

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24年 5月 31日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580345

研究課題名（和文）PI 3-kinase 結合タンパク質 PITKAP による細胞プライミングの分子機構

研究課題名（英文）Molecular mechanism underlying cAMP-induced amplification of IGF mitogenic activity through PI 3-kinase binding protein, PI3KAP/XB130.

研究代表者

伯野 史彦 (Hakuno Fumihiko)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：30282700

研究成果の概要（和文）：

申請者は、ラット甲状腺由来正常細胞 FRTL-5 を甲状腺刺激ホルモン TSH で前処理しておくことにより細胞の運命・性質・方向性が決定づけられ（プライミングと呼ぶ）、IGF-I によって誘導される細胞増殖が相乗的に増強されることを明らかにしてきた。さらに、TSH によるプライミングの分子機構を解明していく過程で、PI 3-kinase と結合する新規タンパク質、PITKAP の精製、同定に成功した。このタンパク質を発現抑制すると TSH によるプライミング効果が認められなくなったため、PITKAP が細胞のプライミングに必須な機能を果たしていることが明らかとなった。また、Src の阻害剤である PP1 や PP2 で処理すると cAMP 依存的な PITKAP のチロシンリン酸化および p85 PI3K との結合が阻害された。cAMP によって Src が活性化されることも併せると、FRTL-5 細胞では、cAMP によって Src が活性化され、同時に PITKAP の発現量が増加、PITKAP は Src によってチロシンリン酸化され、その結果 p85 PI3K が結合することによって、PI 3-kinase が活性化されることが明らかとなった。現在、PITKAP のノックアウトマウスの作製を進めており、今後はノックアウトマウスも使って、個体レベル、細胞レベルでの PITKAP の機能解析を進めていきたい。

研究成果の概要（英文）：

We previously demonstrated that long-term pretreatment of rat FRTL-5 thyroid cells with TSH or cAMP-generating reagents potentiated IGF-I-dependent DNA synthesis. Under this condition, cAMP treatment increased tyrosine phosphorylation of a 125 kDa protein (p125) and its association with a p85 regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase (p85 PI3K), which were suggested to be important for potentiation of DNA synthesis. This study was undertaken to identify p125 and to elucidate its roles in potentiation of DNA synthesis induced by IGF-I. Immunoprecipitated phosphotyrosyl p125 in cAMP-stimulated FRTL-5 cells, was shown by MALDI-TOF MS analysis, to be a rat orthologue of human XB130, which we named phosphatidylinositol 3-kinase-associated protein (PI3KAP). cAMP treatment elevated PI3KAP/XB130 mRNA and protein levels as well as tyrosine phosphorylation and PI3KAP/XB130 interaction with p85 PI3K, leading to increased PI3K activities. Importantly, PI3KAP/XB130 knockdown in FRTL-5 cells attenuated cAMP-dependent potentiation of IGF-I-induced DNA synthesis. Addition of Src family kinase inhibitors, PP1 or PP2, during cAMP treatment abolished tyrosine phosphorylation of PI3KAP/XB130 and its interaction with p85 PI3K. In addition, c-Src was associated with PI3KAP/XB130 and was activated in response to cAMP. Together, these data indicate that cAMP-dependent induction of PI3KAP/XB130 and its association with PI3K are required for enhancement of IGF mitogenic activities.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用動物科学

キーワード：IGF-I、PI 3-kinase、PI3KAP、細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

FRTL-5細胞をTSHで長時間前処理すると細胞がプライミングされ、その後IGF-I刺激すると、IGF-Iによって誘導される細胞増殖が相乗的に増強される。さらに申請者らがその分子機構を調べたところ、PI 3-kinaseの阻害剤によってTSHによるプライミング効果が完全に消失すること、TSHによってPI 3-kinaseと結合する125kDaのチロシンリン酸化タンパク質が発現してくることから、この125kDaのタンパク質の同定が渴望されていた。最近、我々はこのタンパク質の精製と同定に成功し、PI3KAP (PI 3-kinase associated protein)と命名した。PI3KAPは、分子内にSrcチロシンキナーゼの基質配列を複数個有し、そのうちの1箇所はPI 3-kinase p85制御サブユニット結合motifであった。またSH3ドメインの標的となりうるPXXP motif、そしてタンパク質間相互作用を担うと考えられるPHドメイン、coiled-coilドメインを有していた。PI3KAPをsiRNA技術によって発現抑制すると、TSHによるプライミング効果が完全に抑制されたため、PI3KAPはTSHによるプライミングに必須の役割を果たしていることが明らかとなった。ところが、PI3KAPが具体的にどのようにIGF-Iの生理活性を増強するのかという詳しい分子メカニズムは全く明らかになっていない。PI3KAPが多くのIGF-I標的組織・細胞で発現していることを考え合わせると、PI3KAPによるプライミングが、IGF生理活性の増強に稼働している普遍的なメカニズムであることが予想される。しかしPI3KAPが生体内でどのような機能を果たしているのかは推測の域を出な

い。

2. 研究の目的

そこで本研究では、PI3KAPがプライミングを引き起こす分子メカニズムを解明し、その生理機能を細胞レベル、個体レベルで明らかにすることを目的としている。そのため本研究課題では以下の2つの研究項目について解明を目指す。(1)PI3KAPがプライミングを引き起こす分子メカニズムを解明する。(2)PI3KAP遺伝子のノックアウトマウスを作製し、その表現型を解析することにより、PI3KAPが個体レベルでどのような生理機能を持つかを推定する。

3. 研究の方法

本研究はPI3KAPタンパク質のプライミングにおける機能を培養細胞系、動物個体レベルで解明することを目的としている。前述したように本研究課題はPI3KAPの機能について以下の2つの研究項目に分けて明らかにする。

(1)PI3KAPによるプライミングの分子メカニズムの解明

前述したようにPI3KAPはFRTL-5細胞においてTSH長時間処理によるプライミングに必須の役割を果たしている。ところが、TSH長時間処理によってPI3KAPが発現誘導されてくるメカニズムや、PI3KAPをチロシンリン酸化するキナーゼ、PI3KAPの各ドメインが果たす役割は明らかになっていない。そこでこの研究項目では下記に示すような研究を計画している。

a) PI3KAP細胞内局在の解析、b)PI3KAPをチ

ロシニンリン酸化するキナーゼの同定、d) PI3KAP ドメインの機能の解明

(2) 動物個体での PI3KAP の機能の解明

この研究項目では動物個体での PI3KAP の機能を明らかにするため、PI3KAP をノックアウトマウスしたマウスを作製する。まずは全身で PI3KAP ノックアウトマウスを作製し、その表現型を解析する。そのノックアウトマウスで欠損の認められた臓器において特異的に PI3KAP をノックアウトしたマウスを作製し、その表現型を観察する。この実験によって、それぞれの臓器での PI3KAP の機能を解明する。特に甲状腺での PI3KAP の機能に重点を置いて研究を進める。

4. 研究成果

(1) Src の阻害が PI3KAP を介したシグナルに及ぼす影響

PI3KAP のタンパク質内には Src チロシンキナーゼにリン酸化されるモチーフが複数含まれている。また、我々は PI3KAP のチロシンリン酸化に Src 型チロシンキナーゼが関与することを示唆するデータを得ていた (Nedachi et al. 2000)。そこで Bt₂cAMP 処理中に Src の阻害剤である PP1 または PP2 を添加し、PI3KAP のチロシンリン酸化、p85 との結合量、PI3KAP 結合性 PI 3-kinase 活性を測定した。その結果、PP1 または PP2 の添加によって、PI3KAP のチロシンリン酸化が抑制、それに伴って p85 との結合量が減少し、PI3KAP 結合性の PI 3-kinase 活性も抑制されていた。続いて、cSrc のタンパク質を siRNA を用いて発現抑制し、同様な因子の測定を行った。その結果、Src タンパク質の発現抑制により、PI3KAP のチロシンリン酸化、p85 との結合、PI3KAP 結合性 PI 3-kinase 活性が阻害されていた。この結果から、Bt₂cAMP 処理によって誘導される PI3KAP のチロシンリン酸化には Src 活性が必要であることが示された。最後に Bt₂cAMP による Src に活性化について検討を加えた。Bt₂cAMP 処理した細胞から細胞抽出液を調製し、PI3KAP と Src の結合量および活性化型 Src の量を測定した。その結果、Bt₂cAMP 処理によって PI3KAP と Src の結合が誘導された。また活性化型 Src を検出する抗体 pSrc (Y416) での immunoblot 解析の結果、Bt₂cAMP 依存的に Src の Y416 がチロシンリン酸化されて、活性化されていることが明らかとなった。

(2) メチマゾール投与によって肥大した甲状腺における PI3KAP の発現量の解析

抗甲状腺薬 MMI をラット投与すると、甲状腺ホルモン合成が阻害されて甲状腺機能低下症が誘導され、TSH 分泌が促進されることが良く知られており、この実験系は *in vivo* において TSH に応答した遺伝子発現を解析する際にしばしば用いられる。そこで、飲料水に 0.03% の MMI を混合してラットに 4 週間投与し、PI3KAP の遺伝子発現を解析した。MMI 投与によって、コントロール群と比べて血漿 TSH 値は増加し、甲状腺の肥大が観察された。このような甲状腺において、PI3KAP の遺伝子発現は MMI 投与によって増加することがわかった。さらに甲状腺のタンパク質発現量を解析したところ、PI3KAP の発現が著増していた。

(3) PI3KAP ノックアウトマウスの作製

上記のように PI3KAP は TSH と IGF-I の相乗的な DNA 合成の増強に必須の役割を果たしていることを示すことができた。そこで、PI3KAP が動物個体でも IGF の生理活性に重要な役割を果たしているか調べた。PI3KAP 遺伝子座の exon 4-5 部位に loxP を導入した ES 細胞を作製し、これをマウスの受精卵に導入、キメラマウスを作製した。これを野生型 C57BL/6 マウスと交配することにより、ヘテロ変異マウスの作成に成功した。現在は、CAG プロモーターにより Cre リコンビナーゼの発現が誘導されるマウス (全身発現性 Cre マウス) と交配しており、全身で PI3KAP がノックアウトされたマウスを作製し、その表現系を解析する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者には下線を記した)

[雑誌論文] (計 15 件)

1. Yamanaka D, Akama T, Fukushima T, Nedachi T, Kawasaki C, Chida K, Minami S, Suzuki K, Hakuno F, Takahashi phosphatidylinositol 3-kinase-binding protein, PI3KAP/XB130, is required for cAMP-induced amplification of IGF mitogenic activity in FRTL-5 thyroid cells. *Mol. Endocrinology*. **26**: 1043-1055. 2012
2. Nakae J, Cao Y, Hakuno F, Takemori H, Kawano Y, Sekioka R, Abe T, Kiyonari H, Tanaka T, Sakai J, Takahashi S, Itoh H. *EMBO J*. **31**: 2275-95 2012
3. Kawashima Y, Higaki K, Fukushima T, Hakuno F, Nagaishi JI, Hanaki K, Nanba E, Takahashi SI, Kanzaki Novel missense mutation in the IGF-I receptor L2 domain

- results in intrauterine and postnatal growth retardation *Clin. Endocrinol.* 2012
4. Nishizawa H, Handayaningsih AE, Iguchi G, Cho Y, Takahashi M, Yamamoto M, Suda K, Kasahara K, Hakuno F, Yamanouchi K, Nishihara M, Seino S, Takahashi S, Takahashi Enhanced oxidative stress in GH-transgenic rat and acromegaly in humans. *Growth Horm. IGF Res.* **22**: 64-68. 2012
 5. Hakuno F, Yamauchi Y, Kaneko G, Yoneyama Y, Nakae J, Chida K, Kadowaki T, Yamanouchi K, Nishihara M, Takahashi S-I. Constitutive expression of insulin receptor substrate (IRS)-1 inhibits myogenic differentiation through nuclear exclusion of Foxo1 in L6 myoblasts. *PLoS One.* **6**: e25655. 2011
 6. Fukushima T, Arai T, Ariga-Nedachi M, Okajima H, Ooi Y, Iijima Y, Sone M, Cho Y, Ando Y, Kasahara K, Ozoe A, Yoshihara H, Chida K, Okada S, Kopchick JJ, Asano T, Hakuno F, Takahashi S-I. 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**: pp767-773. 2011
 7. Yoshihama Y, Sasaki K, Horikoshi Y, Suzuki A, Ohtsuka T, Hakuno F, Takahashi S-I, Ohno S, Chida K. KIBRA suppresses apical exocytosis through inhibition of aPKC kinase activity in epithelial cells. *Curr. Biol.* **21**: pp705-711. 2011
 8. Hara T, Miyazaki M, Hakuno F, Takahashi S-I, Chida K. PKC \cdot promotes a proliferation to differentiation switch in keratinocytes via upregulation of p27Kip1 mRNA through suppression of JNK/c-Jun signaling under stress conditions. *Cell Death Dis.* **2**: e157. 2011
 9. Fukushima T, Okajima H, Yamanaka D, Ariga M, Nagata S, Ito A, Yoshida M, Asano T, Chida K, Hakuno F, Takahashi S-I. 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. 2011
 10. Kimura K, Katsumata Y, Ozawa T, Tawara S, Igarashi K, Cho Y, Shibata N, Hakuno F, Takahashi S-I, Takenaka A. Effect of paraquat-induced oxidative stress on insulin regulation of insulin-like growth factor-binding protein-1 gene expression. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **46**: pp157-167. 2010
 11. Kabuta T, Hakuno F, Cho Y, Yamanaka D, Chida K, Asano T, Wada K, Takahashi S-I. Insulin receptor substrate-3, interacting with Bcl-3, enhances p50 NF-kappaB activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **394**: pp697-702. 2010
 12. Shibata M, Hakuno F, Yamanaka D, Okajima H, Fukushima T, Hasegawa T, Ogata T, Toyoshima Y, Chida K, Kimura K, Sakoda H, Takenaka A, Asano T, Takahashi S-I. Paraquat-induced oxidative stress represses phosphatidylinositol 3-kinase activities leading to impaired glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* **285**: pp20915-25. 2010
 13. Toyoshima Y, Tokita R, Ohne Y, Hakuno F, Noguchi T, Minami S, Kato H, Takahashi S-I. Dietary protein deprivation upregulates insulin signaling and inhibits gluconeogenesis in rat liver. *J. Mol. Endocrinol.* **45**: pp329-340. 2010
 14. Morita J, Hakuno F, Hizuka N, Takahashi S-I, Takano K. Growth hormone (GH) and Insulin-like growth factor (IGF)-I represses 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (HSD1) mRNA expression in 3T3-L1 cells and its activity in their homogenates. *Endocrine J.* **56**: pp561-570. 2009
- [学会発表] (計 7 件)
1. Yamanaka D, Akama T, Fukushima T, Minami S, Chida K, Hakuno F, Takahashi SI. PI 3-kinase activity associated with PI3KAP/XB130 that is recruited to F-actin is required for potentiation of IGF-I-induced cell proliferation. 第 32 回分子生物学会年会. Dec. 11th. 2009.
 2. Yamanaka D, Akama T, Fukushima T, Minami S, Chida K, Hakuno F, Takahashi SI. PI 3-kinase activation through c-Src-dependent tyrosine phosphorylation of PI3KAP, a novel binding partner of a PI 3-kinase p85 regulatory subunit, plays novel roles in priming cells to IGF. The 5th international congress of the GRS and IGF society. Oct. 4th, 2010 in New York (USA).
- [図書] (計 1 件)
1. 高橋伸一郎、竹中麻子、豊島由香、木村久美、加藤久典、福嶋俊明、山中大介、伯野史彦、南史朗、岩下光利 2010 発達と成長を司るホルモン、インスリン様成長因子 日本未熟児新生児学会雑誌 22: 19-25. 2010.
- [その他]
- ホームページ
<http://endo.ar.a.u-tokyo.ac.jp/lab/shin-group/index.html>
6. 研究組織
 (1) 研究代表者
 伯野 史彦 (Hakuno Fumihiko)
 東京大学・大学院農学生命科学研究科
 研究者番号: 30282700

(2) 研究分担者 なし
(3) 連携研究者 なし