

様式 C-19 (記入例)

科学研究費補助金研究成果報告書

平成22年 5月31日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17014012

研究課題名(和文) がん化におけるプロテインキナーゼの機能

研究課題名(英文) Functions of protein kinases in tumorigenesis

研究代表者

後藤 由季子 (GOTOH YUKIKO)

東京大学・分子細胞生物学研究所・教授

研究者番号：70252525

研究成果の概要(和文)：本研究では癌悪性化における Akt の機能と関連して(1) Akt が細胞の前後極性の形成と維持に貢献することを見いだした。特に Akt が細胞前方における方向性を持った微小管の安定化を誘導し持続的に極性を維持する事を明らかにした。また(2) Akt の活性制御機構について、PAK が Akt とその活性化因子 PDK1 の両方に結合し、PDK1 による Akt の活性化を促進する「スキャフォールド分子」として働く事を見いだした。さらに PAK は Akt の基質選択性にも関わる事が示された。

研究成果の概要(英文)：The proto-oncogene Akt is a key regulator of various biological processes such as cell proliferation, survival, metabolism and motility, as well as tumorigenesis. We have shown that the serine/threonine kinase PAK serves as a scaffold protein in the Akt signaling pathway. We also found that inactivation of PAK1 reduced phosphorylation of only a subset of Akt substrates and suppressed Akt-mediated cell motility but not cell survival or protein synthesis. PAK thus appears to contribute to the signaling specificity of Akt, in addition to its signaling efficiency. PAK appears to affect the signaling specificity of Akt by regulating subcellular localization of a specific isoform of Akt as well as by associating with a subset of Akt substrates related to cell motility regulation. We are now further examining the mechanism by which Akt regulates cell motility.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	14,300,000	0	14,300,000
2006年度	13,200,000	0	13,200,000
2007年度	13,200,000	0	13,200,000
2008年度	14,200,000	0	14,200,000
2009年度	14,200,000	0	14,200,000
総計	69,100,000	0	69,100,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：

キーワード：Akt, がん遺伝子, Mdm2, 細胞運動

1. 研究開始当初の背景

(1) Akt には強い細胞生存促進活性があり、生存シグナル伝達の異常な活性化は、DNA 損傷、がん遺伝子の活性化、低酸素状態などによるアポトーシスの誘導を阻害し、癌化の発生と進行の重要な要因となると考えられている。しかしながら Akt による生存促進メカニズムについては未だ不明な点がいくつか残されており、本研究ではこれらについて検討した。また癌悪性化と関連して、我々は以前に Akt が細胞運動制御に関わり、がん抑制遺伝子 PTEN を欠損した細胞の運動性亢進に Akt の活性化が重要である事を示し、浸潤性への関与を示唆した (Higuchi et al. 2001)。そこで本研究では Akt の細胞運動制御メカニズムについても検討した。

(2) Akt は細胞生存、増殖、代謝、運動性など様々な機能を持つ。これらの多様な機能を発揮する際に Akt は異なる基質をリン酸化するが、どのようにして適切なコンテキストで適切な基質をリン酸化しているかは必ずしもわかっていなかった。キナーゼがコンテキスト依存的に基質を選択する際に、しばしば足場タンパク質 (scaffold protein) が用いられるが、Akt シグナル伝達における基質の特異性を決定する scaffold protein はこれまで同定されていなかった。

2. 研究の目的

(1) Akt による生存促進メカニズムおよび細胞運動性促進メカニズムについて検討する。

(2) Akt 経路の scaffold protein を同定し、その Akt 経路に対する制御について調べる。

3. 研究の方法

哺乳類繊維芽細胞を中心に、Akt の機能を分子の過剰発現、ノックダウン、ノックアウト等により調べる。結合分子を手がかりに制御因子ならびにターゲット (基質) を探索する。

4. 研究成果

(1) -1 Akt の生存促進におけるターゲット: Mdm2 を介した E2F1 制御

細胞周期の G1/S 期制御に中心的な役割を果たす転写因子 E2F ファミリーのメンバーである E2F1 は、他の E2F ファミリーメンバーとは異なり、DNA 損傷などの細胞障害に

応答して分解が抑制され活性化し、アポトーシス誘導に働くことが知られている。E2F1 遺伝子破壊によってがん化が促進することが示されているが、このとき、E2F1 の持つアポトーシス誘導活性ががん抑制因子としての機能に重要であると考えられている。そこで E2F1 の制御、特に分解制御メカニズムはがん抑制を理解する上で重要であると考えられるが、E2F1 の生理的ユビキチンリガーゼについてはこれまで不明であった。当グループは、p53 のユビキチンリガーゼとして良く知られている癌遺伝子産物 Mdm2 が E2F1 のユビキチン化を直接触媒することを *in vitro* 再構成系により示した (未発表)。また、この Mdm2 の E2F1 ユビキチン化活性は Akt によるリン酸化で著しく活性化した。さらに、E2F1 上の Mdm2 によるユビキチン化部位を 4 つ同定したが、これらのユビキチン化部位を変異した E2F1 タンパク質は細胞内で安定化され、半減期が長くなる事があきらかになった。さらに Mdm2^{-/-} p53^{-/-} 繊維芽細胞においては、p53^{-/-} 繊維芽細胞よりも E2F1 タンパク質の半減期が長くなり、Mdm2 遺伝子産物が E2F1 の生理的なユビキチンリガーゼであることが強く示唆された。従って、Mdm2 とその活性化因子である Akt (いずれも癌遺伝子) が癌抑制遺伝子 p53 に加え E2F1 をも分解することにより癌化を誘導している可能性が示唆された。

(1)-2 Akt の細胞運動制御における役割の解析

我々は以前に増殖因子による繊維芽細胞の運動性上昇に Akt が必須の役割を果たすことを報告した。Akt の活性型は移動中の細胞の前方 (先端) に局在する。本研究において、Akt とその活性化因子 PDK1 が PI3 キナーゼからのシグナルのポジティブフィードバックに関与し、細胞の前方を規定することを示した。Akt シグナルを抑制すると極性が失われ、細胞の前方に特徴的なラフリング膜等の構造が阻害された。

長い距離を移動する繊維芽細胞等の細胞においては、前後極性の維持に微小管が関与することが知られている。しかし、細胞外のシグナルに応答していかなるメカニズムで微小管が配向するのかについては不明であった。本研究において、細胞の前後極性の確立に関わる Akt が、その後の微小管の安定化に重要な役割を果たす事を明らかにした。Akt 活性を抑制すると配向を持った微小管の重合が阻害され、また活性型 Akt を発現するだけで安定な微小管の量が上昇した。さらに

この際のみカニズムとして、微小管プラス端のダイナミクスを制御する因子のひとつ EB1 の類似分子が Akt のターゲットとなっている可能性を示唆する結果を得た。この EB1 類似分子は微小管を不安定化する機能を持つことを見出したが、Akt はこの分子に結合しリン酸化することによって微小管不安定化機能を抑制し、結果的に微小管プラス端を安定化する方向に働くことが明らかになった。

(2) Akt の活性化メカニズム : PAK は Akt 経路のスキヤフォールド分子として機能する

増殖因子による効率的な Akt の活性化に Rac が必要である事を以前に報告したが、本研究で Rac のエフェクターである PAK が直接に Akt とその活性化因子 PDK1 に結合し、PDK1 による Akt の活性化を促進する事を見出した。このような「スキヤフォールド因子」の同定は Akt 経路では初めてである。

・ Rac-PAK 経路による Akt の活性化

細胞に増殖因子や接着因子などの刺激が加わると、細胞内では PI3K が活性化し、細胞膜中のリン脂質であるホスファチジルイノシトールをリン酸化して PI(3,4)P₂、PI(3,4,5)P₃ を産生する。すると、Akt は自身の PH ドメインがこれらのリン脂質に結合することによって細胞膜へ移行し、細胞膜近傍に存在する上流キナーゼ PDK1 および TORC2 (mTOR, mLST8, Rictor, mSin1, Protor から成る複合体) によってそれぞれ Thr308 と Ser473 をリン酸化されて活性化すると考えられてきた。我々はこれまでに、細胞運動性を制御する際、Akt は低分子量 GTPase Rac/Cdc42 の下流で活性化することを見出しているが、Rac/Cdc42 の下流で Akt が活性化するメカニズムは不明であった。そこで、Rac/Cdc42 の下流でどのような分子が Akt の活性化に関与するのかを検討することにした。活性型 Rac (RacV12) の発現により Akt のリン酸化が上昇するが、CRIB ドメインに結合できない変異 (RacV12C40) を導入すると、Akt のリン酸化の上昇がコントロールレベルまで抑制された。このことから、Rac は CRIB ドメインを持つエフェクター分子を介して Akt を活性化することが示唆された。そこで我々は、CRIB ドメインを持つ Rac のエフェクター分子の中で最もよく知られている PAK が Akt の活性化に関与する可能性について検討した。RNA 干渉法を用いて PAK をノックダウンすると、活性型 Rac 過剰発現あるいは増殖因子刺激依存的な Akt の活性化が抑制されることがわかり、Rac および増殖因子刺激依存的な Akt の活性化に PAK が貢献していることが示唆された。さらに、PAK を細胞に発現するだけで Akt のリン酸化の上昇が観察された。

PAK はセリン/スレオニンキナーゼであるが、面白いことに、キナーゼ不活性型 PAK を発現した場合にも Akt が強く活性化されることがわかった。これらの結果から、PAK はキナーゼ活性非依存的に Akt を活性化することが示唆された。

・ PAK による Akt の活性化メカニズム

それでは、PAK はどのように Akt の T308 および S473 のリン酸化を促進しているのだろうか。Akt の活性化に PAK のキナーゼ活性が不要であったことから、PAK が Akt と直接相互作用するのではないかと考え、免疫共沈実験を行った。その結果、PAK が増殖因子刺激依存的に Akt と結合することが示唆された。また、リコンビナントタンパク質を用いた結合実験から、PAK と Akt が直接結合し得ることもわかった。Akt は細胞膜へ移行することで上流のキナーゼと出会い、活性化されると考えられていたため、PAK が Akt の細胞膜への移行に関与するのではないかと考えた。実際に、RNA 干渉法により PAK をノックダウンすると増殖因子刺激依存的な Akt の細胞膜への移行が抑制され、PAK が Akt の細胞膜への移行に必要であることが示唆された。もしも PAK の機能が Akt の膜移行を促進することだけであるならば、膜局在型 Akt のリン酸化にはもはや PAK が必要ないはずである。そこで、細胞に膜局在型 Akt (Akt m・PH: PH ドメインをけずり、ミリスチル化配列を付加した Akt) とともに優性抑制型 PAK を発現させ、膜局在型 Akt (Akt m・PH) のリン酸化に与える影響を調べた。膜局在型 Akt (Akt m・PH) は、これまで活性型 Akt として用いられてきた変異体であり、増殖因子非存在下でも高いリン酸化状態にある。そこに優性抑制型 PAK を共発現すると、Ser473 のリン酸化はほとんど影響を受けないのに対し、Thr308 のリン酸化は顕著に抑制される、という非常に興味深い結果が得られた。このことはつまり、Akt の S473 のリン酸化には細胞膜への移行のみで十分であるが、T308 のリン酸化には PAK が持つ何か別の機能が必要であることを意味している。PDK1 が Akt の T308 をリン酸化する唯一のキナーゼであることがわかっていたため、PAK が PDK1 と結合し、PDK1-Akt のスキヤフォールド分子として機能するのではないかと我々は考えた。実際に、免疫共沈実験およびリコンビナントタンパク質を用いた結合実験から、PAK と PDK1 も細胞内で増殖因子刺激依存的に結合し、しかも直接結合し得ることがわかった。PAK が PDK1-Akt のスキヤフォールド分子であるなら、PDK1 と Akt の結合は、PAK の発現量依存的に促進されることが期待されるが、実際に PAK の過剰発現により PDK1-Akt の結合が促進され、一方 PAK のノックダウンにより PDK1-Akt の結合が抑制された。これらの結果から、PAK が

PDK1-Akt のスキヤフォールド分子の機能も持っており、細胞膜近傍で Akt と PDK1 の結合を促進することにより Akt の T308 のリン酸化を促進することが示唆された。PAK は増殖因子刺激のない不活性な状態の時には折りたたまれた構造をしており、N 末端側に存在する AID (autoinhibitory domain) によってキナーゼドメインがマスクされているが、増殖因子刺激存在下では、活性化した Rac が N 末端側に存在する CRIB ドメインに結合することによりコンフォメーション変化を起こして開いた構造をとり、キナーゼドメインが露出して活性化型となる。PDK 1 および Akt は PAK の C 末端側に存在するキナーゼドメインに結合することから、増殖因子刺激依存的に PAK がコンフォメーション変化を起こすことにより初めて PDK1 および Akt との結合部位が露出し、スキヤフォールド分子としての機能を発揮するものと考えられる。内在性の PAK と PDK1 および Akt の結合が増殖因子刺激依存的であることもこのモデルを支持している。

・PAK による Akt の選択的機能制御

これまでに Akt 以外のシグナル伝達経路においてはいくつもスキヤフォールド分子が同定されており、シグナル伝達の効率、特異性、局在などを制御していることが知られている。そこで、PAK が PDK1-Akt のスキヤフォールド分子として働くことにより、Akt の活性化効率だけでなくシグナルの特異性も制御する可能性があるのではないかと考えた。まず、PAK が Akt の一部の基質のリン酸化を特異的に制御する可能性について検討した。優性抑制型 PAK の発現により PAK 依存的な経路を阻害すると、増殖因子刺激による Akt の活性化が部分的に抑制されるが、このとき Akt の基質である FOXO3a のリン酸化は顕著に抑制される一方で、GSK3 および Bad のリン酸化はほとんど抑制されない、という結果が得られた。さらに、PAK が Akt の一部の生物学的機能を選択的に制御する可能性についても検討を行ったところ、PDGF 刺激依存的な繊維芽細胞のマトリゲルへの浸潤については優性抑制型 Akt も優性抑制型 PAK も同様に阻害するのに対し、タンパク質の翻訳や細胞の生存率については、優性抑制型 Akt では阻害されるが優性抑制型 PAK では比較的阻害されないこともわかった。従って、PAK が何らかのメカニズムで Akt の基質特異性を制御し、Akt の細胞運動性/浸潤能に関わる機能を選択的に制御している可能性が示唆された。PAK が Akt の基質特異性を制御するメカニズムとして、(i) PAK が Akt の局在を規定することにより Akt の基質特異性を決める可能性、(ii) PAK が Akt の一部の基質にも結合することにより、Akt の一部の基質が選択的に活性

化される可能性、(iii) PAK が Akt のアイソフォーム特異的にスキヤフォールド分子として機能することにより、Akt の下流シグナルの特異性が変化する可能性、などが考えられる。すでに(iii)の可能性に関連して、PAK が Akt2 に比べ Akt1 とより効率的に結合し、リン酸化を促進する、という結果も得られた。さらに細胞運動性についても検討したところ、Rac および PAK によって上昇した細胞運動性は、Akt1 のノックダウンにより完全に阻害されるが、Akt2 のノックダウンではほとんど阻害されないことがわかった。以上の結果から、哺乳類繊維芽細胞において、増殖因子刺激の下流で Rac-PAK-PDK1-Akt1 という経路を介して細胞運動性が制御されている可能性が示唆された。

考察

癌の発生および悪性化の過程において、しばしば生存・増殖・運動などに関わる細胞内シグナル伝達の異常な活性化が大きな要因となる。例えば原癌遺伝子 Akt も、正常な個体であれば細胞の生存・増殖・運動を厳密に制御する重要なシグナル伝達分子であるが、乳癌、膀胱癌、子宮癌など様々な癌においては遺伝子増幅や上流因子の遺伝子変異により異常に活性化することで癌に寄与している。また、Akt の異常な活性化は種々の抗癌剤耐性とも相関が高いことが報告されている。従って、Akt 経路は癌の発生、悪性化、抗癌剤耐性における薬剤ターゲットとして有効であると考えられ、実際に多くの Akt 経路を抑制する薬剤が開発されつつある。しかし、Akt 経路を制癌の薬剤ターゲットとする際に、非常に大きな問題点がある。すなわち、Akt 経路は正常細胞の増殖・生存に必須である上に、Akt の遺伝子破壊は発生などに重篤な症状を示す事からも、Akt 経路をやみくもに抑制することは生体にとって有害となる可能性が高いと考えられるのである。そこで「Akt の過度な活性化を抑制する」あるいは「Akt の癌悪性化により関わりの深い機能のみを抑制する」というストラテジーが Akt 依存的な癌悪性化を制圧するのに有効であると考えられる。

Akt が癌悪性化を引き起こす原因は必ずしも明らかでなかったが、癌の浸潤性と関連して我々は、Akt が低分子量 GTPase Rac/Cdc42 の下流で活性化し、哺乳類細胞の運動性制御に必須の役割を果たすことを報告した

(Higuchi et al. *Curr Biol* 2001)。また、細胞運動性の制御の際、leading edge において Rac はエフェクター分子のひとつ PAK を介して Akt を活性化していることを示唆する結果を得た (Higuchi et al. *Nat Cell Biol* 2008)。ここで重要な事に、PAK は Akt の細胞運動性に関する機能を促進する一方で、生存

やタンパク質合成促進に関する機能にはほとんど影響しないことがわかった。従って、「PAKに依存したAktの活性化のみを抑制する」というストラテジーが、上記のアイデアに基づいたAkt依存的な癌を制圧する方法として期待出来るのではないかと現在考えている。

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10件)

① Kuwahara, A., Hirabayashi, Y., Knoepfler, P.S., Taketo, M.M., Sakai, J., Kodama, T., and Gotoh, Y. Wnt signaling and its downstream target N-Myc regulate basal progenitors in the developing neocortex. *Development* 137(7), 1035-44, 2010. 査読あり

② Hirabayashi, Y., Suzuki, N., Tsuboi, M., Endo, T.A., Toyoda, T., Shinga, J., Koseki, H., Vidal, M. and Gotoh, Y. Polycomb limits the neurogenic competence of neural precursor cells to promote astrogenic fate transition. *Neuron* 63, 600-613, 2009. 査読あり

③ Oishi, K., Watatani, K., Itoh, Y., Okano, H., Guillemot, F., Nakajima, K. and Gotoh, Y. Selective induction of neocortical GABAergic neurons by the PDK1-Akt pathway through activation of Mash1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 13064-13069, 2009. 査読あり

④ Higuchi, M., Onishi, K., Yoneyama, C. and Gotoh, Y. Scaffolding function of PAK in the PDK1-Akt pathway. *Nat. Cell Biol.* 10, 1356-1364, 2008. 査読あり

⑤ Kawaguchi, D., Yoshimatsu, T., Hozumi, K. and Gotoh, Y. Selection of differentiating cells by different levels of delta-like 1 among neural precursor cells in the developing mouse telencephalon. *Development* 135, 3849-3858, 2008. 査読あり

⑥ Mori, Y., Higuchi, M., Hirabayashi, Y., Fukuda, M. and Gotoh, Y. JNK phosphorylates Syt 4 and enhances Ca²⁺-evoked release. *EMBO J.* 27, 76-87, 2008. 査読あり

⑦ Itoh, Y., Masuyama, N., Nakayama, K., Nakayama, K.I. and Gotoh, Y. The cdk inhibitors p57 and p27 regulate neuronal migration in the developing mouse neocortex. *J. Biol. Chem.* 282, 390-396, 2007. 査読あり

⑧ Onishi, K., Higuchi, M., Asakura, T., Masuyama, N., and Gotoh, Y. The PI3K-Akt pathway promotes microtubule stabilization in migrating fibroblasts. *Genes to Cells* 12, 535-546, 2007. 査読あり

⑨ Yoshimatsu, T., Kawaguchi, D., Oishi, K., Takeda, K., Akira, S., Masuyama, N. and Gotoh, Y. Non-cell-autonomous action of STAT3 in maintenance of neural precursor cells in the mouse neocortex. *Development* 133, 2553-2563, 2006. 査読あり

⑩ Sunayama, J., Tsuruta, F., Masuyama, N. and Gotoh, Y. JNK antagonizes Akt-mediated survival signals by phosphorylating 14-3-3. *J. Cell. Biol.* 170, 295-304, 2005. 査読あり

[学会発表] (計5件)

① Yukiko Gotoh: Regulation and functions of the Akt/PKB pathway, AACR/JCA Joint Conference, Hilton Waikoloa Village, Waikoloa, Hawaii, February 5-9, 2010

② Yukiko Gotoh: Temporal regulation of neural stem cell fate in the mouse developing neocortex, The International Society for Stem Cell Research 8th Annual Meeting, Preinary lecture, Centre Convencions Internacional Barcelona, Spain, July 8-11, 2009

③ Yukiko Gotoh: Polycomb regulation of neural stem cell fate, Keystone Symposia, Chromatin Dynamics and Higher Order Organization, Coeur d'Alene Resort, Coeur d'Alene, Idaho, USA, February 25 - March 2, 2009

④ Yukiko Gotoh: Temporal regulation of neocortical neural precursor cell fate, Gordon Research Conference "Molecular and Cellular Neurobiology", The Hong Kong University of Science & Technology, Hong Kong, June 8-13, 2008

⑤ Yukiko Gotoh: Regulation and function of

Akt, The Federation of American Societies
for Experimental Biology (FASEB),
SUMMER RESEARCH CONFERENCES.
Hyatt Grand Champions Resort & Spa,
Indian Wells Lane, Indian Wells, CA. July
7-12, 2007

[その他]
ホームページ等
<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/celltech/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 由季子 (GOTOH YUKIKO)

東京大学・分子細胞生物学研究所・教授

研究者番号：70252525

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：