

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007 ~ 2009

課題番号：19770098

研究課題名 (和文) AKT 活性を修飾する新しい分子標的の探索とその生物効果の解析

研究課題名 (英文) Identification of novel AKT regulating molecules.

研究代表者

水津 太 (SUIZU FUTOSHI)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教

研究者番号：90431379

研究成果の概要 (和文)：

本研究では、セリンスレオニンキナーゼ Akt の新規特異的結合因子として同定した TTC3 が、活性化 (Thr308 のリン酸化型) Akt を特異的にポリユビキチン化し、それにより Akt がプロテアソームによって分解 (不活性化) される事を証明した。この発見は、これまで不明であった核内 Akt の不活性化 (分解) 機構の解明に大きく寄与した。TTC3 遺伝子は、ヒト 21 番目染色体長腕上のダウン症責任遺伝子領域に存在することから、TTC3-Akt シグナル伝達が、ダウン症に見られる様々な症候や合併症発症に関与する可能性が示唆された (Suizu et al. *Developmental Cell* 2009)。

研究成果の概要 (英文)：

In yeast two-hybrid assays, we found that TTC3, which is located at chromosome 21 within the Down Syndrome Critical Region, specifically interacted with Akt. TTC3 preferentially binds to phosphorylated Akt and facilitates its ubiquitination/degradation predominantly within the nucleus. By confocal microscopy the TTC3 co-localizes with Akt throughout the cell cycle, suggesting that TTC3 regulate cell survival and proliferation by controlling Akt activity within the nucleus. (Suizu et al. *Developmental Cell* 2009)

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	600,000	180,000	780,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	450,000	3,750,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物科学

キーワード：タンパク分解, リン酸化, AKT, ユビキチン, セリンスレオニンキナーゼ, ダウン症, 21Trisomy, TTC3

## 1. 研究開始当初の背景

セリンスレオニンキナーゼAkt (Protein Kinase Bの別称)は細胞死(アポトーシス)を抑制し、細胞生存を促進する要の細胞内シグナル伝達因子である。Aktは細胞外成長因子などの刺激でPI3K (Phosphoinositide Dependent 3 kinase)によって活性化される。このPI3K-Aktシグナル伝達系は細胞死と増殖の制御、細胞周期、タンパク合成、糖代謝、血管新生などの多岐にわたる細胞反応制御に重要な役割を果たす細胞内シグナル伝達系である。最近相次いでPI3K-Aktシグナル伝達系のマウスモデルを用いた*in vivo*での機能解析が行われた。興味深いことにAkt3遺伝子ノックアウトマウスの解析では21トリソミー(ヒト21番染色体を3本もつ染色体異常)によるダウン症候群に特徴的な脳の発達障害が見られた。一方PI3K-Aktシグナル伝達系のトランスジェニックマウス(PI3K, p27, Aktなど)には心臓肥大などの心奇形、発達障害(short stature)などの21トリソミーによって発症する循環器系異常に類似する臨床症候が見られた。またPI3K-Aktシグナル伝達系の活性化は白血病の重要な原因として知られ、この事実も実に21トリソミーにおいて小児期に各種白血病の発症頻度が高い事と合致する。さらにpoly-Transgenic 21トリソミーマウスモデルを用いたタンパク発現の検討においてHeat shock protein Hsp90やNG, NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolaseなどのPI3K-Akt familyキナーゼと結合する分子の発現の亢進が指摘された(Antonarakis et al., *Nature Rev Genet* 2004; Shin et al., *J Proteome Res* 2006)。これらの事象を総括的にかんがみ、申請者はPI3K-Aktシグナル伝達系の異常に認められる症候は、心臓奇形、白血病、脳発達障害、short stature、さらに細胞レベルではアポトーシスの亢進などの21トリソミーによるダウン症候群においても高頻度に認められる症候と極めて類似する点に注目した。

## 2. 研究の目的

セリンスレオニンキナーゼAktは、細胞死(アポトーシス)プロセスを阻害することによって細胞生存、細胞増殖を促進する。近年、Aktの活性化が、乳がん、肺がん、前立腺が

ん、卵巣がん、或いは、白血病及びリンパ系腫瘍のような血液系がん等に関与することが報告されている。Akt活性は、Thr308, Ser473のリン酸化および脱リン酸化によって制御されており、Akt活性の制御因子として、これまでAkt上流のキナーゼまたは、脱リン酸化酵素が注目されていた。最近では、Akt活性化補助因子として、TCL1 (T cell leukemia 1)が発見され、TCL1とAktがヘテロ複合体を形成することによりAkt分子間のトランスアクティベーションによるAkt活性化メカニズムが明らかとなった。本研究ではYeast Two Hybridアッセイを行った結果、Akt特異的に結合するTTC3 (Tetrapeptide Repeat Domain 3)を同定した。TTC3はE3ユビキチンリガーゼに共通したRING fingerモチーフを有していたことから、ユビキチン-プロテアソーム系を介したTTC3によるAktの不活性化(タンパク分解)制御機構の可能性について検討を行った。

## 3. 研究の方法および結果

(1) TTC3のAktに対する結合性の解析  
内在性TTC3の発現がみられない293T細胞にFlag-TTC3およびHA-Akt (Akt isoforms; Akt1, -2, -3)を共発現させ共沈実験を行った。TTC3は、比較的Akt2に結合性が高いもののAkt isoform全てに結合することが示された。(図1参照)

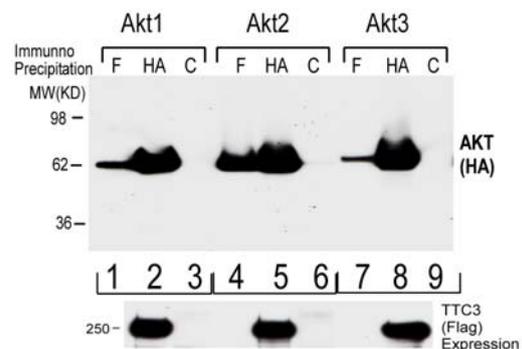


図1. TTC3のAktに対する結合性

(2) TTC3の結合特異性の検討  
293T細胞において、他のセリンスレオニンキナーゼとの結合性を比較したところ、HA-PDK1やHA-PrK1には親和性を示さず、Flag-TTC3はHA-Akt特異的に結合することが示唆された。(図2参照)

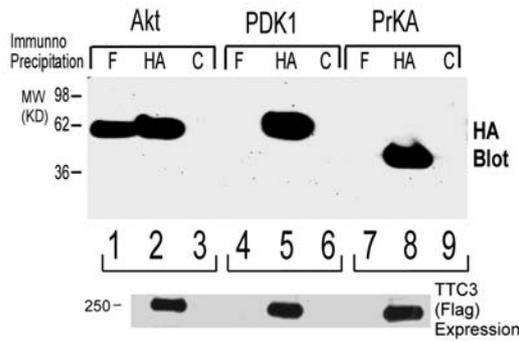


図2. TTC3の結合特異性

(3) Akt のユビキチン化アッセイ  
 間接免疫蛍光抗体法によるTTC3 の細胞内局在の解析により、TTC3 は有意に核に存在することが明らかになった。そこで、細胞分画により核分画におけるAkt のユビキチン活性を解析したところ、293T 細胞にFlag-TTC3、HA-Akt2、His-Ubiquitin を共発現させた条件では、有意に核に存在するリン酸化Akt がユビキチン化されることが示された。(図3参照)

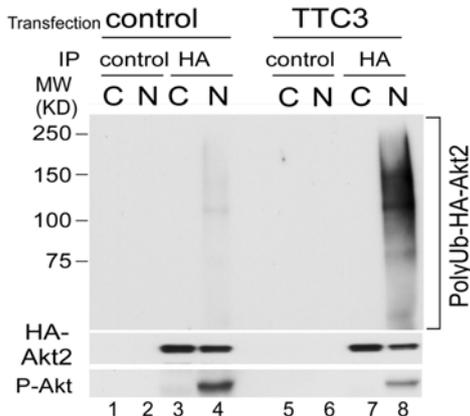


図3. TTC3によるAktのユビキチン化

(4) プロテアソームによる分解アッセイ  
 (3)の結果を元に、プロテアソーム系を介したAkt 分解実験を行った。蛋白合成阻害剤 cyclohexamide 処理後12 時間後には80%以上の核内Akt が分解され、その分解はプロテアソーム阻害剤MG132 によって阻害されたことから、Akt の分解はTTC3 によるユビキチン化およびプロテアソーム系を介したものであることが明らかとなった。(図4参照)

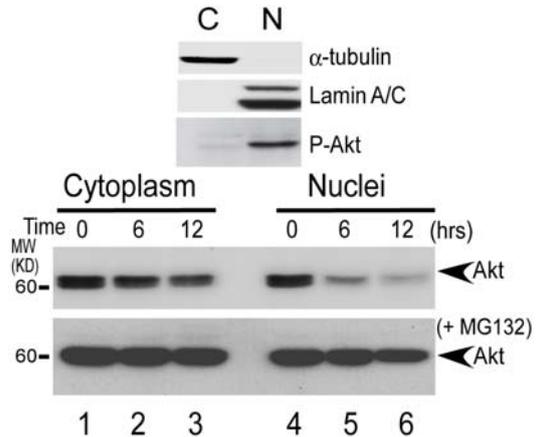


図4. Aktのプロテアソームによる分解

#### 4. 研究成果

本研究では、Yeast Two HybridシステムによるAkt結合因子の同定を行うと同時に、ヒト21番染色体長腕上のダウン症責任遺伝子領域DSCRに存在する遺伝子群のうち、セリンスレオニンキナーゼAktによる特異的リン酸化配列ならびに14-3-3による特異的認識配列の二つを同時に持つ重複モチーフ {R-X-R-S-X-(S/T)-X-P} を保存したAkt活性化修飾因子のスクリーニングを行った。その結果、活性型(リン酸化された)Aktに特異的に結合するE3ユビキチンリガーゼTTC3 (Tetratricopeptide Repeat Domain 3)を同定した。TTC3は、細胞の核内に局在する活性型(Thr308がリン酸化された)Aktのみを特異的にポリユビキチン化し、プロテアソームによる分解(不活性化)を促進することを初めて明らかにした。(図5参照)これまで、脱リン酸化酵素であるPP2AやPHLPP等がAkt

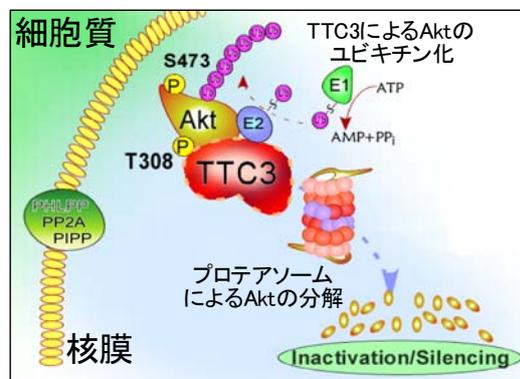


図5. 細胞質の活性型(リン酸化された)Aktは、核内に移行し、TTC3によってユビキチン化され、プロテアソーム系を介して不活性化(分解)される。(Suizu et al. *Developmental Cell* 2009)

の不活性化に機能している報告がされていたが、本研究において、新たにTTC3によるユビキチン-プロテアソーム経路を介したAkt活性の不活性化制御機構の存在が明らかになった。(Suizu et al. *Developmental Cell* 2009)。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Suizu, F., Hiramuki, Y., Okumura, F., Matsuda, M., Okumura, A. J., Hirata, N., Narita, M., Kohno, T., Yokota, J., Bohgaki, M., Obuse, C., Hatakeyama, S., Obata, T., and Noguchi, M.  
The E3 Ligase TTC3 Facilitates Ubiquitination and Degradation of Phosphorylated Akt. (2009)  
*Developmental Cell* 17(6) 800-810. 査読あり
- ② Kurabe, N., Arai, S., Nishijima, A., Kubota, N., Suizu, F., Mori, M., Kurokawa, J., Miyazaki, M.K., Ide, T., Murakami, K., Ueki, K., Koga, H., Yatomi, Y., Tashiro, F., Noguchi, M., Kadowaki, T., and Miyazaki, T. (2009)  
The death effector domain-containing DEDD supports S6K1 activity via preventing Cdk1-dependent inhibitory phosphorylation.  
*J Biol Chem* 284(8) 5050-5055. 査読あり
- ③ Noguchi, M., Obata, T., and Suizu, F. (2008)  
Regulation of the PI3K-Akt Network: Current Status and a Promise for the Treatment of Human Diseases.  
*Curr Sig Thera* 3 138-151. 査読あり
- ④ Noguchi, M., Ropars, V., Roumestand, C., and Suizu, F. (2007)  
Protooncogene *TCL1*: More Than Just a Co-Activator for AKT.  
*FASEB J* 21(10) 2273-2284. 査読あり

[学会発表] (計 6 件)

- ① Suizu, F.  
TTC3 is an E3 ligase for Akt that facilitate ubiquitination and degradation of phosphorylated Akt. Keystone Symposia, Mar. 13, 2010, Fairmont Hotel, Vancouver.
- ② 水津 太  
A novel E3 ligase for Akt facilitates

ubiquitination and degradation.  
日本分子生物学会, 2009. 12. 11, パシフィコ横浜

- ③ Noguchi, M.  
“*Akt-in*” a peptide inhibitor for AKT, implications for cancer therapy.  
AACR, Nov. 12, 2008, Hiltone Hotel, Bostone, USA
- ④ 野口 昌幸  
リンパ系ウイルス感染症におけるPI3K-AKTシグナル伝達系の活性化機構  
リンパ網内系学会, 2008. 6. 14, 北海道大学
- ⑤ Noguchi, M.  
PI3K-AKT network as a Therapeutic Target For Human Disease.  
International Drug Discovery Science and Technology (IDDST) 2007, Nov. 8, 2007, グランドニューワールドホテル 西安 (中国)
- ⑥ 野口 昌幸  
Protooncogene *TCL1*: More than just a co-activator for Akt.  
日本癌学会, 2007. 10. 3, パシフィコ横浜

[その他]  
ホームページ等

[http://www.igm.hokudai.ac.jp/hu\\_ifgm\\_c/b/index.html](http://www.igm.hokudai.ac.jp/hu_ifgm_c/b/index.html)

#### 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
水津 太 (SUIZU FUTOSHI)  
北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教  
研究者番号：90431379
- (2) 研究分担者  
( )  
研究者番号：
- (3) 連携研究者  
( )  
研究者番号：