

(様式A)

学位論文の内容の要旨

郝昕



Expression pattern of class I phosphoinositide 3-kinase and distribution of its product, phosphatidylinositol-3, 4, 5-trisphosphate, during *Drosophila* embryogenesis
(ショウジョウバエの胚発生におけるクラスI ホスホイノシチド3-キナーゼ及びその産物、ホスファチジルイノシトール-3, 4, 5-三リン酸の発現パターン)

(学位論文の要旨) 2,000字程度、A4判、ワープロ等使用

ショウジョウバエは飼育が容易で、遺伝学的解析が進んでおり、多くの細胞学的及び発生学的知見が集積されているという利点をもつ。特にその胚発生は観察が容易で短期間で終了するため、従来から多細胞生物の形態形成のモデルとして研究されてきたが、イノシトールリン脂質代謝と胚発生との関連は十分には解明されてこなかった。一方、ホスホイノシチド 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' 位をリン酸化することによって、細胞の増殖、分化、運動性や細胞内輸送など様々な細胞機能に関与する重要なイノシトールリン脂質の産生を行う。PI3KファミリーはI、II、IIIの3つのクラスに分類される。ショウジョウバエでは各クラスに1種類のPI3Kが存在する。クラスI PI3Kはホスファチジルイノシトール (PI)、ホスファチジルイノシトール-4-リン酸 (PI(4)P)、ホスファチジルイノシトール-4, 5-二リン酸 (PI(4, 5)P₂) を基質として使用し、それぞれホスファチジルイノシトール-3-リン酸 (PI(3)P)、ホスファチジルイノシトール-3, 4-二リン酸 (PI(3, 4)P₂)、PI(3, 4, 5)P₃を産生する。このクラスの酵素は制御サブユニット(ショウジョウバエではp60)と、触媒サブユニット(ショウジョウバエではp110)から構成されている。クラスII PI3KはPIとPI(4)Pを基質とし、単一のサブユニットから構成され、カルボキシル末端付近にC2ドメインを持つ。クラスIII PI3Kは制御サブユニットと触媒サブユニットから構成され、PIのみを基質として用いPI(3)Pを産生する。PI3Kのクラスのうち、クラスI のPI3Kだけが細胞外からの様々な刺激に応じて活性化され、細胞膜に存在するホスファチジルイノシトール-4,5-二リン酸 (PI(4, 5)P₂) からホスファチジルイノシトール-3,4,5-三リン酸 (PI(3, 4, 5)P₃) を産生することができる。

本研究では、ショウジョウバエ胚発生におけるイノシトールリン脂質の役割を調べるために、クラスI PI3Kの制御サブユニットp60ならびに触媒サブユニットp110をコードする遺伝子の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて解析し、またPI3Kの酵素の産物であるPI(3, 4, 5)P₃の分布を特異的結合タンパク質を用いて解析した。制御サブユニットをコードする *Pi3K21B* のRNAは、母性由来RNAとして初期胚に存在し、主に生殖細胞系列である極細胞で、細胞性胞胚形成期から胚帯伸長期まで発現していた。触媒サブユニットをコードする *Pi3K92E* のRNAは、母性由来RNAとして初期胚に存在した。原腸形成期では全体に発現は低下するが、陥入している細胞にはやや多く存在した。 *Pi3K21B*、 *Pi3K92E* の両遺伝子のRNAともに胚帯伸長期には遍在し、その発現は胚帯収縮期まで持続した。クラスI PI3Kの産物であるPI(3, 4, 5)P₃の分布は、この脂質に特異的に結合するGRP1由来のプレクストリン類似配列 (pleckstrin homology

domain、PHドメイン) と緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein、GFP) との融合タンパク質であるEGFP-GRP1-PHを発現する遺伝子導入ショウジョウバエで (tGPH) を用いて解析を行った。なお、グルタチオン-Sトランスフェラーゼとの融合タンパク質GST-GRP1-PHを用いて各種の脂質との結合をオーバーレイアッセイで検討し、GRP1-PH はPI(3, 4, 5)P₃へ特異的に結合することを確認した。tGPHにおける解析の結果、PI(3, 4, 5)P₃は原腸形成時に陥入する細胞の頂端部に局在していた。また、抗GFP抗体とF-アクチン結合性のファロイジンを用いて蛍光免疫染色を行ってPI(3, 4, 5)P₃とF-アクチンの分布を検討したところ、陥入が起こる細胞においてF-アクチンとPI(3, 4, 5)P₃の分布が部分的に一致していた。PI3Kとその産物であるPI(3, 4, 5)P₃は細胞内骨格の制御に重要な役割を果たし、ショウジョウバエの培養細胞であるS2R+株ではPI3Kが細胞表層のアクチンの構築に関与することが知られている。また、T細胞が抗原提示細胞との接触面に形成する免疫シナプスでは環状にF-アクチンが再構成されるが、クラスI PI3Kが産生するPI(3, 4, 5)P₃によってこれが制御されていることが知られている。本実験結果より、クラスI PI3Kならびにその産物であるPI(3, 4, 5)P₃が、原腸形成期の細胞群において観察され、時間的・空間的解析によりこれらが陥入に関与することが初めて示唆された。PI(3, 4, 5)P₃が脂質性のセカンドメッセンジャーとして働く機序として、PHドメインなどの脂質結合性ドメインを介して様々な下流分子に作用してその細胞機能を発揮することが知られている。低分子Gタンパク質Rhoの制御因子であるRhoGEF2はPHドメインを持っており、ショウジョウバエの原腸形成時の細胞群の陥入においてF-アクチンやミオシンの制御に関与していると報告されている。本研究により、ショウジョウバエのクラスI PI3Kおよびその産物であるPI(3, 4, 5)P₃はアクト-ミオシンネットワークを介して原腸形成における陥入の制御を行っている可能性が示唆された。