



EGF-Induced Activation of 70-kDa S6 kinase in CHO-Cells Expressing Human EGF Receptors

木戸, 良明

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1996-07-10

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2037

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002037>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	木 戸 良 明 (兵庫県)
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	博第1513号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与の日付	平成8年7月10日
学位論文題目	EGF-induced Activation of 70-kDa S6 kinase in CHO-Cells Expressing Human EGF Receptors (EGF受容体を発現したCHO細胞におけるEGFによる70kDa S6キナーゼの活性化)
審査委員	主査 教授 春日 雅 人 教授 片岡 徹 教授 山村 博 平

論文内容の要旨

(序文)

40SリボソームS6蛋白は、上皮成長因子(EGF)をはじめとする成長因子からの細胞増殖シグナルによりリン酸化を受ける。このリボソームS6蛋白をin vitroでリン酸化するS6キナーゼとして、90kDaと70kDaの2つのセリン・スレオニンキナーゼのファミリーが同定された。これら2つのS6キナーゼは成長因子刺激により早期に活性化されるが、最近の研究により、この2つのS6キナーゼは異なるシグナル伝達に関与していることが明らかにされた。p90S6キナーゼは、チロシンキナーゼによるシグナル伝達系において、Ras→Raf-1キナーゼ→MAPkinase/ERK kinase (MEK) →MAPキナーゼの次に位置し、MAPキナーゼによってリン酸化され活性化されるキナーゼであるのに対し、細胞内で実際にリボソームS6蛋白質をリン酸化しているのはp70S6キナーゼであると考えられている。p70S6キナーゼに至るシグナル伝達経路についてはこれまで不明であった。免疫抑制剤のラパマイシンが、p70S6キナーゼの活性阻害作用を持つことが知られていたが、最近、酵母におけるホスファチジルイノシトール-3キナーゼ(PI-3キナーゼ)のホモログであるTOR2がラパマイシンの標的であることが報告され、p70S6キナーゼ活性化のシグナル伝達経路にPI-3キナーゼが関与している可能性が示唆された。

チロシンキナーゼで活性化されるPI-3キナーゼは、85kDaの調節サブユニットと110kDaの触媒サブユニットからなるヘテロダイマー(p85/p110PI-3キナーゼ)である。Tyr-X-X-Metのモチーフを持つ受容体やその基質がチロシンリン酸化を受けると、85kDaの調節サブユニット内のSH2ドメインがそのモチーフを認識し結合が起こる。インスリン受容体の主要な基質であるIRS-1にはこのTyr-X-X-Metモチーフが数カ所あり、インスリン刺激によりこのチロシン残基がリン酸化を受け、p85/p110PI-3キナーゼと結合する。一方、EGF受容体にはこのモチーフがなく、EGFによるp85/p110PI-3キナーゼの活性化に関しても一定の結果は得られていない。

今回我々は、EGFによるp70S6キナーゼ活性化のシグナル伝達経路に、p85/p110PI-3キナーゼが関与しているか否かを検討するために、110kDaの触媒サブユニットに対する阻害作用を持つワルトマニンを用い、EGFによるp85/p110PI-3キナーゼ活性とp70S6キナーゼ活性化に対する影響を検討

した。

(実験方法)

(1) 細胞

EGF受容体(EGFR)を過剰発現させたChinese hamster ovary細胞(CHO-ER)を用いた。この細胞は、ハムF-12メディウムで培養し、16時間無血清培地にて培養後、以下の各実験を行った。

(2) キナーゼアッセイ

p70S6キナーゼ : 0~100nMワルトマニンで10分間処理後、種々の濃度のEGF或いはインスリンで10分間刺激したCHO-ERを可溶化した。ライセートを抗S6キナーゼ抗体で免疫沈降し、免疫沈降物に3 μCi [γ - ^{32}P] ATPおよび基質としてS6蛋白のリン酸化部位のペプチドを含む反応液を加え、37°Cで30分反応後、S6ペプチドへの [γ - ^{32}P] ATPの取り込みを測定した。

PI-3キナーゼ : 100nMワルトマニンで10分間処理後、種々の濃度のEGF或いはインスリンで2分間刺激したCHO-ERを可溶化した。ライセートを抗ホスホチロシン抗体で免疫沈降し、免疫沈降物に5 μCi [γ - ^{32}P] ATPおよび基質としてホスファチジルイノシトールを含む反応液を加え、室温で6分間反応後、反応液を薄層クロマトグラフィーにて展開し、ホスファチジルイノシトール-3-モノフォスフェート(PI-3P)の生成を測定した。

(実験結果)

(1) CHO-ERにおけるEGFによるp70S6キナーゼとp85/p110PI-3キナーゼの活性化

CHO-ERにおいて、1nMEGFによるp70S6キナーゼの活性化は10分でピークとなる一相性のタイムコースを示した。抗ホスホチロシン抗体による免疫沈降物中のPI-3キナーゼ活性は、EGF刺激後1~2分でピークとなりその後減少した。

(2) EGFとインスリンによるp70S6キナーゼとp85/p110PI-3キナーゼ活性化の比較

CHO-ERでは、EGFおよびインスリンによりp70S6キナーゼ活性は、濃度依存性に増加した。EGFによるp70S6キナーゼ活性は、0.1nMで明らかな増加がみられ、1~10nMで最大となった。一方、インスリンでは、p70S6キナーゼの明らかな増加を引き起こすのに1nM刺激を必要とした。

CHO-ERでは、EGFによるPI-3キナーゼの活性化は濃度依存性に増加し、10nMで2~3倍の増加を示したが、インスリン刺激によるPI-3キナーゼ活性と比べると微増に留まった。

この両者のキナーゼ活性を比較すると、10nMEGFと1nMインスリンは同程度のp70S6キナーゼ活性を示すが、10nMEGFによるPI-3キナーゼ活性は、p70S6キナーゼ活性を示さない0.1nMインスリンによるPI-3キナーゼ活性と同程度であった。

(3) EGFとインスリンによるp70S6キナーゼ活性化に対するワルトマニンの影響

ワルトマニンは、p85/p110PI-3キナーゼの触媒サブユニットであるp110と結合することにより、PI-3キナーゼ活性を阻害する。ワルトマニンは、CHO-ERにおけるEGFおよびインスリン刺激によるp70S6キナーゼ活性を、濃度依存性に抑制し、half-maximum inhibitionは約10nMでみられた。また、100nMワルトマニンはEGFによるPI-3キナーゼ活性を完全に抑制したが、インスリンによるPI-3キナーゼ活性は約70%抑制したに留まった。このインスリン刺激によるp70S6キナーゼの活性化を完全に抑制する濃度のワルトマニン存在下でのPI-3キナーゼ活性は、10nMEGF刺激によるPI-3キナーゼ活性より尚高かった。

(考察)

本研究の結果、CHO-ERにおいて、EGFによるp70S6キナーゼの活性化はインスリン刺激の場合と同程度に生じるが、EGFによるPI-3キナーゼの活性化は、インスリン刺激の場合に比しごく僅かに留まったことから、EGFによるp70S6キナーゼ活性化のシグナル伝達には、p85/p110PI-3キナーゼの活性化とは別の機序が関与している可能性が示唆された。これまでに、インスリンや血小板由来成長因子（PDGF）刺激によるp85/p110PI-3キナーゼおよびp70S6キナーゼの活性化がワルトマニンにより阻害されることから、p85/p110PI-3キナーゼがp70S6キナーゼの上流に位置しているとする報告がいくつかある。その一方で、p85/p110PI-3キナーゼ結合部位を欠くPDGF受容体の変異体でも、PDGFによりp70S6キナーゼは活性化されるという報告もあり、p85/p110PI-3キナーゼがp70S6キナーゼの上流に位置するか否かの結論はでていない。最近、p85/p110PI-3キナーゼの触媒サブユニットであるp110とホモロジーを持つ蛋白がいくつか同定されており、ワルトマニンがこれらのうちいくつかの異なったPI-3キナーゼの活性を抑制していることも報告されている。EGF刺激に対しては、p85/p110PI-3キナーゼ活性の著明な上昇は生じないものの、ワルトマニンによりEGF刺激によるp70S6キナーゼ活性が濃度依存性に抑制された。これらのことより、EGF受容体からp70S6キナーゼへのシグナル伝達経路には、p85/p110PI-3キナーゼの触媒サブユニットに類似したワルトマニン感受性のキナーゼが関与している可能性も示唆された。

論文審査の結果の要旨

p70S6キナーゼは、EGFをはじめ種々の刺激により活性化されるセリン・スレオニンキナーゼであり、細胞増殖シグナルの伝達において必須の役割を果たしていると考えられている。しかし、そのシグナル伝達経路は未だ不明な点が多い。免疫抑制剤のラパマイシンが、p70S6キナーゼの活性阻害作用を持つことは知られているが、最近、酵母においてPI-3キナーゼのホモログであるTOR2がラパマイシンの標的であることが報告され、p70S6キナーゼ活性化のシグナル伝達経路に、PI-3キナーゼが関与する可能性が示唆された。そこで、本研究では、PI-3キナーゼ活性阻害作用を持つワルトマニンを用い、EGFによるPI-3キナーゼとp70S6キナーゼ活性化に対する影響を検討した。

この実験のために、内因性のインスリン受容体を発現しているCHO細胞にEGF受容体を発現させた。この細胞では、EGFおよびインスリンによりp70S6キナーゼおよびPI-3キナーゼが活性化された。EGFは、低濃度でp70S6キナーゼを活性化したが、PI-3キナーゼの活性化には高濃度を要した。逆に、インスリンは低濃度でPI-3キナーゼを活性化したが、p70S6キナーゼの活性化には高濃度を要した。このように、EGFとインスリンではp70S6キナーゼとPI-3キナーゼの活性化に要するホルモン濃度に解離がみられた。次に、PI-3キナーゼの阻害剤であるワルトマニンを用いて更に検討を加えた。ワルトマニンは、EGFおよびインスリン刺激によるp70S6キナーゼ活性を完全に抑制した。これに対し、EGFによるPI-3キナーゼ活性はワルトマニンで完全に抑制されたが、インスリンによるPI-3キナーゼ活性の抑制は部分的であり、EGF刺激によるPI-3キナーゼ活性より尚高い活性を示した。このように、PI-3キナーゼが完全に抑制されていない条件下でもp70S6キナーゼは完全に抑制された。以上より、EGFによるp70S6キナーゼ活性化のシグナル伝達には、PI-3キナーゼの活性化とは別の機序が関与している可能性が示唆された。

現在のところPI-3キナーゼがp70S6キナーゼの上流に位置するか否かの結論はでていない。最近、PI-3キナーゼの触媒サブユニットであるp110とホモロジーを持つ蛋白がいくつか同定されており、

ワルトマニンがこれらのうちいくつかの異なるPI-3キナーゼの活性を抑制していることも報告されている。これらのことより、EGF受容体からp70S6キナーゼへのシグナル伝達経路には、PI-3キナーゼの触媒サブユニットに類似したワルトマニン感受性のキナーゼが関与している可能性も考えられる。

本研究はEGFによるp70S6キナーゼ活性化について、そのシグナル伝達経路を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかったp70S6キナーゼ活性化のメカニズムについて重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を取る資格があると認める。