



α PIX nucleotide exchange factor is activated by interaction with phosphatidylinositol 3-kinase

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 吉井, 重人 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1614

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 337号	学位授与年月日	平成13年 2月23日
氏 名	吉 井 重 人		
論文題目	α PIX nucleotide exchange factor is activated by interaction with phosphatidylinositol 3-kinase (α PIX ヌクレオチド交換因子はホスファチジルイノシトール 3 キナーゼとの相互作用により活性化される)		

博士(医学) 吉井重人

論文題目

α PIX nucleotide exchange factor is activated by interaction with phosphatidylinositol 3-kinase

(α PIX ヌクレオチド交換因子はホスファチジルイノシトール3キナーゼとの相互作用により活性化される)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

p21-activated kinase (PAK) は、Rac/Cdc42の標的蛋白としてMAPキナーゼの活性化や細胞骨格の修飾に関与する重要な蛋白である。今回、我々はPAKに結合する蛋白を胃癌細胞株のcDNAライブラリーからスクリーニングした結果、最近報告されたPAK-interacting exchange factor (PIX) を得た。PIXはRacのグアニンヌクレオチド交換因子として作用し、PAKと共に細胞骨格の変化に関与するが、このPIXの活性化の機序や関与する情報伝達経路はほとんど解明されていない。そこで、我々はPIXが関与する情報伝達経路とその機能を検討した。

〔材料ならびに方法〕

①プラスミド：各種PIXのコンストラクトは、293T細胞にトランスフェクションするためにpCS2+へ、GST融合蛋白をつくるためにpGEX2Tへ、またアフリカツメガエルへマイクロインジェクションするためのmRNAを作るためにpGEXPへ各々サブクローニングした。②トランスフェクションとキナーゼアッセイ：リン酸カルシウム共沈法により、プラスミドDNAを293T細胞にトランスフェクションした。その後、細胞のライセートを作成し、イムノプロットやキナーゼアッセイに使用した。③HA-tag付p85 (HA-p85) とGST融合PIX (GST-PIX) の相互作用：HA-p85を一過性に発現させた293T細胞のライセートを作成し、これとGST-PIXと一緒に4℃、4時間インキュベートした。沈殿物は細胞溶解液で洗浄し、SDS-PAGE後、抗HA抗体をプローブとして解析した。④親和性共沈法：293T細胞のライセートをGSTの融合したPAKのp21-binding domainと共に4℃、0.5時間インキュベートした。沈降物をSDS-PAGEし、イムノプロットにより解析した。⑤GDP解離法： $[^3\text{H}]$ GDP解離法は、溶液内で $[^3\text{H}]$ GDPの結合したCdc42/Rac1をGTP、PIXと共に30℃でインキュベートし、Cdc42/Rac1からの $[^3\text{H}]$ GDP解離の程度を測定した。⑥アフリカツメガエル受精卵へのマイクロインジェクションと中胚葉細胞塊拡散実験：アフリカツメガエル受精卵4分割期の背側割球に各種mRNAをマイクロインジェクションした。その後、囊胚期に背側辺縁帯を摘出し、ファイブロネクチンでコートされたディッシュの上に置いて細胞の拡散程度を調べた。

〔結果と考察〕

情報伝達経路において、Nckは、PAKやPDGF受容体・EphB2受容体に結合する。一方、PI3-Kのp85サブユニットもPDGF受容体に結合する。そこで、 α PIXがPDGF受容体からの刺激を仲介してPAKを活性化するか調べた。その結果、PDGF刺激下で野生型 α PIXにより、PAKは強く活性化されたが、SH3やPHドメインを欠失させた α PIX変異体ではPAKは活性化されなかった。また受容体への結合能を欠失させたNck変異体やPI3-Kのp110サブユニットへの結合能を欠失させたp85変異体を共発現させたり、細胞をPI3-Kの活性を抑制するワルトマニンで処理しても、 α PIXによるPAKの活性は抑制された。以上のことから α PIX

がPDGF受容体からPAKへの情報伝達経路に関与し、p85やNckと相互作用することが示された。さらに免疫沈降法の結果、 α PIX・Nck・PAKとPDGF受容体が複合体を形成していた。また、 α PIXはp85とも直接結合し、さらにPDGF受容体とも複合体を形成していた。EphB2受容体でも同様の結果が得られた。

次に、 α PIXがこれら受容体に局在した場合、どのようにして活性化されるのか調べた。その結果、PI3-Kのp110触媒サブユニットによって細胞膜で産生されたPI-3, 4, 5-P3により α PIXは活性化されたが、それには α PIXのPHドメインが必要であった。以上の結果より α PIXはPAK, Nckと複合体を形成したり、直接PI3-Kのp85と結合する事で、PDGF受容体やEphB2受容体に移行され、その結果PI3-Kの産生物であるPIが、 α PIXのPHドメインに結合して α PIXが活性化され、引き続いてRac/Cdc42, PAKが活性化される一連の情報伝達経路が解明された。

また一方、ファイブロネクチン基質への細胞接着によっても α PIXが活性化され、それにもNck, PI3-Kとの相互作用が必要で、さらに α PIXは接着斑に局在するFAK, p130casなどの蛋白とも複合体形成をしていた。

さらに α PIXによる細胞骨格の変化をアフリカツメガエルの初期胚を用いて検証した。初期胚の中胚葉細胞塊はPDGF受容体を発現しているが、これをファイibroネクチン基質上に置きPDGFを添加すると、細胞は基質上を周囲に向かい移動進展してゆく。この細胞移動は、 α PIX mRNAを受精卵にマイクロインジェクションして過剰発現させると著明に亢進した。一方、ドミナントネガティブRac1を共発現させたり、ワルトマニン処理により細胞の移動は抑制された。よって、 α PIXはPDGF刺激により活性化され、PI3-K依存性に中胚葉細胞の移動を増強したことが示された。

〔結論〕

本研究において、 α PIXがチロシンキナーゼ型受容体や、インテグリンの刺激化にPI3-Kにより活性化されることが明らかになった。また一方、 α PIXはアフリカツメガエルの初期胚において、ファイibroネクチン基質上でのPDGF刺激による中胚葉細胞の移動を促進した。

論文審査の結果の要旨

本研究は、チロシンリン酸型受容体下のシグナル伝達分子の解析を行ったものである。膜受容体シグナルはRasからRac1, Cdc42を介し、PAKに伝えられ、一方はMAPKの活性化に向かい、他方は細胞骨格系の変化をひきおこすことが知られている。吉井氏はPAK蛋白と結合する蛋白をファウエスタン法でスクリーニングしたところ、PAK-interacting exchange factor (PIX)を得た。PIXはRacのグアニンヌクレオチド交換因子として作用し、PAKと共に細胞骨格の変化に関与するが、PIXの活性化やPIXが関与するシグナル伝達経路がほとんどわかっていないことに着目し、PIXの細胞膜下における役割を明らかにしようとした。

シグナル伝達経路において、PAKはNckを介して活性化されたPDGF受容体やEph B2に結合することが知られていた。また、PI3-Kのp85制御サブユニットも活性化されたPDGF受容体に結合することがわかっていて。そこで、 α PIXがPDGF受容体からの刺激を仲介してPAKを活性化するかどうかを検討した。実験は293T細胞への野生型 α PIXやいろいろのドメインを欠失させた α PIXの発現ベクターを遺伝子導入後にPDGF添加により受容体を活性化させた。野生型 α PIXを導入した細胞ではPAKのキナーゼ活性が増加したが、SH3ドメインやPHドメインを欠失させた α PIX変異体を導入した細胞ではPAKキナーゼの活性は

変化しなかった。また、受容体への結合能を欠失させたNck変異体やPI3-Kのp110サブユニットへの結合能を欠失させたp85変異体の共発現により、あるいは細胞をPI3-K活性を阻害するワルトマニンで処理しても、 α PIXによるPAKの活性化が抑制された。これらの結果は、PDGF受容体からPAKへのシグナル伝達経路に α PIXが関与し、PI3-K活性も必要としていることを示している。次に、免疫沈降法を用いて α PIXがPAK/Nck/PDGFRと複合体を形成すること、及び α PIXがp85と直接結合し、これを介してPDGFRとも複合体を形成していること、を明らかにした。同様の結果は、EphB2でも得られた。

次に、 α PIXを活性化する機構について検討を行った。 α PIXがp85に結合することと α PIXがPHドメインをもっていることから、PI3-Kのp110触媒サブユニットにより産生されるPI-3, 4, 5-P3により α PIXが活性化されることが予測されたので、活性型p110の遺伝子導入や膜透過型PI-3, 4, 5-P3添加によりこのことを証明した。

また、細胞運動にはフィロポディアやラメリポディアが関与していることが知られているが、ここにPIXやPAKが局在している。そこで、フィブロネクチン基質への細胞接着によっても α PIXが活性化され、それにもNck, PI3-Kとの相互作用が必要で、さらに α PIXは接着斑に局在するFAK, p130casなどとも複合体を形成していることが明らかにされた。 α PIXによる細胞骨格の変化をカエル初期胚中胚葉細胞塊をフィブロネクチン基質上に置くアッセイ系で観察すると、 α PIXによる細胞運動の亢進が認められた。しかし、この亢進はキナーゼ活性をなくしたPAK変異体によっては抑制されなかったため、 α PIXによる細胞運動亢進はPAKのキナーゼ活性を介するのではなくむしろCdc42, Rac1が直接細胞骨格系の変化を引き起こしていることが示唆された。

このように、申請者は培養細胞への外来性遺伝子の強発現という人工の系ではあるが、 α PIXがPAKやp85に直接結合し、さらにNckを介してPDGFRやp130casと、p85を介してPDGFRやFAKと複合体を形成することを示し、機能的にもPDGFR活性化→複合体形成→細胞膜下への移動→PIP3の産生→ α PIX活性化→cdc42, Rac1活性化→PAK活性化というシグナル伝達経路を明らかにしたことは大いに評価される。

審査の過程において、申請者に次のような質問がなされた。

- 1) 293T細胞を使う理由は
- 2) NckR308Kや Δ p85との共発現に野生型 α PIXではなくなぜ Δ CHを用いたか
- 3) 複合体を解析する実験で使った界面活性剤は
- 4) α PIXの作用を β PIXは阻害するか
- 5) α PIXはいつもPAKと結合しているのか
- 6) α PIXの作用がNck変異体によりPDGFRでは阻害されているが、EphB2で弱く阻害されるのはなぜか
- 7) α PIXや他の結合蛋白の細胞内局在を免疫染色で観察したか
- 8) α PIXシグナルとMAPK, JNK, p38シグナルとの関係は
- 9) 内因性蛋白で同じことがおこるかどうかを調べたか
- 10) 293T細胞以外でも同じことがおこるのか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解していると判断されたので、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 三 浦 直 行
副査 北 川 雅 敏 副査 小 出 幸 夫