

The mechanism of PI3-kinase signaling

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/25148

【総説】

PI3キナーゼ・ファミリーの細胞内情報伝達機構

The mechanism of PI3-kinase signaling

金沢大学大学院医学系研究科血管分子生理学
(生理学第一)

吉岡和晃, 多久和陽

はじめに

ホスファチジルイノシトール(phosphatidylinositol: PtdIns) 3-キナーゼ(PI3K)はイノシトールリン脂質のイノシトール環の3位をリン酸化する酵素である(図1)。そのリン酸化PtdInsを介して細胞分裂, 増殖, 分化, 遊走, アポトーシス制御やガン化, 細胞内小胞輸送など多岐に渡る細胞応答に関与している¹⁾。約20年前, 増殖因子受容体の下流で, PI3Kが活性化されることが明らかになって以来, これまで多くの研究者が, PI3Kの多彩な生理機能を明らかにしてきた。特に近年, クラスI型PI3Kと癌や糖尿病といった疾患との関係が注目され, 精力的に研究が進められている。クラスI酵素が発見されて直ちに, その主要な生成物がPtdIns(3,4,5)P₃であることが分かり, その下流でプロテインキナーゼB(PKB)/Aktが活性化されることが示された。更に興味深いことに, PtdIns(3,4,5)P₃を特異的に脱リン酸化する酵素が, ガン

抑制遺伝子PTEN(phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10)であることが報告されたことも, PI3K研究を加速させた。クラスI型PI3Kの他に, 細胞内小胞輸送調節に関与するクラスIII型PI3K(Vacuolar protein sorting-34: Vps34)と最近までほとんど機能が不明であったクラスII型PI3Kが見出されている。クラスI型PI3Kとは異なり, クラスII及びクラスIII型PI3Kは共に主要な生成脂質がPtdIns(3)Pである。本稿では, 3つのPI3Kクラスにおける薬理学的特性及び生理機能の相違点を中心に解説し, 特にクラスII型PI3Kに関する最近の知見をまとめた。

1. 分類, 構造, 組織分布及び薬理学的特性

PI3Kは哺乳類において, ドメイン構造や薬理学的特性の違いにより, 3つのクラス(I, II及びIII), 8つのアイソフォームに分類されている(図2)。一方, ショウジョバエや線虫では各クラス1種類ずつ計3種のPI3Kが, 酵母ではクラスIIIに属するVps34のみが存在する。クラ

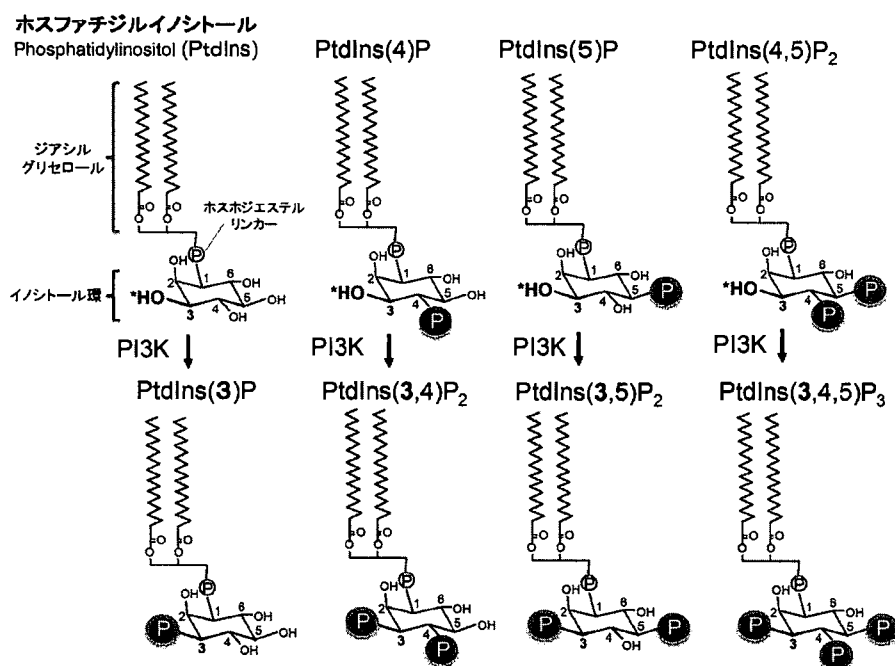


図1 ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ(PI3K)による3'-リン酸化ホスホイノシチドの生成
PI3キナーゼは, PtdInsのイノシトール環3位のOH基(*)を特異的にリン酸化する酵素ファミリーである。

スI酵素は、触媒サブユニットと調節サブユニットとのヘテロ二量体構造をとり、全ての細胞に発現している。*in vitro*系において、クラスI型PI3KはPtdIns, PtdIns(4)P, PtdIns(4,5)P₂のすべてをリン酸化することが出来るが、実際*in vivo*では刺激に応じて主としてPtdIns(4,5)P₂を基質としてPtdIns(3,4,5)P₃を産生することが明らかにされている(図2)。クラスIの触媒サブユニットはp110 α , p110 β , p110 γ , p110 δ の4つのアイソフォームから成り、これらは多くのチロシンキナーゼ型受容体(RTK)やGタンパク質共役型受容体(GPCR)の刺激によって活性化され、細胞膜においてPtdIns(3,4,5)P₃を産生し、下流に情報を伝える。これまで、クラスI-Bに属するp110 γ 以外のクラスI-A型-PI3K(p110 α , p110 β , p110 γ)は、主にRTK(インシュリン, 増殖因子等)刺激によって活性化されると考えられていたが、しかし最近、多くの報告によりGPCR刺激によって三量体Gタンパク質のG $\beta\gamma$ サブユニットを介して直接的にp110 β を活性化し、またRas活性化を介して間接的にp110 α やp110 δ を活性化することが示された²⁾。p110 δ 及びp110 γ は主に白血球に多く発現することから、ほ乳類が進化的に免疫システムを獲得するに伴って多様化したPI3Kアイソフォームと考えられる。

クラスII型PI3Kには、図2に示す通り哺乳類にはC2 α , C2 β , C2 γ の3つのアイソフォームの存在が知られているが、これらの活性化機序及び生理機能はほとんど不明であった。1995年、イギリスのWaterfieldらのグループがクラスI酵素との相同性を利用したPCR法により、まずショウジョバエよりPI3K_{68D}³⁾をクローニングし、さらにマウス、ヒトC2 α ⁴⁾及びC2 β がクローニングさ

れ、その生化学的な特性が解析された³⁾⁴⁾。マウス、ヒトにおけるC2 α の薬理学的特徴は、PI3K阻害剤に低感受性を示すことである。C2 α に対するウォルトマニン(Wortmannin: WMN)のIC₅₀値は420 nM, LY294002のIC₅₀値は20 μ Mであり、p110 α に対するIC₅₀値(それぞれ、5 nMと0.8 μ M)と比較すると、少なくとも1オーダーから2オーダーの差となる。一方、C2 β アイソフォームに対するWMNのIC₅₀値は1.6 nMとp110 α のIC₅₀値と近いが、LY294002のIC₅₀値は7 μ Mと若干抵抗性を示す。クラスII酵素はクラスIとは異なり、*in vitro*の系ではPtdIns(3)P及びPtdIns(3,4)P₂を産生することが出来るが、最近の報告では実際の細胞内においてはPIを主要な基質としてPtdIns(3)Pを産生することが示された⁵⁾。クラスII酵素に結合するアダプターサブユニットは現在のところ見つかっていない。クラスII酵素の構造的特徴は、カルボキシル基(C)末端にPX(Phox homology)ドメインとC2ドメインを有していること、長いアミノ基(N)末端においてクラスIには見られない複数の機能ドメインを有していることである(図2)。N末端にプロリンリッチドメインが存在することから、SH3(Src homology)ドメインを持つタンパク質が結合することが考えられる。C2 α とC2 β には、Coiled-Coilドメインが存在するが、更にC2 α にのみクラスリン結合ドメインが存在し、これらがC2 α 独自の機能を担う可能性が高い。3つのクラスII型酵素に共通してC末端に存在するPX及びC2ドメインは共に、PtdIns(4,5)P₂との親和性が比較的高いことが報告され、クラスII酵素独自の細胞内局在や機能に寄与する可能性が示唆されている⁶⁾。C2 α 及びC2 β は全身に広汎に発現し、中でもC2 α は心臓、胎盤、子宮及び

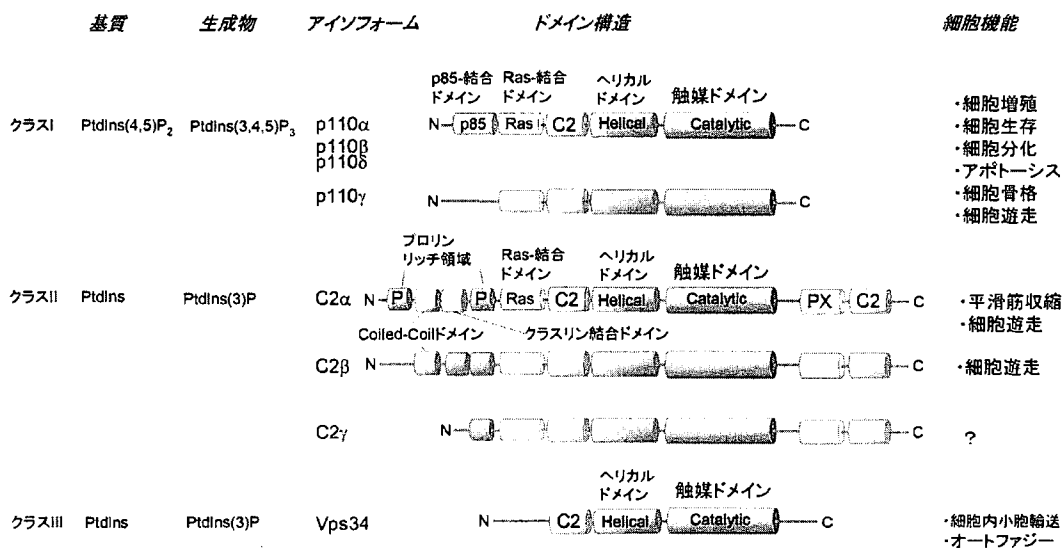


図2 PI3キナーゼ・ファミリーの分類とドメイン構造

PI3キナーゼは構造と生化学的特性により3つのクラスに分類される。クラスI PI3キナーゼ(p110 α , p110 β , p110 δ , p110 γ)はPtdIns(4,5)P₂を基質とし、調節サブユニット(p85アイソフォーム)と共に複合体を形成し存在する。クラスII PI3キナーゼ(C2 α , C2 β , C2 γ)は主にPtdInsを基質とする。調節サブユニットは存在せず、N末端とC末端にクラスIでは見られない領域(プロリンリッチ領域, PXドメイン, C2ドメイン)が存在する。これら結合ドメインは、クラスII酵素の局在を制御していると考えられる。クラスIII PI3キナーゼはVps34(vacuolar protein sorting-34)1種のみから成り、PtdInsを基質とし、Vps15サブユニットと複合体を形成している。

血管に、 $C2\beta$ は皮膚、胸腺及び胎盤に比較的多く発現しているのに対し、 $C2\gamma$ の発現は主として肝臓に局限している。一方、クラスⅢ酵素 Vps34 (vacuolar protein sorting protein 34)は、もともと酵母で発見された唯一のPI3Kであり、その研究の歴史は古い。その名の通りVps34は、酵母において細胞内小胞輸送に関係した働きを持つ酵素として同定され、ヒトでの相同体であるhVps34もまた生体内の細胞全般において、PI(3)Pを恒常的に産生して細胞内小胞輸送調節に関わっていると考えられている⁷⁾。

2. シグナル情報伝達、生理機能及び疾患との関連

PI3キナーゼは、その生成物であるPtdIns(3)P、PtdIns(3,4)P₂及びPtdIns(3,4,5)P₃を介して、下流にシグナルが伝達される(図3)。この内、主に原形質膜上で生成されるPtdIns(3,4)P₂とPtdIns(3,4,5)P₃に対しては、これらに高い親和性を有するPH (pleckstrin homology)ドメインを有する様々な分子が結合しシグナルが伝達される。タンパク質リン酸化酵素プロテインキナーゼB(PKB)/Aktは、PtdIns(3,4)P₂とPtdIns(3,4,5)P₃に親和性の高いPHドメインを持つセリン/スレオニン・キナーゼであり、タンパク質合成促進、グリコーゲン合成酵素活性制御、グルコース輸送、アポトーシス抑制、遺伝子転写制御、細胞遊走等、多種多様な作用に関与している。また、最近ではクラスⅠ型PI3Kの下流ターゲットとし

てAktの他に、低分子量Gタンパク質に注目が集まっている。PI3Kファミリーは、Ras, Rhoファミリー (Rho, Rac, cdc42) 及びArfファミリーに対して、それぞれ特異的なグアニンヌクレオチド交換因子(Guanine nucleotide Exchange Factor: GEF)やGTPase活性化因子(GTPase-Activating Factor: GAP)を調節して活性を制御することが示されている(図3)。しかし、全てのアイソフォームと言うわけではなく、おそらく限られたPI3Kアイソフォームが特定の組織・細胞において限定的に低分子量Gタンパク質の活性を制御していると考えられる。

p110 α 及びp110 β のノックアウト(KO)マウスはそれぞれ胎児期の比較的早期(E9.5-10.5, E3.5-7.5)に致死であることから、器官形成以前の細胞全般の増殖や分化過程に必須な酵素であることは間違いなさそうである⁸⁾。これらクラスⅠ-A型PI3Kはガン細胞の分裂・増殖能力の制御に深く関わっているものと考えられる。クラスⅠ-Bに属するp110 γ のKOマウスは正常に生まれてくるものの、p110 γ は生後の免疫系や心機能調節における役割が示唆されている⁹⁾。近年、腫瘍細胞においてp110 α 遺伝子の触媒ドメイン上に特異的変異がいくつか見つかり¹⁰⁾、腫瘍の悪性化とPI3Kの異常活性との関連が報告されて以来、この分野のPI3K研究は進歩を見せている。

一方、クラスⅡ及びⅢ酵素が産生するPtdIns(3)Pに特異的に結合するFYVEドメインは、エンドソームに特異

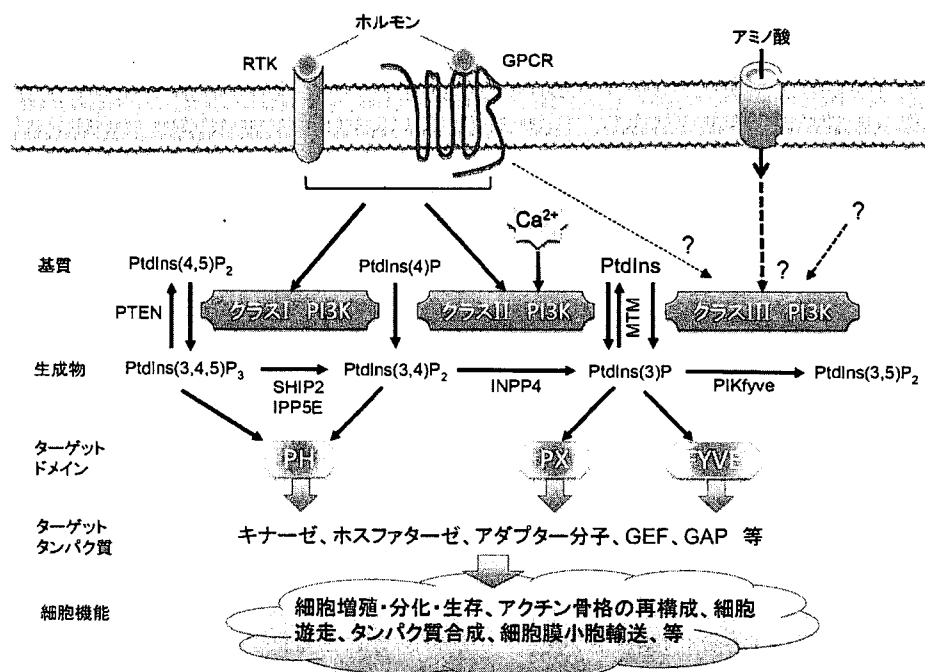


図3 PI3キナーゼによるフォスファチジルイノシトール (PtdIns) 情報伝達経路

様々なアゴニスト (ホルモン) によりPI3キナーゼ・ファミリーは活性化され、各基質PtdIns(4,5)P₂, PtdIns(4)P, PtdInsよりPtdIns(3,4,5)P₃, PtdIns(3,4)P₂, PtdIns(3)Pをそれぞれ生成する。各生成PtdInsリン酸は、特異的結合ドメイン (PH, PX, FYVEドメイン等)を有するターゲットタンパク質 (キナーゼ、ホスファターゼ、アダプタータンパク質、足場タンパク質、Guanine nucleotide exchange factors (GEF), GTPase-activating protein (GAP)等)と結合し、その局在と活性を制御する。脂質ホスファターゼは、脱リン酸化によりPI3Kとは逆の反応を触媒する。PTEN: phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10, SHIP2: SH2 domain-containing inositol 5-phosphatase, IPP5E: inositol polyphosphate-5-phosphatase E, INPP4: inositol polyphosphate-4-phosphatase, MTM: myotubularin phosphatase, PIKfyve: FYVE finger-containing phosphoinositide kinase

的に発現するEEA1 (early endosome antigen-1)を始めとする幾つかの細胞内膜輸送に関わるタンパク質に多く見られるモチーフである。また、C2 α はクラスリン結合ドメインを有することからも、クラスリンに依存したエンドサイトーシスに関わるPI3Kと考えられる。受容体などの膜タンパク質が活性化に伴って細胞内に移行するエンドサイトーシスは、従来から考えられていた細胞内シグナルの終結メカニズム (脱感作) の一つであると同時に、最近ではある種の細胞や刺激においてエンドソームを介したシグナルの局在化や持続的シグナル産生に関わっている証拠が多数見つかっており、この点においてC2 α の機能的役割は何か?非常に興味深い。クラスII酵素の細胞レベルでの活性化は、ケモカインであるMCP-1 (monocyte chemotactic protein-1), サイトカインであるレプチンやTNF α (tumor necrosis factor α), インテグリン, クラスリン, インシュリン, リゾホスファチジン酸 (LPA) といった刺激により生じることが報告されている¹¹⁾。我々のグループは血管平滑筋細胞において、ノルアドレナリン刺激や膜脱分極刺激に伴う細胞内カルシウムの上昇によりC2 α が活性化することを見出している¹²⁻¹⁵⁾。C2 α は細胞内において*tans*-Golgiネットワークやクラスリン陽性小胞に比較的豊富に存在しており、クラスリン依存性エンドサイトーシス、あるいは細胞内膜小胞のソーティング、及び分泌顆粒のエキソサイトーシス等に関係していることが*in vitro*系で示されていることから生体においてもこれらの機能を司る可能性は高い。我々は、RNA干渉 (RNAi)法を用いて培養血管平滑筋細胞のC2 α 発現を特異的にノックダウンした結果、ノルアドレナリン刺激やKClによる膜脱分極を介した平滑筋収縮が有意に阻害されることを見出した¹²⁾¹³⁾。平滑筋の持続的な強い収縮には、低分子量Gタンパク質Rhoを介したRhoキナーゼの活性化が必要である。我々の詳細な解析により、平滑筋でのRho活性調節機構の1つに細胞内Ca²⁺による活性化経路が存在し¹⁵⁾、この過程にC2 α が関与することを明らかにした。このことは、C2 α は生理的な血管収縮を制御する役割を持つばかりでなく、高血圧、脳卒中などの病的血管収縮においても重要な役割を果たしている可能性がある。一方、C2 β は上皮細胞に比較的多く発現していることから、そのKOマウスは皮膚上皮細胞分化・生存に異常を来すことが推察されていた。しかし、予想に反しC2 β KOマウスは正常に生まれるのみならず、皮膚上皮細胞には全く異常が無いことが報告されている¹⁶⁾。また、*in vitro*細胞系において、LPAによるC2 β 活性化が細胞遊走に関与することがRNAi法を用いた検討から示唆されている¹¹⁾。

クラスII型PI3Kと同じPtdInsを基質とするVps34の研究において、特に最近特筆すべき点は、ほ乳類細胞におけるオートファジーとの関係である。Vps34-Vps15ヘテロダイマーはBeclin1, ATG14Lと共に複合体を形成し、アミノ酸飢餓状態に伴ってPtdIns(3)P依存的にオートフ

ァゴソームを形成することが明らかになった¹⁷⁾。また、初期及び後期末エンドソームにもVps34-Vps15複合体は存在し、エンドソームタンパク質であるRab5やRab7と共に、リソソームによるタンパク質分解系を調節することが示されている。ほ乳類のエンドサイトーシス系は、酵母や線虫に比べ非常に多様で複雑なシステムに進化している。古典的な「初期エンドソーム→後期末エンドソーム→リソソーム」による分解系に加え、リサイクリング・エンドソームによるタンパク質メンテナンス、最近ではAPPLエンドソーム¹⁸⁾¹⁹⁾、SARAエンドソーム¹⁹⁾のように機能的に分化したエンドソームがシグナル伝達をダイナミックに調節することが明らかになりつつある。おそらく、これらエンドソームの機能は、Vps34の他に、クラスIやクラスII型PI3Kによっても調節されていると考えられる。どのPtdInsプールがVps34あるいはクラスII型PI3Kによる調節を受けるのかは不明であり、まだ多くの謎が存在する。

今後の展望

これまでのPI3K研究は、クラスI型酵素を中心に進み、特にガン、糖尿病といった疾患との関連性について集中的に行われてきた。そのような中で、クラスII型PI3KであるC2 α 及びC2 β に関して近年関心が集まりつつある。この4、5年の間に、培養細胞を用いた*in vitro*系においてRNAi法を適用した研究成果から、クラスII型PI3Kの新たな役割が見えつつある。その1つが我々の行った血管平滑筋収縮におけるC2 α の関与である。この発見は、Ca²⁺による平滑筋収縮メカニズムについての従来の考え方に変更を余儀なくするものである。しかし、クラスII型PI3Kの真の生理機能を*in vivo*で解明するためには、幾つかの課題を乗り越えなければならない。1) クラスII酵素に対する選択的阻害剤の開発、2) クラスII型酵素各アイソフォームの正確な組織・細胞内分布と*in vivo*基質特異性、3) クラスII型PI3K各アイソフォームに対するKOマウスを用いた解析、これらの問題に対し我々のグループは精力的にクラスII型酵素特にC2 α の生理機能解明に向け取り組んでいる。今後、これまでクラスI型PI3Kの関与と考えられていた生理機能が実はクラスIIやIIIの役割であると判明する可能性もあり、更にクラスIの及ぼす生理作用とクラスII/IIIの生理作用とのクロストークが存在することは十分に予想される。PI3Kファミリーがおりなす多彩な生理機能は、まだまだ不明な点が多く、今後各アイソフォームの役割が明らかになるにつれて、多くの疾患に対する創薬のターゲットが見つかること期待される。

文 献

- 1) Cantley, LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296: 1655-1657, 2002
- 2) Guillermet-Guibert J, Bjorklof K, Salpekar A, et al. The p110 β isoform of phosphoinositide 3-kinase signals downstream of G

protein-coupled receptors and is functionally redundant with p110 γ . *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 8292-8297, 2008

- 3) MacDougall LK, Domin J, Waterfield MD, et al. A family of phosphoinositide 3-kinases in *Drosophila* identifies a new mediator of signal transduction. *Curr Biol* 5:1404-1415, 1995
- 4) Domin, J, Pages F, Volinia S, et al. Cloning of a human phosphoinositide 3-kinase with a C2 domain that displays reduced sensitivity to the inhibitor wortmannin. *Biochem. J* 326: 139-147, 1997
- 5) Falasca M, Hughes WE, Dominguez V, et al. The role of phosphoinositide 3-kinase C2 α in insulin signaling. *J Biol Chem* 282: 28226-28236, 2007
- 6) Liu L, Song X, He D, et al., Crystal structure of the C2 domain of class II phosphatidylinositide 3-kinase C2 α . *J Biol Chem* 281: 4254-4260, 2006
- 7) Halstead JR, Jalink K, Divecha N. An emerging role for PtdIns(4,5)P₂-mediated signalling in human disease. *Trends Pharmacol Sci* 26:654-660, 2005
- 8) Bi L, Okabe I, Bernard DJ, et al. Proliferative defect and embryonic lethality in mice homozygous for a deletion in the p110 α subunit of phosphoinositide 3-kinase. *J Bio Chem* 274: 10963-10968, 1999
- 9) Crackower MA, Oudit GY, Koziaradzki I, et al. Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathways. *Cell* 110: 737-749, 2002
- 10) Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* 304: 554, 2004
- 11) Falasca M, Maffucci T. Role of class II phosphoinositide 3-kinase in cell signalling. *Biochem Society Transactions* 35: 211-214, 2007
- 12) Wang Y, Yoshioka K, Azam MA, et al. Class II phosphoinositide 3-kinase α -isoform regulates Rho, myosin phosphatase and contraction in vascular smooth muscle. *Biochem J* 394: 81-592, 2006
- 13) Yoshioka K, Sugimoto N, Takuwa N, et al. Essential role for class II phosphoinositide 3-kinase alpha-isoform in Ca²⁺-induced, Rho- and Rho kinase-dependent regulation of myosin phosphatase and contraction in isolated vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 71: 912-920, 2007
- 14) Azam M, Yoshioka K, Ohkura S, et al. Ca²⁺-independent, inhibitory effects of cyclic adenosine 5'-monophosphate on Ca²⁺ regulation of phosphoinositide 3-kinase C2 α , Rho, and myosin phosphatase in vascular smooth muscle *J Pharmacol Exp Ther* 320: 907-916, 2007
- 15) Sakurada S, Takuwa N, Sugimoto N, et al. Ca²⁺-dependent activation of Rho and Rho kinase in membrane depolarization-induced and receptor stimulation-induced vascular smooth muscle contraction. *Circ Res* 93: 548-556, 2003
- 16) Harada K, Truong AN, Cai T, et al. The class II phosphoinositide 3-kinase C2 β is not essential for epidermal differentiation. *Mol Cell Biol* 25:11122-11130, 2005
- 17) Backer JM. The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochem J* 410: 1-17, 2008
- 18) Zoncu R, Perera RM, Balkin DM, et al. A Phosphoinositide Switch Controls the Maturation and Signaling Properties of APPL Endosomes. *Cell* 136: 1110-1121, 2009
- 19) Doherty GJ, McMahon HT. Mechanism of endocytosis. *Annu Rev Biochem* 78: 31.1-31.46, 2009