

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850220

研究課題名(和文) 初期胚に見出された新規ホスファチジルイノシトール3キナーゼ結合分子の機能解析

研究課題名(英文) Molecular and functional studies of early embryonic phosphatidylinositol 3-kinase and its associating protein.

研究代表者

亀井 宏泰 (KAMEI, HIROYASU)

東京大学・農学生命科学研究科・特任研究員

研究者番号：00610362

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、正常な発生に必要不可欠な分子であるホスファチジルイノシトール3キナーゼの触媒サブユニット (Pik3cb) の働きが初期胚の細胞でどのように調節されているのか調べる為、マウス胚性幹細胞 (mESCs) やゼブラフィッシュ胚を用いてPik3cbとその結合分子に関する解析を行った。その結果、mESCsでは成体組織とは異なるタイプのPik3cbや結合分子が複合体を形成し、その活性が調節されることが示唆された。また、ゼブラフィッシュにおいてPik3cbと複合体を形成する分子を多数クローニングする事もできた。得られた成果は初期胚のPik3cbの働きを理解する上で有用な知見となる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic beta (Pik3cb) plays crucial role in early embryonic survival and development; however, yet the detailed molecular mechanism regulating its embryonic action has been poorly understood. Here the embryonic Pik3cb and its associating proteins were studied in mouse embryonic stem cells (mESCs) and zebrafish embryo. The cDNA sequencing and subsequent biochemical analyses revealed that mESCs express a unique splicing variant of Pik3cb, which can interact with embryo specific associating protein (Pik3cbAP) only when growth factor signaling is activated. The embryonic cell specific Pik3cb-Pik3cbAP complex is seemingly important for activating the enzymatic function of Pik3cb. Furthermore, cDNAs encoding other potential Pik3cb associating molecules were cloned and their embryonic actions were tested in zebrafish embryo. These data will help to decipher the molecular mechanisms governing embryonic Pik3cb function and developmental competency.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ホスファチジルイノシトール3キナーゼ 胚性幹細胞 ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景

卵子や初期胚の品質管理は生命の萌芽を保証する原理的なしくみの一つであるとともに、これを理解し制御する事は多くの応用的観点からも重要である。近年の研究から、初期胚の生存や正常な発生にホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ110βサブユニット (Phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, beta: Pik3cb) が必須であることが明らかになりつつある。申請者は、これまでにマウス胚性幹細胞 (mESCs) とゼブラフィッシュ胚を用いた解析から『初期胚の細胞内で新規の Pik3cb 結合タンパク質 (Pik3cbAP) と Pik3cb が相互作用し、Pik3cb の機能が適切に調節される結果、正常な初期発生が進行する』という初期胚の品質管理に関わる新しい分子機構を提唱するに至っている。

2. 研究の目的

本研究では、初期胚特異的な Pik3cbAP が発生初期の Pik3cb 活性の制御と胚発生に及ぼす役割を分子および個体レベルで精査し、初期胚の品質管理機構に関わる新しい知見の集積を目指した。

3. 研究の方法

本研究では、既に同定している初期胚特異的な Pik3cbAP に関して、特異抗体や欠損変異体等を用いた生化学実験により、分子間相互作用の様式と Pik3cb 活性に及ぼす影響を調べた。また初期胚特異的な Pik3cbAP の発現阻害実験を行い、この分子が初期胚において Pik3cb の生理活性にどのような役割を持つか、そして、これらの結合が種々のストレス条件でどのように変化するかを調べた。さらに、これまでに Pik3cb の活性を変化させることが知られている既知 Pik3cbAP に関しても特にゼブラフィッシュ胚を用いて検討を行った。

4. 研究成果

Pik3cb アイソフォームの存在

本研究を進めるにあたり mESCs から抽出した mRNA を材料に Pik3cb 分子の cDNA のクローニングを試みた。その過程で、これまで報告されていた Pik3cb cDNA よりも短い cDNA が単離された。DNA 配列解析の結果から、この Pik3cb cDNA はアミノ末端側の配列をコードしているエクソンの一つがスキップされたものである事がわかった。Pik3cb のアミノ末端側の配列には古典的 Pik3cb 結合分子である Pik3cr の結合に必須のドメイン配列 (Adaptor binding domain: ABD) が含まれており、新たに発見した Pik3cb の転写産物からは ABD を欠く Pik3cb 分子 (ABD-Pik3cb) が発現する事が推測された。 ABD-Pik3cb mRNA の cDNA 配列を用いた実験から、ABD-Pik3cb mRNA は ABD を含む Pik3cb (Full-Pik3cb) と比較してタンパク質への翻訳効率劣る

ものの、確かに ABD-Pik3cb 分子へ翻訳される mRNA であることが示された。さらに、実際に mESCs や成体マウスから抽出した各組織の抽出物を用いた免疫沈降・イムノブロット解析の結果から ABD-Pik3cb 分子は成体マウスの組織中にはほとんど見いだされない事もわかった。本研究によって調べた限りでは、 ABD-Pik3cb は mESCs でのみ確認された。ただし、 ABD-Pik3cb は Full-Pik3cb と比較して少量であった。

ABD-Pik3cb と新規 Pik3cbAP との結合

これまでの研究から得られていた『新規 Pik3cbAP はマウス成体の各組織では Pik3cb と複合体を形成していない』という結果と、本研究の解析で得られた『 ABD-Pik3cb 分子は成体マウスの組織中にはほとんど見いだされず、未分化胚性幹細胞で存在が見出される』という結果を併せ、『Pik3cbAP は ABD-Pik3cb 分子と優先的に複合体を形成しうる』と云う仮説をたてた。これを検証するため Pik3cb のドメイン欠損変異体や Pik3cbAP の点変異体を用いた結合実験を行った。その際、Pik3cb 活性を上昇させるインスリン様成長因子-1 (Insulin-like growth factor-1: IGF-1) による刺激の有無が、結合に影響を与えるかも併せて調べた。その結果、Pik3cbAP は血清除去状態および IGF-1 刺激をしていない条件下では、ごく僅かながら Full-Pik3cb と複合体を形成するが ABD-Pik3cb とはほとんど複合体を形成していないこと；一方で、細胞を IGF-1 により刺激した状態では、Pik3cbAP は Full-Pik3cb よりもむしろ ABD-Pik3cb と顕著に複合体を形成するようになる事が分かった。そして、IGF-1 の刺激の有無にかかわらず、いずれの場合にも Pik3cbAP の点変異体は Pik3cb と複合体を形成する事ができなかった。この Pik3cbAP の点変異体は、この分子の持つ酵素活性 (Pik3cbAP はキナーゼ活性を持つ酵素分子として報告されている) やその細胞内局在等を変化させうる点変異として知られている。これらの結果から、Pik3cbAP と Pik3cb の複合体形成はそれぞれの構造や細胞外刺激からの活性調節、そして細胞内局在等の様々な要因によって制御されている事が強く示唆された。

Pik3cbAP と Pik3cb の複合体形成がそれぞれの分子の働きに及ぼす影響

ヒト胎児腎臓細胞 (HEK293 細胞) に Pik3cbAP と Full-Pik3cb あるいは ABD-Pik3cb を単独あるいは共発現させ、免疫沈降により複合体を回収し、それぞれの分子の酵素活性を調べた。その結果、Pik3cbAP には IGF-1 刺激時の Full-Pik3cb および ABD-Pik3cb の酵素活性を上昇させる傾向が見られた。一方で、 ABD-Pik3cb は IGF-1 刺激時には Pik3cbAP 分子の持つ酵素活性を減少させるように働くことが示唆された。

さらに、Full-Pik3cb および ABD-Pik3cb、そして Pik3cbAP のすべてを内在性分子として発現している mESCs において siRNA を用いて Pik3cb および Pik3cbAP の発現抑制実験を行った。現在、それぞれの分子の発現阻害が成功している事は確認できているが、予想に反して、これまでの所 mESCs を用いた機能阻害実験からは HEK293 細胞での過剰発現実験で見られた結果に合致する結果は得られていない。今後、引き続き IGF-1 刺激等の実験条件を再検討し繰り返し実験を行って行く予定である。

エネルギー代謝の変化が Pik3cb と Pik3cbAP の複合体形成に与える影響

既報では、Pik3cbAP は細胞のエネルギー代謝に深く関与する分子である事が示されている。そこで、細胞のエネルギー代謝状態を大きく変化させるグルコース代謝の阻害剤 (2-deoxy glucose: 2-DG) や低酸素環境の模倣薬剤(Deferoxamine: DFO; Cobalt chloride: CoCl₂) を mESCs に処理する実験を行った。その結果、DFO や CoCl₂ を細胞に処理した場合には ABD-Pik3cb のタンパク量が減少し、Pik3cb と共免疫沈降されてくる Pik3cbAP 量もそれに伴い減少する事が分かった。このような結果は 2-DG を用いた実験には見る事はできなかった。これらの結果から、Pik3cbAP と Pik3cb の複合体形成には、少なくとも低酸素状態の様な特異的な環境要因が関わっており、その際には積極的に Pik3cb 分子に変化が生じて Pik3cbAP と Pik3cb の複合体形成が調節される仕組みがある事が示唆された。

ゼブラフィッシュ胚における Pik3cb-AP の解析

ゼブラフィッシュ胚はその発生の早さや透明度、操作性において胚発生の初期を研究する上で最適な実験動物である。本研究をさらに展開させるため、初期胚特異的な Pik3cbAP の解析に加え、既知の Pik3cb と複合体を形成する可能性の有る分子の cDNA をゼブラフィッシュ胚からクローニングした。これまでの所、7種類のインスリン受容体基質 (Insulin receptor substrate: IRS) のゼブラフィッシュホモログの存在を確認し、うち6種類の IRS 分子に関して全翻訳配列をカバーする cDNA を単離する事に成功した。また、PI3KAP/XB130 分子のゼブラフィッシュホモログに関しても全長をコードする cDNA を単離した。さらに、これらの分子に関しモルフォリノアンチセンスオリゴ (MO) を用いて発現阻害実験を行い、胚の発生や成長を調べた。IRS のうち、胚の正常な成長に大きく関与する事がマウスの研究例から示唆されている IRS-1 分子や主に生体組織の代謝や生殖機能の発達等に関与する IRS-2 分子に関して、ゼブラフィッシュホモログを MO を用いて発現阻害すると、IRS-1 の発現

阻害では、胚成長が明らかに遅滞する傾向が見られたが IRS-2 の発現阻害では IRS-1 ほど顕著な影響は見られなかった。このことから IRS-1 と IRS-2 はそれぞれに異なる役割を持つ事が示唆された。また、PI3KAP/XB130 に関しても、胚発生の細胞運動や胚成長に重要な役割を持つ事が示唆される結果を得ている。現在、低酸素をはじめとする代謝状態の変化を引き起こす条件において、これらの分子が発生初期で果たす役割についてさらに解析・検討を加えている。これらの成果は、ゼブラフィッシュ胚を用いて Pik3cbAP 分子の生理機能の解析を行う場合に重要な知見となる事が期待される。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計5件)(研究代表者に下線)

- 1) Hakuno, F., Fukushima T., Yoneyama Y., **Kamei H.**, Ozoe A., Yoshihara H., Yamanaka D., Shibano T., Sone-Yonezawa M., Yu B.C., Chida K., Takahashi S. § The novel functions of high-molecular-mass complexes containing insulin receptor substrates in mediation and modulation of insulin-like activities: Emerging concept of diverse function by IRS-associated proteins. *Front. Endocrinol.* doi: 10.3389/fendo.2015.00073, 2015. (査読有り)
- 2) Fukushima, T., Yoshihara H., Furuta H., **Kamei H.**, Hakuno F., Luan J., Duan C., Sacki Y., Tanaka K., Iemura S., Natsume T., Chida K., Nakatsu Y., Kamata H., Asano T., Takahashi S. Nedd4-induced monoubiquitination of IRS-2 enhances IGF signalling and mitogenic activity. *Nat. Commun.* 6:6780 2015 (査読有り)
- 3) Sawada R., **Kamei H.**, Hakuno F., Takahashi S., Shimizu T. *In vivo* loss of function study reveals the *short stature homeobox-containing* gene plays indispensable roles in early embryonic growth and bone formation in zebrafish. *Dev. Dyn.* 244:pp146-156, 2015 (査読有り)
- 4) **Kamei H.**, Sawada R., Yoneyama Y., Hakuno F., Shimizu T., Takahashi S. Insulin receptor substrate-1 promotes embryonic growth through IGF-IR signal-dependent and -independent mechanisms in response to developmental stages and environmental oxygen availability. *Growth hormone & IGF research*, 24(Supp.1): ppS16, doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1096-6374\(14\)50042-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1096-6374(14)50042-1), 2014 (査読なし: 国際学会紀要)

- 5) 高橋伸一郎・伯野史彦・**亀井宏泰**・Leonard Girmita・Ignacio Torres-Aleman・東祐輔・福嶋俊明・柴野卓志・尾添淳文・山中大介, 解説:インスリン様活性と高齢化社会で克服すべき疾病, **化学と生物**, Vol. 51 No. 6, pp 389-399, 2013 (査読有り)

[学会発表](計6件)(発表者に印)

- 1) °**Kamei H.**, Yoneyama Y., Sawada R., Duan C., Hakuno F., Shimizu T., Takahashi S. Early embryonic Irs1 signaling governs the neural crest cell survival that is indispensable for catch-up growth in zebrafish embryo induced by the changing environmental oxygen tension. Gordon Research Conference "Insulin-Like Growth Factors In Physiology & Disease" in Ventura, USA. 2015, March 8-13 (ポスター発表)
- 2) Kawauchi H., °Yamanaka D., **Kamei H.**, Hakuno F., Minami S., Chida K., Takahashi S. PI 3-kinase-binding protein PI3KAP plays an important role in cell migration and is required for embryogenesis in zebrafish. Gordon Research Conference "Insulin-Like Growth Factors In Physiology & Disease" in Ventura, USA. 2015, March 8-13 (ポスター発表)
- 3) °**Kamei H.**, Sawada R., Yoneyama Y., Hakuno F., Shimizu T., Takahashi S. Insulin receptor substrate-1 promotes embryonic growth through IGF-IR signal-dependent and -independent mechanisms in response to developmental stages and environmental oxygen availability. The 7th International Congress of GRS and IGF Society in Singapore, Singapore. 2014, Oct. 15-18 (口頭発表)
- 4) °**Kamei H.** Roles of insulin receptor substrate-1 in catch-up growth: A lesson from tiny fish embryo. INTERNATIONAL SEMINAR "Evolution of Insulin-like Peptides and Their Function:Development, Growth, Metabolism and Ageing" in The University of Tokyo, 2014, Oct.11 (口頭発表)
- 5) °**亀井宏泰**・山口里恵・米山鷹介・伯野史彦・清水俊明・高橋伸一郎, 低酸素環境で成長が遅滞したゼブラフィッシュ胚が常酸素環境で追いつき成長を起こす機構の解明:インスリン受容体基質(IRS)-1の機能, 2014(平成26年)年度 日本内分泌学会学術総会, 福岡, 2014年4月 (ポスター発表)

- 6) °川内啓希・山中大介・**亀井宏泰**・南史郎・伯野史彦・千田和広・高橋伸一郎, ゼブラフィッシュの初期発生における phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) の新規結合タンパク質の役割, 2014(平成26年)年度 日本内分泌学会学術総会, 福岡, 2014年4月 (ポスター発表)

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://endo.ar.a.u-tokyo.ac.jp/shingroup/English/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

亀井 宏泰 (KAMEI HIROYASU)

東京大学・大学院農学生命科学研究科
特任研究員

研究者番号: 00610362

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし