

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440039

研究課題名(和文)細胞極性制御の分子基盤におけるAktの機能解析

研究課題名(英文)Analysis of molecular mechanisms of Akt-mediated cell polarity regulation.

研究代表者

水津 太 (Suizu, Futoshi)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・講師

研究者番号：90431379

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Yeast Hybrid System法を用い、Akt2およびAkt3の両者に結合する一次繊毛タンパクInversinを単離同定することに成功した。この因子はAkt1、2、3のいずれにも結合したが、他のセリンスレオニンキナーゼには結合しないAkt特異的結合因子であることがわかった。さらに、Inversinが新規Aktのリン酸化基質であり、そのリン酸化サイトを同定した。そのリン酸化は、MDCK細胞の管腔様構造に必須であり、Akt-Inversinのリン酸化シグナル伝達が、細胞極性や生体の形作りに重要な役割を果たすことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have tried to identify the new Akt substrate in primary cilia as a factor for controlling cell polarity based on a hypothesis for Akt to participate in structure maintenance of primary cilia. By using the Yeast Hybrid System method, we used Akt2 and Akt3 isoform as a bait, respectively. As a result, we have succeeded in isolating and identifying primary cilia protein Inversin which was both isolated by Akt2 and Akt3 screening. Inversin bound to all of Akt1, 2 and 3 isoforms, but other Ser-Thr kinase (PDK or PrkA), suggesting that it was the Akt specific binding factor. Furthermore, we made it clear that Inversin was new Akt substrate and we identified its phosphorylation sites. The phosphorylation is indispensable to lumen-like structure in the three-dimensional culture of the canine MDCK cells; meaning that the phosphorylation signal transduction via Akt-Inversin plays an important role for controlling cell polarity and body plan of vertebrates.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞極性 一次繊毛 Akt 嚢胞腎

1. 研究開始当初の背景

一次繊毛 (primary cilia; non-motile cilia) は、細胞膜と9+0の微小管細胞骨格から成る一本の毛様体で、現在では哺乳類のほとんど全ての細胞に存在する事が知られている (図1 c、および図2参照)。9+2の骨格から成る運動性繊毛 (motile cilia) と違い、primary cilia は、これまで機能を持たない単なる遺残物として見なされてきた。近年、この primary cilia が多様な機能を持ち、primary cilia の欠失や機能異常により嚢胞性腎疾患をはじめ網膜萎縮、肝線維症、多指症、肥満、中枢神経系異常や骨格形成異常などの遺伝性疾患 (繊毛病; ciliopathy) が引き起こされることが分かってきた。

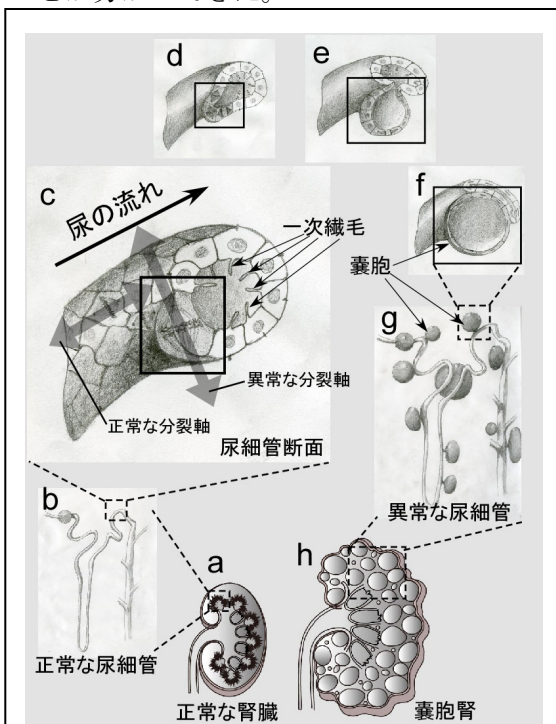


図1. 繊毛病の一例、多発性嚢胞腎発生過程の模式図。PCP 破綻による尿細管細胞の分裂軸異常 (c)、嚢胞形成により (d-h)、尿の流れが阻害され (f)、重篤な腎不全 (g、h) へと発展する。

繊毛病のうち最も多い症例として、多発性嚢胞腎疾患 (図1参照) が挙げられる。この疾患の腎臓尿細管上皮細胞は、平面内細胞極性 (planar cell polarity, PCP) が破綻しており、そのため細胞分裂方向 (軸) が異常になる。分裂軸異常により、おおよそ尿の流れと垂直方向に分裂が進行し (図1 c、d参照)、尿細管が拡張し嚢胞を形成する (図1 d-h参照)。その結果、正常な

尿の流れが阻害され、重篤な腎疾患をもたらす (図1 f-h参照)。PCP 破綻の原因として、尿細管細胞表面に存在する primary cilia (図1 c参照) の構造的・機能的異常が指摘されているが、未だその分子メカニズムについては不明である。

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) や細胞生存制御において、要となる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を受け PI3K

(Phosphoinositide 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。近年、Akt の細胞運動や細胞極性調節因子としての機能が注目され始めているが、その詳細な分子メカニズムは明らかになっていない。

(Menager C. et al., *J Neurochem*, 2004, Yoshimura et al., *Cell*, 2005, Higuchi et al., *Nat. Cell Biol.* 2008)

2. 研究の目的

一次繊毛 (primary cilia) を介した細胞極性制御におけるセリンスレオニンキナーゼ Akt の役割を明らかにしたい。近年、primary cilia の構造・機能異常によって様々な疾患が引き起こされる (繊毛病) ことが明らかになってきた。我々は最近、primary cilia の構造的安定性の保持に Akt が必須である事実を掴んだ。本研究では、バイオセンサー、さらには細胞内へのシグナル伝達装置として機能する primary cilia の構造的・機能的恒常性維持における Akt の役割を分子生物学、発生生物学的視点から解析し、これまでに知られていない Akt の生物機能の開拓、更には繊毛病や Akt シグナル伝達系破綻に関わる様々な疾患の早期発見、新規治療法確立を目指す。

申請者のこれまでの解析から primary cilia 基部に存在する活性型 Akt は、無血清条件下においてもその活性が強く維持され続けていることから (未発表データ)、Akt は繊毛形態形成および繊毛維持に関わる因子をリン酸化 (活性化) している可能性が示唆される。(図2 d 仮説モデル参照)

本研究では、研究期間内に

- (1) primary cilia および繊毛基部に存在する Akt 基質の網羅的探索を行い、
- (2) 基質の primary cilia での細胞生物学的な構造・機能的役割を明らかにし、
- (3) PCP 制御、および繊毛病責任遺伝子としての機能をモデルマウスを用いて明らかにする事を当初の目標とした。

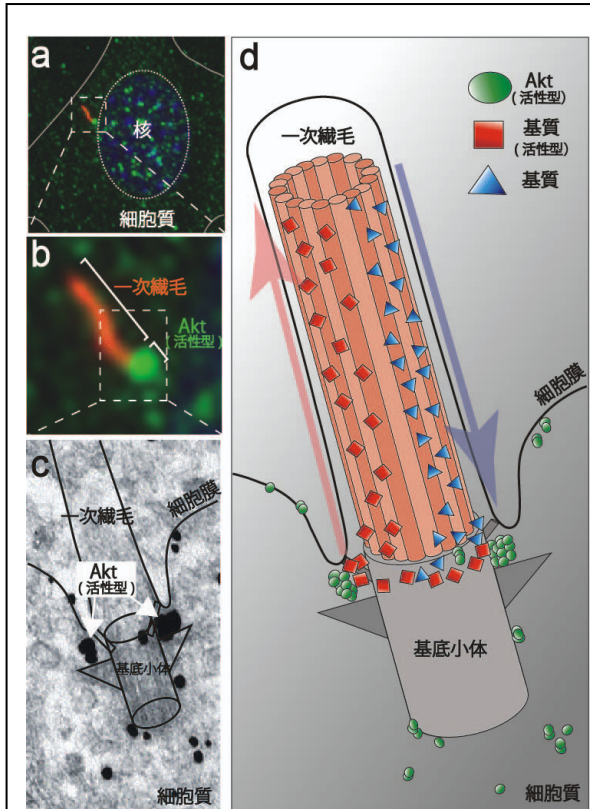


図 2 (a および b) NIH3T3 細胞に存在する primary cilia。間接免疫蛍光抗体法により活性化 Akt が primary cilia の基部に局在することがわかる。

(c) 透過型電子顕微鏡を用いた高解像観察から活性化 Akt (黒く見える金コロイド粒子) は基底小体から primary cilia への移行帯 (transition zone) に多く存在する。

(d) primary cilia における Akt の機能仮説モデル。活性化 Akt は繊毛基部で基質をリン酸化し、繊毛の形態形成、および繊毛から細胞内へのシグナル伝達制御に関与する。

3. 研究の方法

申請者が立てた仮説モデル (図 2 d) の様に、primary cilia に Akt 基質は存在するのか? その基質のリン酸化、また Akt との結合が primary cilia の形態形成や維持、更にはバイオセンサーや細胞内シグナル伝達装置としての繊毛機能にどのような影響を与えるのか? 組織・生体レベルでの Akt 基質の

機能は何なのか? などの疑問を追求すべく、以下3項目の戦略でプロジェクトを進める。

- (1) primary cilia および繊毛基部に存在する Akt 基質の網羅的探索、
- (2) primary cilia での細胞生物学的な構造・機能的解析、
- (3) PCP 制御、および繊毛病責任遺伝子としての生物機能の検証を行う。

4. 研究成果

Yeast Two Hybrid システムを用いた包括的なスクリーニング法により、Akt 特異的に結合する繊毛タンパク Inversin を同定した。Inversin は新規 Akt リン酸化基質であり、そのリン酸化がイヌ腎臓 (MDCK) 細胞の分裂軸の傾き決定および、正しい細胞配向を伴った腎尿細管の三次元構築に必須であることが明らかとなった。Inversin 遺伝子の欠失マウスの表現型は、繊毛病 (嚢胞腎や内蔵逆位など) の原因遺伝子として認知されていたが、その疾病の分子メカニズムは明らかになっていなかった。本研究で初めて、Akt から Inversin へのリン酸化シグナル伝達が、Inversin 遺伝子欠失によって疾病に至る機序を説明できる重要な分子制御機構である事実を解明した (Suizu et al. *EMBO J*)

またヒト Inversin の Akt リン酸化サイトはアミノ酸配列 Thr-Ser-Thr (864-866) であることが分かった (図 3 参照)。しかしながら、この配列はヒトやチンパンジーを始めとする霊長類、およびウシやイヌなどの進化上比較的霊長類との分岐が新しい種属

Akt リン酸化サイト	
ヒト	849 STEELRSGARRLETSTLSED 870
チンパンジー	753 STEELRSGARRLETSTLSKD 774
ウシ	848 STEVLRSGVRKLGTSARSED 871
イヌ	848 NTEVLRSGVRKSGTSTLSED 871
マウス	846 STEASRS GCKQ-----LYED 868
ツメガエル	821 SEKEFSSTGIQG-----RVD 847
ゼブラフィッシュ	815 REKDKRS--RTEGDKQTVRE 832

図 3. 各動物種の Inversin アミノ酸配列の multiple alignment

には保存されているが、マウスやカエル、ゼブラフィッシュなどの動物群には欠如していることが明らかとなった。(図 3 参照)

哺乳類由来の殆ど全ての細胞において、一次繊毛は細胞増殖が休止した状態 (細胞周期 G₀ 期) に形成される。これまでの研究では、セリンスレオニンキナーゼ Akt は、

腫瘍や癌組織で高い活性が維持されていることから、がん化過程における腫瘍細胞の増殖促進、および細胞生存へのAktの関与がおもに注目されており、G₀期でのAktの機能解析は皆無であった。本研究成果によりこれまでに全く知られていなかったAktによるG₀期でのInversinを介した一次繊毛制御メカニズムの存在が証明されその重要性が明らかになり、細胞極性制御および疾患分子メカニズム解明に繋がり、更には繊毛病だけでなくAktが関与する癌、糖尿病、心臓病などの様々な疾病に対してこれまでにない治療法に向けた新しいドラッグデザイン方法の開発の可能性が切り開かれ、保健医療への貢献が期待できる。

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 6件)

1. Suizu F, Hirata N, Kimura K, Edamura T, Tanaka T, Ishigaki S, Donia T, Noguchi H, Iwanaga T and Noguchi M. (2016)
Phosphorylation dependent Akt- Inversin interaction at basal body of primary cilia.
EMBO J. In press (査読あり)
2. Suizu F, Hirata N, Ishigaki S, Edamura T, Kimura K, Tanaka T and Noguchi M. (2016)
Primary cilium-mediated crosstalk of signaling cascades in ciliogenesis: Implications for tumorigenesis and senescence.
Cell Commun Insights. 8: 13-24 (査読あり)
3. Noguchi M, Hirata N, Suizu F. (2014)
The links between AKT and two intracellular proteolytic cascades: Ubiquitination and autophagy.
Biochim Biophys Acta. 1846(2): 342-352. (査読あり)
4. Hirata N, Suizu F, Matsuda-Lennikov M, Edamura T, Bala J, Noguchi M. (2014)
Inhibition of Akt kinase activity suppresses entry and replication of influenza virus.
Biochem Biophys Res Commun. Jul 18;450(1):891-8. (査読あり)
5. Matsuda-Lennikov M, Suizu F, Hirata N, Hashimoto M, Kimura K, Nagamine T, Fujioka Y, Ohba Y, Iwanaga T, Noguchi M. (2014)
Lysosomal interaction of Akt with Phafin2: a critical step in the induction of autophagy.
PLoS One. Jan 8;9(1): e79795. (査読あり)

6. Hashimoto M, Suizu F, Tokuyama W, Noguchi H, Hirata N, Matsuda-Lennikov M, Nagamine T, Tanaka S and Noguchi M. (2013)

Protooncogene TCL1b functions as Akt kinase co-activator that exhibits oncogenic potency *in vivo*.

Oncogenesis. Sep 16;2: e70. (査読あり)

[学会発表] (計 6件)

1. Suizu F, Hirata N, Ishigaki S, Edamura T, Tanaka T, Obuse C, and Noguchi M.
Intersection of apoptosis and autophagy cell death pathways, Cold Spring Harbor Laboratory Asia Meeting in Shanghai, China, 2015年11月11日
2. 平田徳幸、水津 太、レニコフ真実、枝村達磨、木村光輝、Jyoti Bala、野口昌幸
Akt 活性抑制ペプチド“*Akt-in*”を用いたインフルエンザ感染の病態修飾効果の検討
第37回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)2014年11月27日
3. 平田徳幸、水津 太、野口昌幸
Akt 活性抑制ペプチド“*Akt-in*”を用いたインフルエンザ感染におけるオートファジー修飾効果の検討
第8回オートファジー研究会、・第2回新学術「オートファジー」班会議、シャトレゼガトーキングダム サッポロ(北海道・札幌市)2014年11月9-11日
4. 平田徳幸、水津 太、野口昌幸
遺伝子導入が困難な培養細胞におけるRNA干渉、
平成26年北海道大学総合技術研究会、北海道大学 高等教育推進機構(北海道・札幌市)札幌2014年9月4、5日
5. 平田徳幸、水津 太、レニコフ真実、橋本学、宮崎忠昭、野口昌幸
Akt 活性抑制ペプチドを用いたインフルエンザウイルス感染症の治療への試み、
第79回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、北海道大学遺伝子病制御研究所(北海道・札幌市)2014年6月19、20日
6. 松田-レニコフ真実、水津 太、平田徳幸、橋本学、木村光輝、枝村達磨、藤岡容一郎、大場雄介、岩永敏彦、野口昌幸
新規Akt結合因子Phafin2によるオートファジー制御の仕組み
第36回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)2013年12月3日

[その他]

ホームページ等

http://www.igm.hokudai.ac.jp/hu_ifgm_cb/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・講師

研究者番号：90431379