

2024年3月27日

国立大学法人東北大学
国立研究開発法人科学技術振興機構（JST）

細胞運動のアクセルである酵素 PI3K に 秘められたブレーキを発見

エンドサイトーシス分子 AP2 との相互作用を介した
新たな細胞運動の制御機構

【発表のポイント】

- 細胞運動のアクセルとなる酵素 PI3K にブレーキ機構も内蔵されていることを解明しました。
- PI3K とエンドサイトーシス^(注1) 分子 AP2^(注2) との結合を介した PI3K の新規制御機構が判明しました。
- 細胞の運動やがん化過程における PI3K の役割の理解を深め、新規治療薬開発への道を拓くことが期待される成果です。

【概要】

PI3K（ホスホイノシトール 3-キナーゼ）は、細胞の運動や増殖、がん化などに関わる重要な酵素で、抗がん剤のターゲットとなるなど医学的にも重要な分子です。東北大学 学際科学フロンティア研究所の松林英明助教らは、PI3K のアミノ酸配列の中に、従来知られていなかった AP2 結合配列を発見し、この AP2 結合配列が、PI3K 本来の酵素活性とは別に、細胞膜を細胞内側へ取り込む働き（エンドサイトーシス）を誘発することを明らかにしました。さらに AP2 と結合できないように改変した PI3K は、細胞をより速く運動させることから、PI3K と AP2 との結合が細胞運動のブレーキとして働くことが示されました。これまで PI3K は、その酵素活性によって細胞運動のアクセルとして機能すると考えられてきましたが、本研究の成果によって、PI3K には、AP2 結合配列を介したブレーキ機構も内蔵されていることが分かりました。PI3K の新たな制御機構が明らかになったことで、PI3K が関わる疾患の機序解明や、それらの治療薬開発のための知見となることが期待されます。

本研究成果は、オンライン科学誌 Nature Communications にて、2024年3月23日付で公開されました。

【詳細な説明】

研究の背景

PI3Kは、細胞の運動や増殖を促進する重要なシグナル分子であるPI(3,4,5)P₃を細胞膜上で生成する酵素であり、この過程は細胞の代謝や免疫応答にも深く関わっています。また、PI3Kの異常な活性化は、細胞のがん化などの病態につながるため、PI3Kは疾患研究や治療における重要なターゲットとなっています。細胞運動のプロセスにおいては、PI3KによるPI(3,4,5)P₃の生成は、細胞の進行方向を決定し、細胞骨格の活性化を通じて細胞を前進させる役割があります。そのため、PI3Kは細胞運動の「アクセル」として機能することが知られていました。

本研究で焦点を当てたクラスIAと呼ばれるPI3Kは、触媒サブユニットp110と、シグナル伝達を調節する制御サブユニットp85から構成される二量体のタンパク質です。この複合体は細胞外のシグナルに応答して活性化され、p85は活性化した受容体からのシグナルをp110の酵素活性へと伝達する重要な役割を担います。

これまでの研究では、p110の酵素活性を対象とした研究が中心となっていました。一方で、制御サブユニットであるp85には細胞シグナルの調節において様々な役割を果たすことが示唆されていたものの、PI3Kの酵素活性に関する研究とは対照的に、p85による細胞シグナルの制御メカニズムの詳細は十分に解明されていませんでした。

今回の取り組み

本研究では、PI3Kの制御メカニズムへの理解を深めるため、まず、p85と結合するタンパク質の予測を行いました。p85のアミノ酸配列を基に、タンパク質結合モチーフ^(注3)の解析を行ったところ、p85内のiSH2ドメインと呼ばれる部位にYxxphiモチーフやdi-leucineモチーフなどのAP2というタンパク質が結合する配列があることが明らかになりました(図A)。AP2は、細胞が細胞膜を細胞内部へと取り込むプロセスであるエンドサイトーシスにおいて働くタンパク質であることが知られています。このことは、PI3Kの機能がエンドサイトーシスによって制御されることを示唆しています。そこで、最先端のタンパク質構造予測手法であるAlphaFold2^(注4)や、タンパク質どうしの結合を実験的に検証するプルダウンアッセイを行なったところ、iSH2ドメインがAP2と直接結合することを明らかにしました(図A)。

次に、iSH2ドメインそのものがAP2と結合し、その複合体を介したエンドサイトーシスによって、細胞内部への取り込まれるのかについて、細胞を使った実験で検証しました。エンドサイトーシスの活性を持つ分子が細胞膜に運ばれると人工的なエンドサイトーシスの誘導が見られることが知られていたことから、この実験では、Chemically inducible dimerization (CID)法^(注5)と呼ばれる方

法で iSH2 ドメインを細胞膜に運び、その後の iSH2 ドメインの動きを追跡しました。実験の結果、iSH2 ドメインは細胞膜上に運ばれると AP2 と同じ細胞膜上の位置で観察されること、それに伴って細胞内へのエンドサイトーシスが起これ、細胞膜を取り込んだ多数の小胞が細胞内で生じることが明らかになりました（図 B）。また、iSH2 ドメインと AP2 によるエンドサイトーシスは PI3K のキナーゼ活性（p110 の酵素活性）を抑制した条件でも維持されたことから、今回新たに発見した AP2 との結合やエンドサイトーシスの現象は、PI3K 自体の酵素活性とは独立して働くことが分かりました。

iSH2 ドメインと AP2 との結合やエンドサイトーシスが、PI3K の機能にどのように関わっているのかを調べるため、AP2 に結合しないように iSH2 ドメインを改変した p85 を作製して解析を行いました。解析の結果、改変した p85 タンパク質（変異型）は、正常な p85（野生型）と比較して、細胞の接着斑^{（注6）}への局在が顕著に増加し、その結果、細胞運動の速度が上昇することが明らかになりました。接着斑は、細胞が運動する際の床面となる基質部位をつかむグリップの働きがあり、接着斑での PI3K の活性化は細胞運動を促進させることが知られています。このことから、今回新たに発見された p85 が持つ iSH2 ドメインの AP2 結合モチーフは、PI3K の接着斑への局在を抑制することで、細胞運動のブレーキとして機能することが示されました（図 C）。

今後の展開

PI3K は細胞の運動、増殖、代謝などに関わる細胞内シグナル伝達の中心的分子です。これらのプロセスは健康な細胞機能の維持だけでなく、がんや糖尿病、心血管疾患など多くの病態に関わっています。そのため、今回見つかった AP2 との結合や、それによる PI3K の制御機構は、細胞の様々な機能の調節機構や病態への関連を深く理解するための知見となることが期待されます。特に、p85 と細胞のがん化との相関も報告されていることから、今回見つかった機構と細胞のがん化のメカニズムと関わりや、新たな治療薬の開発も期待されます。

【謝辞】

本研究は、科学技術振興機構（JST）戦略的創造研究推進事業 さきがけ「ゲノムスケールの DNA 設計・合成による細胞制御技術の創出」研究領域 研究課題名「潜在する生命のゲノムが創出する原始細胞骨格機能の具現化」（JPMJPR20KA、研究代表者：松林英明）、日本学術振興会（JSPS）科研費（20H00618、20H05971、22K12255、研究代表者：川又生吹）、JSPS 海外特別研究員制度（松林英明）、アメリカ国立衛生研究所（NIH）グラント（研究代表者：井上尊生）、アメリカ国防高等研究計画局（DARPA）グラント（研究代表者：井上尊生）の助成により実施されました。

【用語説明】

注1. エンドサイトーシス

エンドサイトーシスは、細胞がその膜をくぼませて細胞膜や外部の物質を取り込むプロセスです。この過程により、細胞の外にある栄養素やシグナル分子などを細胞内に取り込むことができます。エンドサイトーシスは、物質の細胞内への輸送、細胞表面の受容体の調節などに重要な役割を果たします。

注2. AP2

AP2複合体はエンドサイトーシスにおける中心的なアダプター分子の一つで、細胞内に取り込まれる細胞膜上のタンパク質のモチーフを認識し、クラスリンと呼ばれるタンパク質を結びつける働きがあります。クラスリンは、取り込まれる細胞膜をつつむ包装材のような役割を果たし、クラスリンに囲まれた小胞が「荷物」として細胞内部へと運ばれます。

注3. モチーフ

モチーフとは、複数のタンパク質や DNA の配列で共通して見られる、短い配列のパターンを指します。これらのパターンは、特定の機能を持つ分子間の相互作用や、特定の生物学的プロセスにおいて重要な役割を果たすことが多いです。例えば、タンパク質の活性部位や DNA 結合部位など、特定の生物学的機能を持つ領域に見られます。

注4. AlphaFold2

AlphaFold2 は、人工知能 (AI) を用いてタンパク質の 3 次元構造を予測する技術です。DeepMind 社によって開発され、タンパク質のアミノ酸配列からその立体構造や複合体の構造を高精度で予測することができます。

注5. Chemically inducible dimerization (CID) 法

CID は、化学物質の添加によって特定のタンパク質が二量体化を誘導する技術です。この方法を用いることで、細胞内でのタンパク質の局在や活性を制御することが可能になり、細胞のシグナル伝達経路の研究や、細胞の挙動を調節するためのツールとして利用されます。

注6. 接着斑

接着斑は、細胞が周囲の基質（細胞外マトリックスや他の細胞）に接着するための特殊な領域です。これらは細胞内の細胞骨格と細胞外環境を結びつけるタンパク質複合体によって形成され、細胞の運動、形態の維持、細胞間の通信など、多くの重要な生物学的プロセスに関与しています。接着斑は、細胞の動きを支える「足場」として機能し、細胞が特定の方向へ移動する際に

重要な役割を果たします。

A

PI3-Kinase: p110 + p85

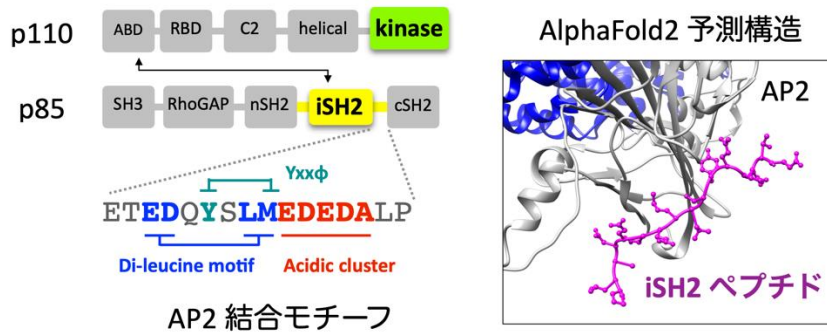


図 A : PI3K のドメイン構造と AP2 との結合予測構造

PI3K は、p110 の ABD ドメインと p85 の iSH2 ドメインが結合する形で二量体を形成しています。本研究では、iSH2 ドメインの中に AP2 と結合するモチーフ（YxxΦモチーフ、di-leucine モチーフ、acidic cluster）があることを見出しました。AlphaFold2 予測構造は、AP2 と iSH2 の YxxΦモチーフとの結合状態の構造を予測したものです（iSH2 ペプチドは YxxΦモチーフを含む 16 アミノ酸の配列）。

B

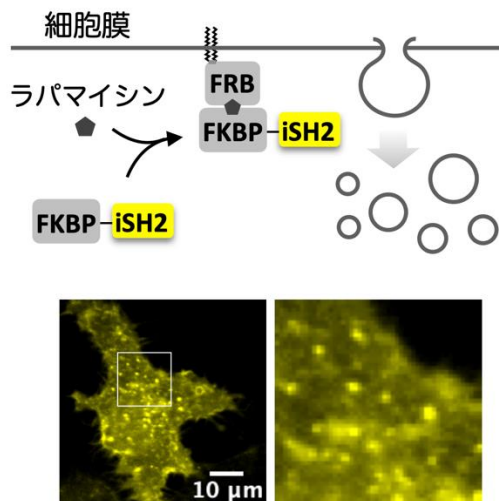


図 B : iSH2 ドメインによるエンドサイトーシスの誘発

CID法では、ラパマイシンによって結合するFKBP、FRBというタンパク質のペアを使ってiSH2ドメインを細胞膜へ運びました。顕微鏡画像（右は拡大図）は、iSH2によってエンドサイトーシスが誘発され、iSH2のシグナルが小胞（顕微鏡像内では輝点として観察される）において観察された様子を表しています。

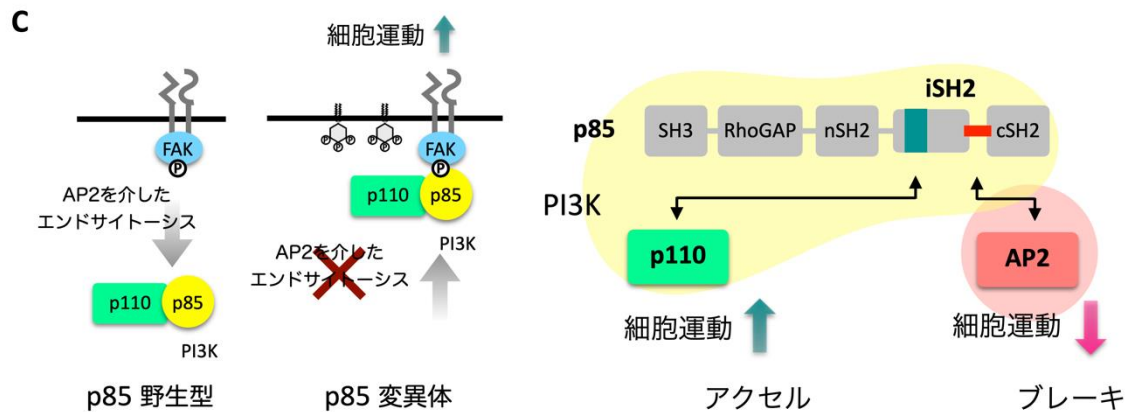


図 C : iSH2 ドメインと AP2 結合による細胞運動の制御

（左）AP2 との結合部位を改変した p85（変異型）では、接着斑への局在が強まること示した模式図。AP2 によるエンドサイトーシスは、PI3K の細胞内局在の制御に重要な働きをしていると考えられます。（FAK は、接着斑に関わる酵素であり p85 と結合することが知られています）。

（右）iSH2 ドメインに、細胞運動の「アクセル」と「ブレーキ」という二つ機能があることを示す模式図。従来知られていた p110 との結合を介したアクセルとしての機能に加えて、AP2 との結合を介したブレーキの機能があることが、本研究によって明らかになりました。

【論文情報】

タイトル : Non-catalytic role of phosphoinositide 3-kinase in mesenchymal cell migration through non-canonical induction of p85 β /AP2-mediated endocytosis

著者 : Hideaki T. Matsubayashi*, Jack Mountain, Nozomi Takahashi, Abhijit Deb Roy, Tony Yao, Amy F. Peterson, Cristian Saez Gonzalez, Ibuki Kawamata, Takanari Inoue*

*責任著者 : 東北大学 学際科学フロンティア研究所 助教 松林英明

ジョーンズホプキンス大学 医学系研究科 教授 井上尊生

掲載誌 : Nature Communications

DOI : 10.1038/s41467-024-46855-y

URL : <https://www.nature.com/articles/s41467-024-46855-y>

【問い合わせ先】

(研究に関すること)

東北大学 学際科学フロンティア研究所

助教 松林英明

TEL: 022-795-6966

Email: hideaki.matsubayashi.e1@tohoku.ac.jp

(JST 事業に関すること)

科学技術振興機構 戦略研究推進部

ライフイノベーショングループ

保田睦子

TEL: 03-3512-3524

Email: presto@jst.go.jp

(報道に関すること)

東北大学 学際科学フロンティア研究所

特任准教授 藤原英明

Email: Hideaki@fris.tohoku.ac.jp

科学技術振興機構 広報課

TEL: 03-5214-8404

Email: jstkoho@jst.go.jp