

Title	A new class of mutations reveals a novel function for the original phosphatidylinositol 3-kinase binding site
Author(s)	原田, 亜希
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/46002">https://hdl.handle.net/11094/46002</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	はらだ みかみ あき 希 原田 (三上) 亜 希
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 19110 号
学位授与年月日	平成17年2月16日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	A new class of mutations reveals a novel function for the original phosphatidylinositol 3-kinase binding site (フォスファチジルイノシトール-3 キナーゼ結合部位の未知の役割を明らかにする変異)
論文審査委員	(主査) 教授 長田 重一  (副査) 教授 高井 義美 教授 平野 俊夫

#### 論 文 内 容 の 要 旨

##### [目 的]

SH2 や PTB の結合コンセンサス配列はリン酸化されたチロシン残基 (Y) とその周辺のアミノ酸から成ると考えられている。リン酸化チロシン依存の結合部位の最初の2例はポリオーマウイルスのミドル T 抗原 (MT) 上に見出された。Y250 を含む NPXY モチーフは ShcA の結合部位であり、リン酸化された Y315 とそれに続く3つのアミノ酸残基 (YMPM) は、Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) の p85 サブユニットの SH2 結合配列を形成している (YMXM)。リン酸化チロシンのシグナルにおける役割の解析を遺伝学的に行う場合、Y からフェニルアラニン (F) への置換を行うと、そこに複数の蛋白質が結合していた場合に全ての結合を阻害することになり、結果の解析が困難なことがある。ある蛋白質が、別の蛋白質に2カ所で結合し、その結合のうちの一つであるリン酸化チロシンとの結合が2次的なものである場合、解析の複雑さは深まる。リン酸化チロシンの2次的な結合を阻害しない MT 変異体の作製、及びそれを用いてリン酸化チロシンの2次的結合部位としての役割を明らかにすることを目的とした。

##### [方法ならびに成績]

MT は宿主細胞の細胞周期や増殖に関わる蛋白質と相互作用することにより、細胞を癌化させる。C 末に膜貫通領域を持ち、これが細胞の癌化に必要である。PP2A の MT への結合、Src キナーゼのリクルート、それによる MT 上の Y のリン酸化が順次起こり、このリン酸化チロシンにシグナル分子が結合する。MT は恒常的に活性化されたチロシンキナーゼレセプターともいえる。

MT の親株 (WT) または変異体を発現するウイルスをマウス線維芽細胞に導入し、細胞の癌化効率と、MT と PI3K の結合の相関を調べた。

Y250 は ShcA の結合配列である NPTY と PI3E の潜在的結合配列である YXXM に含まれている (NPTY250SVN)。Y250F と M253A (A=アラニン) の解析より、Y250 が PI3K の結合に必要なこと、M253 の重要性は低いことが分かった。またこの結果は Y250 が PI3K の二次的結合部位である可能性を示している。

Y315 領域に相当する PI3K 結合モチーフ (YMPM) を Y250 と Y315 の中間に挿入した変異体 (Y250F-YMPM) では WT でみられる以上の PI3K の結合が確認された。PI3K は WT では ShcA と Y250 を共有しなければならない

が、Y250F-YMPM では挿入された YMPM の Y を独占できるためと考えられる。さらに PI3K 結合のコンセンサス配列を破壊したモチーフを挿入した変異体 (Y250F-YAAA) では YMPM の挿入には及ばないものの、PI3K の結合が若干回復した。これも Y250 がその周辺配列に非依存的に PI3K の結合部位として機能していることを示している。

本来の PI3K 結合部位として同定された Y315 領域に変異を加えた Y315AAA は、Y315F 同様 PI3K に殆ど結合しないことから、Y250 が PI3K の二次的結合部位であるのに対して、Y315 は一次的結合部位であることが示唆された。また Y315F が殆ど癌化しないのに対して、WT と同程度に癌化したことから、Y315 に未知の、かつ癌化に必要な蛋白質が結合することが考えられた。

Y315F を骨格とした挿入変異体を作製し、PI3K の結合の回復と癌化能力の回復の相関をみた。YMPM の挿入のみが PI3K の結合を回復し、WT の MT にみられるそれと同程度であった。しかし YMPM の挿入による癌化は WT のそれには及ばなかった。PI3K だけでは癌化に十分でないこと、Y315AAA の解析と同様、Y315 には他の蛋白質が結合することが示唆された。

PI3K と未知の蛋白質を競合させず MT に結合させれば、WT 以上の癌化が期待できると考え、WT を骨格とした挿入変異体を解析したところ、YMPM の挿入が PI3K の結合を促進したのに対して、YAAA の挿入は癌化能力を伸ばした。これは未知の蛋白質が二次的結合部位としての Y315 を PI3K と競合する必要がなく、挿入された Y に効率良く結合した結果と思われる。

#### [総括]

我々は一連の MT 変異体を作製することにより、(1)MT の Y315 は PI3K の一次的な結合部位であり、Y250 は二次的結合部位であること、(2)Y315 は未同定の蛋白質の二次的結合部位であり、(3)この未知の蛋白質が MT の癌化能力に必要であることを示した。

リン酸化チロシンの二次的結合を阻害しない変異の導入、それにより明らかになった、リン酸化チロシンが複数の蛋白質の結合部位となりうること及び蛋白質間の結合部位には順位が存在しうることは、他のチロシンキナーゼレセプターへの応用が考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

ポリオーマウイルスのミドル T 抗原 (MT) は種々の細胞を癌化する。その際、MT はリン酸化チロシン残基を介して、フォスファチジルイノシトール-3 キナーゼ (PI3K) などの種々の蛋白質と結合する。ところで、リン酸化チロシンと蛋白質の結合はチロシン (Tyr) をフェニルアラニン (Phe) に置換した変異体を用いて解析されている。しかし、あるリン酸化 Tyr 残基に複数の蛋白質が結合する場合、Tyr を Phe に置換するとすべての蛋白質の結合を阻害し、シグナル伝達の詳細な解析が困難となる。申請論文では、MT 上の Tyr250、Tyr315 およびそれらの周辺のアミノ酸を Phe や Ala に置換した変異体を作成し、その MT 変異体と PI3K との結合能、トランスフォーメーション能を検討した。その結果、これまで PI3K の結合部位と同定されてきた YMXM 配列中の Tyr315 には、PI3K がその SH2 ドメインを介して結合するが、その際、Tyr250 にも周辺のアミノ酸配列に依らずに結合することが示された。また、Tyr315 には PI3K 以外にも未同定蛋白質が結合し、この結合が MT による細胞の癌化に重要であることを見出した。この結果はポリオーマウイルス MT の PI3K 結合部位の未知の機能を明らかにするものであり、学位授与に値すると考える。