

令和元年5月31日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18812

研究課題名(和文)新規アダプタータンパク質PI3KAPが甲状腺ホルモン産生調節に果たす新しい役割

研究課題名(英文) A novel role for adaptor protein PI3KAP in regulation of thyroid hormone production

研究代表者

山中 大介 (Yamanaka, Daisuke)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任助教

研究者番号：10553266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：甲状腺ホルモンは、動物の正常な発達・成長・成熟や基礎代謝の維持に必須なホルモンで、甲状腺刺激ホルモン(TSH)とインスリン様成長因子(IGF)が、甲状腺機能の制御、ひいては甲状腺ホルモンの血中濃度の調節に重要な役割を果たす。最近我々は、TSHとIGFによる甲状腺細胞の増殖誘導を司る新規アダプタータンパク質としてPI3KAPを同定した。本研究では、甲状腺ホルモン産生の重要なステップであるサイログロブリン再吸収にPI3KAPが必須の役割を果たし、PI3KAPとアクチン細胞骨格との相互作用やモータータンパク質などのPI3KAP結合タンパク質がメカニズムの一端を担うことを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で着目したPI3KAPは我々の研究の過程で最近発見した新しいタンパク質であり、このタンパク質を介したサイログロブリン再吸収の制御機構を解明することによって、甲状腺ホルモンの新しい生成機構を見出したという学術的意義がある。今回、PI3KAPと相互作用するタンパク質を新たに同定し、これらがサイログロブリン再吸収に重要な役割を果たすことを示せたことが本研究の基礎を成している。同時に、本研究を基盤として応用研究に発展させれば、甲状腺機能亢進症や機能低下症の新しい発症機構を解明し、その治療法開発を可能とするという社会的意義も本研究は有している。

研究成果の概要(英文)：Thyroid hormones are essential for normal development, growth, maturation and maintenance of basal metabolism. Thyroid-stimulating hormone (TSH) and insulin-like growth factors (IGF) play an indispensable role in regulation of thyroid functions, leading to control of blood thyroid hormone levels. Recently, we identified PI3KAP as a novel adaptor protein to direct cell proliferation induced by TSH and IGF. In this study, we demonstrated that PI3KAP was important for thyroglobulin uptake (endocytosis), an essential step in thyroid hormone production, and that interaction of PI3KAP with actin cytoskeletons and motor proteins was a component of the mechanisms.

研究分野：分子内分科学

キーワード：甲状腺ホルモン アダプタータンパク質 サイログロブリン エンドサイトーシス 細胞骨格

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

甲状腺ホルモンは、熱産生促進、神経活動促進、心拍数/心拍出量上昇、成長促進などの作用を持つホルモンであり、動物の正常な発達・成長・成熟や基礎代謝の維持に必須である。甲状腺刺激ホルモン (TSH) は、細胞表面の TSH 受容体を介して、①ヨードの濾胞腔内への輸送、②ホルモン前駆体であるサイログロブリンのチロシンへのヨードの結合 (ヨードの有機化) とヨードチロシンの縮合、③サイログロブリンの甲状腺細胞への再吸収 (エンドサイトーシス) を促進し、甲状腺ホルモンの合成・分泌を増加させる【文献 1】。TSH により活性化される cAMP 経路の過剰なシグナルは、過剰なホルモン合成を誘導し、甲状腺機能亢進症を引き起こす。バセドウ病はその代表例で、TSH 受容体抗体が甲状腺を刺激する自己免疫疾患であり、甲状腺疾患の中では最も頻度が高い。治療法としては、我が国では抗甲状腺薬による薬物療法が最も多く選択されているが、再発率が高く、また劇症肝炎などの重篤な副作用も起こりうるため、薬物療法を継続できなくなる患者も少なくない。そのため、甲状腺ホルモンの合成・分泌を制御する新しい情報伝達経路を明らかにすることは、従来とは異なる作用機序を持つ薬剤の開発につながり、バセドウ病患者にとって福音となる。

インスリン様成長因子 (IGF) は、様々な細胞の増殖・分化・機能維持を誘導するホルモンであり、これらの活性は他のホルモンなどとのクロストークで増強される【文献 2】。甲状腺においては、TSH と IGF により相乗的に増殖が誘導され、TSH あるいは IGF のどちらかが欠損した動物では、甲状腺発達が低下し、患者では甲状腺機能不全が起こる。申請者らは、TSH と IGF の相乗作用発現機構を解明する目的で研究を進め、その過程で、TSH により誘導されて PI3 キナーゼに相互作用する分子質量 125kDa のチロシンリン酸化タンパク質が、IGF 依存性増殖の増強に必須であることを見出した。このタンパク質を精製・同定したところ、①PI3 キナーゼなどの SH2 ドメインが認識するリン酸化チロシンモチーフ (このチロシンは Src によりリン酸化される)、②SH3 ドメイン認識配列、③PH ドメイン、④coiled-coil ドメインなど、多くの機能ドメインを有する新規タンパク質であることがわかった (PI3KAP と命名した)【文献 3】。そこで、甲状腺培養細胞 FRTL-5 をモデル細胞として解析を進め、この細胞で PI3KAP を発現抑制、TSH と IGF の共存下で増殖能を調べた結果、増殖が阻害されることがわかった【文献 3】。この結果は、PI3KAP が TSH と IGF のクロストーク制御タンパク質として機能することを示していた。

このタンパク質の *in vivo* レベルでの生理的意義を明らかにする目的で、全身で PI3KAP をノックアウト (KO) したマウスを作製したところ、驚いたことに、KO マウスでは甲状腺の腫大が引き起こされ、組織学的解析では濾胞サイズの増加、甲状腺細胞数の増加も観察された。内分泌指標の解析から、甲状腺ホルモン (T4) レベルが低下し、代償的に TSH レベルが上昇することもわかった【文献 4】。既に、甲状腺特異的 IGF 受容体 KO マウスが報告されており【文献 5】、このマウスの研究成果を併せると、①IGF 経路は甲状腺細胞の増殖に必須で、PI3KAP を欠損すると個体レベルでは補償機構が働き、TSH の増加に伴って IGF 依存性増殖が増強される、②IGF 経路と協調して、TSH による PI3KAP 経路の活性化は濾胞の縮小 (おそらく濾胞腔のサイログロブリンのエンドサイトーシス促進を反映している) を誘導し、甲状腺ホルモンの分泌を促進すると考えられた。

これらの結果から、「バセドウ病のような TSH シグナルの過剰状態では、発現誘導された PI3KAP を介して甲状腺ホルモンの過剰分泌が引き起こされる」という作業仮説が考えられ、この PI3KAP を介した機構を阻害できれば、バセドウ病などの甲状腺機能亢進症に対して、新しい機序で作用する治療薬の開発へ直結すると着想するに至った。

【参考文献】

1. 橋本貢士ほか, 総合臨床, 2009, 58:1491, 2. 福嶋俊明ほか, ホルモンと臨床, 2007, 55:259, 3. Yamanaka *et al*, *Mol Endocrinol*, 2012, 26:1043, 4. Yamanaka *et al*, *Growth Horm IGF Res*, 2014, 24:S29, 5. Muller *et al*, *Mol Endocrinol*, 2011, 25:1867

2. 研究の目的

そこで本研究では、「PI3KAP を介して起こる甲状腺ホルモンの新しい生成機構を解明する」ことを目的に、サイログロブリンのエンドサイトーシスを促進する分子機構に着目して解析を進めることとした。

具体的には、(1) PI3KAP がサイログロブリンエンドサイトーシスに果たす役割を明らかにする。続いて、(2) エンドサイトーシス誘導に必須な PI3KAP 上の制御領域 (ドメインやモチーフ) を特定する。さらに、(3) PI3KAP に結合するエンドサイトーシス関連タンパク質を同定し、どのような分子機構でエンドサイトーシスを促進するか明らかにする。このような解析から甲状腺ホルモンの新しい生成機構を解明し、新しい抗甲状腺薬を開発するための分子基盤とすることを旨とした。

3. 研究の方法

1) PI3KAP がエンドサイトーシスに果たす役割の解明

野生型あるいは KO マウスの甲状腺組から初代培養甲状腺細胞を調製する、または、甲状腺培

養細胞株 FRTL-5 において、PI3KAP をノックダウン（発現抑制）する等の方法で、PI3KAP を欠損させた甲状腺細胞を調製した。これらの細胞を TSH や IGF の存在下で培養し、エンドサイトーシス基質として蛍光標識されたデキストランやサイログロブリンを取り込ませた。レーザー共焦点顕微鏡や、フローサイトメーターを用いて蛍光強度を測定することで、エンドサイトーシス経路の活性化を定量化した。

2) エンドサイトーシスを促進する PI3KAP 上の機能ドメインの特定

FRTL-5 細胞や遺伝子導入が容易な HEK293 細胞に、PI3KAP やその欠損変異体を過剰発現し、蛍光標識デキストランを取り込ませた。これらの細胞に取り込まれた蛍光強度を測定することにより、各種欠損変異体のエンドサイトーシス促進への影響を調べ、PI3KAP のどのドメインやモチーフがエンドサイトーシスに重要であるかを明らかにした。

3) PI3KAP に結合するエンドサイトーシス関連タンパク質の同定

PI3KAP に FLAG タグを付加して甲状腺細胞に発現させ、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降した。この沈降物に含まれる PI3KAP 結合タンパク質を、高感度質量分析機 (LC-MS/MS) を用いて同定した。続いて、TSH 処理を施した FRTL-5 細胞において、内在性の PI3KAP を免疫沈降し、この免疫沈降物に対してウェスタンブロット解析を行うことで、同定した結合タンパク質と PI3KAP が TSH に依存して結合するか調べた。さらに、同定したタンパク質を siRNA 法でノックダウンし、蛍光デキストランや蛍光サイログロブリンの取り込み量を測定することで、エンドサイトーシス制御における役割を検討した。

4. 研究成果

1) PI3KAP がエンドサイトーシスに果たす役割の解明

甲状腺培養細胞株 FRTL-5 において、siRNA 法を用いて PI3KAP をノックダウンし、TSH 存在下で培養、蛍光標識デキストランの取り込み量を調べた。その結果、デキストラン取り込みは、TSH 処理で増加し、この増加は PI3KAP ノックダウンにより抑制された。また、蛍光標識デキストランの代わりに蛍光標識サイログロブリンを用いて解析した結果、この実験においても同様の結果が得られた。これらの結果から、PI3KAP がサイログロブリンのエンドサイトーシスに必須の役割を担うことが示された (図 1)。(なお、PI3KAP の KO マウスから初代培養甲状腺細胞を調製し、同様の実験を試みたが、KO マウスから回収できた初代培養細胞が少なく、十分な解析結果を得られなかった。)

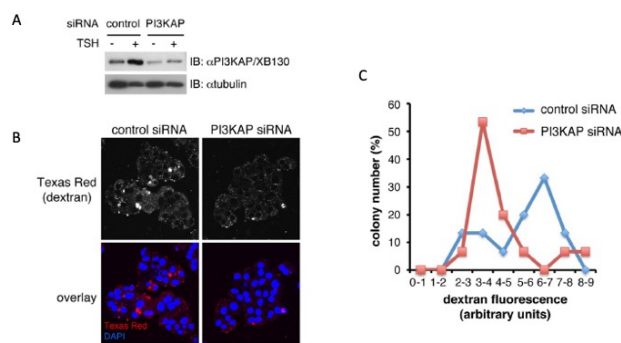


図1. PI3KAP を発現抑制した甲状腺細胞におけるエンドサイトーシス
甲状腺細胞株 FRTL-5 において、control または PI3KAP siRNA を導入し、TSH で刺激、Texas Red 標識デキストランを取り込ませた。A, PI3KAP タンパク質の発現抑制を確認した。B, 取り込まれたデキストラン (Texas Red) および細胞核 (DAPI) を共焦点顕微鏡で撮影した。C, Texas Red デキストランの蛍光強度を細胞コロニーのヒストグラムとして示した。

2) エンドサイトーシスを促進する PI3KAP 上の機能ドメインの特定

エンドサイトーシス促進に必須な PI3KAP 上の機能ドメインを特定するため、遺伝子導入が容易な HEK293 細胞に GFP タグを付加した PI3KAP または欠損変異体を過剰発現し、蛍光デキストランの取り込み量を解析した。その結果、PI3KAP の過剰発現によりデキストラン取り込みが増加する一方で、カルボキシル末端の約 70 アミノ酸を欠損した変異体では、このようなデキストラン取り込みの増加が観察されなかったことがわかった。このカルボキシル末端領域について解析を進めた結果、この領域がアクチン細胞骨格と結合することがわかった。このような解析から、PI3KAP はエンドサイトーシスを促進する能力を有し、これにはアクチン骨格との結合ドメインが必須であることが明らかになった (図 2)。

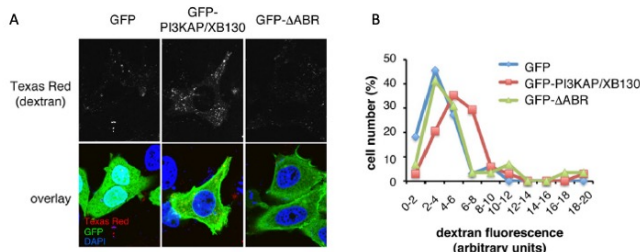


図2. PI3KAP または欠損変異体の過剰発現細胞におけるエンドサイトーシス
HEK293 細胞において、GFP、GFP-PI3KAP または GFP-ΔABR (カルボキシル末端 69 アミノ酸を欠損) を過剰発現し、Texas Red 標識デキストランを取り込ませた。A, 取り込まれたデキストラン (Texas Red)、発現させたタンパク質 (GFP) および細胞核 (DAPI) を共焦点顕微鏡で撮影した。B, Texas Red デキストランの蛍光強度を細胞数のヒストグラムとして示した。

3) PI3KAP に結合するエンドサイトーシス関連タンパク質の同定

PI3KAP を介したエンドサイトーシス制御の分子機構をさらに詳しく調べるため、PI3KAP がエンドサイトーシス関連タンパク質と結合する可能性について検討を進めた。FLAG タグを付加した PI3KAP を安定発現する FRTL-5 細胞を作成、抗 FLAG 抗体で免疫沈降することにより、PI3KAP

結合タンパク質を含む沈降物を調製した。これを LC-MS/MS 用いて分析し、沈降物中に含まれる PI3KAP 結合タンパク質の候補を同定した。その結果、同定されたタンパク質には、エンドサイトーシス制御に関連する可能性のある細胞骨格タンパク質 (アクチン) やモータータンパク質などが含まれていた。続いて、TSH 処理した FRTL-5 細胞から、内在性の PI3KAP を免疫沈降し、同定したタンパク質についてウェスタン解析を行うことで、これらのタンパク質が TSH 処理によって PI3KAP と結合するか確認した。さらに、同定したタンパク質を siRNA 法でノックダウンして蛍光サイログロブリン取り込みを測定し、これらのタンパク質がエンドサイトーシス制御に関与するか解析を進めた。一連の結果から、PI3KAP に結合し、エンドサイトーシス促進に関与すると考えられる細胞骨格タンパク質やモータータンパク質を決定した。

本研究の成果により、「甲状腺において TSH に応答して発現誘導される PI3KAP が、アクチン骨格やモータータンパク質などの分子との相互作用を介して、サイログロブリンのエンドサイトーシスを促進する結果、甲状腺ホルモンの合成が適切に制御される」と結論した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

Yamanaka D, Akama T, Chida K, Minami S, Ito K, Hakuno F, Takahashi S. Phosphatidylinositol 3-kinase-associated protein (PI3KAP)/XB130 crosslinks actin filaments through its actin binding and multimerization properties in vitro and enhances endocytosis in HEK293 cells. *Front Endocrinol.* 7:89. doi:10.3389/fendo.2016.00089. eCollection. 2016.

〔学会発表〕 (計 1 件)

山中大介、谷口紗貴子、伊藤公一、伯野史彦、南史朗、高橋伸一郎 甲状腺細胞の増殖に重要な役割を果たすアダプタータンパク質 PI3KAP は正常な甲状腺ホルモン産生に必須である。第 60 回日本甲状腺学会学術集会 2017 年 10 月 5 日～7 日 (別府)

〔図書〕 (計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
食と生体機能モデル学研究室ホームページ
<http://webpark1838.sakura.ne.jp>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。