

平成 21 年 6 月 26 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007 年～2008 年

課題番号：19770184

研究課題名（和文） Akt-Ral シグナルが細胞運動を調節するメカニズムの解明

研究課題名（英文） The roles of Akt-Ral pathway for EGF induced cell migration

研究代表者

吉崎 尚良（Yoshizaki Hisayoshi）

立命館大学・生命科学部・助教

研究者番号：00443490

研究成果の概要：

申請者は、前年度までにセリンスレオニンキナーゼ Akt から低分子量 G タンパク質 Ral を介したシグナル伝達が増殖因子刺激による細胞膜の伸展に必須なシグナル経路であることを明らかにした。Ral は Ras の下流で機能するとされる一方で、Akt は PI3 キナーゼ(以下 PI3-K)の下流で働く。そこで Ral の葉状仮足上での活性化は Ras、PI3-K どちらのシグナルが規定しているのかそれぞれの FRET プローブを用い調べた。また Akt 活性の PI3-K 以外の制御機構を調査した。その結果ホスホリパーゼ C が Akt 活性の制御に関与する可能性を見出した。そこでホスホリパーゼ C の活性をモニターする FRET プローブを作製し、Akt 活性の空間制御の関係を調べた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,400,000	420,000	3,820,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：シグナル伝達、細胞運動、FRET

1. 研究開始当初の背景

細胞は外界からの情報に従って特定方向へ運動する仕組みを持っており、細胞の運動は、個体の発生、維持に必須の生命現象である。一方、細胞運動シグナルの亢進は炎症や癌細胞の浸潤、転移、癌病巣での血管新生などの病態を示す。この細胞運動は

(1)細胞運動先端部でのアクチン制御による葉状仮足の形成。(2)小胞輸送による、運動先端部への葉状仮足形成分子の能動輸送。(3)細胞尾部でのアクチンの収縮。(4)運動する方向性の決定。により規定されると考え

る。細胞前部において葉状仮足が伸長し基質と接着点を形成する。細胞後部では基質との接着点を外しながら収縮する。このように、細胞は伸長と収縮という2つの動作を時空間的に協調(極性化)させることによって、特定方向への運動を可能にしている。細胞運動には多くの低分子量 G タンパク質が関与することが知られている。細胞先端部での葉状仮足の伸張には Rac や Cdc42 がアクチン骨格の再重合を行い、伸長に必要な細胞膜成分、接着分子等は小胞輸送の経路を使い Rab や Arf の制御下で細胞先端部に集められエキソ

サイトーシスされる。また、尾部における収縮は Rho を介したアクトミオシンの収縮によって制御される。研究代表者は、これまで FRET (蛍光共鳴エネルギー移動) を応用したバイオセンサーの開発を行い、低分子量 G タンパク質の空間制御が、細胞の形態変化に与える影響について調べてきた。最近申請者はセリンスレオニンキナーゼ Akt と Ral の FRET による解析から、(1)Akt が増殖因子刺激によって形成される葉状仮足上で Ral を局所的に活性化すること、(2)さらに Akt-Ral のシグナル伝達が増殖因子刺激による細胞膜の伸展に必須なシグナル経路であることを明らかにした (Yoshizaki H, et.al, Mol. Biol. Cell, 2007)。Ral は Ras の下流で機能するとされ、これまでに小胞の膜融合を制御し、その恒常活性型変異体発現細胞では運動能が亢進することが報告されている。一方 Akt は PI3 キナーゼ (以下 PI3K) の標的分子で細胞死の制御をしている。Akt の過剰な活性化は、細胞死の抑制以外に細胞運動の異常により、癌細胞の転移、癌病巣での血管新生を促進することが報告されている。しかし、Akt が細胞運動に寄与するメカニズムについての詳細は未だ明らかにされていない。

2. 研究の目的

申請者が明らかにしつつある増殖因子依存性の細胞運動では Ras-Ral シグナルと Akt-Ral シグナルが協調的に働いている可能性が予想される。本研究では特に Akt-Ral シグナルに特化して研究を計画した。Akt-Ral のシグナル伝達が細胞運動に機能するという作業仮説をたて Akt-Ral 経路がどのようなメカニズムで細胞運動に関わるかを化吉良化にすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)細胞培養、形質転換、免疫プロットティング: NIH3T3 細胞および Cos7 細胞は 10%FCS 含有 DMEM にて培養した。形質転換には Polyfect (QIAGEN) を使用した。細胞の解析は形質転換後 24 時間培養した細胞を用い、免疫プロットティングにて行った。抗体は anti RalA antibody (RhoCh), anti Flag mouse monoclonal antibody (SIGMA), anti pan Akt rabbit monoclonal antibody (cell signaling), anti phospho Akt T308 rabbit monoclonal antibody (cell signaling) を使用した。増殖因子刺激は 12 時間の血清飢餓の後 50ng/mL EGF (SIGMA) を用い行った。EGF 刺激後 10 分で細胞の可溶化を行った。PI3-K の阻害剤 LY294002 (Calbio Chem), PLC の阻害剤 U73122 (Calbio Chem) は EGF 処理する 10 分前に培地に添加した。

(2) Pull down assay: Cos7 細胞、NIH3T3 細胞は、細胞可溶化液 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 200 mM NaCl, 2.5 mM MgCl₂, 1% NP-40, 10% glycerol, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 µg/ml aprotinin, and 10 µg/ml leupeptin) で可溶化した後 15000rpm、4、10 分遠心分離した。上澄みは、GST 融合 Sec5RA ドメイン、グルタチオンセファロースビーズを加え 4 で 2 時間転倒置換した後、細胞可溶化液で 3 回洗浄した。ビーズは SDS サンプル緩衝液を加えアクリルアミドゲル電気泳動を行い、免疫プロットティングを行った。GTP 結合型 Ral は抗 RalA 抗体 (ロッシュ社) を用いて検出した。

(3) FRET イメージング: CFP と YFP 標識された FRET プローブを発現させた細胞は 35mm ガラスボトムディッシュに蒔き 24 時間培養した後、冷却 CCD カメラ付き蛍光顕微鏡にてタイムラプス観察を行った。CFP と FRET の露光時間は 300 ms で行い、タイムラプス間隔は 30 秒とした。増殖因子 (EGF) の添加はタイムラプス開始後 10 分で行った。

(4) FRET プローブ: pPippi-PI(4,5)P₂ は CFP, スペーサー配列 (Glu-Ala-Ala-Ala-Arg)₆, PLCgamma(aa18-130), スペーサー配列 (Glu-Ala-Ala-Ala-Arg)₃-Gly-Gly-(Glu-Ala-Ala-Ala-Arg)₃, YFP, スペーサー配列 (Glu-Ala-Ala-Ala-Arg)₆, Ki-Ras4B の CAAX モチーフ (aa169-188) をつなぎ構築した。Akt, Ral, PI3-K の FRET プローブは既報 (Yoshizaki H, et.al, Mol. Biol. Cell, 2007) のプローブを使用した。

4. 研究成果

(1) EGF 刺激による Akt 活性と Ral 活性は同様の活性局在を示す。

我々は、これまでに EGF (上皮増殖因子) 刺激による Ral の活性化に Akt 活性が必要なることを明らかにしてきた。そこで EGF 刺激による Akt の活性と Ral の活性の細胞内局在にどのような違いが観察されるか、その上流シグナル分子である Ras と PI3-K の活性局在と合わせて、FRET プローブを用いて検討した。Raichu-Ras, Pippi-PIP₃, Akind および、Raichu-Ral を Cos7 細胞に形質転換し、50ng/mL の EGF で刺激し、FRET イメージングを行った (図 1)。その結果 Ras と PI3-K は EGF 刺激により細胞全体に活性の増加が観察されたのに対し、下流の Akt および Ral 活性は、増殖因子刺激により進展した細胞膜上で顕著な活性増加が観察された。

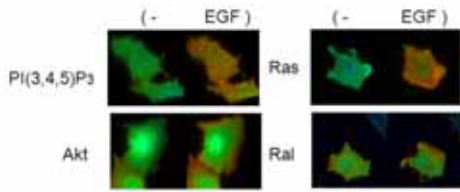


図1 EGF刺激によりAktとRalAは伸展した膜上で顕著な活性が観察される

(2)EGF により誘導される Akt 活性化は優勢劣勢型 Ras により阻害される

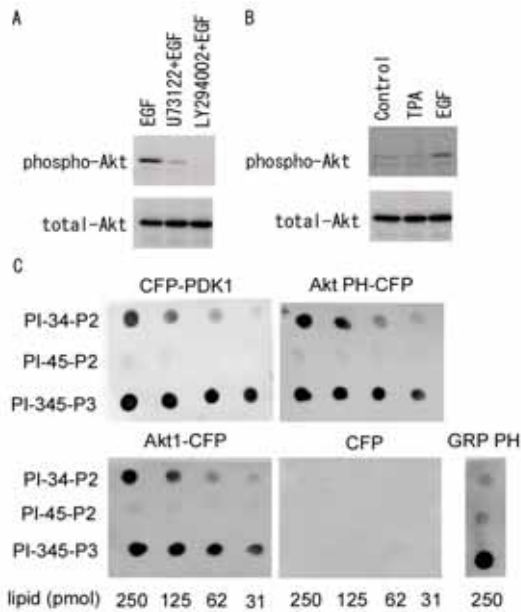


図3 EGF刺激によるAktのリン酸化はPLCの阻害剤で抑制される。

- A. EGFにより誘導されるAktのリン酸化はPLCの阻害剤で抑制される。
- B. Aktのリン酸化はTPAでは誘導されない。
- C. AktPHドメインのlipid overlay assayの結果。

我々は、Akt-RalA 経路が EGF で誘導される細胞膜の伸展に寄与することをすでに明らかにしている。図1で観察される伸展膜に Akt-RalA 活性を限局させるシグナルは、この生理機能に重要な役割を担っていることが期待される。そこでこの Akt-RalA を伸展膜上に限局するシグナルの解明を進めることにした。増殖因子シグナルでは、多くの Ras ファミリーや Rho ファミリーの低分子量 G タンパク質の活性を調節していることが知られている。そこで低分子量 G タンパク質シグナル伝達経路が、Akt 活性の調節に関与するか、それぞれの低分子量 G タンパク質の恒常活性化型変異体 (CA) を発現させた細胞の Akt リン酸化と、FRET プローブによる Akt 活性の変動をイムノプロットにより調べた (図2A)。その結果、これまで報告されている H-, K-Ras 以外に Rac が Akt の活性調節に関

与していることが示唆された。次に Ras と Rac の優勢劣勢型変異体 (DN) を発現させた細胞で EGF による Akt 活性化抑制されるか調べた (図2B)。この結果 Rac を阻害しても Akt 活性に影響はないが Ras を阻害した場合 Akt 活性化が阻害される事がわかった。

(3)増殖因子刺激による Akt 活性の増加は、PI3-K だけでなく Phospho lipase C 活性も要求する。

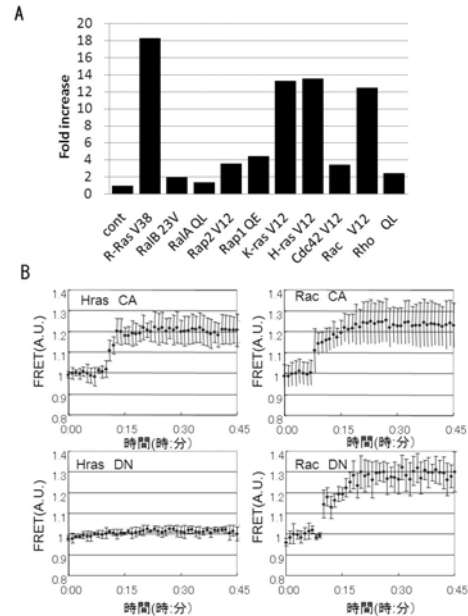


図2 Aktのリン酸化はRas活性に依存する

- A. Aktのリン酸化はH-, K-RasとRacの恒常活性化型により誘導される。
- B. Akt活性はRasの優勢劣勢型変異体発現により抑制されるが、Racの優勢劣勢型変異体では抑制されない。

EGF 刺激による Ral 活性の局在は Ras ではなく、Akt と非常に似ていること、EGF 刺激による Ral の活性化に Akt が必須な事を合わせると Ral の活性の局在は Akt が制御していることを示唆する。しかし Akt 活性の細胞辺縁部への限局はどのようなメカニズムで制御されているのかは明らかにされていない。そこで Akt の上流として知られる PI(3,4,5)P₃ の局在を合わせて観察した (図1右上)。しかし Akt 活性の局在と PI(3,4,5)P₃ の分布は一致しなかった。そこで Akt 活性が EGF 刺激により PI3-K 以外のどのような分子の影響を受けるか検討したところ、Akt は Ras の優勢劣勢型変異体の発現により活性が抑制された (図2B)。そこで Ras の下流の分子である PI3-K, PLC, c-Raf の阻害剤を用い EGF 処理により誘導される Akt リン酸化への影響を調べた (図3)。このうち、PI3-K の阻害剤 LY-294002 と、PLC の阻害剤 U73122 処理した細胞では Akt のリン酸化の抑制が見られた (図3A)。Rac の優勢劣勢型変異体発現細胞では EGF による Akt の活性化は抑制されなかったにもかかわらず、Ras の場合抑制されたの

は、PI3-K と PLC の両方を抑制していたことが原因であることが示唆される。

次に、PLC がどのようなメカニズムで Akt の活性調節に働くか調べるために PLC の代謝産物であるジアシルグリセロール (DAG) をミミックするホルボールエステル (TPA) が Akt のリン酸化に影響を与えるか調べた (図 3b)。この結果 TPA 処理では Akt のリン酸化を誘導することはなかった。またこれまで報告されているように PLC の基質である PIP₂ は Akt の PH ドメインとの相互作用は観察されず Akt 活性との関連は示唆されなかった (図 3C)。

(4) PLC 活性をモニターする FRET プロブの開発

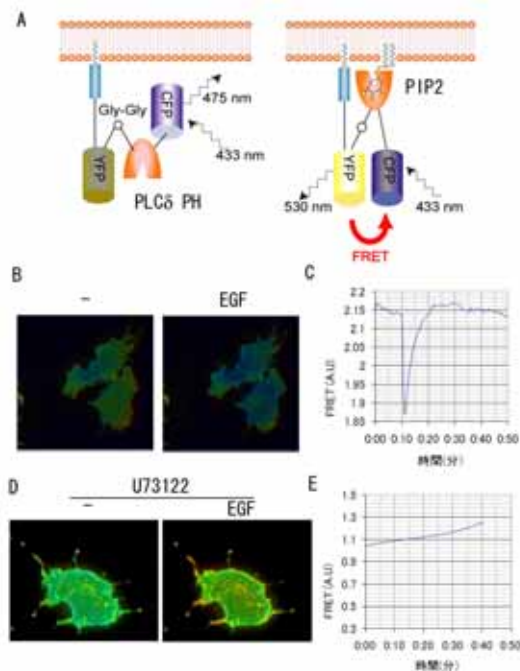


図4 Pippi-PIP₂の作製

A. Pippi-PIP₂の構造と原理、B. Pippi-PIP₂のFRETイメージ、C. Pippi-PIP₂のEGF刺激によるFRETの変動、D. Pippi-PIP₂のU73122感受性、E. U73122処理Cos7細胞のEGF刺激におけるPippi-PIP₂のFRETの変動

PLCは、PIP₂を分解しIP₃とDAGを産生する。そこで我々は PLC 活性は、その基質である PIP₂の変動をモニターすることで知ることができるのではないかと考え PIP₂をモニターする FRET プロブ Pippi-PIP₂を作製した。その構造は、既報の PIP₃ プロブ (Sato M. et.al, Nat. Cell Biol. 2003) の骨格を参考に、センサー領域に PIP₂ に特異的に結合することが知られる PLC の PH ドメインを利用した (図 4A)。このプロブは PIP₂ の減少 (FRET の減少) により PLC の活性の増加を観察できるよう設計されている。

作製した Pippi-PIP₂は Cos7 細胞に発現させ、EGF 刺激による FRET の変動を調べた (図

4B,C)。その結果 EGF 刺激により一過的な FRET の減少が観察された。FRET の減少は細胞中心部で大きく辺縁では中心部よりは小さい傾向が観察された。また EGF 刺激による FRET の減少は、PLC の阻害剤である U73122 処理により抑制された (図 4D,E)。この結果から Pippi-PIP₂は PLC により代謝される PIP₂の減少をモニターできていることが示された。詳細なプロブの解析と細胞運動における PIP₂局在の解析は共同研究者である西岡が論文にまとめ公表した (Nishioka T. et.al, Mol. Biol. Cell, 2008)。

プロブを用いた解析の結果、Pippi-PIP₂を用いた EGF 刺激による PIP₂の分布の変動は Akt 活性の分布と相関を示さなかった (図 4B)。現在この結果を受けて、PLC によるもう一つの代謝産物である IP₃-カルシウムが Akt 活性の局在に与える影響について検討を進めている。また本報告書では触れることはできなかったが、Akt と Ral をつなぐシグナル伝達経路についても現在そのメカニズムの詳細を解析中であり、いくつかの知見が集積しつつある。

(5) 参考文献

Nishioka T, Aoki K, Hikake K, Yoshizaki H, Kiyokawa E, and Matsuda M, Rapid Turnover Rate of Phosphoinositides at the Front of Migrating MDCK Cells., Mol Biol Cell. 2008 19: 4213-4223.

Yoshizaki H, Mochizuki N, Gotoh Y, and Matsuda M., Akt-PDK1 Complex Mediates EGF-induced Membrane Protrusion through Ral Activation. Mol Biol Cell. 2007 Jan;18(1):119-28.

Yoshizaki H, Aoki K, Nakamura T, Matsuda M., Regulation of RalA GTPase by phosphatidylinositol 3-kinase as visualized by FRET probes., Biochem Soc Trans. 2006 Oct;34(Pt 5):851-4.

Sato M, Ueda Y, Takagi T, Umezawa Y., Production of PtdInsP3 at endomembranes is triggered by receptor endocytosis. Nat Cell Biol. 2003 Nov;5(11):1016-22.

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1件)

Nishioka T, Aoki K, Hikake K, Yoshizaki H, Kiyokawa E, and Matsuda M Rapid Turnover Rate of Phosphoinositides at the Front of Migrating MDCK Cells.

Mol Biol Cell. 2008 19: 4213-4223. 査読有

〔学会発表〕(計1件)

吉崎尚良、FRETプローブを用いた、PI3-KによるRafA活性制御の可視化、特定領域研究「G蛋白質シグナル」&「膜輸送複合体」合同若手ワークショップ、2008/1/27、神奈川県箱根市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉崎 尚良 (Yoshizaki Hisayoshi)

立命館大学・生命科学部・助教

研究者番号：00443490