

## 論文の内容の要旨

応用動物科学専攻  
平成23年度博士課程進学  
氏名 米山 鷹介  
指導教員名 高橋伸一郎

論文題目 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

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へ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 IRS を介したインスリン/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、 $\mu$ 1A および  $\mu$ 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  $\mu$ 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 $\Phi$ 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、 $\mu$ 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 $\Phi$ モチーフが  $\mu$ 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  $\Delta$  AP) は、CI-MPR 陽性エンドソームへ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  $\Delta$  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 $\Phi$ 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 $\Phi$ 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  $\Delta$  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および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、対照細胞と有為な差異は観察されなかった。これに対して、IRS-1 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。

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、癌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。