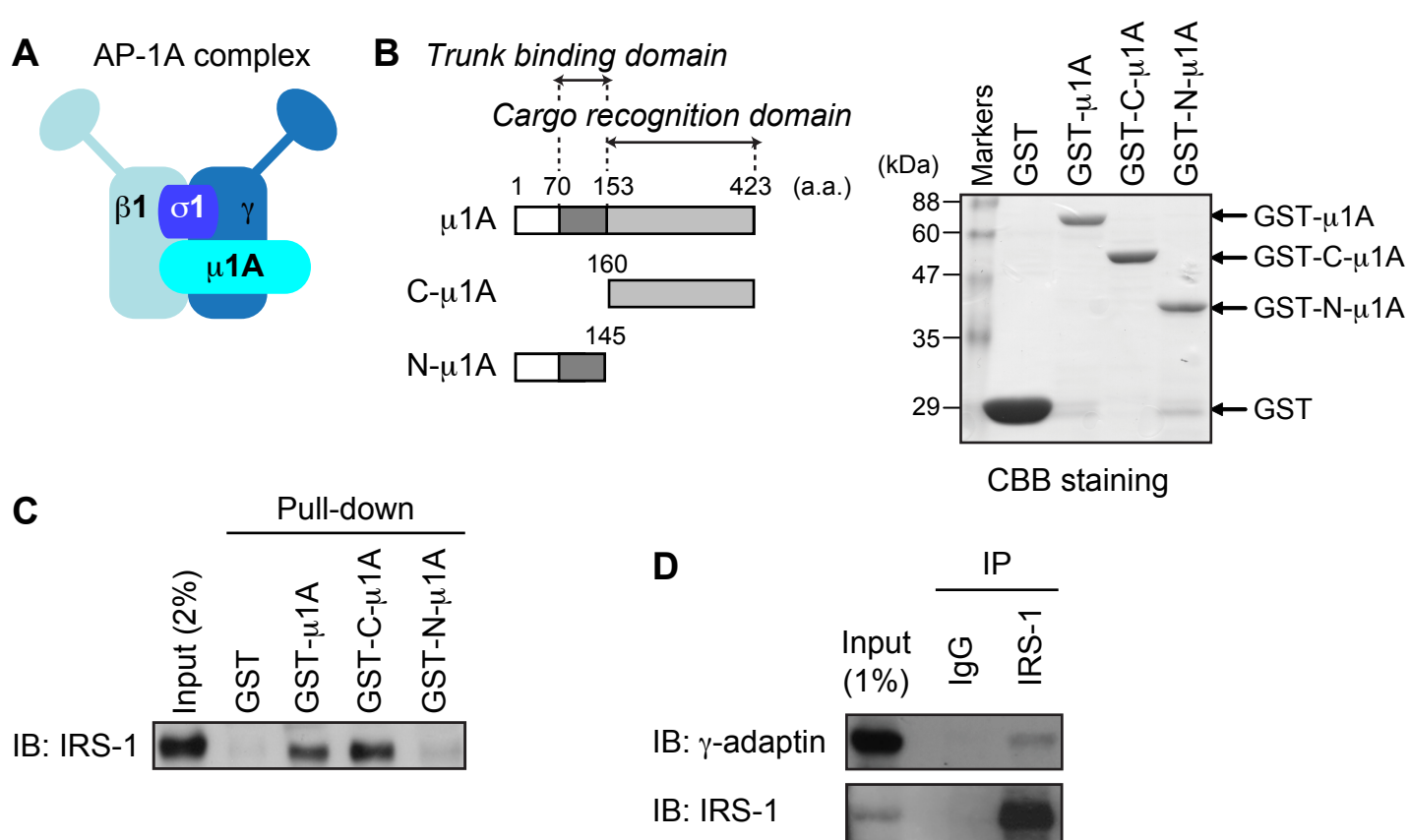


Fig. 3-1 IRS-1とAP-1A複合体の相互作用

A AP-1A複合体の構造。γ-adaptin, β1-adaptin, μ1A, σ1の四つのサブユニットから構成される。Yeast two-hybrid法によるスクリーニングの結果、IRS-1の相互作用分子の一つとしてμ1Aが同定された。

B 実験に用いたリコンビナントGST-μ1Aの模式図を示した（左）。複合体本体と相互作用するN末端ドメイン（暗いグレー）を含むN-μ1Aと、積荷タンパク質を認識するC末端ドメイン（明るいグレー）を含むC-μ1Aを大腸菌発現系を用いて精製し、CBB染色によって各コンストラクトの発現を確認した（右）。

C L6筋芽細胞から調製した抽出液と精製したGST-μ1Aを混合し、pull-downアッセイを行った。サンプルを抗IRS-1抗体を用いたimmunoblottingに供した。Inputはpull-downアッセイに供した抽出液の2%分に相当する。

D L6筋芽細胞から調製した抽出液を抗IRS-1抗体を用いて免疫沈降し、沈降物を図に示した抗体を用いたimmunoblottingに供した。Inputは免疫沈降に供した抽出液の1%分に相当する。

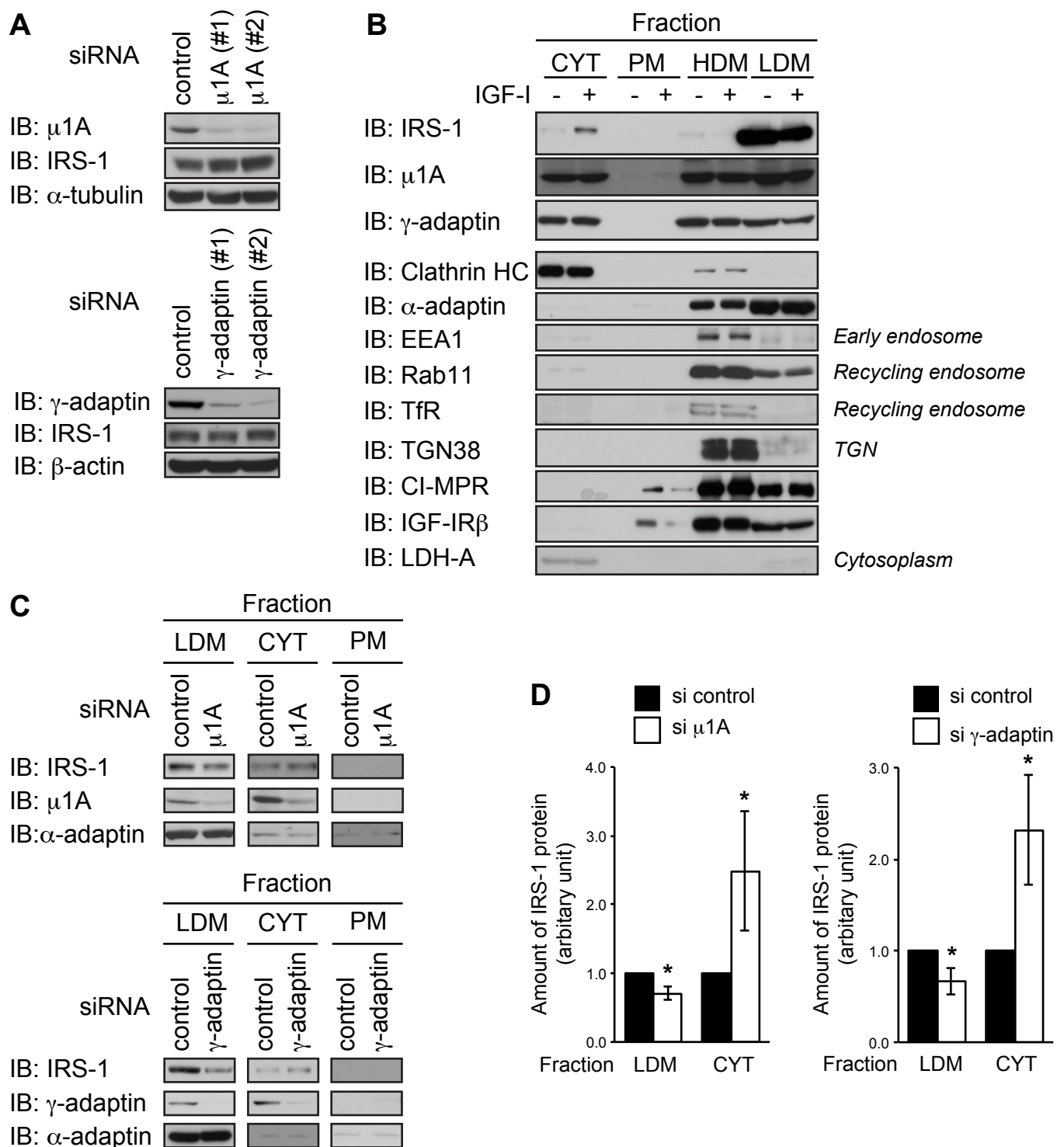


Fig. 3-2 AP-1A複合体の発現抑制がIRS-1の細胞内配置に与える影響

A μ 1A (上) あるいは γ -adaptin (下) に対するsiRNAをL6筋芽細胞に導入した。細胞抽出液を図に示した抗体を用いたimmunoblottingに供した。

B L6筋芽細胞をIGF-I (100 ng/ml) で5分間刺激した後、細胞内分画法によって4つの画分 (CYT, cytosol; PM, plasma membrane; HDM, high-density microsome; LDM, low-density microsome) に分離した。CYT画分および他の画分を体積比0.05:1.00の割合で調製した後、図に示した抗体を用いたimmunoblottingに供した。(Clathrin HC, clathrin heavy chain; TfR, transferrin receptor)

C μ 1A (上) あるいは γ -adaptin (下) に対するsiRNAを導入したL6筋芽細胞を細胞内分画法に供した。各画分を図に示した抗体を用いたimmunoblottingに供した。内部標準は α -adaptinを用いて評価した。

D 4回の独立したCに示す実験から各画分におけるIRS-1のバンド強度を定量し、その平均値をグラフに示した。グラフ中の値は、対照細胞の値を1として計算した。Means \pm SE (n=4; *, $P < 0.05$)

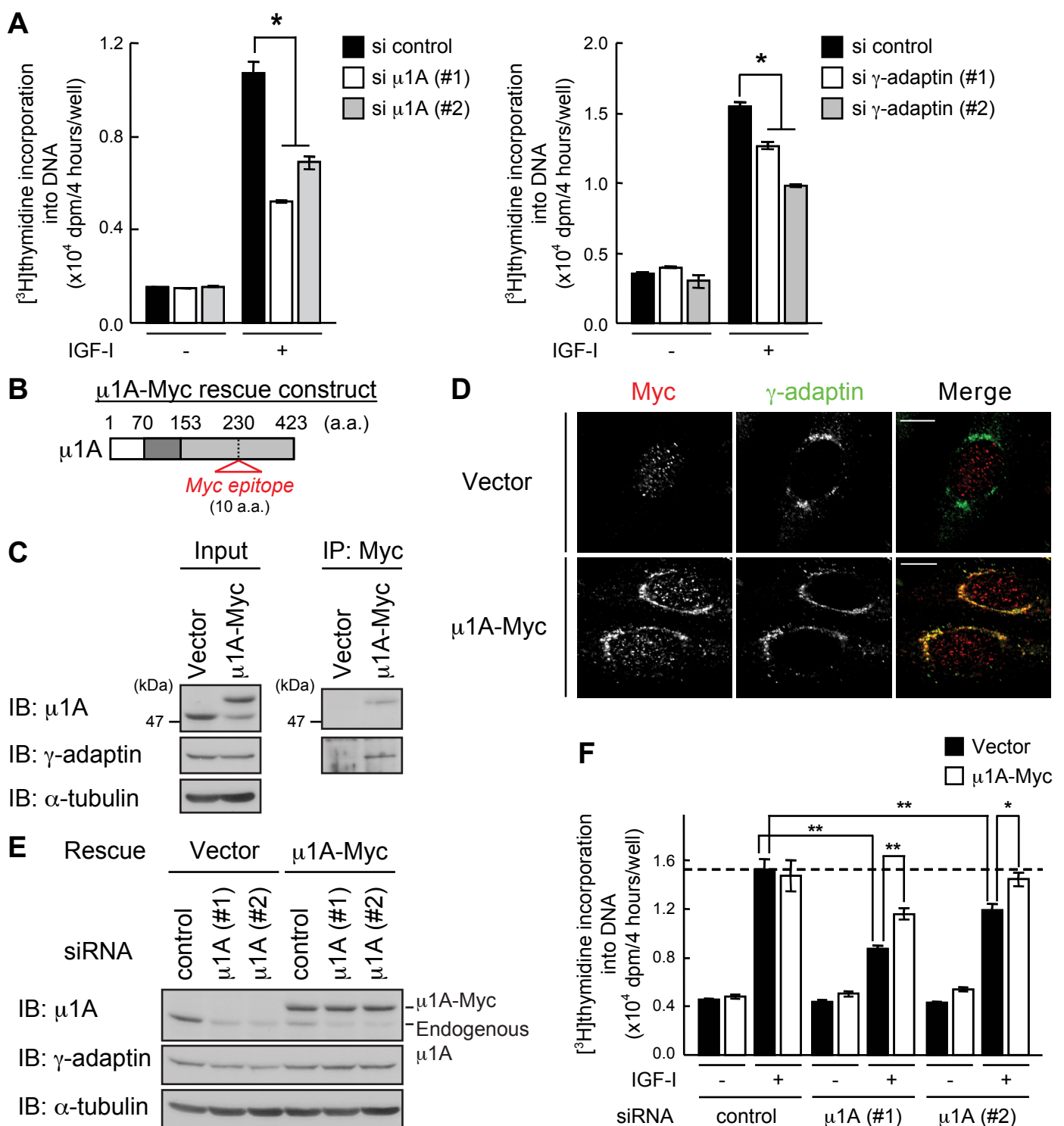


Fig. 3-3 AP-1A複合体の発現抑制がIGF-I依存性DNA合成に与える影響

A μ1A (左) あるいはγ-adaptin (右) に対するsiRNAをL6筋芽細胞に導入した。血清飢餓後、IGF-I (100 ng/ml) で細胞を処理し、最終4時間でDNAに取り込まれた ^3H thymidineの量を測定した。Means \pm SE (n=3; *, $P < 0.05$)

B レスキュー実験に用いたμ1A-Mycの模式図。マウスμ1Aのアミノ酸番号230番目にMyc epitopeを挿入した。

C, D ベクターまたはμ1A-Mycを発現するL6筋芽細胞から調製した抽出液を、抗Myc抗体を用いた免疫沈降および図に示した抗体を用いたimmunoblottingに供した (C)。また、抗Myc抗体と抗γ-adaptin抗体を用いた免疫染色に供した。共焦点顕微鏡を用いてサンプルを観察した。Bar, 10 μm (D)

E, F μ1Aに対するsiRNAを、ベクターまたはμ1A-Mycを発現するL6筋芽細胞に導入した。調製した細胞抽出液を図に示した抗体を用いたimmunoblottingに供した (E)。また、これらの細胞をIGF-I (100 ng/ml) で処理し、DNA合成量を測定した。Means \pm SE (n=3; *, $P < 0.05$; ** $P < 0.01$) (F) 独立した3回の実験から得られた代表的な結果を示す。

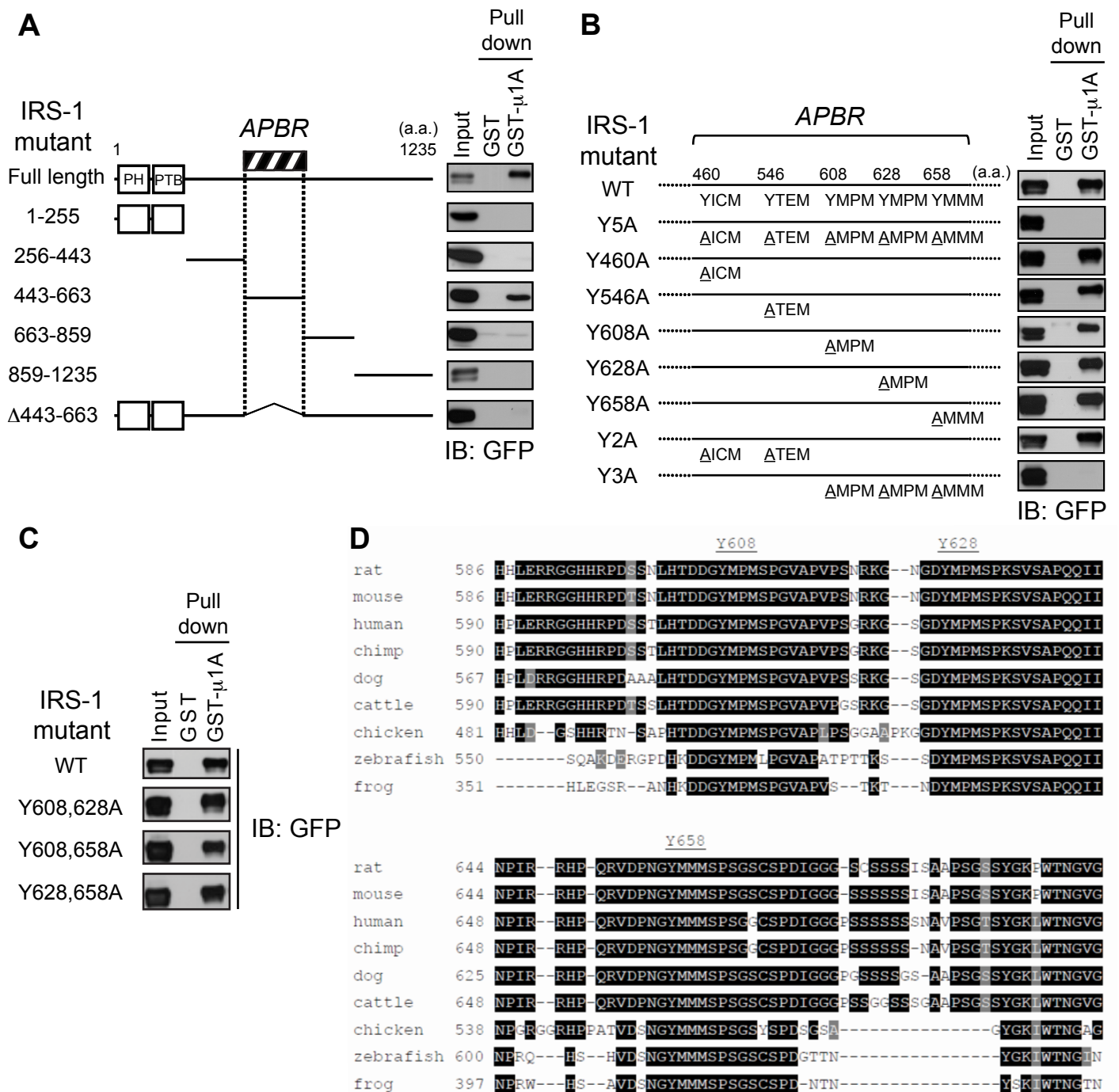


Fig. 3-4 μ 1Aが結合するIRS-1のYxxΦモチーフ

A IRS-1全長の構造の下に、実験に用いたIRS-1欠損変異体を示した。GFP-IRS-1欠損変異体を発現させたHEK293T細胞の抽出液と、精製したGST- μ 1Aを混合し、pull-downアッセイを行った。サンプルを抗GFP抗体を用いたimmunoblottingに供した。Inputはpull-downアッセイに供した抽出液の2%分に相当する。縞模様のボックスはAP-1A binding region (APBR)を表す。

B APBR内に存在する5ヶ所のYxxΦモチーフと、実験に用いたIRS-1アラニン置換変異体を示した。GFP-IRS-1アラニン置換変異体を発現させたHEK293T細胞の抽出液を用いて、Aと同様のpull-downアッセイを行った。

C GFP-IRS-1アラニン二重置換変異体 (Y608A Y628A, Y608A Y658A, Y628A Y658A) を発現するHEK293T細胞の抽出液を用いて、Aと同様のpull-downアッセイを行った。

D 様々な脊椎動物のIRS-1のAPBRをClustalX2を用いて配列比較し、Boxshadeによって色づけした。種間で同一のアミノ酸残基を黒で、同種のアミノ酸残基をグレーで色付けした。

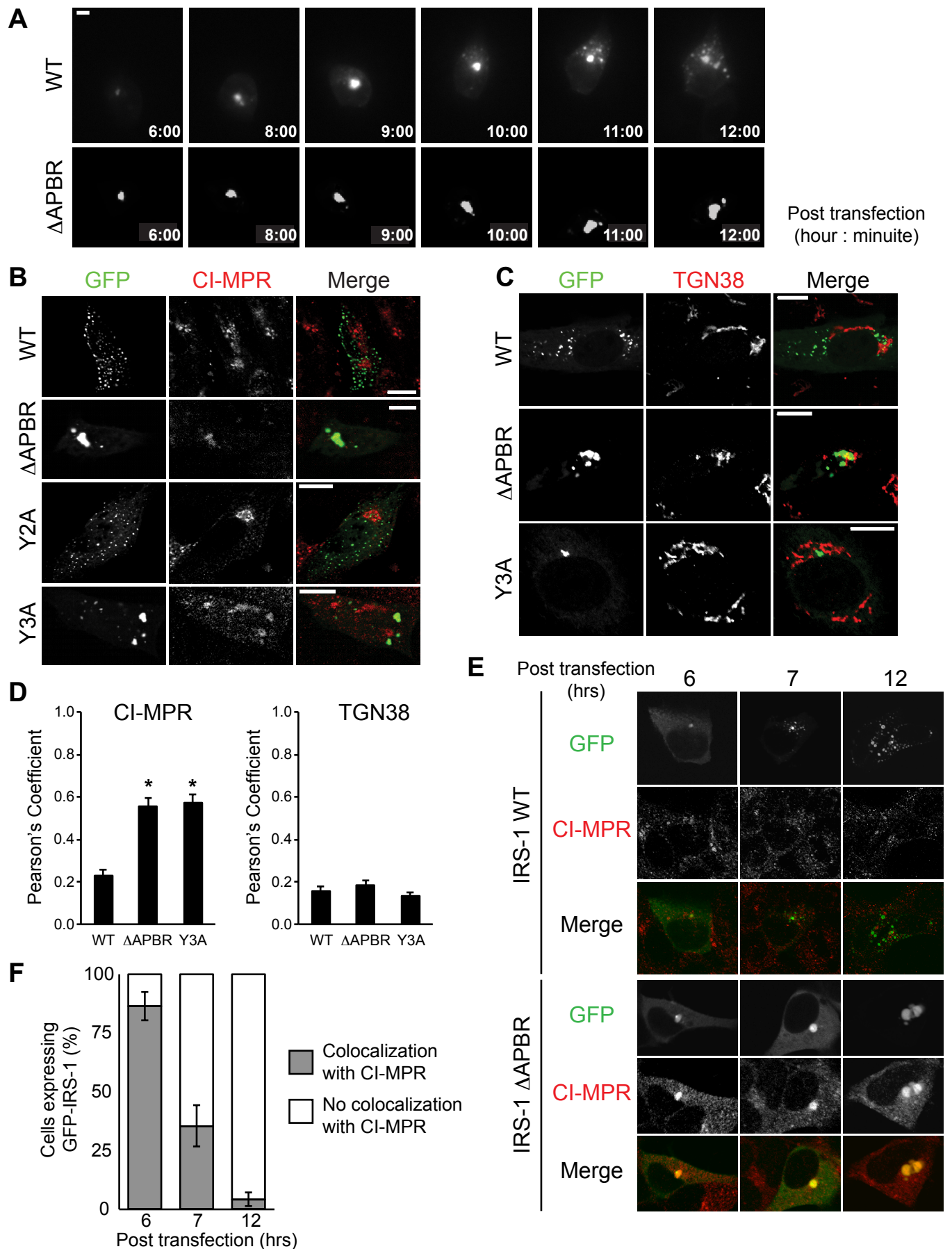


Fig. 3-5 μ 1Aとの結合が欠損したIRS-1変異体の細胞内配置

A GFP-IRS-1 WTまたは Δ APBRを発現するHEK293T細胞の蛍光シグナルを経時的に観察した。

Bar, 10 μ m

B, C 図に示したGFP-IRS-1変異体（緑）を発現するL6筋芽細胞を、抗CI-MPR抗体（赤; B）あるいは抗TGN38抗体（赤; C）を用いて蛍光免疫染色した。サンプルは共焦点顕微鏡を用いて観察した。

Bar, 10 μ m

（説明の続きは次ページ）

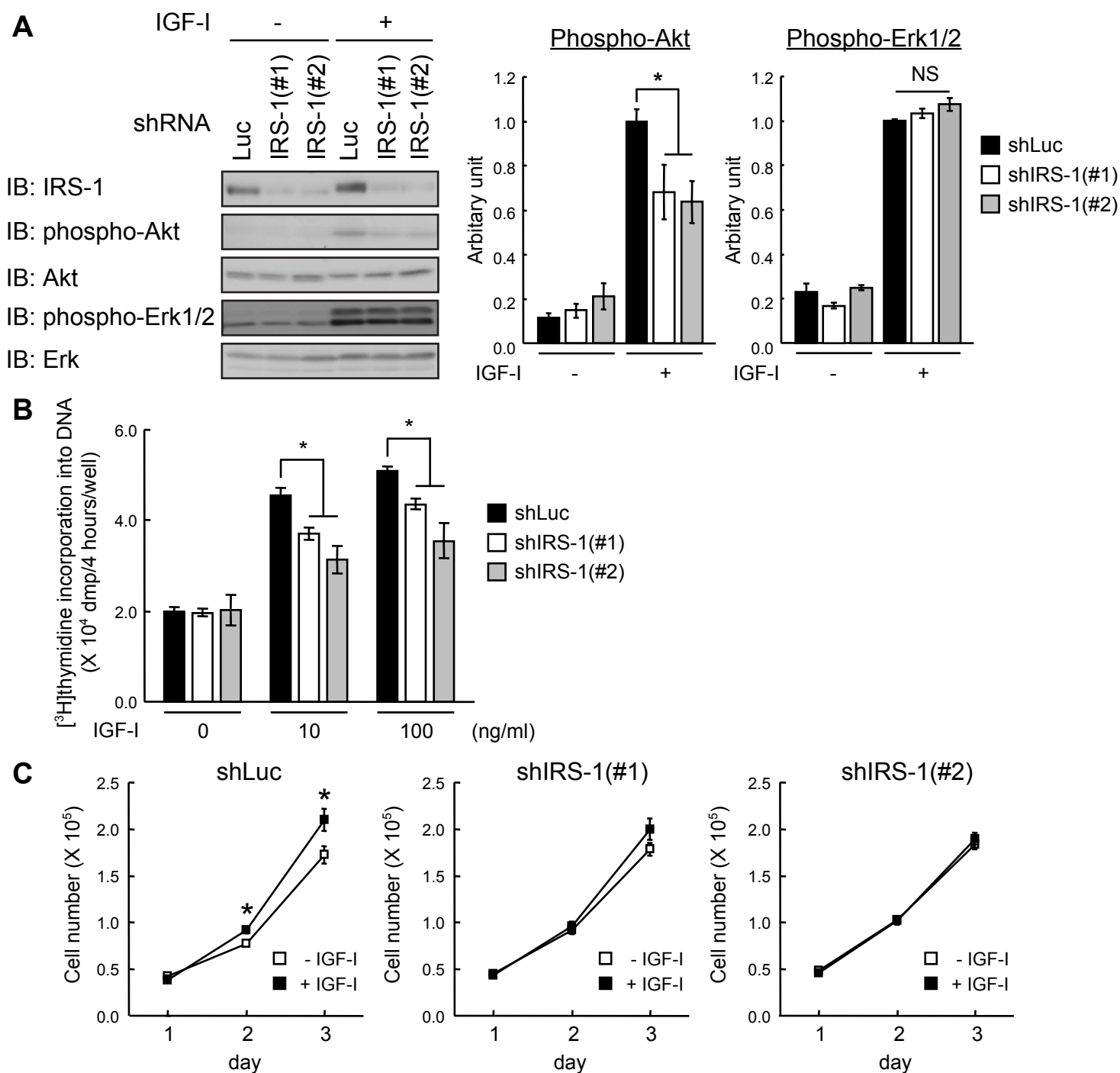


Fig. 3-6 IRS-1の発現抑制がIGFシグナル伝達と細胞増殖に与える影響

A ルシフェラーゼ (Luc) またはIRS-1に対するshRNAを恒常的に発現するL6筋芽細胞をIGF-I (100 ng/ml) で5分間刺激した。細胞抽出液を図に示した抗体を用いたimmunoblottingに供した (左)。リン酸化Akt (Ser473) とリン酸化Erk1/2のバンド強度を定量し、グラフに示した (右)。Means \pm SE; *, $P < 0.05$ ($n = 4$) (NS, not significant)

B, C LucまたはIRS-1に対するshRNAを発現するL6筋芽細胞をIGF-Iで処理し、DNA合成量を測定した (B)。また、各日細胞数を計数し、細胞増殖を解析した (C)。Means \pm SE; *, $P < 0.05$ ($n = 3$)

Fig. 3-5 μ 1Aとの結合が欠損したIRS-1変異体の細胞内配置 (図は前ページ)

D GFP-IRS-1変異体とCI-MPRあるいはTGN46との共局在の割合を、Pearson's coefficientによって評価し、棒グラフで示した。Means \pm SE; *, $P < 0.05$ versus IRS-1 WT; $n > 40$ 細胞

E GFP-IRS-1 WTあるいは Δ APBR (緑) を発現するHEK293T細胞を図に示した時間で固定し、抗CI-MPR抗体 (赤) を用いて蛍光免疫染色した。サンプルは共焦点顕微鏡を用いて観察した。

F 図に示した時間においてCI-MPRと共局在するGFP-IRS-1 WTが観察された細胞の割合をグラフに示した。Means \pm SE; $n > 40$ 細胞

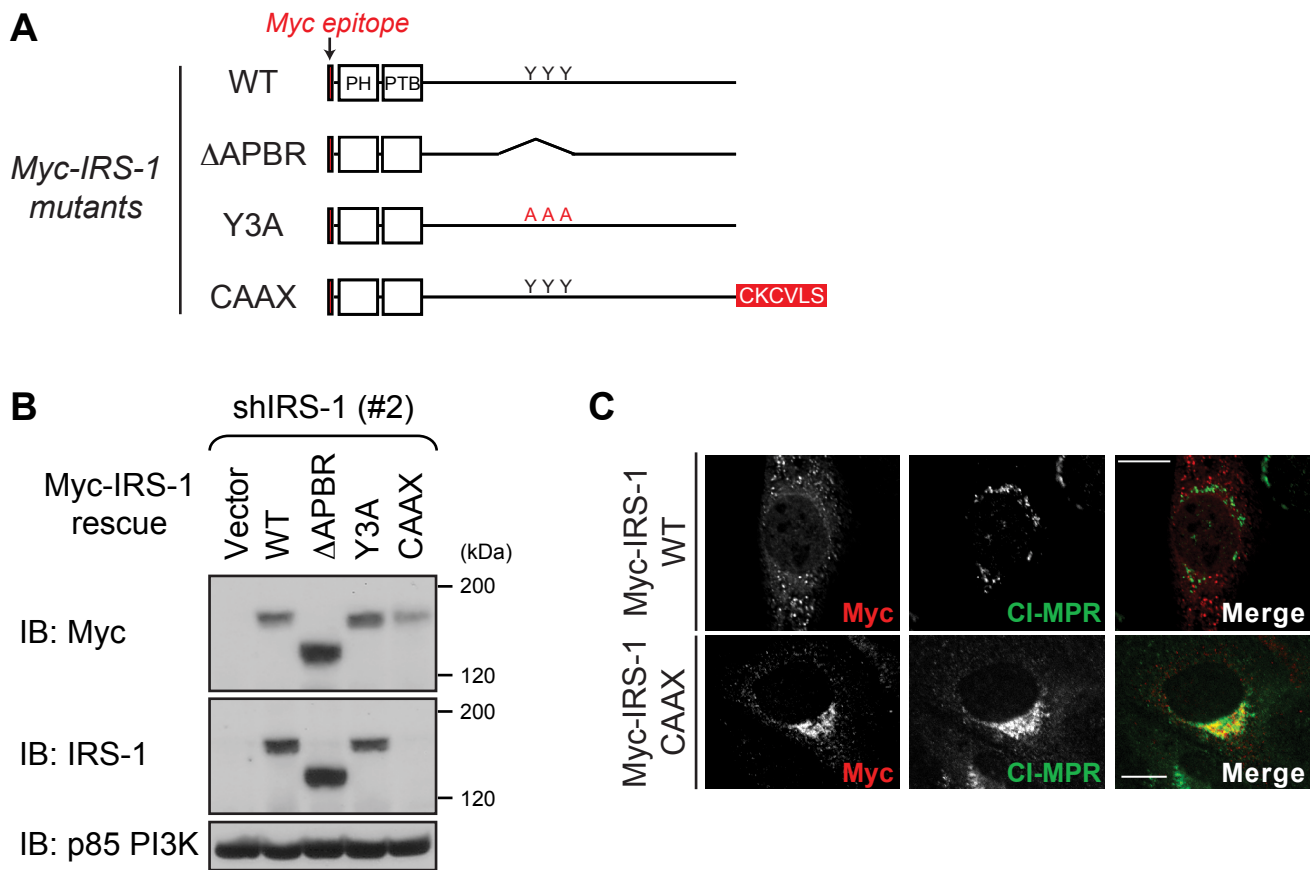


Fig. 3-7 IRS-1とAP-1A複合体との相互作用の欠損がIGF-Iシグナル伝達に与える影響

A レスキュー実験に用いたIRS-1変異体の模式図。Myc-IRS-1 CAAXはIRS-1のC末端にH-RasのCAAX配列由来のCKCVLSを付加した変異体である。

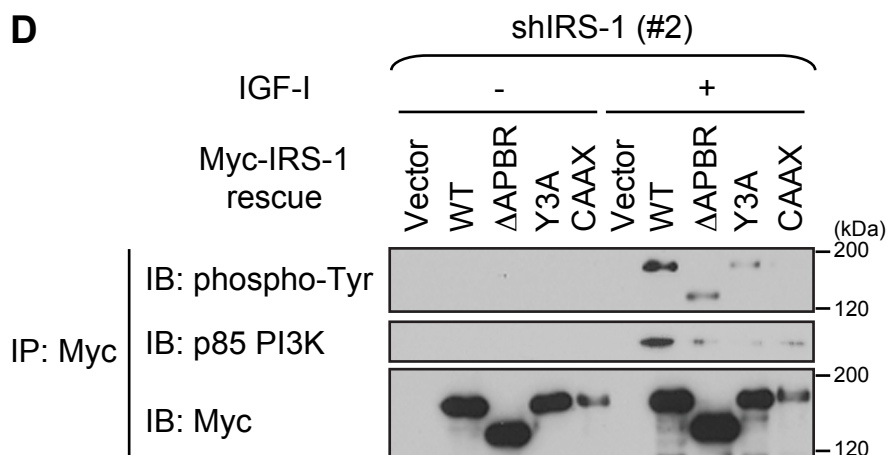
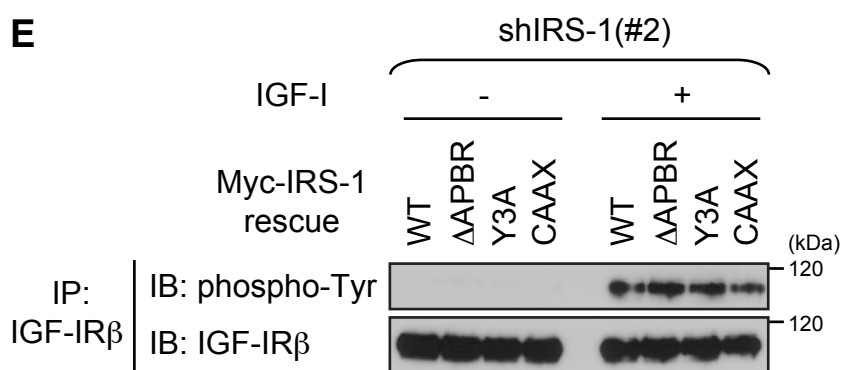
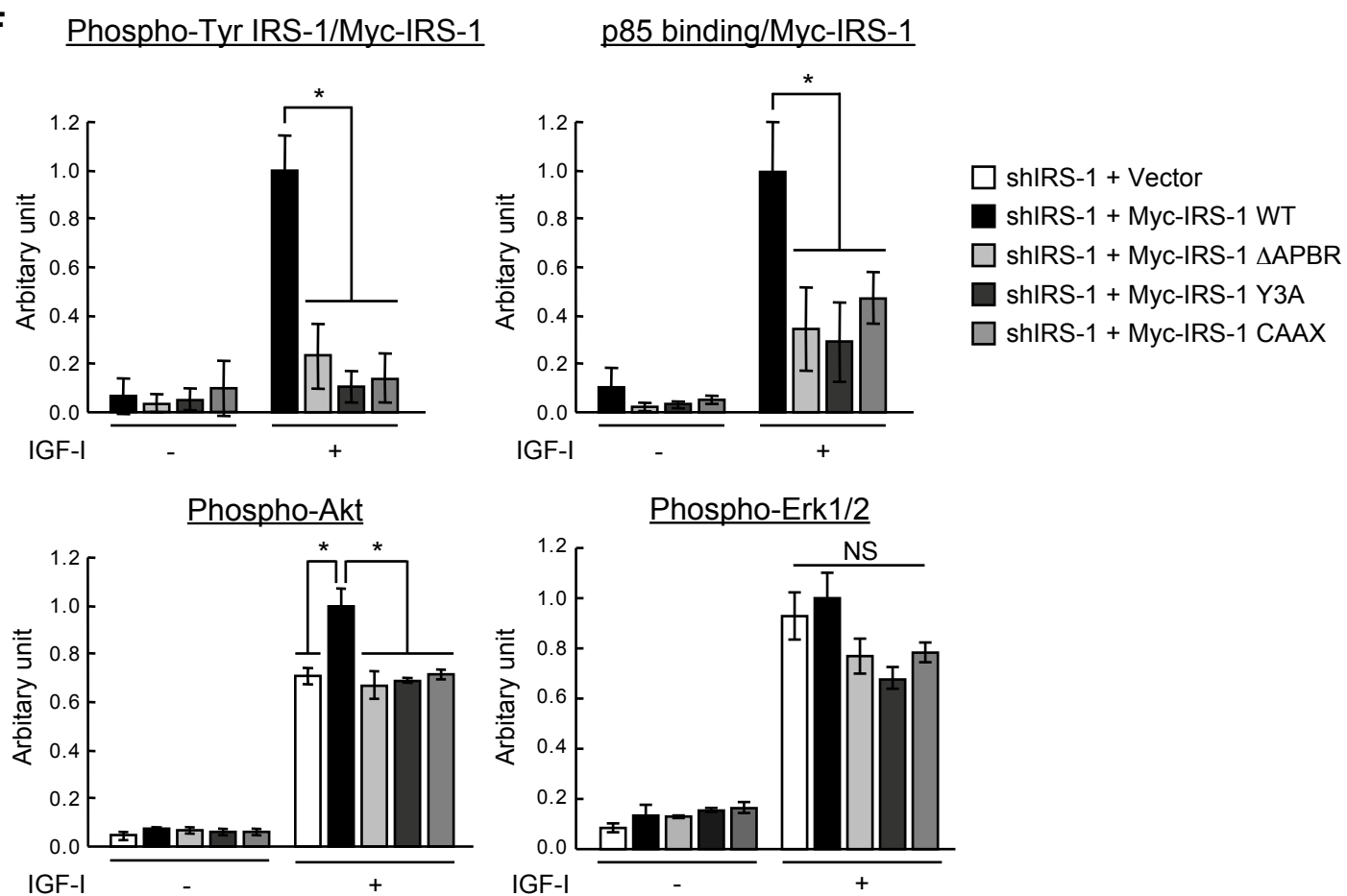
B shIRS-1(#2)を恒常的に発現するL6筋芽細胞に、Aに示したMyc-IRS-1変異体をレトロウイルスを用いて発現させた。細胞抽出液を図に示したimmunoblottingに供した。C末端にCAAX配列を付加することで、IRS-1のC末端を認識する抗IRS-1抗体のMyc-IRS-1 CAAXに対する免疫反応性が阻害された。内部標準はp85 PI3Kを用いて評価した。

C shIRS-1(#2)とMyc-IRS-1 WTまたはCAAXを共発現するL6筋芽細胞を、抗CI-MPR抗体を用いて免疫蛍光染色した。サンプルを共焦点顕微鏡を用いて観察した。Bar, 10 μ m

D, E shIRS-1(#2)とMyc-IRS-1変異体を共発現するL6筋芽細胞をIGF-I (100 ng/ml) で5分間処理した。細胞抽出液を抗Myc抗体 (D) または抗IGF-IR β 抗体 (E) を用いて免疫沈降し、図に示した抗体を用いたimmunoblottingに供した。

F Myc-IRS-1変異体、チロシンリン酸化IRS-1、IRS-1と結合したp85、リン酸化Akt (Ser473)、リン酸化Erk1/2のバンド強度を定量し、グラフに示した。独立した3回の実験から得られた代表的な結果を示す。Means \pm SE; *, $P < 0.05$ (n = 3) (NS, not significant)

(図の続きは次ページ)

D**E****F**

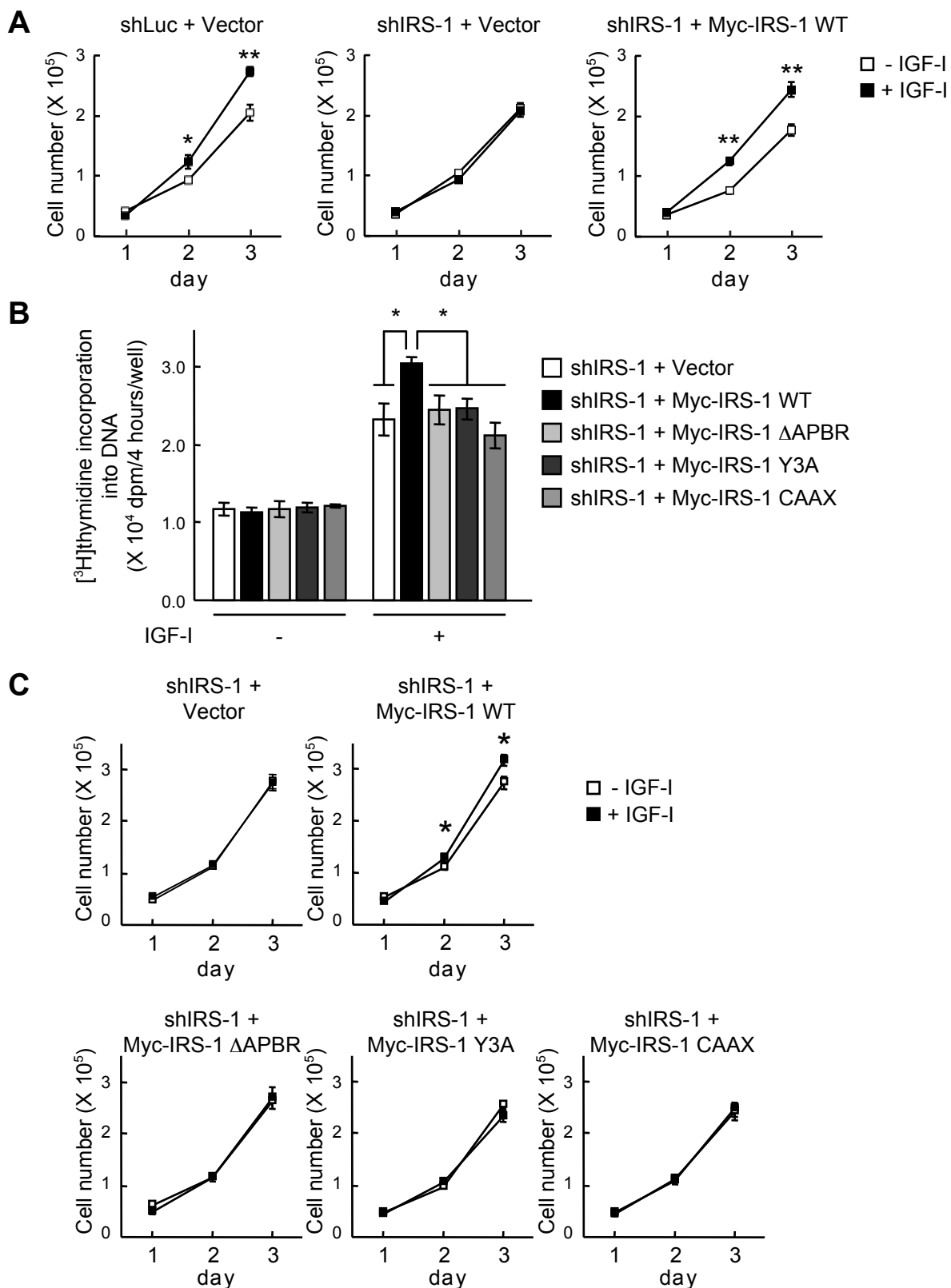


Fig. 3-8 IRS-1のAP-1A複合体との相互作用の欠損がIGF-I誘導性細胞増殖に与える影響

A LucまたはIRS-1に対するshRNAと、ベクターまたはMyc-IRS-1 WTを共発現するL6筋芽細胞を、IGF-I非添加あるいは添加した培地で培養した。各日細胞数を計数し、細胞増殖を解析した。

Means \pm SE; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ ($n = 3$)

B, C shIRS-1(#2)とMyc-IRS-1変異体を共発現するL6筋芽細胞を血清飢餓後、IGF-I (100 ng/ml) で細胞を処理し、最終4時間でDNAに取り込まれた[³H]thymidineの量を測定した。Means \pm SE ($n=3$; *, $P < 0.05$) (B) また、各日細胞数を計数し、細胞増殖を解析した (C)。Means \pm SE; *, $P < 0.05$ ($n = 3$) 独立した3回の実験から得られた代表的な結果を示す。

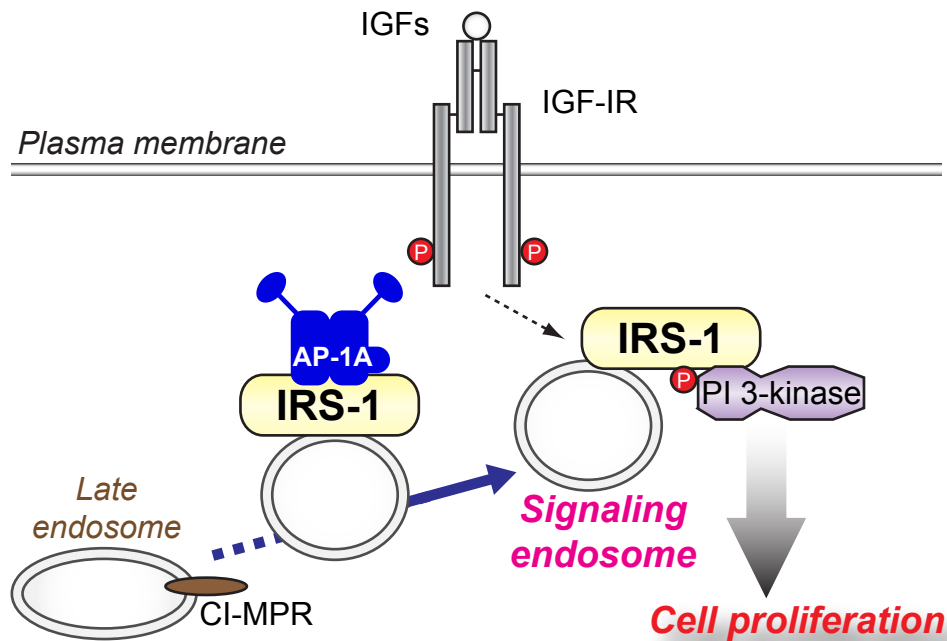


Fig. 3-9 (作業仮説) AP-1A複合体によるIRS-1の細胞内小胞への配置は、IGFによって誘導される細胞増殖に必須である

IRS-1はYxxΦモチーフを介してAP-1A複合体と結合し、CI-MPR陽性の後期エンドソームからシグナリングエンドソームへ輸送される。AP-1A複合体との結合が欠損したIRS-1変異体は、輸送が阻害される結果、CI-MPR陽性小胞へ蓄積してしまう。また、このIRS-1変異体を発現する細胞ではIGFシグナル伝達や増殖誘導が抑制される。これらのことから、AP-1A複合体によってシグナリングエンドソームに輸送されたIRS-1がIGF-IRからのシグナルを仲介し、主にPI 3-kinase経路を介して細胞増殖を誘導していると考えられる。

第四章 細胞膜上に配置する IRS-1 と AP-2 複合体の相互作用機構とその生理的意義の解明

緒言

第三章において、AP-1A 複合体によって IRS-1 が IGF シグナル伝達を仲介する特定の細胞内小胞、シグナリングエンドソームに輸送されることが明らかになった。一方、IRS-1 結合タンパク質として、yeast two-hybrid 法によって $\mu 1A$ に加えて AP-2 複合体のサブユニット $\mu 2$ も同定されている (Fig. 4-1A)。AP-2 複合体はクラスリン依存的な膜輸送において、細胞膜からのエンドサイトーシスを担う唯一の AP 複合体であり、 $\mu 2$ は Yxx Φ タイプの積荷タンパク質を認識するサブユニットとして機能している。そこで、本章では AP-2 複合体と IRS-1 の相互作用と、AP-2 複合体が IRS-1 の細胞内配置に果たす役割について検討した。

ここまで述べてきたように、IRS-1 の多くは細胞内小胞に配置されている。それに対して、AP-2 複合体は細胞膜上で積荷タンパク質を認識することから、細胞膜上にも IRS-1 が配置され、そこで AP-2 複合体と相互作用している可能性も考えられた。そこで本章では、全反射顕微鏡 (total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy) を用いて、細胞膜上の IRS-1 や AP-2 複合体の挙動を観察した。対物レンズ型全反射照明法では、レーザー光を対物レンズの後方から入射し、対物レンズ先端から平行光となるように角度をつけて出射することで、対物レンズと接するカバーガラス側へ 100 nm 程度の薄い光場 (エバネッセント光) を形成させて、細胞接着面を特異的に励起することが可能である。この全反射顕微鏡を用いて、L6 筋芽細胞において IRS-1 と AP-2 複合体が細胞膜上へ配置される分子機構を解析した。

さらに、本章では IRS-1 が AP-2 複合体を介したエンドサイトーシスに果たす役割についても検討した。AP-2 複合体によるクラスリン依存的なエンドサイトーシスは、二種類に大別されることが知られている。ひとつは、細胞内に取り込まれる速度が一定に保たれている構成的エンドサイトーシスであり、血中の鉄を細胞内に輸送するトランスフェリンが代表的な積荷タンパク質として知られている (Sorkin and von Zastrow, 2009)。

もう一つは、リガンド依存的な受容体のインターナリゼーションである(Goh and Sorkin, 2013)。本章では、IGF-I 依存的な IGF-IR のインターナリゼーションについて検討した。この IGF-IR のインターナリゼーションには、チロシンキナーゼの活性化が必須であることが示されている(Kato et al., 1994; LeRoith et al., 1995)。IGF-IR はリガンドと結合すると、キナーゼドメインの活性化ループ内に存在する 3 ヶ所のチロシン残基がリン酸化されることで、チロシンキナーゼ活性が上昇する。中でも 1131 番目のチロシン残基のリン酸化は IGF-IR のキナーゼ活性化に必須であることから、当該チロシン残基のリン酸化を IGF-IR の活性指標として評価した。

結果

AP-2 複合体の $\mu 2$ サブユニットは IRS-1 と相互作用する

まず、yeast two-hybrid 法の結果を確認するために、IRS-1 と $\mu 2$ の相互作用を pull-down アッセイによって調べた。そのために GST を融合した $\mu 1A$ と $\mu 2$ を、大腸菌発現系を用いて精製した (Fig. 4-1B)。GFP-IRS-1 WT を発現する HEK293T 細胞から調製した抽出液と、GST- $\mu 1A$ あるいは GST- $\mu 2$ を混合して、pull-down アッセイを行ったところ、IRS-1 は $\mu 1A$ に加えて $\mu 2$ と結合することが明らかになった (Fig. 4-1C)。次に、IRS-1 内の $\mu 2$ が結合する部位を探索した。 $\mu 2$ は $\mu 1A$ と同様に積荷タンパク質の Yxx Φ モチーフを認識する。そこで、 $\mu 1A$ が結合する 608、628、658 番目のチロシン残基を含む 3 ヶ所の Yxx Φ モチーフのチロシン残基をアラニン残基に置換した IRS-1 変異体 (Y3A) を用いて pull-down アッセイを行った結果、IRS-1 Y3A 変異体は $\mu 2$ と結合しなかったことから (Fig. 4-1C)、 $\mu 2$ は $\mu 1A$ と同じ結合部位を認識して IRS-1 と結合すると結論した。

次に、IRS-1 が細胞内で AP-2 複合体と相互作用しているかどうかを検討するために、共免疫沈降実験を行った。HEK293T 細胞に FLAG タグを融合した IRS-1 または IRS-2 を発現させ、抗 FLAG 抗体で免疫沈降したところ、内在性 α -adaptin (AP-2 複合体のサブユニット) が IRS-1 と強く共沈降されることがわかった (Fig. 4-1D)。さらに、FLAG-IRS-1 を恒常的に発現する L6 筋芽細胞においても、内在性 α -adaptin が IRS-1 と共沈降された (Fig. 3-1E)。以上の結果から、IRS-1 は細胞内で $\mu 2$ を介して AP-2 複合体

と結合していることが明らかとなった。

AP-2 複合体の発現抑制によって IRS-1 の細胞内配置や IGF-I 依存的な DNA 合成は変化しない

第三章で示したように、AP-1A 複合体は IRS-1 の細胞内小胞への配置と IGF-I による細胞増殖の誘導に必要である。そこで、AP-2 複合体も IRS-1 の細胞内配置や細胞増殖に関与するかを検討した。まず、AP-2 複合体の発現抑制が IRS-1 の細胞内配置に与える影響を解析した。L6 筋芽細胞に $\mu 2$ に対する siRNA を導入し、 $\mu 2$ を発現抑制した (Fig. 4-2A)。この細胞では、AP-2 複合体のサブユニット α -adaptin の発現量も減少することがわかった (Fig. 4-2A and B)。次に、GFP-IRS-1 を恒常的に発現する L6 筋芽細胞に $\mu 2$ に対する siRNA を導入し、蛍光ラベルしたトランスフェリンの取り込みを調べたところ、 $\mu 2$ の発現抑制によってトランスフェリンの取り込みが顕著に抑制され、AP-2 の機能が阻害されていることが確認された (Fig. 4-2B)。しかし、この細胞において、GFP-IRS-1 は対照細胞と同様に細胞質中で小胞構造に分布していたことから、AP-2 複合体は IRS-1 の細胞内配置に影響しないと考えられた。

さらに、AP-2 複合体が AP-1A 複合体と同様に、IGF による細胞増殖の誘導に必要かどうかを検討するために、 $\mu 1A$ または $\mu 2$ を発現抑制した L6 筋芽細胞の IGF-I 依存的な DNA 合成を測定した。その結果、第三章で明らかになったように、 $\mu 1A$ の発現抑制によって IGF-I 依存的な DNA 合成は有意に減少するのに対して、 $\mu 2$ の発現抑制の影響はほとんど観察されなかった (Fig. 4-2C)。これらの結果から、AP-1A 複合体とは異なり、AP-2 複合体は IRS-1 の細胞内配置や細胞増殖に関与しないと結論した。

IRS-1 と AP-2 複合体は細胞膜裏打ち F-アクチン上に局在する

AP-2 複合体と IRS-1 の相互作用の生理的意義を解明するために、両者が相互作用している細胞内部位に注目した。第三章で示したように、IRS-1 の多くは細胞内小胞に配置されているのに対して、AP-2 複合体は細胞膜上において積荷タンパク質のシグナルモチーフを認識することが知られている (Traub and Bonifacino, 2013)。IRS-1 は $\mu 2$ の認識モチーフである Yxx Φ モチーフを介して、AP-2 複合体と結合することから、IRS-1 の

一部は細胞膜にも存在し、AP-2 複合体と相互作用している可能性が考えられた。そこでまず、内在性 IRS-1 が細胞膜へ配置されているかどうか調べることにした。

超遠心分離によって細胞膜画分を部分精製したが、細胞膜の回収効率が低いために、IRS-1 は細胞膜画分にほとんど検出されなかった (Fig. 3-2B 参照)。そこで、細胞膜の収率を上げるために、L6 筋芽細胞の細胞膜タンパク質をビオチン標識し、細胞膜タンパク質画分をストレプトアビジンビーズで単離すると、内在性 IRS-1 と AP-2 複合体のサブユニット α -adaptin が同画分に存在することがわかった (Fig. 4-3A)。細胞質マーカーである HSP90 はほとんど pull-down されない、IRS-1 は直接ビオチン標識されていないことから (データは示さない)、IRS-1 の一部は何らかの細胞膜タンパク質と相互作用することで、細胞膜に配置していることが示唆された。

次に、細胞膜上における IRS-1 の分布を、全反射顕微鏡を用いて詳細に解析した。抗 IRS-1 抗体を用いて内在性 IRS-1 を染色して全反射顕微鏡での観察を試みたが、染色シグナルが弱く明瞭な観察像を得ることができなかった。そこで GFP-IRS-1 を恒常的に発現させた L6 筋芽細胞を用いて、細胞膜近傍の IRS-1 の存在を検討することにした (Fig. 4-3B)。その結果、細胞膜近傍に存在している GFP-IRS-1 は繊維状に分布していることが明らかとなった (Fig. 4-3C)。さらに、内在性 α -adaptin やクラスリン重鎖の染色シグナルの一部も繊維状の IRS-1 に沿って局在していた。このような局在パターンは、mRFP を融合させたクラスリン軽鎖を一過的に発現させた場合でも認められた (Fig. 4-3D)。さらに、GFP-IRS-1 は、膜を裏打ちする F-アクチンの束構造であるストレスファイバーに相当する F-アクチンの染色パターンとよく一致したことから (Fig. 4-3E)、IRS-1 の一部は、AP-2 複合体やクラスリンとともに、細胞膜を裏打ちする F-アクチン上に存在すると考えた。

次に、このような細胞膜上の IRS-1 と AP-2 複合体の配置を制御する分子機構を明らかにするために、(1) F-アクチンの重合阻害、(2) AP-2 複合体や (3) IRS-1 の発現抑制などが、IRS-1 と AP-2 複合体の細胞膜上の分布に与える影響を調べることにした。

F-アクチンは IRS-1 と AP-2 複合体の細胞膜上への配置に必要である

まず、F-アクチンが IRS-1 や AP-2 複合体の細胞膜上への配置に与える影響を明らかにするために、アクチン重合阻害剤である Latrunculin B で細胞を処理し、全反射顕微鏡を用いて IRS-1 と AP-2 複合体の局在変化を解析した。その結果、Latrunculin B の処理によって、F-アクチンの染色パターンは繊維状から斑点状に変化した (Fig. 4-4A、赤)。同様に、GFP-IRS-1 の繊維状の局在パターンも崩壊し、斑点状の F-アクチンと共局在した (Fig. 4-4A、緑)。さらに、内在性 α -adaptin やクラスリン重鎖の染色シグナルも斑点状の GFP-IRS-1 や F-アクチンと共局在することがわかった (Fig. 4-4A、青)。このことから、IRS-1 や AP-2 複合体は F-アクチンを足場として細胞膜上へ配置していることが示された。

IRS-1 のアミノ酸配列中にアクチン結合する部位が存在するか探索したが、 α -actinin などに存在するアクチン結合ドメインや、talin などに存在するアクチン結合モチーフ (ILWEQ) は見つからなかった。このことから、IRS-1 は細胞膜裏打ち F-アクチンに直接ではなく、アクチン結合タンパク質を介在して相互作用していることが考えられた。当研究室では IRS-1 と共免疫沈降される分子を質量分析法で探索する過程で、アクチン結合性モータータンパク質である Myosin IIA を同定している (Vicente-Manzanares et al., 2009)。Myosin IIA が細胞内で IRS-1 と相互作用しているかどうかを、免疫沈降によって検討した。HEK293T 細胞に FLAG タグを付加した IRS-1 と GFP を付加した Myosin IIA を共発現させて免疫沈降を行ったところ、GFP-Myosin IIA が FLAG-IRS-1 と共沈降されることがわかった (Fig. 4-4B)。さらに、IRS-1 の近傍に存在する分子をビオチン標識して単離する BioID 法を用いて探索したところ、アクチン架橋タンパク質である Filamin A を同定した (BioID 法を用いた IRS の近傍分子の探索は第五章で詳述する) (Gorlin et al., 1990)。FLAG-IRS-1 を HEK293T 細胞に発現させて免疫沈降を行ったところ、内在性 FilaminA も FLAG-IRS-1 と共沈降された (Fig. 4-4C)。さらに、全反射顕微鏡を用いた観察の結果、GFP-IRS-1 と内在性 Filamin A が共に細胞膜を裏打ちする F-アクチン上に局在することが明らかとなった (Fig. 4-4D)。Myosin IIA もストレスファイバーに局在する分子であることから、IRS-1 は Myosin IIA や Filamin A などのアクチン結合タンパク質と相互作用して、細胞膜裏打ち F-アクチンへ配置されていると考えられた。

上述の分子のうち、Filamin A について、IRS-1 の細胞膜上への配置に与える影響を調べるために、Filamin A に対する shRNA を恒常的に発現する L6 筋芽細胞を樹立した (Fig. 4-4E)。全反射顕微鏡を用いて、Filamin A 発現抑制細胞における細胞膜近傍の IRS-1 の局在を観察したところ、繊維状に局在する GFP-IRS-1 が部分的に欠損していることがわかった (Fig. 4-5F and G)。これは、Filamin A をノックアウトした胎児繊維芽細胞において、F-アクチンの束化が阻害されてしまい、細胞の中を縦横に走行するストレスファイバーの一部が穴のように欠損する表現型と酷似している (Luo et al., 2013; Lynch et al., 2011)。Filamin A の発現抑制によって、GFP-IRS-1 が欠損した部分には、内在性 α -adaptin やクラスリン重鎖の染色シグナルもほとんど検出されなかった (Fig. 4-4F and G)。これらの結果から、IRS-1 や AP-2 複合体の細胞膜上への配置は、F-アクチンや Filamin A などのアクチン結合タンパク質に依存していると考えられた。

IRS-1 は AP-2 複合体非依存的に細胞膜裏打ち F-アクチンへ局在する

次に、AP-2 複合体が細胞膜上への IRS-1 の配置に寄与しているか検討するために、GFP-IRS-1 を恒常的に発現する L6 筋芽細胞に、 $\mu 2$ に対する siRNA を導入し、全反射顕微鏡を用いて細胞膜近傍における GFP-IRS-1 の局在を観察した (Fig. 4-5A)。その結果、 $\mu 2$ を発現抑制しても細胞膜裏打ち F-アクチンへの GFP-IRS-1 の局在は阻害されなかった。また、 $\mu 1A$ を発現抑制した場合も、GFP-IRS-1 は細胞膜裏打ち F-アクチンへ局在していた (Fig. 4-5B)。さらに、AP-1A/AP-2 複合体との相互作用が IRS-1 の細胞膜への配置に与える影響を、IRS-1 変異体を用いて調べた。 $\mu 1A$ と $\mu 2$ の両者に結合しない IRS-1 変異体 $\Delta APBR$ または Y3A を恒常的に発現する L6 筋芽細胞を樹立し (Fig. 4-5C)、各 IRS-1 変異体の局在を全反射顕微鏡を用いて観察した。その結果、IRS-1 $\Delta APBR$ 、Y3A ともに細胞膜裏打ち F-アクチンへ局在することがわかった (Fig. 4-5D)。これらの結果から、IRS-1 が細胞膜裏打ち F-アクチンへ配置するためには、AP-1A 複合体や AP-2 複合体を介した膜輸送系は関与していないと結論した。

IRS-1 の発現抑制は、AP-2 複合体の細胞膜裏打ち F-アクチンへの配置を阻害する

AP-2 複合体は細胞膜への IRS-1 の配置に関与しない一方、膜裏打ち F-アクチンは AP-2

複合体と IRS-1 の両方の細胞膜への配置に必要であることから、次に、細胞膜裏打ち F-アクチンに配置された IRS-1 が AP-2 複合体の局在に与える影響を検討することにした。L6 筋芽細胞に IRS-1 に対する siRNA を導入して、IRS-1 を発現抑制した (Fig. 4-6A)。全反射顕微鏡を用いた観察の結果、対照細胞では内在性 α -adaptin の染色シグナルが細胞膜を裏打ちする F-アクチンに局在していたのに対し、IRS-1 発現抑制細胞では α -adaptin の染色シグナルが細胞辺縁に集中しており、ストレスファイバー上にはほとんど存在しないことがわかった (Fig. 4-6B)。これまでの結果を合わせ、IRS-1 は細胞膜を裏打ちする F-アクチンに局在し、そこへ AP-2 複合体をリクルートする機能を持つ可能性が考えられた。

IRS-1 の過剰発現はトランスフェリンの取り込みを阻害しない

IRS-1 は積荷タンパク質を認識する μ 2 サブユニットに直接結合することから、細胞膜上の IRS-1 は AP-2 複合体による積荷タンパク質の輸送を競合的に阻害する可能性が考えられる。すなわち、IRS-1 の過剰発現によって、IRS-1 と結合する AP-2 複合体の割合が増加し、逆に積荷タンパク質と相互作用する AP-2 複合体の割合が減少してエンドサイトーシスが抑制されると予想した。そこで、IRS-1 が AP-2 複合体を介したクラスリン依存的な構成的エンドサイトーシスに及ぼす影響について、細胞内に取り込まれるトランスフェリン受容体の細胞内分布およびトランスフェリンの細胞内取り込み量を検討した。ベクターのみ、あるいは GFP-IRS-1 を恒常的に発現する L6 筋芽細胞に、蛍光ラベルされたトランスフェリンを取り込ませ、さらにトランスフェリン受容体を免疫蛍光染色した。共焦点顕微鏡を用いた観察の結果、トランスフェリン受容体 (青) は両細胞ともに細胞内の核近傍に局在しており、その分布に大きな差異は認められなかった (Fig. 4-7A)。また、細胞内に取り込まれたトランスフェリン (赤) の量についても、蛍光輝度をもとに定量した結果、IRS-1 の過剰発現によって有意な差は認められなかった (Fig. 4-7A and B)。これらの結果から、AP-2 複合体を介する構成的なエンドサイトーシスには IRS-1 は関与しないと考えられた。

IGF-I の長期刺激によって、細胞膜上の活性化した IGF-IR 量が減少する

AP-2 複合体は構成的エンドサイトーシスに加えて、リガンド依存的な受容体のインターナリゼーションも誘導することが知られている。そこで、IRS-1 が IGF 依存的な IGF-IR のインターナリゼーションに関与しているか検討することにした。抗 phospho-IGF-IR β (Tyr1131)/IR β (Tyr1146)抗体（この抗体はリン酸化 IGF-IR、IR をともに認識する）を用いて、L6 筋芽細胞における IGF-IR/IR の挙動を調べたところ、IGF-IR の量は変化しなかったが、1131 番目のチロシン残基のリン酸化が IGF-I 刺激後 0.5-1 時間をピークとして徐々に減少していくことがわかった (Fig. 4-8A)。次に、細胞表面タンパク質をビオチン標識した後にストレプトアビジンで pull-down し、細胞膜上のチロシンリン酸化 IGF-IR の挙動を解析した。その結果、IGF-I 刺激によって細胞膜上の IGF-IR の量は変化しないが、チロシンリン酸化 IGF-IR/IR は刺激後 1 時間をピークに徐々に減少することがわかった (Fig. 4-8C, Vector)。免疫蛍光染色によって、チロシンリン酸化 IGF-IR の分布を解析したところ、GFP を融合した IGF-IR を一過的に発現させた L6 筋芽細胞では、チロシンリン酸化 IGF-IR/IR の蛍光シグナルの多くは、細胞表面と接着面の両方に分布していた (Fig. 4-8B)。抗チロシンリン酸化 IGF-IR β /IR β 抗体由来のシグナルが、IGF-IR と IR のどちらに由来するかを明らかにするために、IR を一過的に発現させた細胞を IGF-I で刺激し、同様の実験を行ったところ、抗チロシンリン酸化 IGF-IR β /IR β 抗体由来のシグナルはほとんど検出されなかったことから（データは示さない）、この実験系では主にチロシンリン酸化された IGF-IR を検出していると結論した。一連の結果から、IGF-I の長期刺激に応答して、細胞膜上のチロシンリン酸化 IGF-IR がインターナリゼーションによって減少していると考えられた。

IGF-I の長期刺激に応答して、チロシンリン酸化 IGF-IR は AP-2 複合体依存的にインターナリゼーションされる

次に、IGF-I の長期刺激によって誘導される、細胞膜上のチロシンリン酸化 IGF-IR 量の減少が、AP-2 複合体依存的なインターナリゼーションによって生じているかどうかを調べた。細胞表面タンパク質のビオチン標識法を用いて、 $\mu 2$ を発現抑制した細胞におけるリン酸化 IGF-IR の挙動を解析したところ、IGF-I 刺激 1-6 時間後の IGF-IR のチ

ロシンリン酸化が対照細胞と比べて高いことが明らかとなった (Fig. 4-9A)。さらに、チロシンリン酸化 IGF-IR の経時的変化を免疫蛍光染色によっても検討した。IGF-IR-GFP を一過的に発現させた L6 筋芽細胞を、抗チロシンリン酸化 IGF-IR β /IR β 抗体を用いて染色したところ、IGF-I の長期刺激によってリン酸化 IGF-IR が時間をかけて徐々に減少することから、IGF-IR-GFP は IGF-I 刺激に応答して内在性 IGF-IR と同様なリン酸化の変動を示すと結論した (Fig. 4-8E and F, si control)。この実験系を用いて、 μ 2 を発現抑制した細胞におけるチロシンリン酸化 IGF-IR の挙動を解析したところ、やはり IGF-IR のチロシンリン酸化が IGF-I 長期刺激後でも高く維持されていることがわかった (Fig. 4-9B)。これらのことから、IGF-I の長期刺激による細胞膜上のチロシンリン酸化された IGF-IR の減少は、AP-2 複合体によるインターナリゼーションによって生じていることが示された。

IRS-1 は AP-2 複合体と相互作用することで、IGF-I 依存的な IGF-IR のインターナリゼーションを阻害する

細胞膜裏打ち F-アクチンに配置された IRS-1 が、IGF-I 依存的な IGF-IR のインターナリゼーションに与える影響を調べるために、IRS-1 を過剰発現または発現抑制し、IGF-I 長期刺激後の細胞膜上のチロシンリン酸化 IGF-IR 量の変動を解析した。GFP-IRS-1 を恒常的に発現した L6 筋芽細胞において、細胞表面タンパク質のビオチン標識法による解析の結果、IGF-IR の長時間刺激後でもチロシンリン酸化 IGF-IR が細胞膜から細胞内へインターナリゼーションされずに細胞膜上に蓄積していることが明らかとなった (Fig. 4-8C and D, GFP-IRS-1)。それに対して、免疫蛍光染色による解析の結果、内在性 IRS-1 を発現抑制した細胞では、IGF-I 依存的なチロシンリン酸化 IGF-IR のインターナリゼーションが対照細胞よりも早期に誘導されることがわかった (Fig. 4-8F)。以上の結果から、IRS-1 はチロシンリン酸化 IGF-IR の AP-2 複合体依存的なインターナリゼーションを阻害する機能を有すると結論した。

最後に、IRS-1 の過剰発現によるチロシンリン酸化 IGF-IR のインターナリゼーションの阻害が、IRS-1 と AP-2 複合体との相互作用に依存するかを検討した。GFP-IRS-1 WT、または μ 2 と結合しない GFP-IRS-1 Y3A を恒常的に発現する L6 筋芽細胞を IGF-I で刺激

し、IGF-I 長期刺激後の IGF-IR のチロシンリン酸化の変動を比較した。その結果、GFP-IRS-1 WT を発現する細胞では IGF-I の長期刺激後でも IGF-IR のチロシンリン酸化が維持されていたのに対して、GFP-IRS-1 Y3A を発現する細胞では IGF-I 刺激 1 時間後から徐々に減少することがわかった (Fig. 4-9C)。上記の結果を併せ、IRS-1 は AP-2 複合体と相互作用することで、IGF-I に応答した活性化 IGF-IR のインターナリゼーションを阻害することが明らかとなった。

細胞膜上において、チロシンリン酸化 IGF-IR の分布は IRS-1 と一致しない

細胞膜裏打ち F-アクチン上に局在する IRS-1 と AP-2 複合体との相互作用が、IGF-IR のインターナリゼーションに影響を及ぼすことから、最後に、細胞膜上における活性化された IGF-IR と IRS-1 の分布を比較した。GFP-IRS-1 を恒常的に発現する L6 筋芽細胞に、FLAG タグを付加した IGF-IR を一過的に発現させ、抗チロシンリン酸化 IGF-IR β /IR β 抗体を用いて免疫蛍光染色した。全反射顕微鏡を用いた解析の結果、細胞膜近傍において GFP-IRS-1 は IGF-I 刺激前後ともに繊維状に分布していた。一方、IGF-I 刺激後に検出されるチロシンリン酸化 IGF-IR は全体的に斑点状に分布しており、GFP-IRS-1 の分布とはあまり一致していないことが明らかとなった (Fig. 4-10)。この結果は、細胞膜上において大部分の IRS-1 が活性化した IGF-IR とは異なるコンパートメントに存在していることを示唆している。

考察

IRS-1 の細胞内配置に対する AP-1A 複合体と AP-2 複合体の役割の違い

前章において、IRS-1 が AP-1A 複合体と相互作用することで細胞内小胞へ輸送されていることを明らかにした。本章では、IRS-1 が同じクラスリンアダプターである AP-2 複合体とも相互作用することが明らかとなった。結合部位の解析から、 μ 1A と μ 2 は同じ Yxx Φ モチーフを介して IRS-1 と結合することから、AP-2 複合体も IRS-1 を細胞内小胞へ輸送している可能性が考えられた。しかし、 μ 2 を発現抑制しても IRS-1 の細胞内分布には大きな変化は認められず、IGF-I 依存的な DNA 合成も抑制されないことから、

AP-2 複合体は AP-1A 複合体とは異なり、細胞内小胞への IRS-1 の輸送には関与していないことが示唆された。また、本研究で用いた IRS-1 Δ APBR/Y3A は μ 1A と μ 2 の両方の結合を欠損しており、この変異体を用いるだけでは AP-1A 複合体と AP-2 複合体の IRS-1 への関与を単純に区別できない。本章において、 μ 2 の発現抑制が IRS-1 の細胞内小胞への配置や IGF-I 依存的な DNA 合成に影響しないことが明らかとなり、前章で示した IRS-1 Δ APBR/Y3A 変異体が呈する細胞内小胞への配置の異常や IGF 誘導性の細胞増殖の抑制の表現型は、主に AP-1A 複合体との結合の欠損が原因であると考えられる。

以前私は表面プラズモン共鳴法を用いて *in vitro* での IRS-1 と μ 2 の親和性を解析し、両タンパク質の相互作用は μ 2 と他の既知の積荷タンパク質よりも弱いことを示している（米山、修士論文）。これに反して、共免疫沈降実験の結果から細胞内では IRS-1 は AP-2 複合体と安定的に相互作用していることが示された。また当研究室において、細胞内で IRS-1 が同じ分子同士でオリゴマーを形成していることを見出している。一般に F-アクチンが束化したストレスファイバーに局在するアクチン結合タンパク質の多くはダイマーあるいはオリゴマーを形成する性質を有している(Revenu et al., 2004)。細胞膜裏打ち F-アクチンに配置された IRS-1 もオリゴマーを形成することで、AP-2 複合体との親和性が強くなっている可能性が考えられる。さらに、IRS-1 は Myosin IIA や Filamin A などの複数のアクチン結合タンパク質と相互作用することで、F-アクチンへ強く繫留されていることも予想される。エンドサイトーシスされる積荷タンパク質は AP-2 複合体と一過的な相互作用を形成することで、クラスリン被覆小胞に取り込まれ、細胞内に輸送されることが可能になると考えられている(Cocucci et al., 2012)。したがって、IRS-1 は AP-2 複合体と結合しても、両者の相互作用の強さや膜裏打ち F-アクチンへの繫留によって、積荷タンパク質としてクラスリン被覆小胞内へ取り込まれず、結果として AP-1A 複合体の場合のように細胞内小胞へ輸送されない可能性を、現在考えている。

細胞膜裏打ち F-アクチンに配置された IRS-1 がクラスリン被覆小胞形成に果たす役割

電子顕微鏡によって観察されるクラスリン被覆構造と、全反射顕微鏡によって観察されるクラスリンや AP-2 複合体のドット状構造は、その大きさや細胞膜上の挙動が一致

していることから、AP-2 複合体を免疫蛍光染色した際に観察される細胞膜上の斑点状（ドット状）構造は、形成過程のクラスリン被覆構造に相当するとされている(Collins et al., 2011; Saffarian et al., 2009; Yarar et al., 2005)。本研究で私は、AP-2 複合体由来のドット状構造の一部が IRS-1 の局在する細胞膜裏打ち F-アクチンに沿って局在することを見出した。さらに、IRS-1 を発現抑制すると AP-2 複合体は F-アクチンに局在せずに細胞辺縁部に集積すること、Filamin A の発現抑制によって生じる F-アクチンの局所的な崩壊が見られた部分では、やはり AP-2 複合体やクラスリンのドット状構造は観察されないことから、IRS-1 は AP-2 複合体を細胞膜裏打ち F-アクチンへリクルートし、クラスリン被覆小胞の形成に何らかの役割を担っていると予想される。クラスリン被覆小胞の形成過程において、F-アクチンは小胞を膜から切断する後半段階では促進的に作用することが明らかとなっている一方で(Collins et al., 2011; Ferguson et al., 2009; Taylor et al., 2012)、初期段階での役割については促進と抑制の相反する報告がある。F-アクチンが促進的に働く例として、クラスリン被覆小胞の形成初期において、小胞形成に必要な分子をリクルートする、あるいは被覆小胞を組み立てる足場として、F-アクチンが機能している可能性が提唱されている(Yarar et al., 2005)。さらに、Boulant らは、細胞膜の張力が高い場合、クラスリンと結合する Hip1R (huntingtin interacting protein 1 related) が F-アクチンと結合することで、細胞膜の湾曲を誘導することを報告している(Boulant et al., 2011)。このような促進的な役割に反して、F-アクチンがクラスリン被覆小胞の形成において阻害的に働くことを、電子顕微鏡などの観察から示唆する報告もある。一般に膜上には二種類のクラスリン構造が観察される。ひとつは、小さなパッチ状の構造のもの、もうひとつは大きく広がったブランク状のものである。生細胞イメージングによる解析からブランク状のクラスリン構造は膜上に長時間とどまっており、最終的に小胞が形成されずに解体してしまういわば「組み立てに失敗した構造」と考えられている(Aguet et al., 2013)。さらに、F-アクチンがブランク状のクラスリン構造に相互作用する結果、その構造が安定化し、クラスリン被覆小胞の形成阻害が起こることも指摘されている(Saffarian et al., 2009)。本研究で明らかとなった IRS-1 の AP-2 複合体を細胞膜裏打ち F-アクチンへリクルートする機能がクラスリン被覆小胞の形成に促進的あるいは阻害的に働いているかについては、今後、電子顕微鏡や生細胞イメージングによる観察によっ

て検討していく必要がある。

細胞膜裏打ち F-アクチンに配置された IRS-1 が構成的エンドサイトーシスに果たす役割

IRS-1 は自身の YxxΦモチーフを介して AP-2 複合体のμ2 サブユニットと結合することから、YxxΦモチーフを持つ積荷タンパク質のエンドサイトーシスに競合的に作用することが予想された。しかしながら、YxxΦモチーフを有する代表的な積荷タンパク質であるトランスフェリン受容体の細胞内分布やトランスフェリンの細胞内取り込みは、IRS-1 の過剰発現によって有意な差異は認められなかった。したがって、細胞膜裏打ち F-アクチンに配置された IRS-1 は、構成的エンドサイトーシスに関与しないと考えられた。しかし、AP-2 複合体の機能阻害によって AP-2 複合体非依存的にクラスリン依存性エンドサイトーシスが補償的に誘導される(Aguet et al., 2013; Loerke et al., 2009; Motley et al., 2006)、さらに今回調べた時間ではトランスフェリンが回収エンドソームまで輸送されていることから（データは示さない）、IRS-1 の過剰発現によって初期段階のトランスフェリンの取り込みが阻害されている可能性も否定できず、今後、トランスフェリンの初期段階の取り込みを詳細に検討する必要がある。また、F-アクチン上に共局在しない AP-2 複合体も全反射顕微鏡で観察されたことから、トランスフェリンの取り込みは F-アクチンに存在しない AP-2 複合体を介しているのかもしれない。積荷タンパク質の種類によって細胞膜上でクラスリン被覆小胞にパックされる領域が異なっており、この領域の差異は F-アクチンに依存していることを示す報告もある(Grossier et al., 2014)。したがって、IRS-1 と AP-2 複合体の F-アクチン上での相互作用は、積荷タンパク質の選別に機能している可能性が考えられる。今後、他の AP-2 複合体の積荷タンパク質のエンドサイトーシスも調べることで、この可能性を検証できるだろう。

細胞膜裏打ち F-アクチンに配置された IRS-1 が IGF 依存的な IGF-IR のインターナリゼーションに果たす役割

本研究では、IRS-1 の過剰発現がトランスフェリンのエンドサイトーシスには影響しない一方、IGF-I 依存的な IGF-IR のインターナリゼーションを阻害することが明らかと

なった。これまでに IGF 依存的な IGF-IR のインターナリゼーションは、クラスリンやカベオラ依存的なエンドサイトーシスを介して生じることが報告されている(Martins et al., 2011; Monami et al., 2008; Salani et al., 2010)。また、IGF-IR を脱リン酸化することが知られている PTP1B (protein tyrosine phosphatase-1B) は主に小胞体に局在しているが、その脱リン酸化酵素活性は細胞内方向に向かって徐々に強く勾配が形成されており(Yudushkin et al., 2007)、PTP1B による IGF-IR の脱リン酸化は細胞膜からのインターナリゼーションと共役していると考えられている。本研究において、AP-2 複合体の発現抑制によって、細胞膜上のチロシンリン酸化された IGF-IR は対照細胞よりも多く蓄積していく変動が観察されたことから、L6 筋芽細胞では IGF-I の刺激が入ると一定量の活性化 IGF-IR がインターナリゼーションされ、細胞膜上のチロシンリン酸化された IGF-IR が減少していくと考えられる。さらに、IRS-1 の過剰発現によって生じる IGF-IR の持続的なチロシンリン酸化は、 $\mu 2$ と結合できない IRS-1 Y3A 変異体では起こらないことから、IRS-1 は AP-2 複合体と結合することで IGF-IR のインターナリゼーションを阻害している、新規な役割を持つことが明らかとなった。

$\mu 2$ が結合する IRS-1 の Yxx Φ モチーフは、IGF-IR によってリン酸化されるチロシン残基を含んでいる。以前行った X 線結晶構造解析から、 $\mu 2$ の Yxx Φ モチーフ中のチロシン残基を認識するポケットは、リン酸化チロシン残基を立体的に収容できないことが示されている(米山、修士論文)。さらに、*in vitro* の結合実験によっても、IRS-1 のリン酸化 Yxx Φ モチーフは $\mu 2$ と結合できないことから、細胞膜裏打ち F-アクチンに局在する IRS-1 がチロシンリン酸化されると、AP-2 複合体が F-アクチンから解離すると考えられる。また、L6 筋芽細胞においても、IGF-I の長期刺激後に内在性 IRS-1 が顕著に分解されることがわかった (Fig. 4-8A and C)。したがって、IGF-I が長時間細胞に作用して IRS-1 が分解される結果、AP-2 複合体が F-アクチンから解離し、IGF-IR のインターナリゼーションが誘導される可能性も考えられる。IRS-1 を発現抑制すると、IGF-IR のインターナリゼーションが早期に誘導される実験結果は、この仮説をよく支持している。さらに、リン酸化 IGF-IR の細胞膜上の分布は IRS-1 とはあまり一致しないことから、チロシンリン酸化 IGF-IR は F-アクチンに相互作用していない AP-2 複合体によってインターナリゼーションされているかもしれない。以上のことから、私は、「細胞膜

裏打ち F-アクチンに局在する IRS-1 は、IGF 依存的な IGF-IR のインターナリゼーションのタイミングを緻密に制御する AP-2 複合体の調節因子として機能している」、という作業仮説を提唱したい (Fig. 4-11)。

AP-2 複合体によって誘導される IGF 依存的な IGF-IR のインターナリゼーションの分子機構

IGF-IR のリガンド依存的なインターナリゼーションは、チロシンキナーゼ活性のない変異体では生じないことから、活性化した IGF-IR をクラスリン被覆小胞に取り込むメカニズムが存在するはずである。IGF-IR の細胞質領域には、AP-2 複合体の $\mu 2$ が認識し得る 5 ヶ所の Yxx Φ モチーフが存在するが、その内の 3 ヶ所はリン酸化されることが報告されている。また、AP-2 複合体が認識する NPXY モチーフも 1 ヶ所存在し、このモチーフの欠損はインターナリゼーションの速度を低下させる(Hsu et al., 1994)。しかし、AP-2 複合体と IGF-IR の相互作用は未だ確認されておらず、今後の課題である。AP-2 複合体と結合するアクセサリ分子の中でも、NPXY モチーフを認識する PTB ドメインを持った ARH (autosomal recessive hypercholesterolemia) や Dab2 (Disabled-2) は、積荷タンパク質の種類特異的にエンドサイトーシスを促進することが知られている (Mettlen et al., 2010)。また、IGF-IR は活性化依存的にユビキチン化されるが、ユビキチン化積荷タンパク質にリクルートされる EPS15 (EGFR pathway substrate clone 15) や β -arrestin などのアクセサリ分子も AP-2 複合体と相互作用する(Le Roy and Wrana, 2005)。したがって、AP-2 複合体はこれらの結合分子を介して活性化 IGF-IR と相互作用する可能性も考えられる。

細胞膜裏打ち F-アクチンに配置された IRS-1 が IGF 依存的な IGF-IR のインターナリゼーションを調節する生理的意義

IRS-1 の過剰発現や AP-2 複合体の発現抑制によって IGF-I 依存的な DNA 合成に変化が観察されないことから、IGF-IR のインターナリゼーションは、細胞増殖以外の生理活性の発現に関与していると考えられる。これまでに当研究室の伯野らは、IRS-1 の過剰発現によって L6 筋芽細胞の筋分化が抑制されることを見出している(Hakuno et al.,

2011)。これは、IGF シグナルの持続的な活性化が筋分化プログラムの初期段階を抑制することが原因となっている。したがって、筋分化過程における IGF シグナルの一過的な活性化／不活性化の調節には、IRS-1 と AP-2 複合体の相互作用を介して、IGF-IR が適切なタイミングでインターナリゼーションされる機構が寄与しているかもしれない。また、乳がん、平滑筋腫、副腎皮質腫瘍を含む複数の腫瘍において、IRS-1 タンパク質の高発現が認められている(Baserga, 2009; Chang et al., 2002)。がんの過増殖や転移などの悪性形質能の獲得には、IGF-IR を介した IGF シグナルの活性化が大きく関与している(Goetsch et al., 2005; Sell et al., 1993)。したがって、IRS-1 の高発現によって IGF-IR のインターナリゼーションが抑制される結果、IGF シグナルが長期間活性化されることで、がんの過増殖や転移が助長されている可能性が考えられる。

本研究の結果から、私は、IRS-1 の一部は細胞膜裏打ち F-アクチンに配置されており、AP-2 複合体をリクルートすることによって、IGF-IR のリガンド依存的なインターナリゼーションのタイミングを制御する「エンドサイトーシス調節因子」として機能していると結論した。

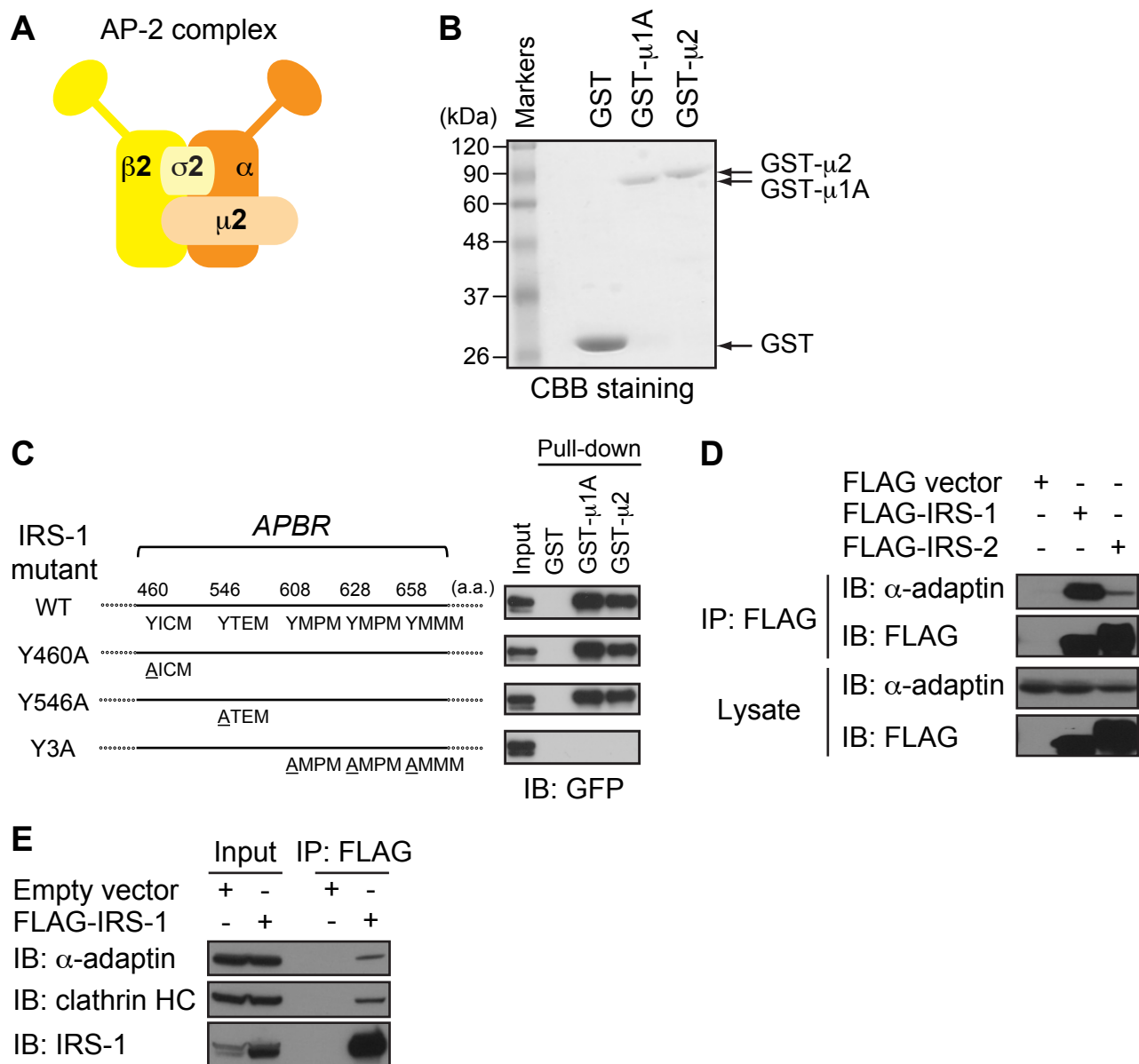


Fig. 4-1 IRS-1とAP-2複合体の相互作用

A AP-2複合体の構造。α-adaptin, β2-adaptin, μ2, σ2の四つのサブユニットから構成される。Yeast two-hybrid法によるスクリーニングの結果、IRS-1の相互作用分子の一つとしてμ2が同定された。

B GST-μ1AおよびGST-μ2を大腸菌発現系から精製し、CBB染色によって各コンストラクトの発現を確認した。

C APBR内に存在する5ヶ所のYxxΦモチーフと、実験に用いたIRS-1アラニン置換変異体を示した。GFP-IRS-1アラニン置換変異体を発現させたHEK293T細胞の抽出液と、精製したGST-μ1AあるいはGST-μ2を混合し、pull-downアッセイを行った。サンプルを抗GFP抗体を用いたimmunoblottingに供した。Inputはpull-downアッセイに供した抽出液の2%分に相当する。

D HEK293T細胞にFLAG-IRS-1またはFLAG-IRS-2を発現させた。細胞抽出液を抗FLAG抗体を用いた免疫沈降、および図に示す抗体を用いたimmunoblottingに供した。

E FLAG-IRS-1を恒常的に発現するL6筋芽細胞から抽出液を調製し、抗FLAG抗体を用いた免疫沈降、および図に示した抗体を用いたimmunoblottingに供した。Inputは免疫沈降に供した抽出液の1%分に相当する。(clathrin HC, clathrin heavy chain)

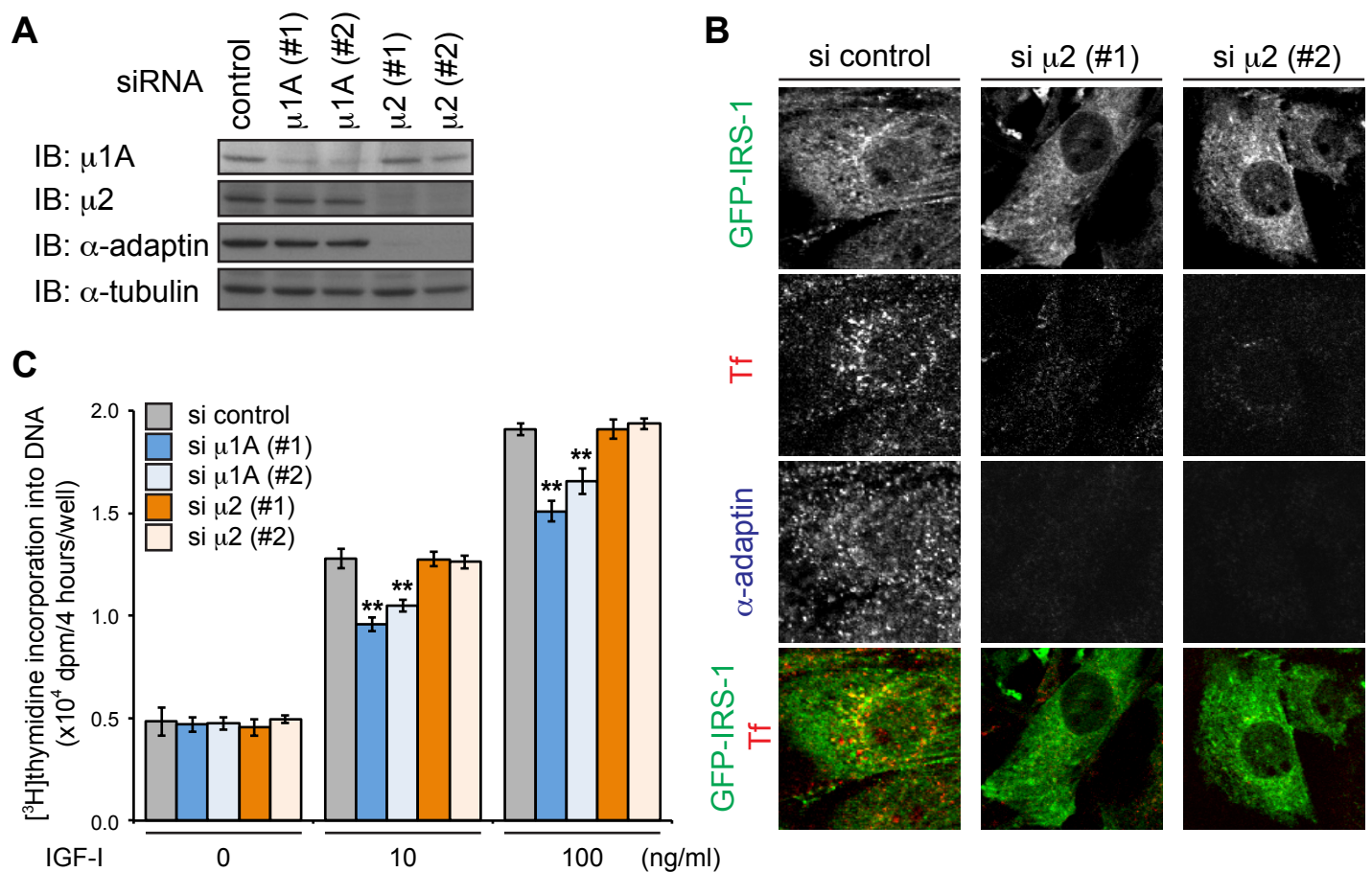


Fig. 4-2 AP-2複合体の発現抑制がIRS-1の細胞内配置とIGF-I依存的なDNA合成に与える影響

A μ 1Aまたは μ 2に対するsiRNAをL6筋芽細胞に導入した。細胞抽出液を図に示した抗体を用いたimmunoblottingに供した。

B μ 2に対するsiRNAをGFP-IRS-1（緑）を恒常的に発現するL6筋芽細胞に導入した。蛍光ラベルされたトランスフェリン（Tf; 赤）を37°Cで30分間細胞に取り込ませた。サンプルを抗 α -adaptin抗体（青）を用いて免疫蛍光染色し、共焦点顕微鏡を用いて観察した。

C μ 1Aまたは μ 2に対するsiRNAをL6筋芽細胞に導入した。血清飢餓後、図に示す濃度のIGF-Iで細胞を処理し、最終4時間で取り込まれた $[^3\text{H}]$ thymidineの量を測定した。Means \pm SE (n=3; **, $P < 0.01$)

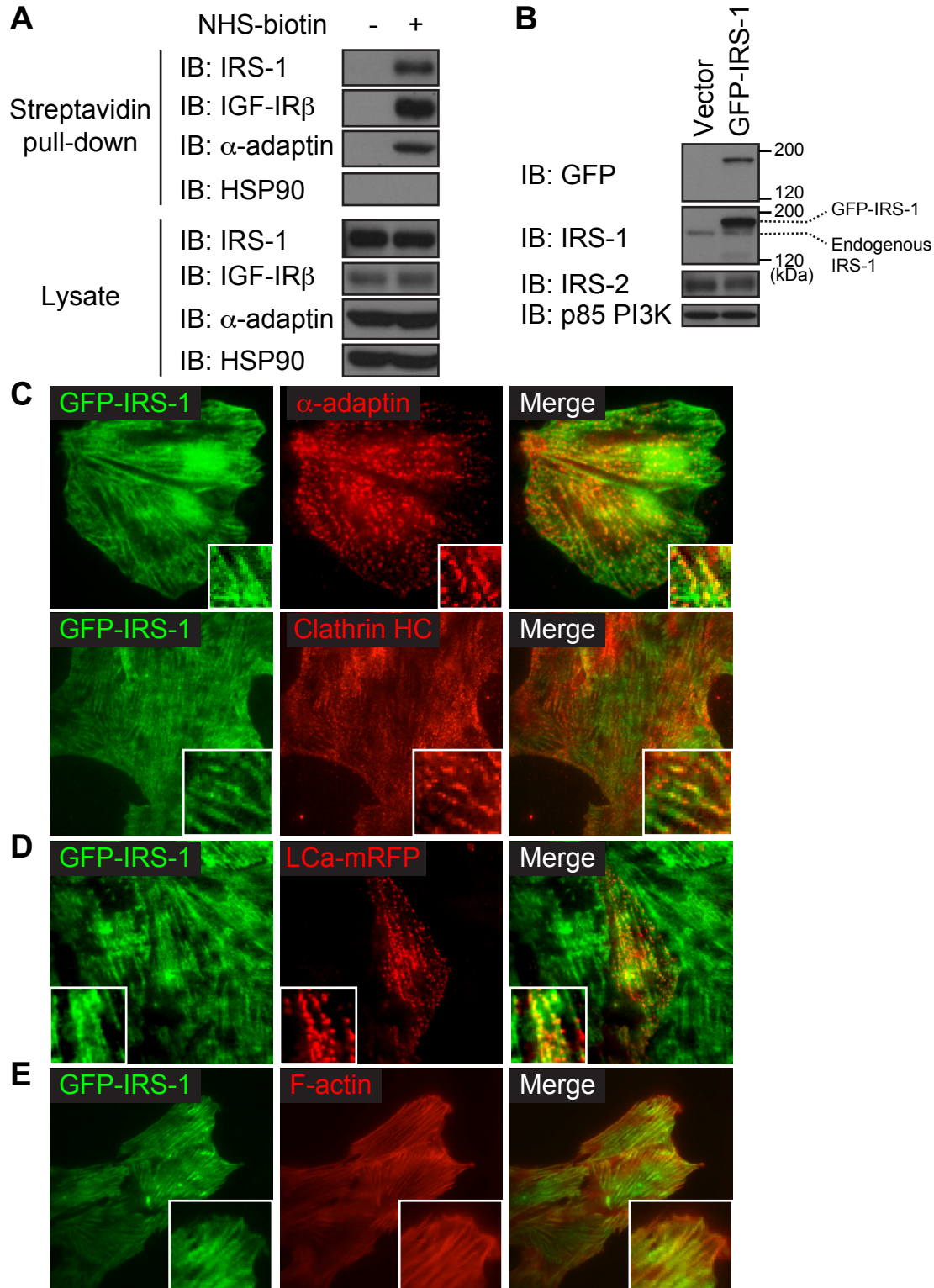


Fig. 4-3 細胞膜上におけるIRS-1とAP-2複合体の局在

A L6筋芽細胞をNHS-biotin溶液中で4°C、30分間インキュベートし、抽出液を調製した。ビオチン化された細胞膜タンパク質画分をstreptavidinビーズを用いて回収した。サンプルを図に示した抗体を用いたimmunoblottingに供した。

B レトロウイルスを用いて、GFP-IRS-1を恒常的に発現するL6筋芽細胞を樹立した。細胞抽出液を図に示した抗体を用いたimmunoblottingに供した。

C GFP-IRS-1（緑）を恒常的に発現するL6筋芽細胞を、抗 α -adaptin抗体（上段；赤）または抗clathrin HC抗体（下段；赤）を用いて免疫蛍光染色した。サンプルを全反射顕微鏡を用いて観察した。

D GFP-IRS-1（緑）を恒常的に発現するL6筋芽細胞にLCa-mRFP（赤）を一過的に発現させた。サンプルを全反射顕微鏡を用いて観察した。（LCa, clathrin light chain a）

E GFP-IRS-1（緑）を恒常的に発現するL6筋芽細胞を、rhodamine phalloidin（F-actin；赤）を用いて染色した。サンプルを全反射顕微鏡を用いて観察した。

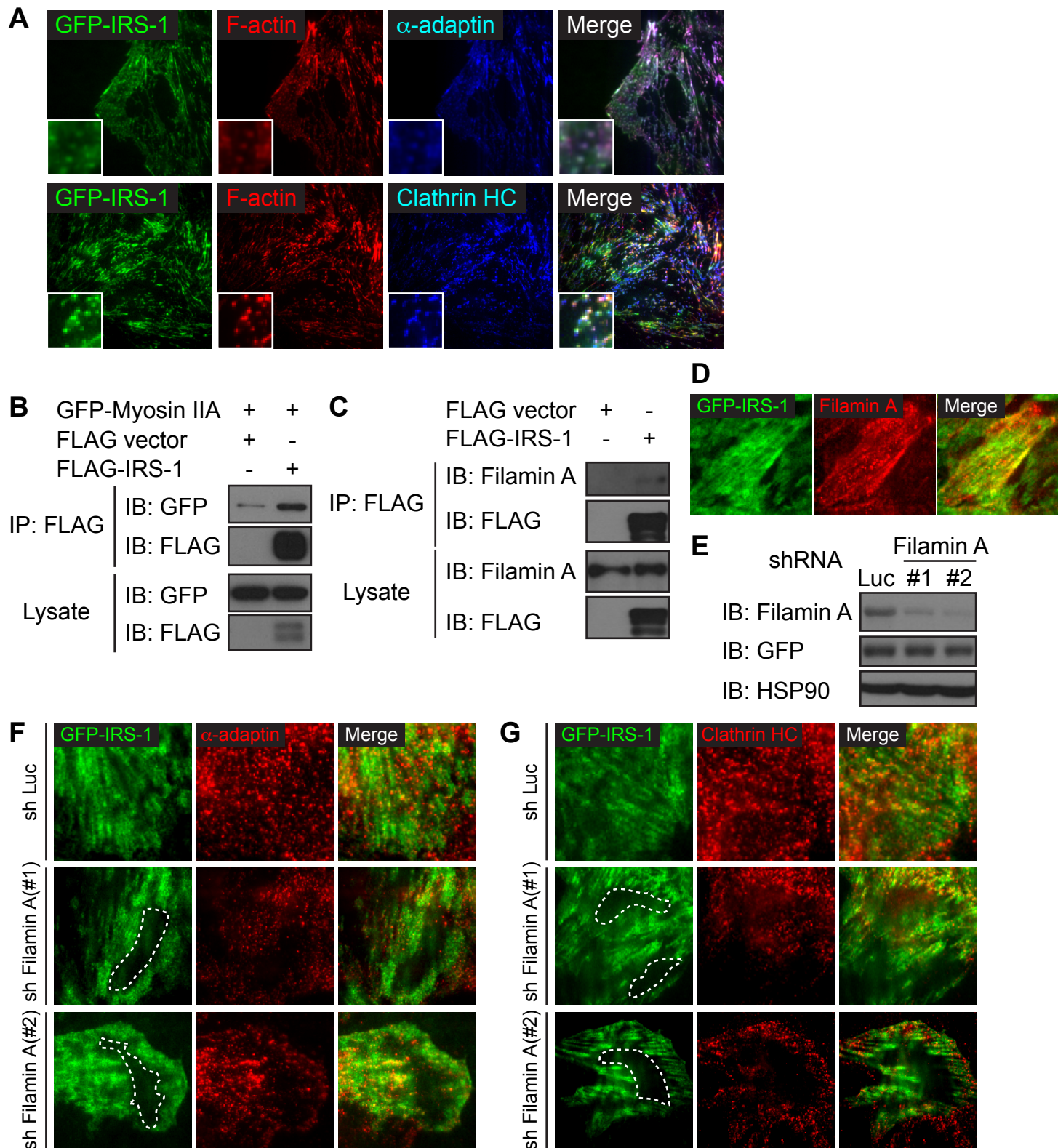


Fig. 4-4 F-アクチンやアクチン結合タンパク質がIRS-1の細胞膜裏打ちF-アクチンへの配置に与える影響

A GFP-IRS-1（緑）を恒常的に発現するL6筋芽細胞をlatrunculin Bで20分間処理した。細胞をrhodamine phalloidin（F-actin；赤）と、抗 α -adaptin抗体（上段；青）または抗clathrin HC抗体（下段；青）を用いて免疫蛍光染色した。サンプルを全反射顕微鏡を用いて観察した。

B HEK293T細胞にFLAG-IRS-1とGFP-Myosin IIAを発現させた。細胞抽出液を抗FLAG抗体を用いた免疫沈降、および図に示した抗体を用いたimmunoblottingに供した。

C HEK293T細胞にFLAG-IRS-1を発現させた。細胞抽出液を抗FLAG抗体を用いた免疫沈降、および図に示した抗体を用いたimmunoblottingに供した。

D GFP-IRS-1（緑）を恒常的に発現するL6筋芽細胞を、抗Filamin A抗体を用いて免疫蛍光染色した。サンプルを全反射顕微鏡を用いて観察した。

（説明の続きは次ページ）

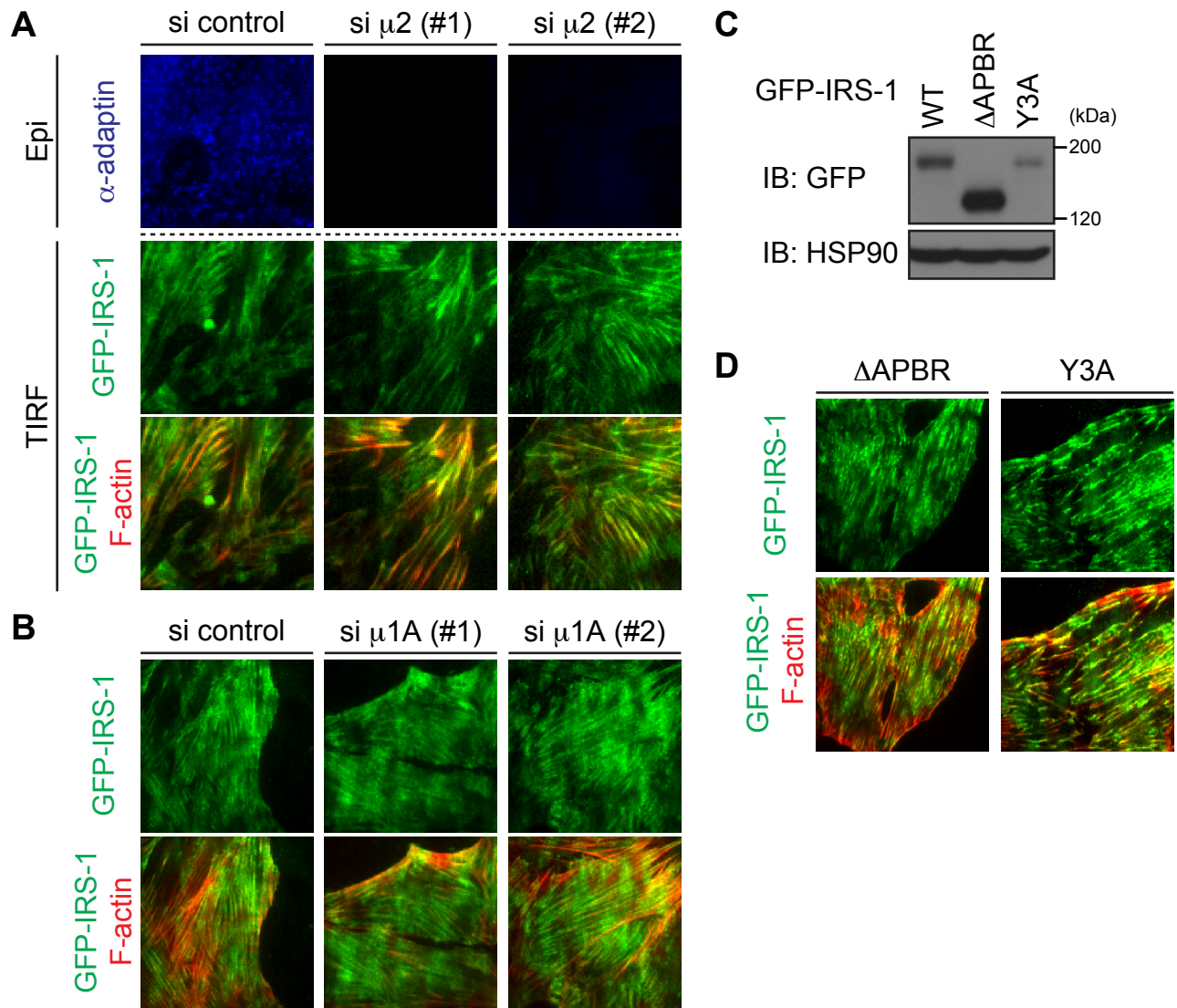


Fig. 4-5 AP-1A/AP-2複合体がIRS-1の細胞膜裏打ちF-アクチンへの配置に与える影響

- A GFP-IRS-1（緑）を恒常的に発現するL6筋芽細胞に $\mu 2$ に対するsiRNAを導入した。細胞を抗 α -adaptin抗体（青）とrhodamine phalloidin（F-actin；赤）を用いて免疫蛍光染色した。サンプルを全反射顕微鏡を用いて観察した。 α -adaptinは落射蛍光像（Epi）を、GFP-IRS-1とF-actinは全反射蛍光像（TIRF）を示す。
- B GFP-IRS-1（緑）を恒常的に発現するL6筋芽細胞に $\mu 1A$ に対するsiRNAを導入した。細胞をrhodamine phalloidin（F-actin；赤）を用いて蛍光染色した。サンプルを全反射顕微鏡を用いて観察した。
- C GFP-IRS-1 WT, Δ APBR, Y3Aを恒常的に発現するL6筋芽細胞の抽出液を調製し、図に示す抗体を用いたimmunoblottingに供した。
- D GFP-IRS-1 Δ APBRおよびY3A（緑）を恒常的に発現するL6筋芽細胞を、rhodamine phalloidin（F-actin；赤）を用いて蛍光染色した。サンプルを全反射顕微鏡を用いて観察した。

Fig. 4-4 F-アクチンやアクチン結合タンパク質がIRS-1の細胞膜裏打ちF-アクチンへの配置に与える影響（図は前ページ）

- E Filamin Aに対するshRNAとGFP-IRS-1を恒常的に発現するL6筋芽細胞から抽出液を調製し、図に示した抗体を用いたimmunoblottingに供した。
- F, G Filamin Aに対するshRNAとGFP-IRS-1（緑）を恒常的に発現するL6筋芽細胞を、抗 α -adaptin抗体（F；赤）または抗clathrin HC抗体（G；赤）を用いて免疫蛍光染色した。サンプルを全反射顕微鏡を用いて観察した。点線部分はF-アクチンを欠損した領域を示している。

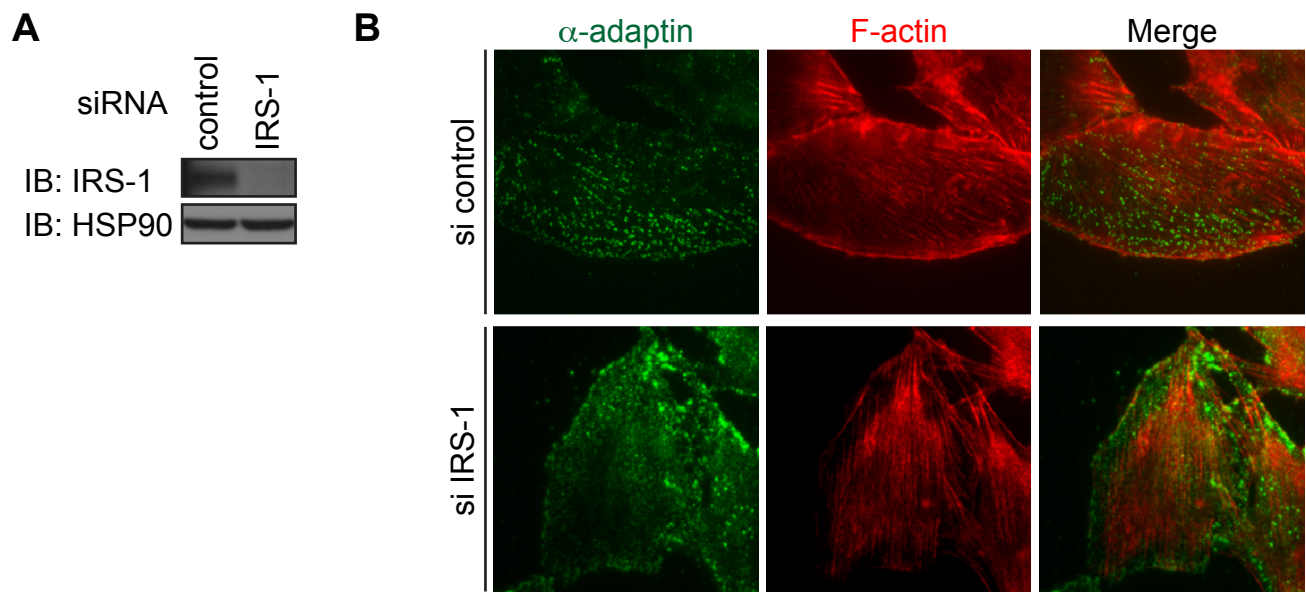


Fig. 4-6 IRS-1の発現抑制が細胞膜におけるAP-2複合体の配置に与える影響

A L6筋芽細胞にIRS-1に対するsiRNAを導入した。細胞抽出液を図に示した抗体を用いた immunoblottingに供した。

B L6筋芽細胞にIRS-1に対するsiRNAを導入した。細胞を抗 α -adaptin抗体（緑）とrhodamine phalloidin（F-actin；赤）を用いて免疫蛍光染色した。サンプルを全反射顕微鏡を用いて観察した。

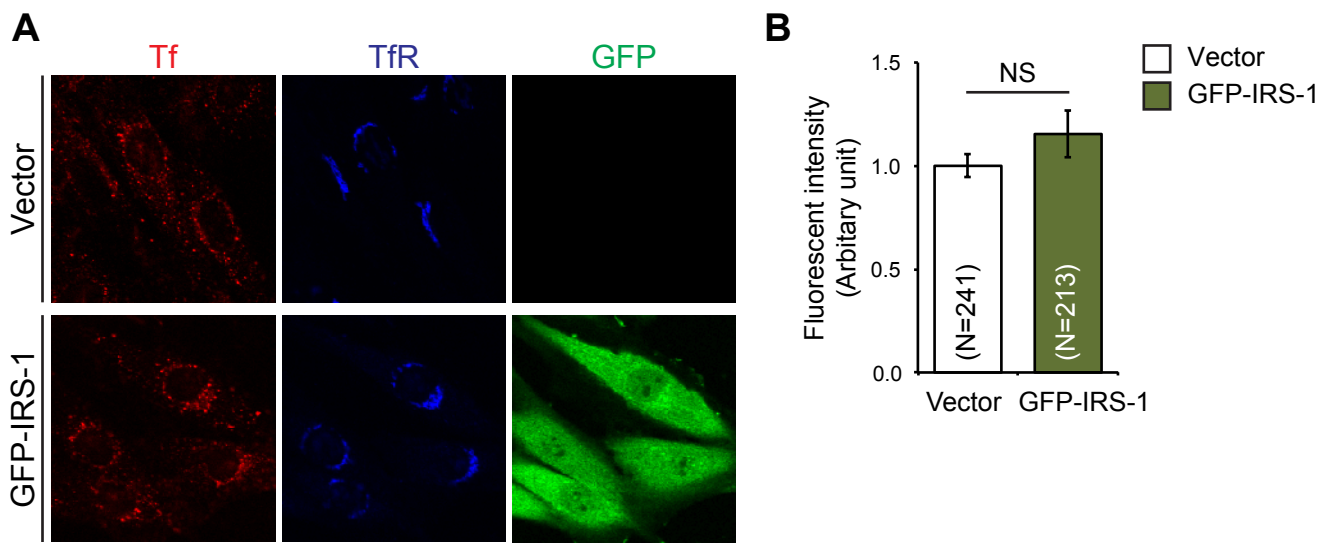


Fig. 4-7 IRS-1の過剰発現がトランスフェリンの細胞内取り込みに与える影響

A ベクターあるいはGFP-IRS-1を恒常的に発現するL6筋芽細胞に、蛍光ラベルされたトランスフェリン（Tf；赤）を37℃で30分間取り込ませた。サンプルを抗transferrin receptor抗体（TfR；青）を用いて免疫蛍光染色し、共焦点顕微鏡を用いて観察した。

B 10視野以上の画像からTfの蛍光シグナルを測定した。測定した値の平均と標準誤差を相対値としてグラフに示した。グラフ中のNは測定した全細胞数を表す。(NS, not significant)

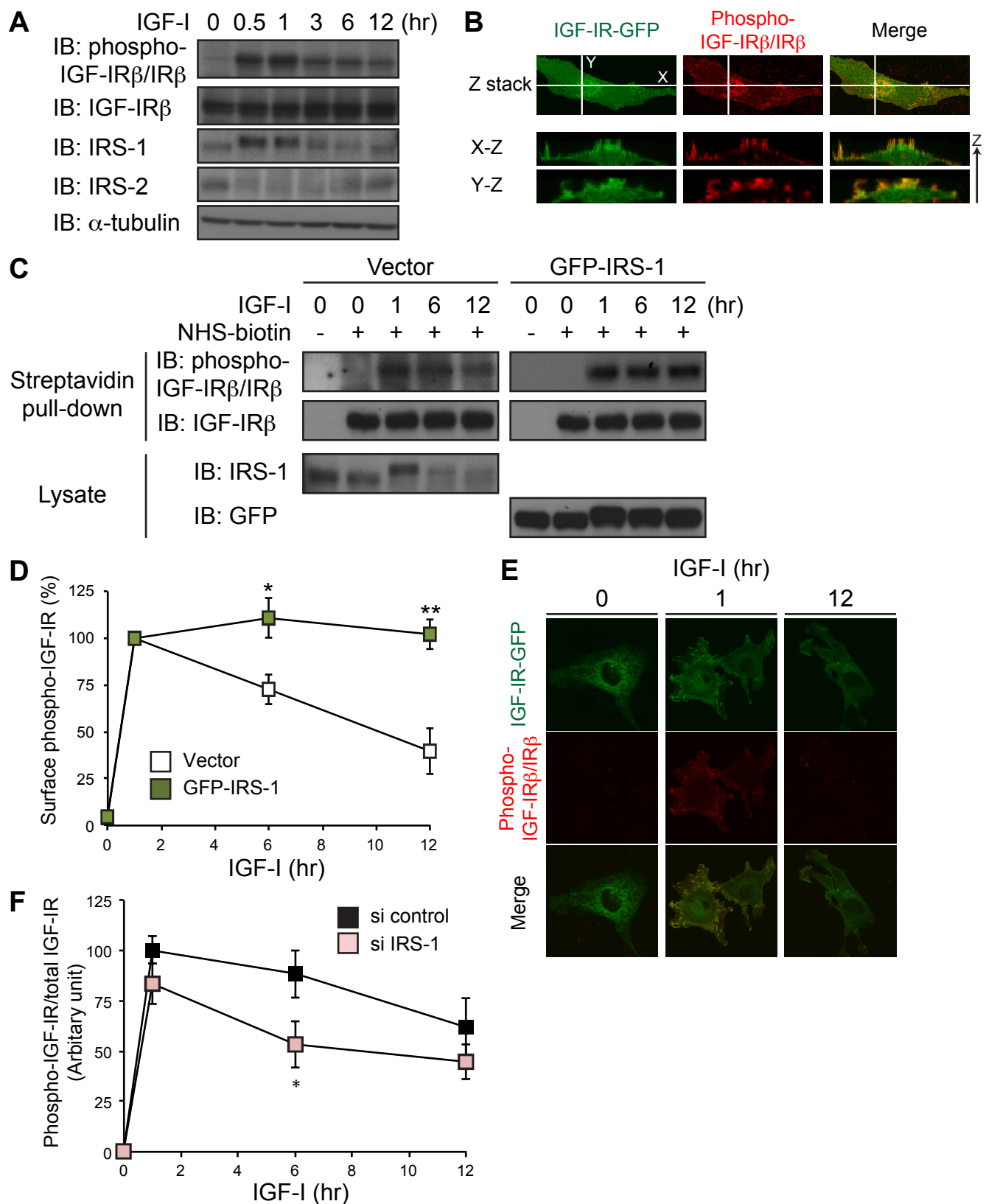


Fig. 4-8 IRS-1がIGF-I依存的なIGF-IRのインターナリゼーションに与える影響

A L6筋芽細胞を図に示した時間IGF-I (100 ng/ml) で処理した。細胞抽出液を図に示した抗体を用いたimmunoblottingに供した。

B L6筋芽細胞に一過的にIGF-IR-GFP (緑) を発現させた。血清飢餓後、IGF-I (100 ng/ml) で細胞を30分間処理し、抗phospho-IGF-IR β /IR β 抗体 (赤) を用いて免疫蛍光染色した。サンプルを共焦点顕微鏡を用いて観察し、Z方向にXY画像を連続的に取得した。取得したZシリーズの画像から作製したスタック画像を上段に示す。また、白線で示したX方向とY方向のZ断面の画像を下段に示す。

(説明の続きは次ページ)

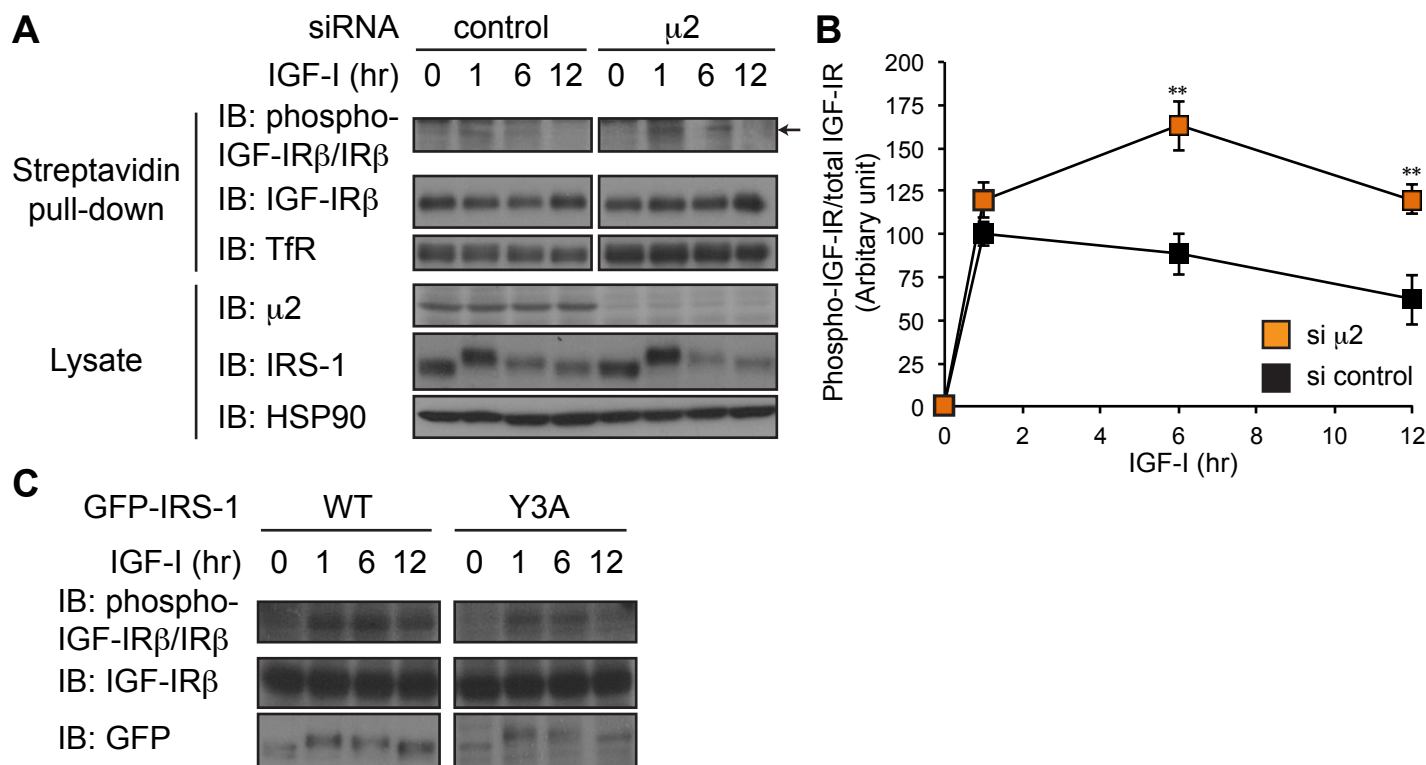


Fig. 4-9 AP-2複合体がIGF-I依存的なIGF-IRのインターナリゼーションに与える影響

A μ2に対するsiRNAを導入したL6筋芽細胞において、細胞表面をビオチン標識し、細胞膜画分を単離した。サンプルを図に示した抗体を用いたimmunoblottingに供した。

B μ2に対するsiRNAを導入しIGF-IR-GFPを一過的に発現させたL6筋芽細胞において、phospho-IGF-IR/total IGF-IRの値を求めた。IGF-Iを1時間処理した対照細胞 (si control) の値を100とした場合の相対値をグラフに示す。Means ± SE; **, $P < 0.01$

C GFP-IRS-1 WT, Y3A変異体を恒常的に発現するL6筋芽細胞を血清飢餓後、図に示す時間IGF-I (100 ng/ml) で処理した。細胞抽出液を図に示す抗体を用いたimmunoblottingに供した。

Fig. 4-8 IRS-1がIGF-I依存的なIGF-IRのインターナリゼーションに与える影響 (図は前ページ)

C ベクターあるいはGFP-IRS-1を恒常的に発現するL6筋芽細胞を図に示した時間、IGF-I (100 ng/ml) で処理した。細胞をNHS-biotin溶液中で4°C、30分間インキュベートし、抽出液を調製した。ビオチン化された細胞膜タンパク質画分をstreptavidinビーズを用いて回収した。サンプルを図に示した抗体を用いたimmunoblottingに供した。

D Cと同様の実験を4回繰り返し、得られた結果からphospho-IGF-IRβとIGF-IRβのバンド強度を定量して、phospho-IGF-IR/IGF-IRの値をグラフに示した。Means ± SE; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ (n = 4)

E L6筋芽細胞に一過的にIGF-IR-GFP (緑) を発現させた。血清飢餓後、IGF-I (100 ng/ml) で細胞を図に示す時間処理し、抗phospho-IGF-IRβ/IRβ抗体 (赤) を用いて免疫蛍光染色した。サンプルを共焦点顕微鏡を用いて観察した。

F L6筋芽細胞にIRS-1に対するsiRNAを導入させた後、IGF-IR-GFPを一過的に発現させた。血清飢餓後、IGF-I (100 ng/ml) で細胞を図に示す時間処理し、抗phospho-IGF-IRβ/IRβ抗体を用いて免疫蛍光染色した。サンプルを共焦点顕微鏡を用いて観察した。10視野以上20個以上の細胞の画像から、IGF-IR-GFP (total IGF-IR) およびphospho-IGF-IRβ/IRβの蛍光シグナルを測定し、phospho-IGF-IR/total IGF-IRの値を求めた。IGF-Iを1時間処理した対照細胞 (si control) の値を100とした場合の相対値をグラフに示す。Means ± SE; *, $P < 0.05$

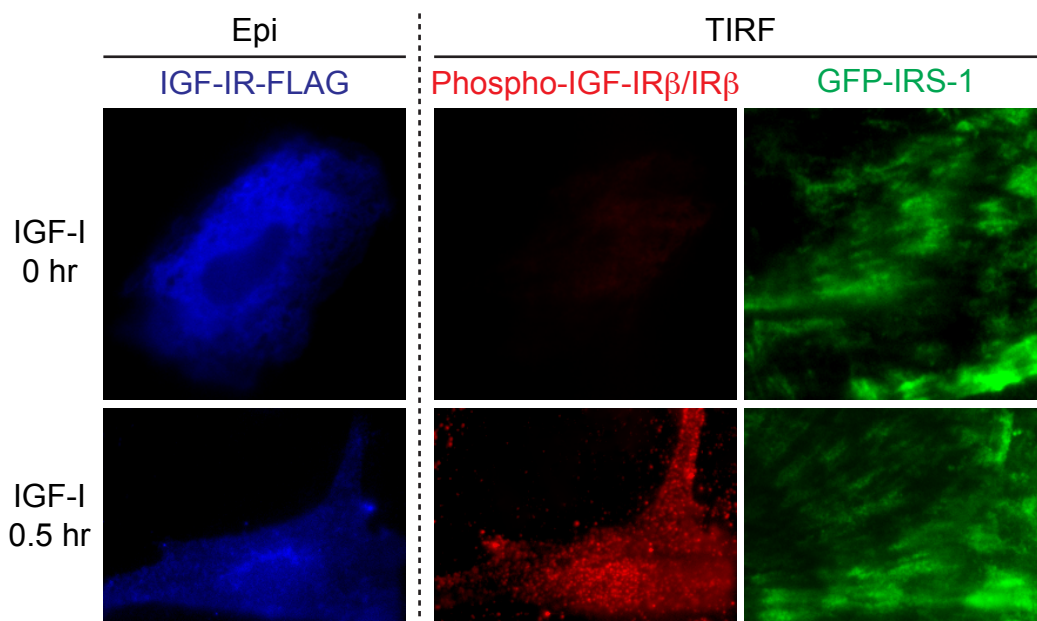


Fig. 4-10 IRS-1とチロシンリン酸化されたIGF-IRの細胞膜上における分布の比較

GFP-IRS-1（緑）を恒常的に発現するL6筋芽細胞にIGF-IR-FLAGを一過的に発現させた。血清飢餓後、IGF-I（100 ng/ml）で30分間処理した。細胞を抗FLAG抗体（青）と抗phospho-IGF-IR β /IR β 抗体（赤）で免疫蛍光染色した。サンプルを全反射顕微鏡で観察した。FLAGのシグナルは落射蛍光像（Epi）を、GFP-IRS-1とphospho-IGF-IRのシグナルは全反射蛍光像（TIRF）を示す。

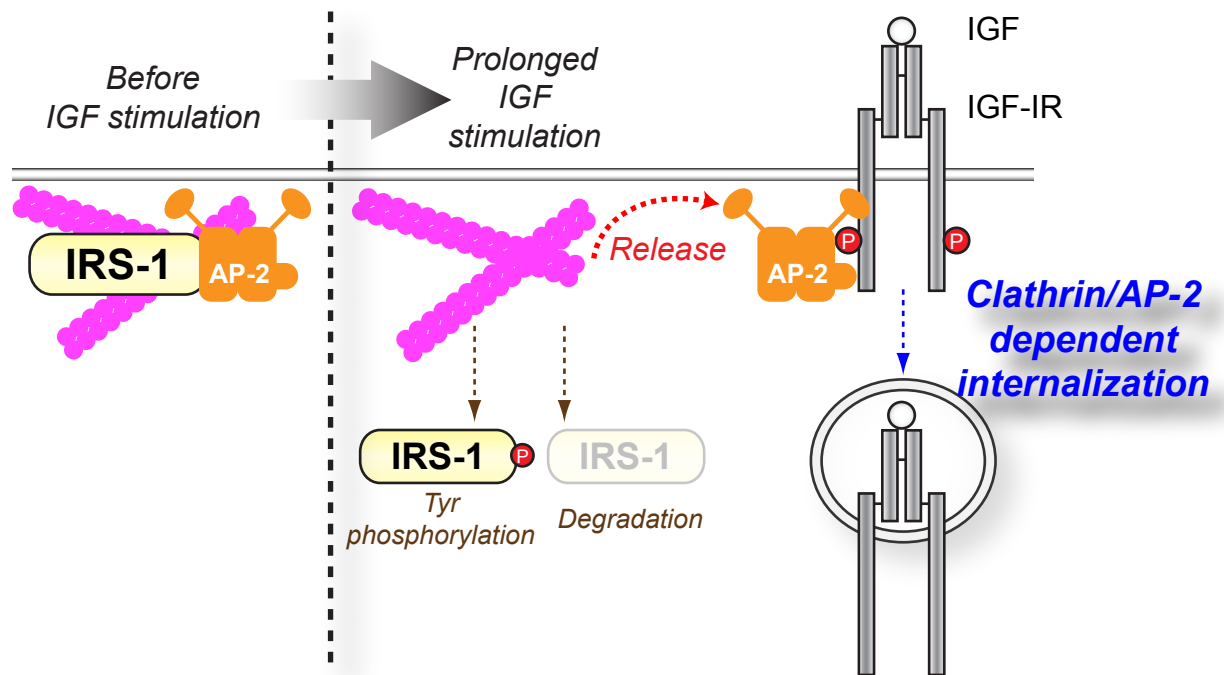


Fig. 4-11 （作業仮説）細胞膜裏打ちF-アクチンを足場としてIRS-1はAP-2複合体と相互作用し、AP-2複合体によるIGF-IRのインターナリゼーションを調節する

IGFが細胞に作用する前では、IRS-1とAP-2複合体は細胞膜裏打ちF-アクチン上で相互作用している。IGFが長時間細胞に作用すると、IRS-1のチロシンリン酸化によるAP-2複合体との解離やIRS-1の分解が生じる結果、AP-2複合体が細胞膜裏打ちF-アクチン上から遊離する。遊離したAP-2複合体は、自己リン酸化により活性化したIGF-IRと相互作用することで、クラスリン依存的にIGF-IRを細胞内へインターナリゼーションすると考えられる。

第五章 IRS 分子種の細胞内配置を決定するタンパク質相互作用ネットワークの網羅的解析

緒言

第三章で、IRS-1 は AP-1A 複合体と相互作用することで細胞内小胞へ輸送され、IGF シグナル伝達と細胞増殖の誘導を仲介すること、また第四章で、細胞膜を裏打ちする F-アクチン上で IRS-1 と AP-2 複合体が相互作用することで、IGF-IR のインターナリゼーションを調節していることを明らかにしてきた。一方、インスリン/IGF のシグナル伝達は IRS-1 以外の IRS 分子種によっても仲介されることは、第一章でも述べたとおりである。当研究室の株田らは、IRS-1 とは異なり、IRS-2 は主に細胞質に、IRS-3 は核に配置されていることを見出しており (Kabuta et al., 2002; Kabuta et al., 2008)、このような分子種ごとに配置されている細胞内部位の差異によって、シグナル伝達や生理作用に対して分子種ごとの特有な機能が発揮されると予想される。この仮説を検証するためには、各 IRS 分子種がそれぞれの細胞内部位でどのような分子群と相互作用ネットワークを形成しているかを網羅的に解析する必要がある。この情報から、それぞれの IRS が存在する細胞内部位も特定できる可能性もある。

これまでに当研究室では、yeast two-hybrid 法や IRS と共免疫沈降される分子を質量分析法によって解析することで、IRS と相互作用する分子群の同定を進めてきた (Fukushima et al., 2010; Hakuno et al., 2007)。その中で、AP-1A 複合体や AP-2 複合体、importin β など、IRS の細胞内配置を決定する分子をいくつか同定することに成功している。しかし、各 IRS 分子種が特定の細胞内部位でどのような分子群と相互作用しているかを理解するには、IRS の細胞内配置が反映されない yeast two-hybrid 法や、目的タンパク質の可溶性が問題となる免疫沈降法などの実験から得られる情報だけでは不十分である。このような背景のもと、私は、IRS の細胞内配置を反映した状態で、かつ網羅的に IRS と相互作用する分子を同定できる手法が必要と考えた。

近年、Roux らは目的タンパク質のごく近傍に存在する分子に対して生細胞の状態でラベルすることができる BioID 法 (proximity dependent biotin identification) を開発した

(Roux et al., 2012)。この方法では大腸菌 *E. coli* 由来のタンパク質ビオチンリガーゼ BirA を利用する。野生型の BirA の 118 番目のリジン残基をグリシン残基に置換すると、この変異体 (BirA*) は基質特異性を失って近距離に存在する任意のタンパク質をビオチン化できるようになる。BirA*を融合させた目的分子を細胞内に発現させ、培地にビオチンを添加することで、細胞が生きた状態で目的分子の近傍に存在する分子がビオチン標識される (Fig. 5-1)。また、SDS を含むバッファーで細胞を溶解することで、試験管内での人為的なタンパク質間相互作用を防ぐことができる。そして、ビオチンとストレプトアビジン間の高親和性を利用して、ビオチン化された分子をアフィニティー精製し、質量分析法によって同定することが可能である。

そこで本章では、BioID 法を用いて各 IRS 分子種の近傍に存在する分子群を網羅的に同定し、それぞれの細胞内部位において形成されているタンパク質相互作用ネットワークを解明することを目的とし、研究を進めた。

結果

BioID 法を用いた IRS の近傍に存在する分子のビオチン標識の条件検討

まず、各 IRS の N 末端に Myc タグと BirA*を融合したタンパク質を発現させるコンストラクトを作製した (Fig. 5-2A)。BirA*は約 35 kDa の比較的大きな分子であるため、BirA*を融合したことによって IRS の機能が阻害されないか検討した。HEK293T 細胞において、Myc-BirA*を付加したいずれの IRS も IGF-I 刺激依存的にチロシンリン酸化された (Fig. 5-2B)。さらに、細胞内配置についても検討を行ったところ、BirA*を融合した IRS-1 は小胞様構造に、IRS-2 は細胞質に、IRS-3 は核に局在していた (Fig. 5-2E and F)。これらのことから、BirA*の融合によって IRS の機能や細胞内配置は阻害されないと考えられた。

次に、Myc-BirA*-IRS-1/-2/-3 を発現させた細胞の培地中にビオチンを添加し、細胞内で起こるビオチン化の様子を経時的に解析した。細胞抽出液を SDS-PAGE および PVDF 膜への転写に供した後、streptavidin-HRP を用いて blotting した結果、ビオチン添加後 6 時間からビオチン化される細胞内タンパク質が蓄積し始め、24 時間後には多くの分子

がビオチン化されることがわかった (Fig. 5-2C)。続いて、ビオチン化された分子の中に、既知の IRS 結合分子が含まれているかどうかを検討した。IGF-I とともにビオチンを添加して培養した Myc-BirA*-IRS-1 発現細胞から、抽出液を調製し、ビオチン化されたタンパク質をストレプトアビジンビーズで回収して、immunoblotting によって解析した。その結果、チロシンリン酸化 IRS に結合する PI 3-kinase の p85 制御サブユニットおよび Grb2 が、IRS-1 の BioID 法によってビオチン化された分子に含まれることを確認した (Fig. 5-2D)。また、IRS と相互作用する脱ユビキチン化酵素 USP7 (ubiquitin-specific peptidase 7) やシャペロン分子 HSP90 (heat shock protein 90) も BioID 法によってビオチン化されることを immunoblotting によって確認している (データは示さない) (Fukushima et al., 2011; Yoshihara et al., 2012)。続いて、ビオチン化された分子の細胞内分布を免疫蛍光染色によって検討した。Myc-BirA*-IRS-1 の一部は、第三章で示したのと同様に細胞質で斑点状 (ドット状) に局在し、ビオチン添加後には大きな小胞構造に局在していた (Fig. 5-2E)。蛍光色素を結合したストレプトアビジンを用いて、ビオチン化タンパク質を可視化したところ、Myc-BirA*-IRS-1 発現細胞において、ビオチン添加依存的にストレプトアビジン由来の蛍光シグナルが検出された。さらに、この蛍光シグナルは Myc-BirA*-IRS-1 のシグナルを含む大きな小胞構造に多く蓄積していた。IRS-2 や IRS-3 についても同様の実験を行ったところ、Myc-BirA*-IRS-2 は細胞質に多く局在し、ビオチン添加依存的に見られるストレプトアビジン由来のシグナルの分布もそれによく一致していた (Fig. 5-2F、上段)。Myc-BirA*-IRS-3 は核に多く局在し、ストレプトアビジン由来のシグナルも核に多く観察された (Fig. 5-2F、下段)。これらの結果から、BioID 法により、それぞれの IRS が、細胞内存在部位を反映した状態で近傍の分子をビオチン化できることが明らかとなった。

BioID 法を用いた IRS の近傍に存在する分子の網羅的同定

次に、BioID 法でビオチン化された分子を網羅的に同定した。まず、各 IRS の分子種について BioID 法によってビオチン化されたタンパク質をストレプトアビジンビーズによって精製し、SDS-PAGE によって分離後、銀染色に供した。その結果、培地へのビオチン添加依存的に、多数のバンドが検出されることがわかった (Fig. 5-3A and B)。

IRS-1 を発現させた場合、200 kDa 付近に濃いバンドが見られた (Fig. 5-3A, 2 のバンド)。また、IRS-2 では 200 kDa 付近に、IRS-3 では 90kDa 付近に濃いバンドが検出された (Fig. 5-3B, 2 と 3 のバンド)。バンドを切り出して、ゲル片から抽出したタンパク質を LC-MS/MS によって解析したところ、それぞれのバンドが IRS-1, IRS-2, IRS-3 であることが明らかとなった。また、BioID 法でビオチン化された分子の中にベイトの IRS 自身が含まれることを immunoblotting によっても確認できたため (Fig. 5-3C)、IRS 自身も BirA*によってビオチン化されることがわかった。さらに、IRS-1 と IRS-2 の BioID 法において、200 kDa を超える位置に明瞭なバンドが銀染色で検出された。LC-MS/MS による解析の結果、このバンドはアクチン架橋分子である Filamin A であることが明らかとなった (Fig. 5-3A and B, 1 のバンド)。

次に、BioID 法によってビオチン化された分子をストレプトアビジンビーズ上で直接トリプシン消化し、消化産物を LC-MS/MS によって解析することで、ビオチン化された分子を網羅的に同定した。その際、陰性コントロールとして、ビオチンを添加せずに培養した Myc-BirA*-IRS-1 発現細胞から調製したサンプルを用意した。LC-MS/MS で同定されたペプチドを MSCOT で解析し、それぞれの IRS の BioID 法によって同定された分子の中から、陰性コントロールでも同定された分子、および内在性のビオチン化タンパク質を除いた。本研究では、2 種類以上のペプチド断片が得られた分子のみを、同定された分子として解析の対象とした。その結果、IRS-1 を発現させて行った BioID 法によって 36 個、IRS-2 の場合では 49 個、IRS-3 の場合では 70 個の分子を同定することができた。各 IRS 分子種の BioID 法によって同定された分子のうち、MSCOT スコアが高い上位 5 つを示した (Fig. 5-3D)。IRS-1 を発現させて行った BioID 法では、アクチン結合分子 Filamin A や Cortactin が多く含まれていた。Transgelin-2 はデータベースでは機能未知の分子であるが、典型的なアクチン結合モチーフを有し、抗体染色によって F-アクチンに局在することが示されているため、アクチン結合分子の一つと考えられる。また、mRNA のプロセッシングに関与する SERBP1 (SERPINE1 mRNA binding protein) も同定された。IRS-2 に関しては、Filamin A や Transgelin-2 に加えて、CCT8 (chaperone containing TCP1, subunit 8) や HSP70 (heat shock protein 70) などのシャペロン分子が複数同定された。IRS-3 に関しては Filamin A とシャペロン分子に加えて、核膜孔複合体

の構成因子である TPR (translocated promoter region, nuclear basket protein) が同定された。

Filamin A が IRS-1 の細胞内小胞への配置に果たす役割

IRS-1 発現細胞を用いた BioID 法によって、最も高い MSCOT スコアで同定された Filamin A が、IRS-1 の細胞内小胞への配置に関与しているかを、生化学的な分画法を用いて検討した (Fig. 5-4A)。L6 筋芽細胞において、レトロウイルスによる shRNA の実験系を用いて Filamin A を発現抑制した。その結果、Filamin A の発現抑制によって、LDM 画分に存在する IRS-1 量が減少し、細胞質画分に存在する IRS-1 量が増加した。一方、IRS-2 では、IRS-1 のような大きな変化が認められなかった。また、LDM 画分に存在している IGF-IR の量も、Filamin A の発現抑制によって減少していた。これらの結果から、Filamin A は IRS-1 の細胞内小胞への配置や IGF-IR のインターナリゼーションに関与していることが示唆された。

BioID 法によって同定された IRS の近傍に存在する分子の機能や特徴

各 IRS 分子種の近傍に存在する分子の特徴を明らかにするために、同定された全分子を対象に gene ontology 解析を行った。まず、各分子について、同定されたペプチド数をタンパク質の長さ (アミノ酸数) で補正することによって、LC-MS/MS によって同定された全ペプチド数に占める各分子の割合を計算した。そして、分子の機能ごとに分類し、どのような機能を持った分子が同定されているかを円グラフに表した (Fig. 5-4B)。その結果、IRS-1 にはシグナル伝達に関与する分子と同程度に、アクチン結合分子が IRS-1 の近傍に存在することが示唆された。さらに、膜輸送系に関与する分子も複数含まれていた。その中には Rab GTPase の一つ、Rab13 が含まれていた (IRS-2、IRS-3 の BioID 法では同定されなかった)。その他に、リボソームタンパク質を含む翻訳関連分子やシャペロンが含まれていることが明らかとなった。IRS-2 の場合もシグナル伝達に関与する分子に加えて、複数のアクチン結合分子が IRS-2 の近傍に存在することが示唆された。さらに、SERBP1 を含む mRNA のスプライシングやプロセッシングに関与する複数の分子や、翻訳過程における開始因子や伸長因子、MAP4 (microtubule-associated protein 4) などの微小管結合分子、脂肪酸合成酵素が多く同定された。IRS-3 を発現さ

せて行った BioID 法では、転写や mRNA のスプライシング／プロセッシング、核構造や核輸送に関与する分子が多数同定された。

IRS-1 の BioID 法によって同定された Filamin A、Cortactin、Rab13 について、タンパク質相互作用のデータベース STRING を用いて相互作用マップを作成した (Fig. 5-4C)。このマップでは、既知の生化学的あるいは遺伝的な相互作用が報告されている、あるいは同じ生物学的過程を構成している分子間の関係を直線によって表している。相互作用マップを作成したところ、Filamin A、Cortactin、Rab13 はいずれもアクチン骨格の再構成を司る small GTPase、Rac1 と相互作用していることがわかった (Ridley et al., 2003)。さらに、IRS-1 と結合する Grb2 は Filamin A と Cortactin に結合すること、IR は Filamin A と相互作用することが生化学的な実験によって報告されている。これらのことから、IRS-1 は Rac1 と関連するアクチン結合分子や膜輸送系の分子の近傍に局在していることが示唆された。

考察

IRS 結合タンパク質を同定する手法としての BioID 法と yeast two-hybrid 法や免疫沈降法の比較

これまで当研究室では、yeast two-hybrid 法を用いたスクリーニングや IRS と共沈降された分子を質量分析法で解析することによって、IRS に相互作用する分子を複数同定しており、手法によってそれぞれ異なる分子が同定されている (Fukushima et al., 2010; Hakuno et al., 2007)。今回私は、BioID 法を用いて、IRS の近傍に存在する分子を網羅的に解析した。この方法は、これまでの yeast two-hybrid 法や免疫沈降による相互作用タンパク質の解析とは異なり、生細胞の状態で分子をビオチン標識できる点で、各 IRS 分子種の細胞内分布を反映した形で近傍分子を探索できることが最大の利点である。また、膜貫通タンパク質や、密に集合した細胞骨格関連タンパク質は免疫沈降において可溶化が問題になることがあるが、SDS を含むバッファーで可溶化する BioID 法では不溶性タンパク質も同定できる可能性がある。

しかし、BirA*がビオチン化できる距離が細胞内でどの程度なのかについては明らか

になっていないため、同定した分子が IRS と複合体を形成しているかどうかを示すことができない点が欠点である。今後、生化学的な方法も組み合わせて、今回同定された分子が IRS と相互作用しているか解析することで、BioID 法の有用性を検証していく必要がある。

従来法によって同定された IRS 結合タンパク質と、BioID 法によって同定された分子の比較

今回、BioID 法を適用してそれぞれの IRS 分子種の近傍に位置する分子群を網羅的に探索したところ、40-70 個程度の分子を同定することに成功した。その中で、IRS 自身に由来するペプチドが多数同定された。当研究室では、共免疫沈降実験等によって細胞内で IRS 同士がオリゴマーを形成していることを見出しており、今回見られた IRS 自身のビオチン化は、分子内（シス）、あるいはオリゴマー中の分子間（トランス）に BirA* がビオチン化している可能性が考えられる。また、immunoblotting による解析も併せると、ビオチン標識された分子の中には p85 PI 3-kinase や Grb2 などの既知シグナル分子の他、我々のグループが IRS 結合分子として既に同定していた USP7 や HSP90 などの IRS 結合分子も含まれていたことから(Fukushima et al., 2011; Yoshihara et al., 2012)、この方法によって IRS 複合体の構成因子がビオチン標識できていると考えられる。しかし、LC-MS/MS を用いた解析では、immunoblotting では検出できた p85 PI 3-kinase や Grb2 由来のペプチド断片は確認できなかった。これは、これらのシグナル分子は細胞内では一過的に IRS に相互作用しているために効率的にビオチン標識されなかった、あるいは細胞内では IRS に相互作用している下流シグナル分子はごく少量であることを反映しているのかもしれない。また、 μ 1A や μ 2 など、我々のグループが yeast two-hybrid 法で同定してきた分子はほとんど含まれていなかった。我々のグループは、yeast two-hybrid 法で同定された分子と IRS との相互作用を生化学的な方法で検証し、その多くが IRS と一過的に相互作用することを見出しており、BioID 法ではこの一過的な相互作用を検出しにくいと考えると、この結果は良く説明できる。それに対して、同定された分子にはアクチン細胞骨格に関わる分子群やシャペロンが多く含まれていたことから、BioID 法は、一過的に相互作用する分子よりも安定的に相互作用する分子を効率的にビオチン

標識する特徴を持った手法と行うことができそうである。BirA*は導入された変異によって基質特異性が低くなっているものの、近傍に存在する分子の種類によってはその立体構造やビオチン化されるリジン残基の配向によってビオチン化されにくくなる可能性は否定できない。したがって、網羅的な同定を達成するには、BioID 法に加えて、これまでの生化学的な方法を組み合わせて、相互作用を検討していく必要がある。また、IRS-1 の BioID 法において、IRS-1 が配置された小胞構造が、ビオチンの添加によって顕著に大きくなることがわかった。現在のところその理由は不明だが、IRS-1 や IRS-1 の近傍に位置する分子の機能がビオチン化されたことによって、同じ種類の小胞同士の融合 (homotypic fusion) が生じ、小胞のサイズが大きくなったことなども考えられる。

アクチン結合タンパク質が IRS-1 の細胞内配置に果たす役割

今回、IRS-1 の BioID 法によって、新たに Filamin A や Cortactin などのアクチン結合タンパク質を IRS-1 の近傍に位置する分子として同定した。Filamin A や Cortactin は主に F-アクチンに局在する。第四章で示したように、IRS-1 は Filamin A と共沈降されること、細胞膜裏打ち F-アクチン上で両者が共局在することから、今回同定されたアクチン結合タンパク質は IRS-1 の細胞膜への配置を制御していることが示唆される。

IRS-1 の多くは細胞内小胞に配置されており、BioID 法によってビオチン化された分子も小胞構造に蓄積する様子が観察された。今回、IRS-1 を発現させた BioID 法によって、小胞輸送を担う Rab13 を IRS-1 の近傍に位置する分子として同定することができた。Rab13 は Rac1 と共に、Glut4 の細胞膜移行を促進するなど分泌経路に働くことが示されている Rab GTPase である (Chiu et al., 2011; Sun et al., 2010)。また、Filamin A や Cortactin は F-アクチンの再構成に関わる機能に加えて、細胞膜からのエンドサイトーシスを促進することも報告されている (Cao et al., 2010; Mooren et al., 2009; Muriel et al., 2011; Sverdlov et al., 2009)。今回、Filamin A の発現抑制によって LDM 画分に存在する IRS-1 が減少することも明らかにした。これらの結果から、細胞膜上で Filamin A と結合した IRS-1 が Filamin A 依存的なエンドサイトーシスを介して細胞内小胞へ輸送されている可能性を考えている。加えて、細胞内小胞の輸送を制御する WASH (WASP and SCAR homologue) 複合体のサブユニットも同定されており (Derivery et al., 2009; Seaman et al.,

2013)、Filamin A を含む複数のアクチン結合タンパク質によって制御される小胞に IRS-1 が局在している可能性が高い。これまでに私は、IRS-1 が細胞内に取り込まれたトランスフェリンと一部共局在することを見出しているが、共局在していない IRS-1 がどのような性質の小胞に配置されているかは特定できていない。今後、他のアクチン結合分が IRS-1 の細胞内配置に与える影響を調べることが、IRS-1 の細胞内小胞への配置を制御する詳細な分子機構の理解につながると期待している。

他の IRS 分子種の近傍に位置する分子の機能や特徴

他の IRS 分子種についても BioID 法で近傍のタンパク質を同定した結果、IRS-2 や IRS-3 に関しても Filamin A が同定された。いずれの分子も細胞内小胞に配置されていないことから、細胞膜に存在する一部の IRS-2 や IRS-3 が膜裏打ち F-アクチンに局在する Filamin A と近距離に位置しているのかもしれない。Filamin A は核小体にも局在することが報告されており(Loy et al., 2003)、IRS-3 を発現させて行った BioID 法によって同定された Filamin A は、核小体に由来する可能性もある。さらに、SERBP1 はいずれの IRS の BioID 法によっても同定された。当研究室の尾添らは既に IRS-1 が mRNA 複合体と相互作用することを見出しており(Ozoe et al., 2013)、SERBP1 も同一の複合体に存在していると考ええると、極めて興味深い。

一方、IRS-1 では同定されなかった分子が、IRS-2 や IRS-3 の BioID 法によって同定された。IRS-2 の場合は、複数のシャペロン分子に加えて微小管結合因子 MAP4 が IRS-2 の近傍に存在することが示唆された。これらの分子との相互作用によって、IRS-2 が細胞質に配置されている可能性が考えられる。また、脂肪酸合成酵素が IRS-2 の近傍に位置する分子として同定された。肝臓において、IRS-2 が脂肪代謝に強く関わっていることを示す報告が多数あることから(Taniguchi et al., 2005; Withers et al., 1998)、IRS-2 と脂肪酸合成酵素の相互作用は、IRS-1 と IRS-2 の代謝活性における違いを説明できる候補になるかもしれない。当研究室では、最近、膵β細胞由来の他の培養細胞系においても、脂肪酸合成酵素を IRS 結合タンパクとして同定に成功している。IRS-3 の BioID 法では、核に局在する mRNA のスプライシングやプロセッシングに関わる因子、転写に関わる因子、核膜孔複合体を含む核の構造関連因子が多数同定され、IRS-3 の核局在をよく反

映していた。当研究室の株田らはこれまでに、IRS-3 が転写促進活性を有することを報告しているが(Kabuta et al., 2002; Kabuta et al., 2010)、IRS-3 は mRNA のスプライシングやプロセッシングにも関与していることが示唆された。

本章では、BioID 法によって IRS の近傍に位置する分子群を複数同定することに成功した。同定された分子の機能や細胞内局在から、BioID 法は、各 IRS 分子種の細胞内配置を良く反映した形で近傍分子にビオチン標識ができる有用な方法であることを示すことができた。特に、IRS-1 の近傍にはアクチン細胞骨格やエンドソーム結合性アクチン関連因子が存在することを見出し、IRS-1 の細胞内配置にはアクチン結合タンパク質が密接に関与していることが明らかになった。今回同定した分子の解析を進めることで、各細胞内部位へ配置された IRS 複合体の機能が明らかになるものと期待される。

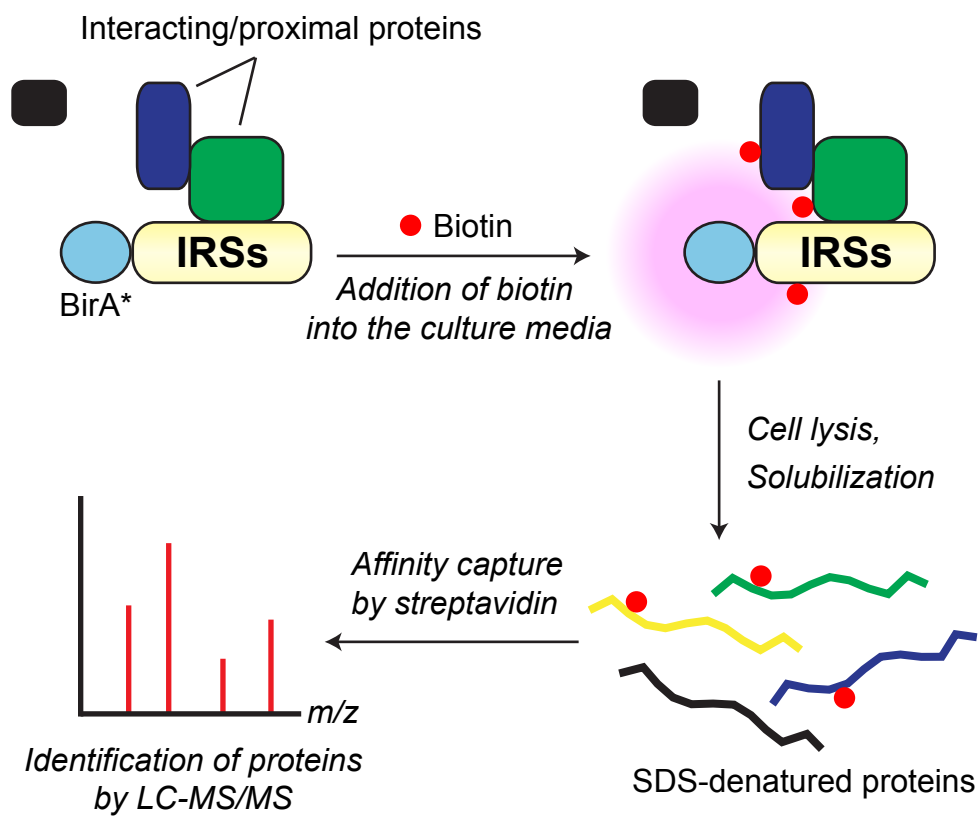


Fig. 5-1 BioID法の模式図

大腸菌由来の改変型タンパク質ビオチンリガーゼBirA*を融合したIRSを細胞に発現させる。ビオチンを培地に添加することによって、IRSに相互作用している、あるいは近傍に存在している分子が、BirA*によってビオチン化される。SDSを含むバッファーで細胞を溶解し、タンパク質を変性させる。ビオチン化されたタンパク質をstreptavidinビーズを用いて精製する。精製したタンパク質をLC-MS/MSによって解析することによって、細胞内でIRSに相互作用している、あるいは近傍に存在している分子群を網羅的に同定することができる。

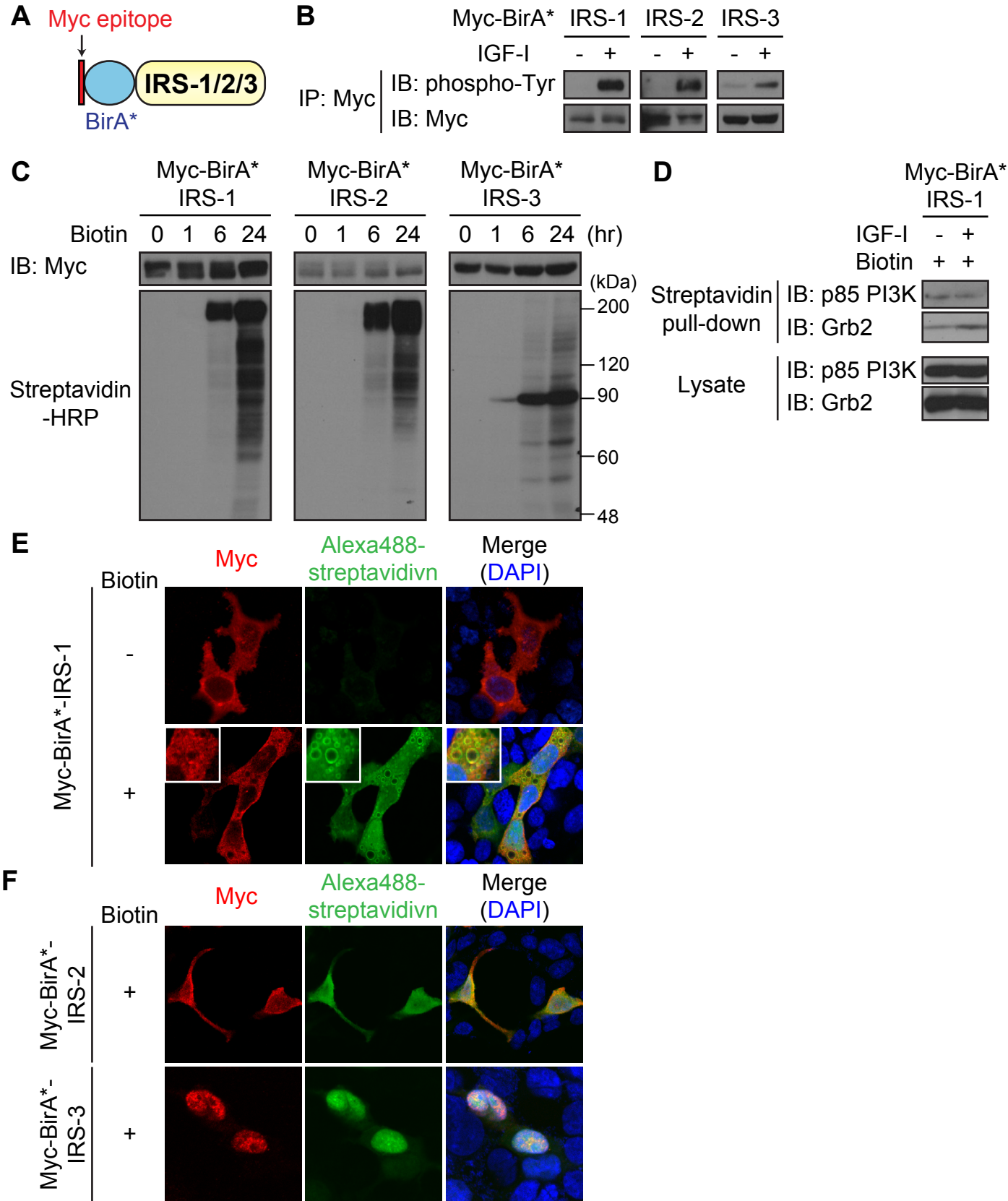


Fig. 5-2 BioID法によるIRSの近傍に存在する分子のビオチン標識の条件検討

A BioID法で用いたコンストラクトの模式図。各IRS-1/-2/-3のN末端にMyc epitopeとBirA*を融合したタンパク質を発現させた。

B Myc-BirA*-IRS-1/-2/-3を発現させたHEK293T細胞を血清飢餓後、IGF-I（100 ng/ml）で5分間刺激した。細胞抽出液を抗Myc抗体を用いて免疫沈降し、図に示した抗体を用いたimmunoblottingに供した。

C HEK293T細胞にMyc-BirA*-IRS-1/-2/-3を発現させた後、培地にビオチンを添加して図に示した時間培養した。細胞抽出液を抗Myc抗体およびstreptavidin-HRPを用いたimmunoblottingに供した。

（説明の続きは次ページ）

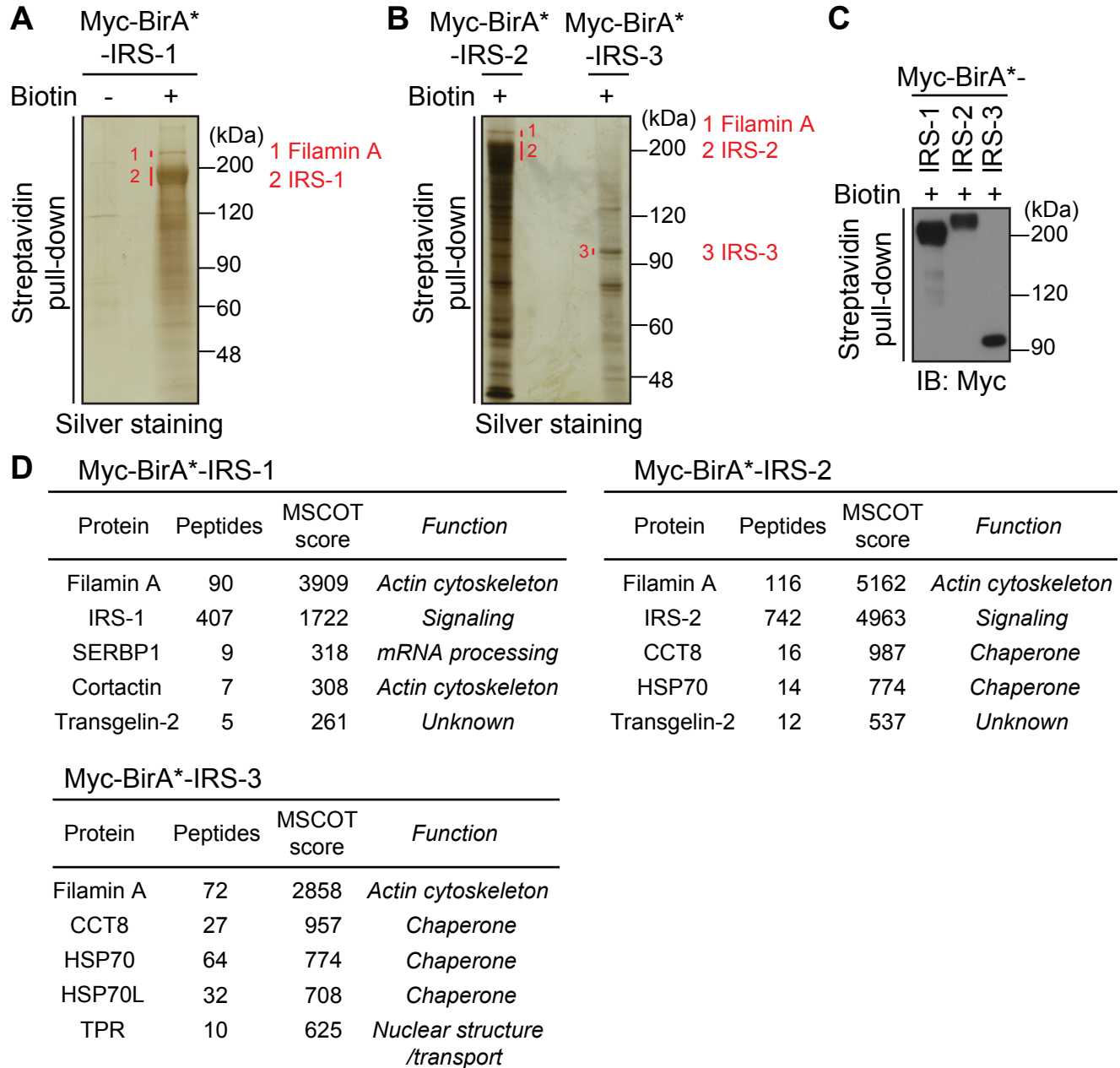


Fig. 5-3 BioID法によるIRSの近傍に存在する分子の同定

A IRS-1のBioID法によってビオチン化タンパク質を精製し、SDS-PAGEおよび銀染色に供した。LC-MS/MSの解析によって同定されたバンドを赤で示した。

B IRS-2/-3のBioID法によってビオチン化タンパク質を精製し、SDS-PAGEおよび銀染色に供した。LC-MS/MSの解析によって同定されたバンドを赤で示した。

C IRS-1/-2/-3のBioID法によって精製したビオチン化タンパク質を、抗Myc抗体を用いた immunoblottingに供した。

D ラージスケールのBioID法によって同定されたタンパク質のうち、MSCOTスコアが高い上位5つの分子を表に示した。各分子について、LC-MS/MSによって同定されたペプチド数と機能を合わせて表記した。

Fig. 5-2 BioID法によるIRSの近傍に存在する分子のビオチン標識 (図は前ページ)

D Myc-BirA*-IRS-1を発現させたHEK293T細胞を血清飢餓後、IGF-I (100 ng/ml) とビオチンで6時間処理した。細胞抽出液からビオチン化タンパク質をstreptavidinビーズを用いてpull-downし、図に示した抗体を用いたimmunoblottingに供した。

E, F HEK293T細胞にMyc-BirA*-IRS-1 (E)、あるいはMyc-BirA*-IRS-2/-3 (F) を発現させた後、培地にビオチンを添加して24時間培養した。抗Myc抗体 (赤)、streptavidin Alexa488 conjugate (緑)、DAPI (青) を用いて、細胞を免疫蛍光染色した。サンプルを共焦点顕微鏡を用いて観察した。

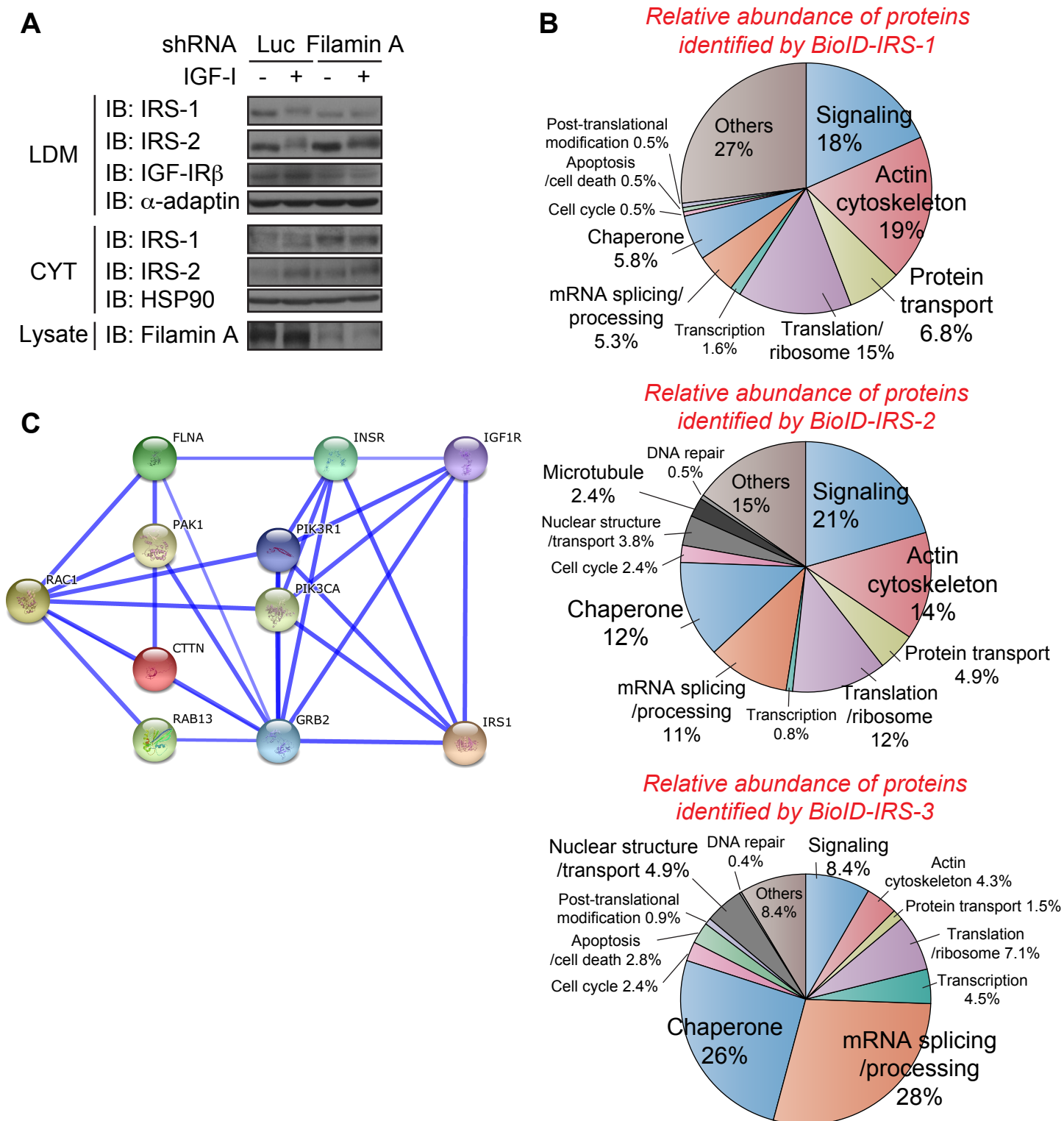


Fig. 5-4 BioID法によって同定されたIRSの近傍に存在する分子の特徴

A Filamin Aに対するshRNAを発現するL6筋芽細胞を血清飢餓後、IGF-I（100 ng/ml）で処理した。細胞内分画法によってLDM画分とCYT画分を単離し、図に示す抗体を用いたimmunoblottingに供した。

B BioID-IRS-1/-2/-3によってビオチン化された分子をstreptavidinビーズを用いて回収し、ビーズ上でトリプシン消化して得られたペプチドをLC-MS/MSによって同定した。得られたペプチドの情報から、タンパク質のサイズで補正した同定ペプチド数（同定されたペプチド/タンパク質のアミノ酸数（ 10^3 ））を求め、相対的な存在比（%）とした。同定された各分子について、UniprotあるいはNCBIのGene reportsの情報を元に機能ごとに分類した。

C STRINGを用いてBioID-IRS-1によって同定されたFilamin A, cortactin, Rab13について、IRS-1を加えて相互作用マップを作成した。分子間の線は、実験的に確認された相互作用あるいは構成しているシグナル経路が同一であることを示している。

第六章 総合討論

本研究で得られた成果

本研究では、クラスリンアダプター分子である AP-1A 複合体および AP-2 複合体との相互作用に注目して、IRS-1 が細胞内小胞と細胞膜に配置される分子機構と、それぞれの細胞内部位で IRS-1 が IGF シグナル伝達や生理活性の発現に果たす役割の解析を進めてきた。その結果、以下のことが新たに明らかとなった。

- (1) AP-1A 複合体との相互作用によって、IRS-1 の CI-MPR 陽性小胞から CI-MPR 陰性小胞への輸送が制御されている。(第三章)
- (2) AP-1A 複合体によって IRS-1 が細胞内小胞へ配置されることが、IGF シグナル伝達や細胞増殖の誘導に必要である。(第三章)
- (3) IRS-1 の一部は細胞膜上にも存在し、膜を裏打ちする F-アクチンを足場として AP-2 複合体と相互作用している。(第四章)
- (4) IRS-1 は AP-2 複合体と相互作用することで、リガンド依存的な IGF-IR のインターナライゼーションを阻害する。(第四章)
- (5) 各 IRS 分子種 (-1/-2/-3) はそれぞれ配置された細胞内部位ごとに、異なる機能を持った分子と相互作用ネットワークを形成している。(第五章)
- (6) 特に IRS-1 は、複数のアクチン結合タンパク質と相互作用ネットワークを形成することで、細胞内小胞と細胞膜へ配置されている。(第五章)

以上のように、IRS-1 の細胞内配置制御の新しい分子機構を明らかにし、その分子機構をもとに、細胞内小胞や細胞膜に配置された IRS-1 が、細胞増殖やシグナル伝達のダウンレギュレーションに果たす役割を明らかにすることができた。

本章では、本研究で得られた知見とこれまでの報告に基づいて、IRS の細胞内配置の制御とインスリン／IGF のシグナル伝達の連携、およびその生理的意義、そして本研究

の将来の展望について、総合的に討論したい。

IR/IGF-IR と IRS-1 が会合する細胞内部位

本研究領域におけるこれまでの研究の問題点

第一章でも述べたように、これまでの生化学的分画法を用いた研究から、チロシンリン酸化された IR/IGF-IR は細胞膜画分において多く検出されるのに対して、チロシンリン酸化された IRS-1 の多くは細胞内小胞画分(LDM)に検出されることが示されている。さらに、細胞膜からインターナリゼーションした IR や IGF-IR がチロシンキナーゼ活性を維持している報告も併せると、「細胞膜からインターナリゼーションした IR や IGF-IR が細胞内小胞において IRS-1 と会合してチロシンリン酸化する」という作業仮説が想定されてきた。しかし、IRS-1 の一部は細胞膜画分にも検出され、特に脂肪細胞では、IR と IRS-1 が細胞膜上のカベオラ構造に存在していることを示唆する電子顕微鏡の観察結果が報告されている(Anai et al., 1998; Karlsson et al., 2004)。さらに、受容体のエンドサイトーシスを、細胞を低温環境に置く、あるいは Dynamin の優勢阻害変異体を発現させることによって阻害した場合でも、IRS-1 のチロシンリン酸化が大きく変わらないことから、やはり細胞膜上で受容体により IRS がチロシンリン酸化される可能性を排除できなかった(Ceresa et al., 1998; Heller-Harrison et al., 1995)。しかしながら、受容体のエンドサイトーシスを阻害するこのような手法は、他の積荷タンパク質のエンドサイトーシスにも影響することから、細胞内小胞への IRS-1 の配置も変化している可能性が高く、決定的な証明とはなっていない。このような背景のもと、IR/IGF-IR と IRS-1 が会合する細胞内部位を明らかにする上で、IRS-1 が細胞内小胞と細胞膜へ配置される分子機構を解明することは根本的な命題であった。

本研究の成果から提案する作業仮説

本研究で、私は、IRS-1 が AP-1A 複合体によって CI-MPR 陽性小胞から CI-MPR 陰性小胞へ輸送されていることを見出した。AP-1A 複合体と結合できない IRS-1 変異体(Y3A、ΔAPBR) の大部分は CI-MPR 陽性小胞に蓄積する一方、全反射顕微鏡を用いた観察から、この IRS-1 変異体は細胞膜上には正常に配置していることがわかった。もし細胞膜

上の IRS-1 が IR/IGF-IR によってチロシンリン酸化されているのならば、IRS-1 Y3A/ΔAPBR 変異体もチロシンリン酸化されるはずである。しかし、第三章における解析の結果、IGF-IR によるこの IRS-1 変異体のチロシンリン酸化は顕著に抑制された。また、インスリンや IGF-I の刺激によって、IRS-1 の細胞膜への移行は観察されていない（データは示していない）。加えて、全反射顕微鏡を用いた観察の結果、IRS-1 とチロシンリン酸化 IGF-IR の分布は細胞膜上では一致しないことも併せると、IRS-1 が IR/IGF-IR によってチロシンリン酸化される細胞内部位は細胞膜ではないことを示している。また、第三章において、IRS-1 を強制的に CI-MPR 陽性小胞へ局在させると、IGF-IR によるチロシンリン酸化が抑制されたことから、AP-1A 複合体によって IRS-1 が CI-MPR 陽性小胞から特定の小胞へ輸送されることが、IGF-IR による IRS-1 のチロシンリン酸化に必須であることが示された。さらに、第四章において、活性化した IGF-IR が AP-2 複合体依存的にインターナリゼーションすることが明らかになった。これらの結果を併せると、「IRS-1 はインターナリゼーションした IR/IGF-IR と細胞内小胞（＝シグナリングエンドソーム）で会合し、チロシンリン酸化される」可能性が高いと言える。

今後、この作業仮説を証明するためには、IR/IGF-IR と IRS-1 が会合し、IRS-1 がチロシンリン酸化される細胞内部位を可視化することが急務である。そのためには、抗チロシンリン酸化 IRS-1 抗体の作製や、IR/IGF-IR のインターナリゼーションの分子機構の解明といった生化学的な課題に加えて、近年急速に技術革新が進んでいる FRET やコンフォメーションセンサーなどを用いて、両者の会合を生細胞でイメージングすることも必要と考えている。さらに、IR/IGF-IR と IRS-1 のチロシンリン酸化の速度論的解析に加え、IR/IGF-IR のインターナリゼーションや AP-1A 複合体による IRS-1 の輸送制御を組み合わせたシミュレーションも導入することで、IR/IGF-IR と IRS-1 が細胞内で会合する仕組みを体系的に理解できると期待している。

特定の細胞内部位に配置された IRS-1 が担う生理的意義

本研究により、顕微鏡イメージングと生化学的解析の両方から、IRS-1 は主に細胞内小胞に多く配置され、また一部は細胞膜裏打ち F-アクチンにも配置されていることが明らかとなった。以下に、細胞内小胞と細胞膜、そして他の細胞内部位へ配置された

IRS-1 が有する機能や可能性について、細胞内部位ごとに考察する。

細胞内小胞に配置された IRS-1 が担う生理的意義

(1) 特定の下流シグナル経路を活性化する役割

第三章において、IRS-1 がシグナリングエンドソームにおいて、IGF-IR から IGF シグナルを特に Akt に伝達していることが明らかとなった。Akt は、初期エンドソームに局在する Rab5 のエフェクターである APPL1/2 (adaptor protein, phosphotyrosine interaction, PH domain and leucine zipper containing 1/2) や WDFY2 (WD repeat and FYVE domain containing 2) と結合し、エンドソーム近傍に存在する Akt 基質をリン酸化することが報告されている(Miaczynska et al., 2004; Schenck et al., 2008; Walz et al., 2010)。また私は、AP-1A 複合体を発現抑制した細胞において、IGF-I 依存的なリン酸化が変化する Akt 基質を探索したところ、転写因子である FoxO1 のリン酸化は変化しないが、GSK3 β (glycogen synthase kinase 3 β) を含むいくつかの Akt 基質のリン酸化が選択的に抑制されることを見出した (米山、修士論文)。これらの事象は、IRS-1 がチロシンリン酸化されるシグナリングエンドソームにおいて、Akt が局所的に活性化される可能性を強く示している。第一章で述べたように、Akt の活性化は、PI 3-kinase によって PI(4,5)P₂ から生成される PI(3,4,5)P₃ が引き金となっている。PI(4,5)P₂ は主に細胞膜に分布しているイノシトールリン脂質であるが、一部は細胞膜からエンドサイトーシスによって細胞内小胞へ供給されている(Brown et al., 2001)。したがって、このような細胞膜小胞の PI(4,5)P₂ は、IGF-IR によってチロシンリン酸化された IRS-1 に結合する PI 3-kinase によってリン酸化されて PI(3,4,5)P₃ となり、Akt を局所的に活性化しているのかもしれない。

このように、シグナリングエンドソームに配置された IRS-1 を介して、様々な Akt 基質の中から細胞内小胞に存在する Akt 基質のみを選択的にリン酸化する機構が稼働すれば、インスリンや IGF の広範な生理活性の中から特定の生理活性を発現することが可能になる。例えば、インスリン依存的な糖取り込みは、Akt による AS160 のリン酸化を介して、細胞内小胞に存在する糖輸送担体 Glut4 が細胞膜へ移行することで生じる(Sano et al., 2003)。AS160 は IRS-1 の存在する細胞内小胞画分に多く存在することが示されており、この IRS-1 は、インスリンの広範な生理作用の中から、糖取り込みを選択的に活

性化することができると推定される。

このようなエンドソームにおけるシグナル伝達は、他の受容体チロシンキナーゼや GPCR (G protein-coupled receptor) のシグナル経路においても稼働していることが明らかとなっている (Sorkin and von Zastrow, 2009)。受容体チロシンキナーゼや GPCR の多くは、細胞膜上でリガンドと結合した後にエンドサイトーシスされると、エンドソームにおいて足場タンパクを介して種々のシグナル分子をリクルートする。これまでに、MAPK 経路を構成するシグナル分子がエンドソームにリクルートされる受容体チロシンキナーゼおよび GPCR シグナル経路は多数報告されている。一方、PI 3-kinase や Akt がエンドソームにリクルートされるシグナル経路は少ない。特に、PI 3-kinase については、リゾホスファチジン酸による GPCR シグナル経路において、インスリン/IGF シグナル経路で主に活性化する PI 3-kinase (class IA) とは異なる PI 3-kinase (class IB) がエンドソーム上で活性化されることが報告されているのみである (Garcia-Regalado et al., 2008)。したがって、シグナリングエンドソームに配置された IRS-1 を介するシグナル伝達は、class IA の PI 3-kinase を活性化する点で他の受容体チロシンキナーゼや GPCR のシグナル伝達と異なっているのかもしれない。

また、我々は、IGF-IR は IRS を介さず直接 PI 3-kinase と結合することを明らかにしている (Fukushima et al., 2012)。IRS-1 結合性 PI 3-kinase は細胞内小胞において IGF に応答して一過的に活性化するのに対して、IGF-IR 結合性 PI 3-kinase の複合体は細胞膜上で長時間活性化しており、シグナリングエンドソームにおける PI 3-kinase シグナル伝達とは細胞内部位や活性の持続時間が異なる点の特徴である。

(2) インスリン/IGF シグナルの下方制御を仲介する役割

細胞内分画法を用いた解析から、細胞内小胞に存在する IRS-1 はインスリン刺激に応答して細胞質へ移行する結果、ユビキチン化されてプロテアソーム依存的に分解されることが報告されている。IRS-1 の細胞内小胞から細胞質への移行と分解は、PI 3-kinase や mTORC1 の阻害剤によって抑制できることから、下流シグナル経路からのフィードバックによって細胞内小胞上の IRS-1 がセリン/スレオニンリン酸化されることが、細胞質への移行の引き金となっていると推定される (Takano et al., 2001)。したがって、シ

グナリングエンドソームにおいて、IRS-1 は IR/IGF-IR によってチロシンリン酸化されて下流へシグナルを仲介するだけでなく、下流シグナル経路のフィードバックによって分解される、すなわちインスリン／IGF シグナルを下方制御する役割も担っていると言える。

種々のインスリン抵抗性状態で、IRS-1 が細胞内小胞から細胞質へ移行することが認められること、酸化ストレスや遊離脂肪酸、TNF α などの炎症性サイトカインによって活性化される JNK、IKK β 、PKC などのキナーゼも IRS-1 をセリン／スレオニンリン酸化することから(Copps and White, 2012)、これらの細胞外因子によって活性化するキナーゼによっても IRS-1 はセリン／スレオニンリン酸化される結果、シグナリングエンドソームへ配置する IRS-1 量が減少すると考えられる。このような機序で生じるシグナリングエンドソームの IRS-1 量の減少が、インスリン抵抗性を誘導しているのかもしれない。今回、IRS-1 と結合することが明らかとなった Filamin A は、MKK4 や MKK7 と結合して JNK を活性化する足場となっていることや、PKC と相互作用することも報告されていることから(Nakagawa et al., 2010; Tigges et al., 2003)、IRS-1 が配置されているシグナリングエンドソームは、他のシグナル経路と合流するクロストークの足場としても機能している可能性が高い。

細胞膜に配置された IRS-1 が担う生理的意義

(1) IR/IGF-IR のリガンド依存的なインターナリゼーションを調節する役割

第四章における解析の結果、IGF-I の長時間刺激後に IRS-1 の分解と IGF-IR のインターナリゼーションが同じタイミングで生じること、IRS-1 の過剰発現によって IGF-IR のインターナリゼーションが阻害される一方、IRS-1 の発現抑制によって IGF-IR のインターナリゼーションが速まることが示された。これらの結果は、フィードバック機構による IRS-1 の分解と、AP-2 複合体依存的な IGF-IR のインターナリゼーションが連動することで、IRS-1 を介した下流シグナルの強度が膜上の IGF-IR の量に反映されていることを示しており、インスリン／IGF に対する脱感作やシグナル伝達の終結を調節する重要な機構であると言える。。

IGF の長期刺激後に誘導される IRS-1 の分解と IGF-IR のインターナリゼーションは

どちらも IGF のシグナルを下方制御する方向に働く。したがって、上述した IRS-1 の量と IGF-IR のインターナリゼーションの運動は、IGF シグナルが標的細胞でどのぐらいの時間持続するかを規定する点で、重要であると考えられる。当研究室の伯野らは、IGF シグナルが長時間持続すると筋分化が阻害されることを複数の実験系で見出している (Hakuno et al., 2011)。IGF シグナルの下流には、IGF 存在下で活性化する分子に加えて、IGF 非存在下で活性化する分子 (FoxO1 や GSK3 β など) が存在する。これは筋分化過程において、IGF の下流シグナルごとに一過的に活性化／不活性化される必要があることを示している。逆に、グリア細胞の細胞生存は、IGF シグナルが長期的に維持されることで実現されていることが報告されている (Romanelli et al., 2007)。さらに、高インスリン血症の状態では、IRS-1 量の顕著な減少にともなって、IR の膜存在量も減少することが報告されており (Friedman et al., 1997; Hirashima et al., 2003)、本来一過的な分泌を示すインスリンも長時間作用すると、標的細胞自身がインスリンに対して不応答性を呈するようになる。このように、細胞膜上に配置された IRS-1 がインターナリゼーションを調節する形で IR/IGF-IR とフィードバックループを形成することは、生体内でのインスリン／IGF 作用の発現を緻密に制御する上で重要な仕組みであると考えている。

(2) クラスリン依存的なエンドサイトーシスを調節する役割

IRS-1 は Yxx Φ タイプの積荷を認識する μ 2 と相互作用することから、IRS-1 と AP-2 複合体の相互作用は他の積荷タンパク質に競合的に作用する可能性が考えられる。AP-2 複合体の積荷タンパク質の中でも、インテグリンは IGF による細胞運動に促進的に働く点で興味深い。インテグリンは AP-2 複合体依存的にエンドサイトーシスされた後、回収エンドソームを経て、接着構造が新たに形成される細胞膜領域へリサイクルされることで、細胞運動が可能となっている (Bridgewater et al., 2012)。逆に、インテグリンのリサイクルを抑えると、細胞接着が強まる。既に、前立腺がんにおいて、IRS-1 を過剰発現すると細胞運動が抑制され、IRS-1 を発現抑制すると促進されることが示されている (Shi et al., 2009)。また、細胞が接着する際に IRS-1 のタンパク質レベルが増加することが報告されている (Lebrun et al., 2000)。これらの結果を考慮すると、IRS-1 は AP-2 複合体依存的なインテグリンのリサイクリングを調節することで、細胞運動を制御している

かのかかもしれない。インテグリン以外の積荷タンパク質のエンドサイトーシスも検討することで、AP-2 複合体依存的なエンドサイトーシスの調節因子として、インスリン／IGF シグナルとは独立した IRS-1 の新しい機能が明らかになると期待している。

他の細胞内部位に配置された IRS-1 が担う生理的意義

(1) 核に配置された IRS-1 の生理的意義

複数のがん細胞において、IRS-1 が核に局在することが報告されている。IRS-1 への核局在には、SV40 T 抗原との相互作用が関与していることが示唆されているが(Prisco et al., 2002)、具体的な分子機構は未だ不明な点が多い。核内において、IRS-1 は β -catenin と結合して標的遺伝子の発現を誘導する他、cyclin D やリボソーム DNA のプロモーター領域に IGF-I 依存的に結合することによって、細胞増殖を促進すると考えられている(Chen et al., 2005; Wu et al., 2008)。また、細胞増殖や細胞死への抵抗性を誘導する Hippo 経路の最下流に位置する転写因子、YAP (Yes-associated protein) と IRS-1 が結合し、YAP の核内への移行を IRS-1 が促進することで、がん細胞の過増殖を誘導することを示唆する報告もある(Fernandez et al., 2009)。最近になって、IGF-IR もリガンド依存的にユビキチン化あるいは SUMO (small ubiquitin-like modifier) 化されて核へ移行することが報告されており(Girnita et al., 2013)、核内においても IGF-IR と IRS-1 を介したシグナルが伝達されている可能性も考えられる。

(2) 細胞膜ラッフリング部位に配置された IRS-1 が担う生理的意義

当研究室では、IRS-1 の一部が IGF 刺激に応答して細胞膜ラッフリング部位へ移行することを見出している。さらに、前立腺がん細胞において、IRS-1 はラッフリング部位で Rab5 のエフェクター分子 Rabankyrin-5 と相互作用することで、細胞外の液相成分を非選択的に取り込むマクロピノサイトーシスを誘導することを示唆するデータを得ている。このように、AP-2 複合体によるエンドサイトーシス以外にも、IRS-1 は細胞膜のラッフリング部位では異なる膜輸送系を制御している可能性がある。

特定の細胞内部位に配置された他の IRS 分子種が担う生理的意義

IRS-2 の細胞内配置が担う生理的意義

当研究室の株田らは、IRS-2 が主に細胞質に局在することを示している(Kabuta et al., 2002; Kabuta et al., 2008)。さらに、細胞内分画法を用いて細胞内小胞画分と細胞質画分に存在している比率を解析した結果、IRS-2 の細胞質に配置される割合が IRS-1 より多いことが報告されている(Inoue et al., 1998)。したがって、IRS-2 は、細胞質で多くチロシンリン酸化されることが、IRS-1 との大きな違いの一つと言えよう。さらに本研究によって、BioID 法を用いた解析から、IRS-2 の近傍には脂肪酸合成酵素が存在することが明らかとなった。RNAi やノックアウトマウスを用いた研究から、肝臓では IRS-1 は主に糖新生の抑制に寄与する一方、IRS-2 は脂肪合成を促進していることが示されており(Taniguchi et al., 2005)、IRS-2 と脂肪酸合成酵素の相互作用がこの差異に関与している可能性が考えられる。

細胞内分画法を用いた解析から、IRS-2 の一部は IRS-1 と同様に細胞内小胞画分に検出されることが明らかになっている。本研究において、IRS-2 の BioID 法によって同定された分子の中には、IRS-1 の場合に同定された Rab13 は見当たらず、この結果は、IRS-1 と IRS-2 が配置されている細胞内小胞の種類が異なると考えると良く説明できる。

Filamin A も IRS-2 の近傍に位置する分子として同定されたことから、IRS-2 も IRS-1 のように細胞内裏打ち F-アクチンに局在していると考えられる。しかし、第四章における解析の結果、IRS-1 と異なり、IRS-2 は AP-2 複合体との相互作用が弱く (Fig. 4-1D)、また IGF-IR のインターナリゼーションが誘導されるよりも早いタイミングで、IRS-2 が IGF-I 刺激後速やかに分解されることが明らかとなった。IGF-IR のインターナリゼーションは IGF の長時間刺激後に AP-2 複合体依存的に生じることから、IRS-2 には IGF 依存的な IGF-IR のインターナリゼーションを調節する機能はないと推定している。

以上のように、IRS-1 と IRS-2 の生理的な機能の違いは、配置される細胞内部位の違いや、配置された部位で相互作用する分子の違いによって、生み出されているのであろう。

核に配置された IRS-3 が担う生理的意義

当研究室の株田らは、importin β と結合することで IRS-3 が核に移行し、転写促進活性を有すること、Bcl-3 と相互作用してアポトーシス抑制因子の発現を促進することなどを見出している(Kabuta et al., 2002; Kabuta et al., 2010)。また、BioID 法によって IRS-3 の近傍に位置する分子として、mRNA のプロセッシングやスプライシングに関与する分子が多数同定されたことから、IRS-3 は核内で mRNA の代謝に何らかの役割を果たしているかもしれない。このように、IRS-3 は、核膜を隔てて IRS-1 や IRS-2 と異なる機能を発揮していると考えられる。

細胞質に配置された IRS-4 が担う生理的意義

IRS-4 は本研究では解析の対象としなかったが、その細胞内配置は主に細胞質であることが明らかとなっている(Kabuta et al., 2002)。最近になって、培養細胞株やある種のがん細胞で高発現が認められている IRS-4 は、培地中にインスリン/IGF や血清がない状態でもチロシンリン酸化されて、PI 3-kinase や Akt を活性化することが報告された(Hoxhaj et al., 2013)。したがって、インスリン/IGF シグナルとは独立に機能する特殊な IRS なのかもしれない。

複数の IRS 分子種が異なる細胞内部位へ配置されることの生理的意義

ここまで、IRS-1 や他の IRS 分子種がそれぞれの細胞内部位で果たす役割について議論してきた。では、インスリンや IGF のシグナル伝達経路において、複数の IRS がそれぞれ異なる細胞内部位に配置されていることにはどのような生理的意義があるのだろうか？以下に、IRS の細胞内配置を介したシグナル伝達の調節機構の意義について、考察したい。

インスリン/IGF の多様なシグナル伝達を時空間的に制御する役割

第一章において詳述したように、インスリン/IGF は IR/IGF-IR による IRS のチロシンリン酸化を介して、多岐にわたる下流シグナル経路を活性化し、広範な生理作用の発現を誘導する。これまでに、主にノックアウトマウスを用いた研究から、それぞれの IRS

分子種の担う生理作用が異なることが明らかとなっている。本研究の成果により、各 IRS 分子種は異なる細胞内部位（細胞内小胞、細胞膜、細胞質、核）へ配置され、それぞれの部位で機能の異なる分子と相互作用ネットワークを形成していることが示された。これらのことから、細胞は多種類の IRS 分子種を異なる部位へ配置することにより、IRS は既知のシグナル経路を仲介するばかりでなく、部位特異的な複合体の形成を介してインスリン／IGF の活性の仲介や調節を担っていると考えられる。

これまで考察してきたように、IR/IGF-IR のインターナリゼーションは、シグナリングエンドソームや核内に配置された IRS のチロシンリン酸化に必須である。活性化した IR/IGF-IR は細胞膜、エンドソーム、そして核と、細胞内を順に輸送されていくために、IRS の細胞内配置が異なれば、活性化した IR/IGF-IR によってチロシンリン酸化されるタイミングが IRS の配置された部位ごとに異なることが予想される。さらに、本研究によって、IRS が IR/IGF-IR の基質としてではなく、IR/IGF-IR の細胞膜からのインターナリゼーションのタイミングを調節することによって、インスリン／IGF シグナルの持続時間を制御する機能を有することが明らかになった。すなわち、第四章で示したように、細胞膜上の IRS-1 は AP-2 複合体との相互作用を介して、リガンド依存的な IGF-IR のインターナリゼーションのタイミングを制御する、いわばシグナル伝達の時間情報を制御する機能があると言える。分子生物学的あるいはシステム生物学的な様々な研究から、Akt や Erk1/2 の活性化の持続時間の違いが、下流経路へ時間情報として伝達され、下流シグナルの活性化に大きな影響を及ぼすことが示されている (Kubota et al., 2012; Sasagawa et al., 2005)。したがって、細胞内部位ごとに IRS がチロシンリン酸化されるタイミングが変化することや、IGF-IR のインターナリゼーションが誘導されるタイミングが変化することは、時間情報としてインスリン／IGF シグナル経路の情報へ統合される。

このように、多種類の IRS を異なる細胞内部位へ配置することによって、インスリン／IGF シグナルを時空間的に制御することが可能となっていると考えられる (Fig. 6)。

他のシグナルとのクロストークを制御する役割

インスリンの生理活性は $\text{TNF}\alpha$ 、遊離脂肪酸、酸化ストレス、成長ホルモンなどのイ

ンスリン抵抗性因子によって抑制される。また IGF は、一般に単独の生理活性は弱く、他のホルモン・成長因子・細胞外マトリクスなどの存在下で活性が増強される特徴を有する。これらのインスリン/IGF の生理活性の増強や抑制は、他の細胞外因子のシグナルがインスリン/IGF シグナルとクロストークすることによって、インスリン/IGF シグナルが修飾されることで起こることが明らかにされている。上述したように、IRS は分子種ごとに異なる細胞内部位に配置され、それぞれの部位において異なるエフェクター分子と相互作用ネットワークを形成している。したがって、他のシグナルがそれぞれ異なる細胞内部位で、IRS の分子修飾や結合タンパク質を変化させ、細胞内部位特異的にシグナル伝達が修飾される結果、特定のインスリン/IGF 活性の増強や減弱が誘導されることが予想される。

本研究によって、IRS の細胞内配置はアクチン細胞骨格と密接に連携していることが明らかとなった。アクチン細胞骨格の構造は、細胞外マトリクスや細胞密度、浸透圧などの物理的な刺激によって再編成される。したがって、サイトカインや酸化ストレスなどに加えて、これらの物理的な刺激も、アクチン細胞骨格の再編成を介して、IRS の細胞内配置を変化させることで、インスリン/IGF のシグナルとのクロストークが生じる可能性も考えられる。

個体レベルの生命現象において IRS の細胞内配置が担う生理的意義

ここまで議論してきたように、細胞レベルでは複数の IRS を異なる細胞内部位へ配置することで、多様なインスリン/IGF の生理作用の発現を緻密に制御していると言える。次に、個体レベルにおいて、IRS を異なる細胞内部位へ配置する仕組みが担う意義について、いくつかの生命現象を例に述べたい。

個体発生や個体成長における IRS の細胞内配置の意義

近年、ゼブラフィッシュを用いた研究から、初期エンドソーム上で Akt を活性化する APPL1 が正常な個体発生に必須であることが示された(Miaczynska et al., 2004)。このことは、細胞内小胞における Akt の局所的なシグナル伝達が個体発生に重要な役割を担っていることを示している。また、ヒトにおいても、低身長児から発見された IGF-IR の

点変異 (R431L) は、IGF-IR のインターナリゼーションに異常を生じさせ、IRS のチロシンリン酸化も減弱させることが報告されている(Kawashima et al., 2012)。したがって、これらの事象は、シグナリングエンドソームに配置された IRS と IGF-IR のインターナリゼーションの連携メカニズムが、IGF による個体発生や個体成長に必要であることを強く示唆している。

インスリン抵抗性の発生における IRS の細胞内配置の意義

インスリン抵抗性の発生機序に関する多くの研究は、上流シグナルの抑制が一様に下流シグナルを抑制する、というように、上流シグナルが下流経路へ直線的に伝達されることを前提にしている。しかしながら、インスリン抵抗性の状態におけるインスリンシグナルは、しばしば上流シグナルと下流シグナルの変動が一致しないことが報告されている(Hoehn et al., 2008)。これは、インスリンシグナルが下流へ一様に伝達されるのではなく、細胞内の複数の部位に分かれて活性化されており、インスリン抵抗性の状態ではその中の一部のシグナル伝達が阻害されている可能性を示している。

インスリン抵抗性を惹起する因子によって、特定の細胞内部位に配置された IRS 依存的なシグナル経路が阻害されているとすれば、インスリン抵抗性の状態において、上流シグナルと下流シグナルの変動が一致していない結果を良く説明できる。例えば、高脂肪食を給餌した動物の脂肪組織や酸化ストレスに暴露した細胞では、細胞内小胞に存在している IRS-1 が減少していることが報告されている(Anai et al., 1998; Clark et al., 2000; Tirosh et al., 1999)。本研究によって明らかになったシグナリングエンドソームにおける IRS-1 の役割を併せると、インスリン抵抗性を誘導する細胞外因子によって、AP-1A 複合体によってシグナリングエンドソームに配置された IRS-1 量が減少し、それを反映して特定の下流シグナル伝達が抑制される、という新しいインスリン抵抗性の発生機構が稼働している可能性が高い。今後、インスリン抵抗性の状態において、他の細胞内部位に配置された IRS の機能も調べることによって、従来の提唱されていたシグナル伝達機構では理解できなかったインスリン抵抗性の発生機序を解明できると期待している。

がんにおける IRS の細胞内配置の意義

IGF シグナルの活性化は、がんの悪性形質の獲得に重要であることが、様々な基礎研究や臨床研究からも示されている。本研究によって、IRS-1 が IGF-IR のインターナリゼーションを阻害する機能を有することが示された。ある種のがん細胞では IRS-1 が高発現していることが確認されている。がん細胞でも、IRS-1 が持つ IGF-IR のインターナリゼーションの阻害機構が稼働していれば、IRS-1 の高発現によって、活性化した IGF-IR がインターナリゼーションされずに細胞膜上に蓄積し、IGF シグナル伝達が持続してしまう結果、過増殖や転移能などの悪性形質が増強される可能性が考えられる。また、前述のように核内に局在する IRS-1 はがん細胞においてのみ認められており、核内の IRS-1 もがん化に寄与している可能性が高い。

今後の展望

本章で議論してきたように、IRS の細胞内配置は、インスリン／IGF の生理活性の種類や持続時間を選択的に調節できる重要なメカニズムであると考えられる。IRS の細胞内配置の制御には、AP-1A 複合体をはじめとした IRS と結合する輸送分子との相互作用が重要であることは明らかである。今後、各細胞内部位において、どのような分子が IRS の細胞内配置を決定し、下流分子と協調して局所的なシグナルリレーを構築しているかを解明していく必要がある。さらに、IRS-1 が IR/IGF-IR の基質としての機能に加えて、AP-2 複合体と相互作用することで、エンドサイトーシスを調節する新しい機能があることを見出した。このことは、IRS が足場タンパク質として、IRS に結合する輸送分子の機能を調節することで、インスリン／IGF のシグナル伝達や生理活性の発現を制御していると言える。IRS が他の積荷タンパク質のエンドサイトーシスに与える影響を解析していくことで、エンドサイトーシス調節分子としてのインスリン／IGF 非依存的な IRS の役割が明らかになっていくと期待される。

また、今回見出された AP-1A 複合体／AP-2 複合体やアクチン結合タンパク質と IRS-1 の相互作用を介したインスリン／IGF シグナル伝達機構が、どの細胞種あるいは組織でも認められる普遍的なメカニズムなのかも検討しなくてはならない。さらに、IRS の細

胞内配置が個体成長や、インスリン抵抗性やがんなどの疾患の発症に与える影響を解析することも、臨床的に重要な課題であると考えられる。細胞レベルで明らかになった IRS の細胞内配置メカニズムに基づいて、遺伝子改変マウス等を用いて *in vivo* レベルの検討が必須になるだろう。

さらに、各 IRS 分子種がそれぞれの細胞内部位において機能の異なる分子と相互作用することが明らかとなった。今後、IRS 分子種の細胞内配置を決定する輸送分子や、IRS が足場となって機能を調節する分子が、インスリン／IGF のシグナル伝達や生理作用の発現に果たす役割を明らかにすることで、インスリン／IGF シグナルを時空間的に調節する IRS 結合分子の生理的意義が解明されると期待している。

総括

これまで提唱されていたインスリン／IGF のシグナル伝達メカニズムにおいて、IRS の細胞内配置や、IR/IGF-IR と IRS が細胞内で会合する部位について不明な部分が多く残っていた。本研究では、AP-1A 複合体や AP-2 複合体が IRS-1 と相互作用することに着目し、IRS-1 が細胞内小胞と細胞膜において全く異なる役割を担っていることを明らかにした。すなわち、IRS-1 は AP-1A 複合体の積荷タンパク質として細胞内小胞に輸送され、IGF-IR から下流シグナル経路にシグナルを伝達することにより、細胞増殖を誘導する。これに対して、細胞膜裏打ち F-アクチン上で IRS-1 は AP-2 複合体と相互作用し、AP-2 複合体による IGF-IR のインターナリゼーションを調節する足場タンパクとしての機能を、初めて明らかにすることができた。私は、本研究の成果から、細胞内小胞と細胞膜という異なる細胞部位への IRS-1 の配置が調節されることによって、IGF のシグナル伝達や活性発現が時空間的に制御されるという新しい調節機構を提案したい。今後、インスリン／IGF の活性異常を起因とする糖尿病や成長異常、がんなどの疾病の発症機構の探求に、IRS の細胞内配置制御という新しい観点を提示できるものと期待している。

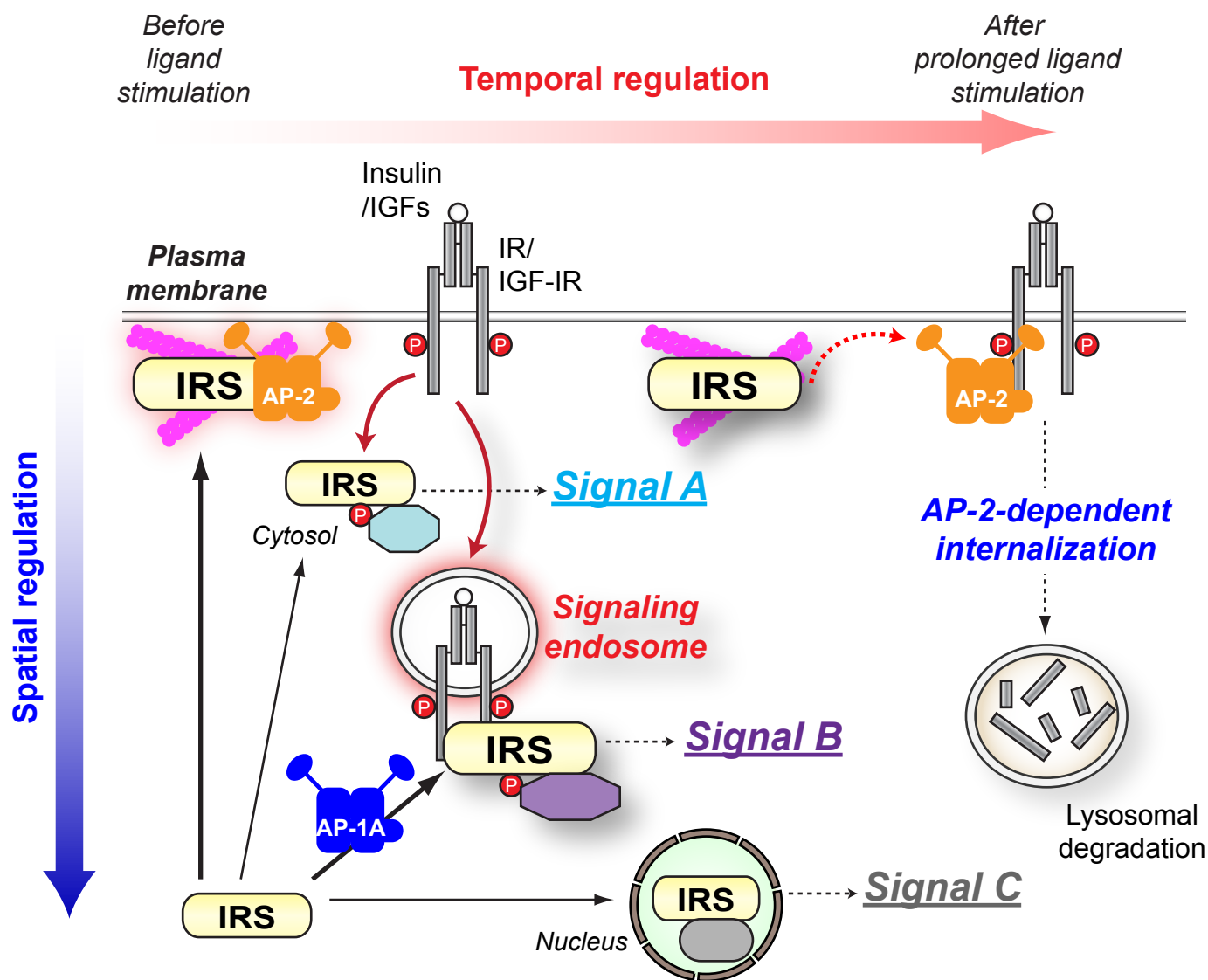


Fig. 6 (作業仮説) IRSが異なる細胞内部位へ配置されることによって、インスリン／IGFの多様なシグナルが時空間的に調節される

AP-1A複合体のように、IRSと相互作用する輸送タンパク質との相互作用によって、IRSは細胞内の異なる部位へ配置される。細胞内部位ごとに機能の異なる分子と相互作用ネットワークを形成することで、インスリン／IGF活性の仲介や調節を担っていると考えられる。さらに、IRSは細胞膜上でAP-2複合体などの輸送タンパク質の足場として機能し、IR/IGF-IRのリガンド依存的なインターナリゼーションのタイミングを制御することで、シグナル伝達の時間情報を制御していると考えられる。このように、IRSを異なる細胞内部位に配置することによって、インスリン／IGFシグナルを時空間的に制御することが可能になっている。

参考文献

- Aguet, F., Antonescu, C.N., Mettlen, M., Schmid, S.L., and Danuser, G. (2013). Advances in analysis of low signal-to-noise images link dynamin and AP2 to the functions of an endocytic checkpoint. *Dev Cell* 26, 279-291.
- Anai, M., Ono, H., Funaki, M., Fukushima, Y., Inukai, K., Ogihara, T., Sakoda, H., Onishi, Y., Yazaki, Y., Kikuchi, M., *et al.* (1998). Different subcellular distribution and regulation of expression of insulin receptor substrate (IRS)-3 from those of IRS-1 and IRS-2. *J Biol Chem* 273, 29686-29692.
- Araki, E., Lipes, M.A., Patti, M.E., Bruning, J.C., Haag, B., 3rd, Johnson, R.S., and Kahn, C.R. (1994). Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature* 372, 186-190.
- Backer, J.M., Myers, M.G., Jr., Shoelson, S.E., Chin, D.J., Sun, X.J., Miralpeix, M., Hu, P., Margolis, B., Skolnik, E.Y., Schlessinger, J., *et al.* (1992). Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. *EMBO J* 11, 3469-3479.
- Backer, J.M., Wjasow, C., and Zhang, Y. (1997). In vitro binding and phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by the insulin receptor. Role of interactions mediated by the phosphotyrosine-binding domain and the pleckstrin-homology domain. *Eur J Biochem* 245, 91-96.
- Baserga, R. (2009). The insulin receptor substrate-1: a biomarker for cancer? *Exp Cell Res* 315, 727-732.
- Belfiore, A., Frasca, F., Pandini, G., Sciacca, L., and Vigneri, R. (2009). Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocr Rev* 30, 586-623.
- Boll, W., Rapoport, I., Brunner, C., Modis, Y., Prehn, S., and Kirchhausen, T. (2002). The mu2 subunit of the clathrin adaptor AP-2 binds to FDNPVY and YppO sorting signals at distinct sites. *Traffic* 3, 590-600.
- Boulant, S., Kural, C., Zeeh, J.C., Ubelmann, F., and Kirchhausen, T. (2011). Actin dynamics counteract membrane tension during clathrin-mediated endocytosis. *Nat Cell Biol* 13, 1124-1131.
- Bridgewater, R.E., Norman, J.C., and Caswell, P.T. (2012). Integrin trafficking at a glance. *J Cell Sci* 125, 3695-3701.
- Brown, F.D., Rozelle, A.L., Yin, H.L., Balla, T., and Donaldson, J.G. (2001). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and Arf6-regulated membrane traffic. *J Cell Biol* 154, 1007-1017.

- Bruning, J.C., Winnay, J., Cheatham, B., and Kahn, C.R. (1997). Differential signaling by insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 in IRS-1-deficient cells. *Mol Cell Biol* 17, 1513-1521.
- Burgess, J.W., Wada, I., Ling, N., Khan, M.N., Bergeron, J.J., and Posner, B.I. (1992). Decrease in beta-subunit phosphotyrosine correlates with internalization and activation of the endosomal insulin receptor kinase. *J Biol Chem* 267, 10077-10086.
- Burks, D.J., Wang, J., Towery, H., Ishibashi, O., Lowe, D., Riedel, H., and White, M.F. (1998). IRS pleckstrin homology domains bind to acidic motifs in proteins. *J Biol Chem* 273, 31061-31067.
- Cai, D., Dhe-Paganon, S., Melendez, P.A., Lee, J., and Shoelson, S.E. (2003). Two new substrates in insulin signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5. *J Biol Chem* 278, 25323-25330.
- Canuel, M., Lefrancois, S., Zeng, J., and Morales, C.R. (2008). AP-1 and retromer play opposite roles in the trafficking of sortilin between the Golgi apparatus and the lysosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 366, 724-730.
- Cao, H., Chen, J., Krueger, E.W., and McNiven, M.A. (2010). SRC-mediated phosphorylation of dynamin and cortactin regulates the "constitutive" endocytosis of transferrin. *Mol Cell Biol* 30, 781-792.
- Ceresa, B.P., Kao, A.W., Santeler, S.R., and Pessin, J.E. (1998). Inhibition of clathrin-mediated endocytosis selectively attenuates specific insulin receptor signal transduction pathways. *Mol Cell Biol* 18, 3862-3870.
- Chang, Q., Li, Y., White, M.F., Fletcher, J.A., and Xiao, S. (2002). Constitutive activation of insulin receptor substrate 1 is a frequent event in human tumors: therapeutic implications. *Cancer Res* 62, 6035-6038.
- Cheatham, B., and Kahn, C.R. (1995). Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr Rev* 16, 117-142.
- Chen, J., Wu, A., Sun, H., Drakas, R., Garofalo, C., Cascio, S., Surmacz, E., and Baserga, R. (2005). Functional significance of type 1 insulin-like growth factor-mediated nuclear translocation of the insulin receptor substrate-1 and beta-catenin. *J Biol Chem* 280, 29912-29920.
- Chiu, T.T., Jensen, T.E., Sylow, L., Richter, E.A., and Klip, A. (2011). Rac1 signalling towards GLUT4/glucose uptake in skeletal muscle. *Cell Signal* 23, 1546-1554.
- Choy, E., Chiu, V.K., Silletti, J., Feoktistov, M., Morimoto, T., Michaelson, D., Ivanov, I.E., and Philips, M.R. (1999). Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi. *Cell* 98, 69-80.
- Clark, S.F., Martin, S., Carozzi, A.J., Hill, M.M., and James, D.E. (1998). Intracellular localization of phosphatidylinositol 3-kinase and insulin receptor substrate-1 in adipocytes: potential involvement of

- a membrane skeleton. *J Cell Biol* *140*, 1211-1225.
- Clark, S.F., Molero, J.C., and James, D.E. (2000). Release of insulin receptor substrate proteins from an intracellular complex coincides with the development of insulin resistance. *J Biol Chem* *275*, 3819-3826.
- Cocucci, E., Aguet, F., Boulant, S., and Kirchhausen, T. (2012). The first five seconds in the life of a clathrin-coated pit. *Cell* *150*, 495-507.
- Collins, A., Warrington, A., Taylor, K.A., and Svitkina, T. (2011). Structural organization of the actin cytoskeleton at sites of clathrin-mediated endocytosis. *Curr Biol* *21*, 1167-1175.
- Copps, K.D., and White, M.F. (2012). Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia* *55*, 2565-2582.
- Derivery, E., Sousa, C., Gautier, J.J., Lombard, B., Loew, D., and Gautreau, A. (2009). The Arp2/3 activator WASH controls the fission of endosomes through a large multiprotein complex. *Dev Cell* *17*, 712-723.
- Di Fiore, P.P., and De Camilli, P. (2001). Endocytosis and signaling. an inseparable partnership. *Cell* *106*, 1-4.
- Dummler, B., and Hemmings, B.A. (2007). Physiological roles of PKB/Akt isoforms in development and disease. *Biochem Soc Trans* *35*, 231-235.
- Fantin, V.R., Wang, Q., Lienhard, G.E., and Keller, S.R. (2000). Mice lacking insulin receptor substrate 4 exhibit mild defects in growth, reproduction, and glucose homeostasis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* *278*, E127-133.
- Ferguson, S.M., Raimondi, A., Paradise, S., Shen, H., Mesaki, K., Ferguson, A., Destaing, O., Ko, G., Takasaki, J., Cremona, O., *et al.* (2009). Coordinated actions of actin and BAR proteins upstream of dynamin at endocytic clathrin-coated pits. *Dev Cell* *17*, 811-822.
- Fernandez, L.A., Northcott, P.A., Dalton, J., Fraga, C., Ellison, D., Angers, S., Taylor, M.D., and Kenney, A.M. (2009). YAP1 is amplified and up-regulated in hedgehog-associated medulloblastomas and mediates Sonic hedgehog-driven neural precursor proliferation. *Genes Dev* *23*, 2729-2741.
- Folsch, H., Pypaert, M., Schu, P., and Mellman, I. (2001). Distribution and function of AP-1 clathrin adaptor complexes in polarized epithelial cells. *J Cell Biol* *152*, 595-606.
- Foote, C., and Nothwehr, S.F. (2006). The clathrin adaptor complex 1 directly binds to a sorting signal in Ste13p to reduce the rate of its trafficking to the late endosome of yeast. *J Cell Biol* *173*, 615-626.
- Formisano, P., Oriente, F., Fiory, F., Caruso, M., Miele, C., Maitan, M.A., Andreozzi, F., Vigliotta, G., Condorelli, G., and Beguinot, F. (2000). Insulin-activated protein kinase C β bypasses Ras and stimulates mitogen-activated protein kinase activity and cell proliferation in muscle cells. *Mol Cell*

Biol 20, 6323-6333.

Friedman, J.E., Ishizuka, T., Liu, S., Farrell, C.J., Bedol, D., Koletsky, R.J., Kaung, H.L., and Ernsberger, P. (1997). Reduced insulin receptor signaling in the obese spontaneously hypertensive Koletsky rat. *Am J Physiol* 273, E1014-1023.

Fukushima, T., Arai, T., Ariga-Nedachi, M., Okajima, H., Ooi, Y., Iijima, Y., Sone, M., Cho, Y., Ando, Y., Kasahara, K., *et al.* (2010). Insulin receptor substrates form high-molecular-mass complexes that modulate their availability to insulin/insulin-like growth factor-I receptor tyrosine kinases. *Biochem Biophys Res Commun* 404, 767-773.

Fukushima, T., Nakamura, Y., Yamanaka, D., Shibano, T., Chida, K., Minami, S., Asano, T., Hakuno, F., and Takahashi, S. (2012). Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) activity bound to insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor, which is continuously sustained by IGF-I stimulation, is required for IGF-I-induced cell proliferation. *J Biol Chem* 287, 29713-29721.

Fukushima, T., Okajima, H., Yamanaka, D., Ariga, M., Nagata, S., Ito, A., Yoshida, M., Asano, T., Chida, K., Hakuno, F., *et al.* (2011). HSP90 interacting with IRS-2 is involved in cAMP-dependent potentiation of IGF-I signals in FRTL-5 cells. *Mol Cell Endocrinol* 344, 81-89.

Garcia-Regalado, A., Guzman-Hernandez, M.L., Ramirez-Rangel, I., Robles-Molina, E., Balla, T., Vazquez-Prado, J., and Reyes-Cruz, G. (2008). G protein-coupled receptor-promoted trafficking of Gbeta1gamma2 leads to AKT activation at endosomes via a mechanism mediated by Gbeta1gamma2-Rab11a interaction. *Mol Biol Cell* 19, 4188-4200.

Girnita, L., Worrall, C., Takahashi, S.I., Seregard, S., and Girnita, A. (2013). Something old, something new and something borrowed: emerging paradigm of insulin-like growth factor type 1 receptor (IGF-1R) signaling regulation. *Cell Mol Life Sci.* Ahead of print

Goetsch, L., Gonzalez, A., Leger, O., Beck, A., Pauwels, P.J., Haeuw, J.F., and Corvaia, N. (2005). A recombinant humanized anti-insulin-like growth factor receptor type I antibody (h7C10) enhances the antitumor activity of vinorelbine and anti-epidermal growth factor receptor therapy against human cancer xenografts. *Int J Cancer* 113, 316-328.

Goh, L.K., and Sorkin, A. (2013). Endocytosis of receptor tyrosine kinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, a017459.

Gorlin, J.B., Yamin, R., Egan, S., Stewart, M., Stossel, T.P., Kwiatkowski, D.J., and Hartwig, J.H. (1990). Human endothelial actin-binding protein (ABP-280, nonmuscle filamin): a molecular leaf spring. *J Cell Biol* 111, 1089-1105.

Gronborg, M., Wulff, B.S., Rasmussen, J.S., Kjeldsen, T., and Gammeltoft, S. (1993). Structure-function relationship of the insulin-like growth factor-I receptor tyrosine kinase. *J Biol*

Chem 268, 23435-23440.

Grossier, J.P., Xouri, G., Goud, B., and Schauer, K. (2014). Cell adhesion defines the topology of endocytosis and signaling. *EMBO J* 33, 35-45.

Hakuno, F., Kurihara, S., Watson, R.T., Pessin, J.E., and Takahashi, S. (2007). 53BP2S, interacting with insulin receptor substrates, modulates insulin signaling. *J Biol Chem* 282, 37747-37758.

Hakuno, F., Yamauchi, Y., Kaneko, G., Yoneyama, Y., Nakae, J., Chida, K., Kadowaki, T., Yamanouchi, K., Nishihara, M., and Takahashi, S. (2011). Constitutive expression of insulin receptor substrate (IRS)-1 inhibits myogenic differentiation through nuclear exclusion of Foxo1 in L6 myoblasts. *PLoS One* 6, e25655.

Heller-Harrison, R.A., Morin, M., and Czech, M.P. (1995). Insulin regulation of membrane-associated insulin receptor substrate 1. *J Biol Chem* 270, 24442-24450.

Hille-Rehfeld, A. (1995). Mannose 6-phosphate receptors in sorting and transport of lysosomal enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1241, 177-194.

Hirashima, Y., Tsuruzoe, K., Kodama, S., Igata, M., Toyonaga, T., Ueki, K., Kahn, C.R., and Araki, E. (2003). Insulin down-regulates insulin receptor substrate-2 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Endocrinol* 179, 253-266.

Hirst, J., Borner, G.H., Antrobus, R., Peden, A.A., Hodson, N.A., Sahlender, D.A., and Robinson, M.S. (2012). Distinct and overlapping roles for AP-1 and GGAs revealed by the "knocksideways" system. *Curr Biol* 22, 1711-1716.

Hoehn, K.L., Hohnen-Behrens, C., Cederberg, A., Wu, L.E., Turner, N., Yuasa, T., Ebina, Y., and James, D.E. (2008). IRS1-independent defects define major nodes of insulin resistance. *Cell Metab* 7, 421-433.

Hoxhaj, G., Dissanayake, K., and MacKintosh, C. (2013). Effect of IRS4 levels on PI 3-kinase signalling. *PLoS One* 8, e73327.

Hsu, D., Knudson, P.E., Zapf, A., Rolband, G.C., and Olefsky, J.M. (1994). NPXY motif in the insulin-like growth factor-I receptor is required for efficient ligand-mediated receptor internalization and biological signaling. *Endocrinology* 134, 744-750.

Hubbard, S.R. (1997). Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog. *EMBO J* 16, 5572-5581.

Hubbard, S.R., Wei, L., Ellis, L., and Hendrickson, W.A. (1994). Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. *Nature* 372, 746-754.

Inoue, G., Cheatham, B., Emkey, R., and Kahn, C.R. (1998). Dynamics of insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. Differential compartmentalization and trafficking of insulin receptor substrate (IRS)-1 and

- IRS-2. *J Biol Chem* 273, 11548-11555.
- Jackson, L.P., Kelly, B.T., McCoy, A.J., Gaffry, T., James, L.C., Collins, B.M., Honing, S., Evans, P.R., and Owen, D.J. (2010). A large-scale conformational change couples membrane recruitment to cargo binding in the AP2 clathrin adaptor complex. *Cell* 141, 1220-1229.
- Jones, J.I., and Clemmons, D.R. (1995). Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 16, 3-34.
- Kabuta, T., Hakuno, F., Asano, T., and Takahashi, S. (2002). Insulin receptor substrate-3 functions as transcriptional activator in the nucleus. *J Biol Chem* 277, 6846-6851.
- Kabuta, T., Hakuno, F., Cho, Y., Yamanaka, D., Chida, K., Asano, T., Wada, K., and Takahashi, S. (2010). Insulin receptor substrate-3, interacting with Bcl-3, enhances p50 NF-kappaB activity. *Biochem Biophys Res Commun* 394, 697-702.
- Kabuta, T., Take, K., Kabuta, C., Hakuno, F., and Takahashi, S. (2008). Differential subcellular localization of insulin receptor substrates depends on C-terminal regions and importin beta. *Biochem Biophys Res Commun* 377, 741-746.
- Kadowaki, T., Tamemoto, H., Tobe, K., Terauchi, Y., Ueki, K., Kaburagi, Y., Yamauchi, T., Satoh, S., Sekihara, H., Aizawa, S., *et al.* (1996). Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1 and identification of insulin receptor substrate-2. *Diabet Med* 13, S103-108.
- Karlsson, M., Thorn, H., Danielsson, A., Stenkula, K.G., Ost, A., Gustavsson, J., Nystrom, F.H., and Stralfors, P. (2004). Colocalization of insulin receptor and insulin receptor substrate-1 to caveolae in primary human adipocytes. Cholesterol depletion blocks insulin signalling for metabolic and mitogenic control. *Eur J Biochem* 271, 2471-2479.
- Kato, H., Faria, T.N., Stannard, B., Roberts, C.T., Jr., and LeRoith, D. (1994). Essential role of tyrosine residues 1131, 1135, and 1136 of the insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor in IGF-I action. *Mol Endocrinol* 8, 40-50.
- Kawashima, Y., Higaki, K., Fukushima, T., Hakuno, F., Nagaishi, J., Hanaki, K., Nanba, E., Takahashi, S., and Kanzaki, S. (2012). Novel missense mutation in the IGF-I receptor L2 domain results in intrauterine and postnatal growth retardation. *Clin Endocrinol (Oxf)* 77, 246-254.
- Kelly, B.T., McCoy, A.J., Spate, K., Miller, S.E., Evans, P.R., Honing, S., and Owen, D.J. (2008). A structural explanation for the binding of endocytic dileucine motifs by the AP2 complex. *Nature* 456, 976-979.
- Kelly, K.L., and Ruderman, N.B. (1993). 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.
- Kublaoui, B., Lee, J., and Pilch, P.F. (1995). Dynamics of signaling during insulin-stimulated endocytosis of its receptor in adipocytes. *J Biol Chem* 270, 59-65.
- Kubota, H., Noguchi, R., Toyoshima, Y., Ozaki, Y., Uda, S., Watanabe, K., Ogawa, W., and Kuroda, S. (2012). Temporal coding of insulin action through multiplexing of the AKT pathway. *Mol Cell* 46, 820-832.
- Kubota, N., Tobe, K., Terauchi, Y., Eto, K., Yamauchi, T., Suzuki, R., Tsubamoto, Y., Komeda, K., Nakano, R., Miki, H., *et al.* (2000). Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell hyperplasia. *Diabetes* 49, 1880-1889.
- Kural, C., Tacheva-Grigorova, S.K., Boulant, S., Cocucci, E., Baust, T., Duarte, D., and Kirchhausen, T. (2012). Dynamics of intracellular clathrin/AP1- and clathrin/AP3-containing carriers. *Cell Rep* 2, 1111-1119.
- Lau, M.M., Stewart, C.E., Liu, Z., Bhatt, H., Rotwein, P., and Stewart, C.L. (1994). Loss of the imprinted IGF2/cation-independent mannose 6-phosphate receptor results in fetal overgrowth and perinatal lethality. *Genes Dev* 8, 2953-2963.
- Le Roy, C., and Wrana, J.L. (2005). Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 112-126.
- Lebrun, P., Baron, V., Hauck, C.R., Schlaepfer, D.D., and Van Obberghen, E. (2000). Cell adhesion and focal adhesion kinase regulate insulin receptor substrate-1 expression. *J Biol Chem* 275, 38371-38377.
- Lefkir, Y., Malbouyres, M., Gotthardt, D., Ozinsky, A., Cornillon, S., Bruckert, F., Aderem, A.A., Soldati, T., Cosson, P., and Letourneur, F. (2004). Involvement of the AP-1 adaptor complex in early steps of phagocytosis and macropinocytosis. *Mol Biol Cell* 15, 861-869.
- LeRoith, D., Werner, H., Beitner-Johnson, D., and Roberts, C.T., Jr. (1995). Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* 16, 143-163.
- Liu, S.C., Wang, Q., Lienhard, G.E., and Keller, S.R. (1999). Insulin receptor substrate 3 is not essential for growth or glucose homeostasis. *J Biol Chem* 274, 18093-18099.
- Loerke, D., Mettlen, M., Yarar, D., Jaqaman, K., Jaqaman, H., Danuser, G., and Schmid, S.L. (2009). Cargo and dynamin regulate clathrin-coated pit maturation. *PLoS Biol* 7, e57.
- Loy, C.J., Sim, K.S., and Yong, E.L. (2003). Filamin-A fragment localizes to the nucleus to regulate androgen receptor and coactivator functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4562-4567.
- Lubben, N.B., Sahlender, D.A., Motley, A.M., Lehner, P.J., Benaroch, P., and Robinson, M.S. (2007). HIV-1 Nef-induced down-regulation of MHC class I requires AP-1 and clathrin but not PACS-1 and is

- impeded by AP-2. *Mol Biol Cell* **18**, 3351-3365.
- Luo, W., Yu, C.H., Lieu, Z.Z., Allard, J., Mogilner, A., Sheetz, M.P., and Bershadsky, A.D. (2013). Analysis of the local organization and dynamics of cellular actin networks. *J Cell Biol* **202**, 1057-1073.
- Lynch, C.D., Gauthier, N.C., Biais, N., Lazar, A.M., Roca-Cusachs, P., Yu, C.H., and Sheetz, M.P. (2011). Filamin depletion blocks endoplasmic spreading and destabilizes force-bearing adhesions. *Mol Biol Cell* **22**, 1263-1273.
- Manning, B.D., and Cantley, L.C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129**, 1261-1274.
- Marion, S., Mazzolini, J., Herit, F., Bourdoncle, P., Kambou-Pene, N., Hailfinger, S., Sachse, M., Ruland, J., Benmerah, A., Echard, A., *et al.* (2012). The NF-kappaB signaling protein Bcl10 regulates actin dynamics by controlling AP1 and OCRL-bearing vesicles. *Dev Cell* **23**, 954-967.
- Martins, A.S., Ordonez, J.L., Amaral, A.T., Prins, F., Floris, G., Debiec-Rychter, M., Hogendoorn, P.C., and de Alava, E. (2011). IGF1R signaling in Ewing sarcoma is shaped by clathrin-/caveolin-dependent endocytosis. *PLoS One* **6**, e19846.
- McMahon, H.T., and Boucrot, E. (2011). Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 517-533.
- Mettlen, M., Loerke, D., Yarar, D., Danuser, G., and Schmid, S.L. (2010). Cargo- and adaptor-specific mechanisms regulate clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol* **188**, 919-933.
- Meyer, C., Zizioli, D., Lausmann, S., Eskelinen, E.L., Hamann, J., Saftig, P., von Figura, K., and Schu, P. (2000). mu1A-adaptin-deficient mice: lethality, loss of AP-1 binding and rerouting of mannose 6-phosphate receptors. *EMBO J* **19**, 2193-2203.
- Miaczynska, M., Christoforidis, S., Giner, A., Shevchenko, A., Uttenweiler-Joseph, S., Habermann, B., Wilm, M., Parton, R.G., and Zerial, M. (2004). APPL proteins link Rab5 to nuclear signal transduction via an endosomal compartment. *Cell* **116**, 445-456.
- Monami, G., Emiliozzi, V., and Morrione, A. (2008). Grb10/Nedd4-mediated multiubiquitination of the insulin-like growth factor receptor regulates receptor internalization. *J Cell Physiol* **216**, 426-437.
- Mooren, O.L., Kotova, T.I., Moore, A.J., and Schafer, D.A. (2009). Dynamin2 GTPase and cortactin remodel actin filaments. *J Biol Chem* **284**, 23995-24005.
- Morgan, D.O., Edman, J.C., Standring, D.N., Fried, V.A., Smith, M.C., Roth, R.A., and Rutter, W.J. (1987). Insulin-like growth factor II receptor as a multifunctional binding protein. *Nature* **329**, 301-307.
- Motley, A.M., Berg, N., Taylor, M.J., Sahlender, D.A., Hirst, J., Owen, D.J., and Robinson, M.S. (2006). Functional analysis of AP-2 alpha and mu2 subunits. *Mol Biol Cell* **17**, 5298-5308.

- Munshi, S., Hall, D.L., Kornienko, M., Darke, P.L., and Kuo, L.C. (2003). Structure of apo, unactivated insulin-like growth factor-1 receptor kinase at 1.5 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **59**, 1725-1730.
- Munshi, S., Kornienko, M., Hall, D.L., Reid, J.C., Waxman, L., Stirdivant, S.M., Darke, P.L., and Kuo, L.C. (2002). Crystal structure of the Apo, unactivated insulin-like growth factor-1 receptor kinase. Implication for inhibitor specificity. *J Biol Chem* **277**, 38797-38802.
- Muriel, O., Echarrri, A., Hellriegel, C., Pavon, D.M., Beccari, L., and Del Pozo, M.A. (2011). Phosphorylated filamin A regulates actin-linked caveolae dynamics. *J Cell Sci* **124**, 2763-2776.
- Myers, M.G., Jr., Backer, J.M., Sun, X.J., Shoelson, S., Hu, P., Schlessinger, J., Yoakim, M., Schaffhausen, B., and White, M.F. (1992). IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10350-10354.
- Myers, M.G., Jr., Wang, L.M., Sun, X.J., Zhang, Y., Yenush, L., Schlessinger, J., Pierce, J.H., and White, M.F. (1994). Role of IRS-1-GRB-2 complexes in insulin signaling. *Mol Cell Biol* **14**, 3577-3587.
- Myers, M.G., Jr., and White, M.F. (1996). Insulin signal transduction and the IRS proteins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **36**, 615-658.
- Myers, M.G., Jr., Zhang, Y., Aldaz, G.A., Grammer, T., Glasheen, E.M., Yenush, L., Wang, L.M., Sun, X.J., Blenis, J., Pierce, J.H., *et al.* (1996). YMXM motifs and signaling by an insulin receptor substrate 1 molecule without tyrosine phosphorylation sites. *Mol Cell Biol* **16**, 4147-4155.
- Nakae, J., Kido, Y., and Accili, D. (2001). Distinct and overlapping functions of insulin and IGF-I receptors. *Endocr Rev* **22**, 818-835.
- Nakagawa, K., Sugahara, M., Yamasaki, T., Kajiho, H., Takahashi, S., Hirayama, J., Minami, Y., Ohta, Y., Watanabe, T., Hata, Y., *et al.* (2010). Filamin associates with stress signalling kinases MKK7 and MKK4 and regulates JNK activation. *Biochem J* **427**, 237-245.
- Nakatsu, F., and Ohno, H. (2003). Adaptor protein complexes as the key regulators of protein sorting in the post-Golgi network. *Cell Struct Funct* **28**, 419-429.
- Ohno, H., Stewart, J., Fournier, M.C., Bosshart, H., Rhee, I., Miyatake, S., Saito, T., Gallusser, A., Kirchhausen, T., and Bonifacino, J.S. (1995). Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science* **269**, 1872-1875.
- Owen, D.J., and Evans, P.R. (1998). A structural explanation for the recognition of tyrosine-based endocytotic signals. *Science* **282**, 1327-1332.
- Ozoe, A., Sone, M., Fukushima, T., Kataoka, N., Arai, T., Chida, K., Asano, T., Hakuno, F., and Takahashi, S. (2013). Insulin receptor substrate-1 (IRS-1) forms a ribonucleoprotein complex associated with polysomes. *FEBS Lett* **587**, 2319-2324.

- Prisco, M., Santini, F., Baffa, R., Liu, M., Drakas, R., Wu, A., and Baserga, R. (2002). Nuclear translocation of insulin receptor substrate-1 by the simian virus 40 T antigen and the activated type 1 insulin-like growth factor receptor. *J Biol Chem* *277*, 32078-32085.
- Razzini, G., Ingrosso, A., Brancaccio, A., Sciacchitano, S., Esposito, D.L., and Falasca, M. (2000). Different subcellular localization and phosphoinositides binding of insulin receptor substrate protein pleckstrin homology domains. *Mol Endocrinol* *14*, 823-836.
- Ren, X., Farias, G.G., Canagarajah, B.J., Bonifacio, J.S., and Hurley, J.H. (2013). Structural basis for recruitment and activation of the AP-1 clathrin adaptor complex by Arf1. *Cell* *152*, 755-767.
- Revenu, C., Athman, R., Robine, S., and Louvard, D. (2004). The co-workers of actin filaments: from cell structures to signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* *5*, 635-646.
- Ricort, J.M., Tanti, J.F., Van Obberghen, E., and Le Marchand-Brustel, Y. (1996). Different effects of insulin and platelet-derived growth factor on phosphatidylinositol 3-kinase at the subcellular level in 3T3-L1 adipocytes. A possible explanation for their specific effects on glucose transport. *Eur J Biochem* *239*, 17-22.
- Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G., Parsons, J.T., and Horwitz, A.R. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* *302*, 1704-1709.
- Romanelli, R.J., LeBeau, A.P., Fulmer, C.G., Lazzarino, D.A., Hochberg, A., and Wood, T.L. (2007). Insulin-like growth factor type-I receptor internalization and recycling mediate the sustained phosphorylation of Akt. *J Biol Chem* *282*, 22513-22524.
- Rose, D.W., Saltiel, A.R., Majumdar, M., Decker, S.J., and Olefsky, J.M. (1994). Insulin receptor substrate 1 is required for insulin-mediated mitogenic signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 797-801.
- Roux, K.J., Kim, D.I., Raida, M., and Burke, B. (2012). A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J Cell Biol* *196*, 801-810.
- Roy, S., Plowman, S., Rotblat, B., Prior, I.A., Muncke, C., Grainger, S., Parton, R.G., Henis, Y.I., Kloog, Y., and Hancock, J.F. (2005). Individual palmitoyl residues serve distinct roles in H-ras trafficking, microlocalization, and signaling. *Mol Cell Biol* *25*, 6722-6733.
- Saffarian, S., Cocucci, E., and Kirchhausen, T. (2009). Distinct dynamics of endocytic clathrin-coated pits and coated plaques. *PLoS Biol* *7*, e1000191.
- Salani, B., Passalacqua, M., Maffioli, S., Briatore, L., Hamoudane, M., Contini, P., Cordera, R., and Maggi, D. (2010). IGF-IR internalizes with Caveolin-1 and PTRF/Cavin in HaCat cells. *PLoS One* *5*, e14157.
- Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold

Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sano, H., Kane, S., Sano, E., Miinea, C.P., Asara, J.M., Lane, W.S., Garner, C.W., and Lienhard, G.E. (2003). Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *J Biol Chem* 278, 14599-14602.

Sasagawa, S., Ozaki, Y., Fujita, K., and Kuroda, S. (2005). Prediction and validation of the distinct dynamics of transient and sustained ERK activation. *Nat Cell Biol* 7, 365-373.

Schenck, A., Goto-Silva, L., Collinet, C., Rhinn, M., Giner, A., Habermann, B., Brand, M., and Zerial, M. (2008). The endosomal protein Appl1 mediates Akt substrate specificity and cell survival in vertebrate development. *Cell* 133, 486-497.

Seaman, M.N., Gautreau, A., and Billadeau, D.D. (2013). Retromer-mediated endosomal protein sorting: all WASHed up! *Trends Cell Biol* 23, 522-528.

Sell, C., Rubini, M., Rubin, R., Liu, J.P., Efstratiadis, A., and Baserga, R. (1993). Simian virus 40 large tumor antigen is unable to transform mouse embryonic fibroblasts lacking type 1 insulin-like growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 11217-11221.

Shi, J., Wang, D.M., Wang, C.M., Hu, Y., Liu, A.H., Zhang, Y.L., Sun, B., and Song, J.G. (2009). Insulin receptor substrate-1 suppresses transforming growth factor-beta1-mediated epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res* 69, 7180-7187.

Shier, P., and Watt, V.M. (1989). Primary structure of a putative receptor for a ligand of the insulin family. *J Biol Chem* 264, 14605-14608.

Skolnik, E.Y., Batzer, A., Li, N., Lee, C.H., Lowenstein, E., Mohammadi, M., Margolis, B., and Schlessinger, J. (1993a). The function of GRB2 in linking the insulin receptor to Ras signaling pathways. *Science* 260, 1953-1955.

Skolnik, E.Y., Lee, C.H., Batzer, A., Vicentini, L.M., Zhou, M., Daly, R., Myers, M.J., Jr., Backer, J.M., Ullrich, A., White, M.F., *et al.* (1993b). The SH2/SH3 domain-containing protein GRB2 interacts with tyrosine-phosphorylated IRS1 and Shc: implications for insulin control of ras signalling. *EMBO J* 12, 1929-1936.

Sorkin, A., and von Zastrow, M. (2009). Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 609-622.

Sun, X.J., Crimmins, D.L., Myers, M.G., Jr., Miralpeix, M., and White, M.F. (1993). Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1. *Mol Cell Biol* 13, 7418-7428.

Sun, Y., Bilan, P.J., Liu, Z., and Klip, A. (2010). Rab8A and Rab13 are activated by insulin and regulate GLUT4 translocation in muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 19909-19914.

Sverdlov, M., Shinin, V., Place, A.T., Castellon, M., and Minshall, R.D. (2009). Filamin A regulates

- caveolae internalization and trafficking in endothelial cells. *Mol Biol Cell* *20*, 4531-4540.
- Takano, A., Usui, I., Haruta, T., Kawahara, J., Uno, T., Iwata, M., and Kobayashi, M. (2001). Mammalian target of rapamycin pathway regulates insulin signaling via subcellular redistribution of insulin receptor substrate 1 and integrates nutritional signals and metabolic signals of insulin. *Mol Cell Biol* *21*, 5050-5062.
- Takeuchi, H., Matsuda, M., Yamamoto, T., Kanematsu, T., Kikkawa, U., Yagisawa, H., Watanabe, Y., and Hirata, M. (1998). PTB domain of insulin receptor substrate-1 binds inositol compounds. *Biochem J* *334 (Pt 1)*, 211-218.
- Taniguchi, C.M., Emanuelli, B., and Kahn, C.R. (2006). Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* *7*, 85-96.
- Taniguchi, C.M., Ueki, K., and Kahn, R. (2005). Complementary roles of IRS-1 and IRS-2 in the hepatic regulation of metabolism. *J Clin Invest* *115*, 718-727.
- Taylor, M.J., Lampe, M., and Merrifield, C.J. (2012). A feedback loop between dynamin and actin recruitment during clathrin-mediated endocytosis. *PLoS Biol* *10*, e1001302.
- Tigges, U., Koch, B., Wissing, J., Jockusch, B.M., and Ziegler, W.H. (2003). The F-actin cross-linking and focal adhesion protein filamin A is a ligand and in vivo substrate for protein kinase C alpha. *J Biol Chem* *278*, 23561-23569.
- Tirosh, A., Potashnik, R., Bashan, N., and Rudich, A. (1999). Oxidative stress disrupts insulin-induced cellular redistribution of insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-L1 adipocytes. A putative cellular mechanism for impaired protein kinase B activation and GLUT4 translocation. *J Biol Chem* *274*, 10595-10602.
- Traub, L.M., and Bonifacio, J.S. (2013). Cargo recognition in clathrin-mediated endocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *5*, a016790.
- Uchida, T., Myers, M.G., Jr., and White, M.F. (2000). IRS-4 mediates protein kinase B signaling during insulin stimulation without promoting antiapoptosis. *Mol Cell Biol* *20*, 126-138.
- VanRenterghem, B., Morin, M., Czech, M.P., and Heller-Harrison, R.A. (1998). Interaction of insulin receptor substrate-1 with the sigma3A subunit of the adaptor protein complex-3 in cultured adipocytes. *J Biol Chem* *273*, 29942-29949.
- Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R.S., and Horwitz, A.R. (2009). Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* *10*, 778-790.
- Walz, H.A., Shi, X., Chouinard, M., Bue, C.A., Navaroli, D.M., Hayakawa, A., Zhou, Q.L., Nadler, J., Leonard, D.M., and Corvera, S. (2010). Isoform-specific regulation of Akt signaling by the endosomal protein WDFY2. *J Biol Chem* *285*, 14101-14108.

- Wang, L.M., Myers, M.G., Jr., Sun, X.J., Aaronson, S.A., White, M., and Pierce, J.H. (1993). IRS-1: essential for insulin- and IL-4-stimulated mitogenesis in hematopoietic cells. *Science* *261*, 1591-1594.
- Wang, Z.Q., Fung, M.R., Barlow, D.P., and Wagner, E.F. (1994). Regulation of embryonic growth and lysosomal targeting by the imprinted *Igf2/Mpr* gene. *Nature* *372*, 464-467.
- Waters, S.B., Yamauchi, K., and Pessin, J.E. (1993). Functional expression of insulin receptor substrate-1 is required for insulin-stimulated mitogenic signaling. *J Biol Chem* *268*, 22231-22234.
- White, M.F. (2002). IRS proteins and the common path to diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* *283*, E413-422.
- 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., *et al.* (1998). Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* *391*, 900-904.
- Wu, A., Chen, J., and Baserga, R. (2008). Nuclear insulin receptor substrate-1 activates promoters of cell cycle progression genes. *Oncogene* *27*, 397-403.
- Yarar, D., Waterman-Storer, C.M., and Schmid, S.L. (2005). A dynamic actin cytoskeleton functions at multiple stages of clathrin-mediated endocytosis. *Mol Biol Cell* *16*, 964-975.
- Yenush, L., and White, M.F. (1997). The IRS-signalling system during insulin and cytokine action. *Bioessays* *19*, 491-500.
- Yoshihara, H., Fukushima, T., Hakuno, F., Saeki, Y., Tanaka, K., Ito, A., Yoshida, M., Iemura, S., Natsume, T., Asano, T., *et al.* (2012). Insulin/insulin-like growth factor (IGF) stimulation abrogates an association between a deubiquitinating enzyme USP7 and insulin receptor substrates (IRSs) followed by proteasomal degradation of IRSs. *Biochem Biophys Res Commun* *423*, 122-127.
- Yudushkin, I.A., Schleifenbaum, A., Kinkhabwala, A., Neel, B.G., Schultz, C., and Bastiaens, P.I. (2007). Live-cell imaging of enzyme-substrate interaction reveals spatial regulation of PTP1B. *Science* *315*, 115-119.

本研究の内容に関わる論文

主要論文

Yoneyama, Y., Matsuo, M., Take, K., Kabuta, T., Chida, K., Hakuno, F., Takahashi, SI.

The AP-1 complex regulates intracellular localization of insulin receptor substrate 1, which is required for insulin-like growth factor I-dependent cell proliferation.

Molecular and Cellular Biology Vol.33, No.10, pp.1991-2003 (2013)

関連論文

Hakuno, F., Yamauchi, Y., Kaneko, G., Yoneyama, Y., Nakae, J., Chida, K.,

Kadowaki, T., Yamanouchi, K., Nishihara, M., Takahashi, SI.

Constitutive expression of insulin receptor substrate (IRS)-1 inhibits myogenic differentiation through nuclear exclusion of Foxo1 in L6 myoblasts.

PLoS One, 6(10):e25655. doi: 10.1371/journal.pone.0025655 (2011)

謝辞

本研究を進めるに当たり、研究室入室以来、親身かつ熱心な御指導御鞭撻を賜りました高橋伸一郎准教授（東京大学大学院農学生命科学研究科）に深く感謝いたします。適切な御指導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）に深く感謝いたします。温かい御指導と御心遣いを賜りました伯野史彦助教（東京大学大学院農学生命科学研究科）に深く感謝いたします。

本研究室での生活を共にし、親身に相談に乗って下さった動物細胞制御学研究室のメンバーに心より感謝いたします。

結晶構造解析の研究を進めるにあたり、多大なる御援助を頂きました、理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研究センターエピジェネクス制御研究ユニットの梅原崇史博士に深く感謝いたします。また、質量分析法によるタンパク質同定の共同研究をしてくださいました、理化学研究所吉田化学遺伝学券研究室の伊藤昭博博士、吉田稔博士に深く感謝いたします。全反射顕微鏡の実験にご助力いただきました、物質・材料研究機構ナノテクノロジー融合ステーションの箕輪貴司博士に感謝いたします。モノクローナル抗体の作製にご助力いただきました、丸山順一博士（東京医科歯科大学病態代謝解析学分野）と一條秀憲教授（東京大学大学院薬学系研究科）に深く感謝いたします。

論文の投稿にあたり、親身にご相談に乗って下さった Jeffrey E. Pessin 博士（Albert Einstein College of Medicine）、Stuart Newfeld 博士（Arizona State University）、Susan Hall 博士（University of North Carolina）に深く感謝いたします。

最後に、研究者を目指すことを選んだ私を支持し、温かく応援してくれた家族に感謝します。