

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22370046

研究課題名（和文） 新規 Akt 特異的ユビキチンリガーゼによる細胞死制御機構の解明

研究課題名（英文）

Modulation of Akt kinase activity by ubiquitination

研究代表者

野口 昌幸（NOGUCHI MASAYUKI）

北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授

研究者番号：40359477

研究成果の概要（和文）：

インフルエンザウイルスの NS1 蛋白が AKT と結合その活性化を促していることを確認した。この結果、AKT シグナルの抑制により、インフルエンザウイルスの治療に役立てる可能性が明らかになった。また、protooncogene TCL1b が TCL1 同様に Akt 活性化補助因子として機能し、bioinformatics 解析により高い相同性が認められた。TCL1b transgenic mouse は致死的な angiosarcoma を発症した。ヒト angiosarcoma ならびに他の悪性腫瘍において、TCL1b とリン酸化 Akt が活性化され、TCL1b 由来 Akt 阻害性剤を用いて細胞増殖を抑え、治療に役に立つ可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

Serine threonine Akt is a core intra-cellular survival regulator. In this study, we demonstrated that the functional interaction of NS1 with Akt and clarified that the functional importance of influenza virus NS1 with Akt in biochemical analysis. The results together supported the functional importance of influenza virus NS1 with Akt.

We clarified that TCL1b functions as an Akt kinase co-activator and exhibits oncogenicity both in vitro and in vivo using biochemical analysis, bioinformatics, and generation of TCL1b transgenic mice which resulted in angiosarcoma. By immunohistochemistry, most of human angiosarcoma samples and various cancer tissues were positively stained by both anti-TCL1b and anti-phospho-Akt antibodies. Moreover, TCL1b structure-based inhibitor “TCL1b-Akt-in” inhibited Akt kinase activity, hence, suppressed cellular proliferation of sarcoma. The current study disclosed TCL1b bears oncogenicity, and hence serves as a novel therapeutic target for human neoplastic diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2011 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2012 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：AKT・蛋白分解

## 1. 研究開始当初の背景

私たちの研究室では、細胞死の制御の要であるセリンスレオニンキナーゼ AKT の活性化機構について特にその結合分子による活性化の修飾機構についての研究を進めている。セリンスレオニンキナーゼ Akt は細胞内の細胞死制御の要の分子として細胞反応の様々な機能制御因子として重要な働きをしている。私たちはこれまでの研究の中で同定した新規 Akt 特異的 E3 リガーゼを標的とする *in vivo* での機能解析計画のもとに研究を進めた。当初 AKT に結合するユビキチンリガーゼ TTC3 に関する AKT 活性化修飾機構についての研究を進めてきた。この方向での研究の中で TTC3 を ubiquitous に過剰発現する transgenic mouse ならびに Cre-Lox を用いたノックアウトマウスを作製その *in vivo* での機能解析を進める予定であった。TTC3 を過剰発現する transgenic mouse は beta-actin promoter を用いた ubiquitous に発現を期待できる construct を用いて作成を試みた。

50 匹をこえる作成の試みかかわらず、genotype 陽性のマウスは 5 ラインの founder が得られたものの、TTC3 タンパク発現するマウスは 1 ラインも得られなかった。この原因としては細胞死を制御する Akt 分子の分解を分解する機能があることから、タンパク発現をするマウスが embryo の段階で正常に生育しないことが推測された。また、Cre-Lox を用いたノックアウトマウスを作製は、germ line への導入が得られなかった。この原因としては、ES への導入により、Embryo の生育が妨げられていることが推測された。

このため、Cre-Lox を用いない、通常のノックアウトマウスに切り替えてその construct 制作を試みている段階である。

これらの不測の事態により、当初の計画通りの TTC3 遺伝子の解析の遂行は困難となったので、我々は、新規 Akt 特異的ユビキチンリガーゼと同じ Akt を bait とする yeast two hybrid 法により同定した Akt に対する結合因子である protooncogene TCL1b ならびに同じく Akt に結合するインフルエンザウイルスのコードするの機能蛋白である NS1

(Non-structural protein 1) の生物機能解析を進めることとした。

## 2. 研究の目的

AKT シグナルとインフルエンザに関してはインフルエンザウイルスが産生する蛋白の中の 1 つである NS1 蛋白 (Nonstructural protein 1) は様々な細胞内の蛋白や dsRNA

に結合して細胞内シグナル伝達レベルで IFN 誘導性遺伝子などの発現を抑制し、その機能を修飾することが知られている。NS1 は PI3K の p85 $\beta$  と結合し下流にシグナルを伝えることが知られている。NS1 には AKT によりリン酸化される可能性のある部位が存在することに着目した。

この NS1 による AKT シグナル伝達系の修飾機構を制御することにより、インフルエンザウイルスの感染における病態を人為的に修飾し、治療に役立てる可能性について明らかにすることを目的とした。

また、protooncogene TCL1b はヒトリンパ芽球性白血病において chromosome 転座により T 細胞受容体下流に転座活性化されることが知られている。しかし、その機能、とくに発癌機構への関与に関しては十分に解析されていない。

ここでは protooncogene TCL1b が細胞死制御の要の細胞内因子である Akt の活性化補助因子として機能しているか否か、そして、発がんにどのように寄与しているかを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### インフルエンザウイルスのコードする NS1 蛋白の AKT シグナル伝達系における役割について

- (1) インフルエンザウイルスのコードする結合分子と AKT との結合活性を、細胞内在性タンパク質あるいは過剰発現系によって得られたタンパク質を用いて、免疫共沈法により検討する。
- (2) NS1 タンパクと AKT との結合に関する、AKT 活性の関与を明らかにする。
- (3) NS1 蛋白による AKT 活性への修飾効果細胞周期との関係を検証する。
- (4) TOF-MS 法を用いて AKT による NS1 蛋白のリン酸化部位を同定する。

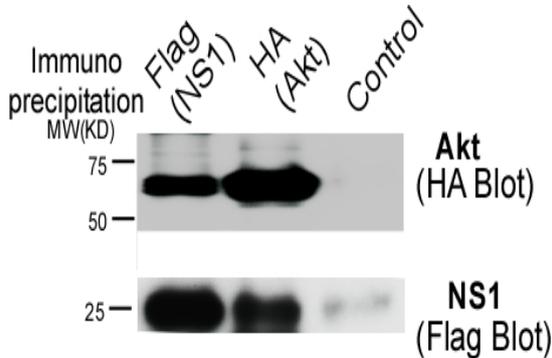
### Protooncogene TCL1b の発がんに関する機能解析について

- (1) AKT との結合性をあきらかにする。
- (2) AKT 活性化に及ぼす効果を検証する。
- (3) Transcriptome 解析に基づく Bioinformatics を用いたにより、AKT 活性化との関係を明らかにする。
- (4) TCL1b を過剰発現する transgenic mouse を作製し、その *in vivo* での解析を行う。
- (5) ヒト sarcoma をふくめた悪性腫瘍における TCL1b と AKT 活性化の比較検証を行う。

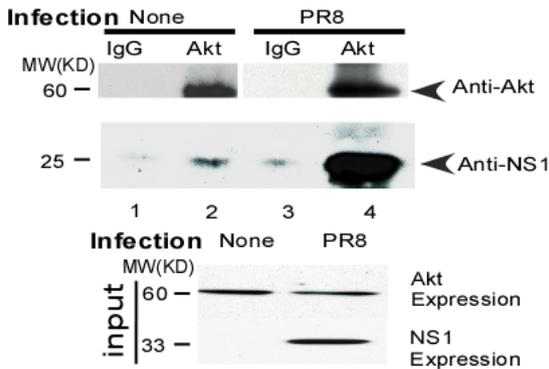
(6) TCL1b の構造に基づく AKT 活性化阻害剤を用いて腫瘍増殖効果を検証する。

#### 4. 研究成果

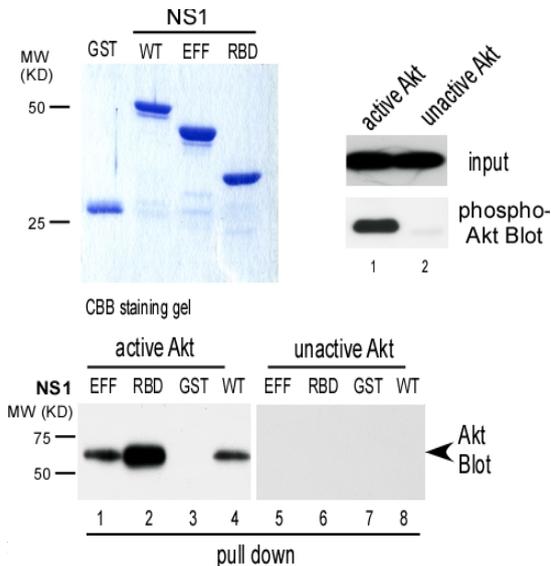
(1) HEK293 細胞を用いた過剰発現系において NS1 タンパクと AKT との結合性についての検証を行った。その結果この NS1 蛋白は AKT と結合することを見出した。



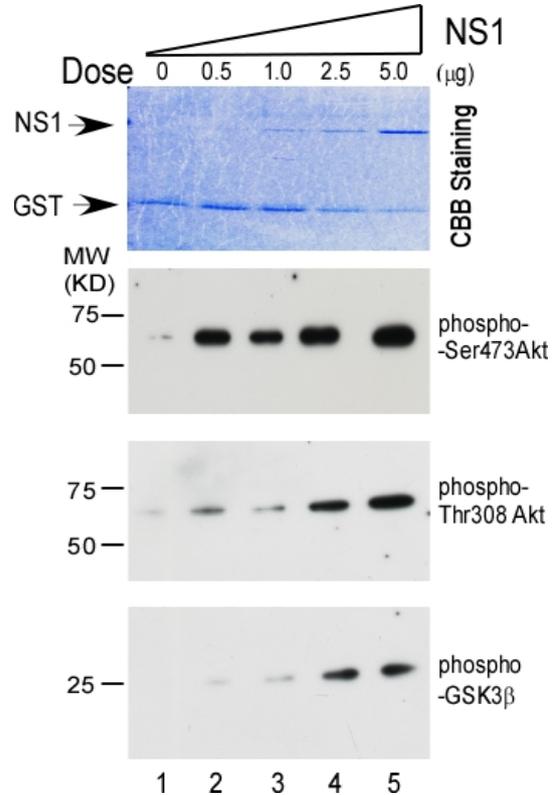
次にインフルエンザ感染細胞を用いて NS1 タンパクと AKT との結合性について検証した。



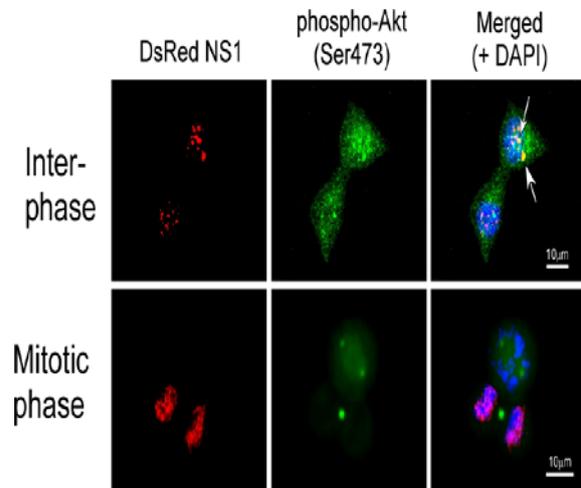
(2) 次にリコンビナント活性型 AKT と非活性型 AKT を作製し、その結合性に差がみられるかを検証した。その結果、活性型 AKT に高い結合性がみられることが判明した。



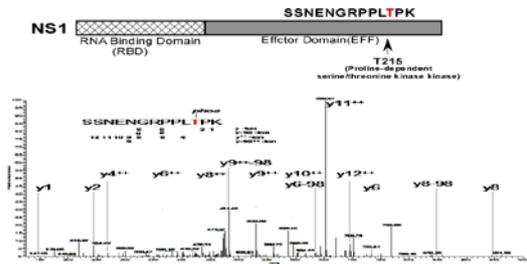
(3) 次に、NS1 タンパクが AKT の活性化を増強するか否かを検証した。In vitro kinase assay において、NS1 タンパク容量依存的に AKT の活性化が増強することがかんさつされた。



(4) 共焦点顕微鏡を用いて細胞周期との関係を検証した。その結果 inter phase において NS1 タンパクが AKT と結合していることが判明した。

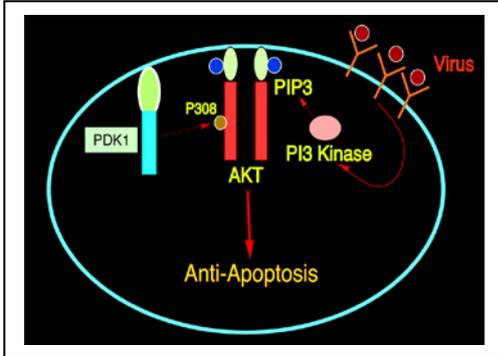


(5) 次に AKT による NS1 タンパクのリン酸化部位に関して TOF-MS 法による同定を試みた。その結果、NS1 タンパクの Thr215 が特異的にリン酸化されることが判明した。



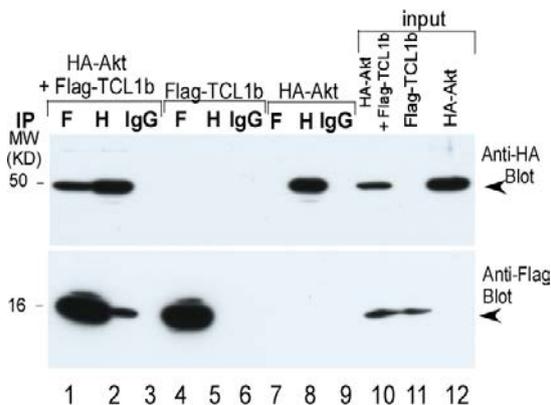
まとめ

AKT が NS1 タンパクによりリン酸化されることにより、インフルエンザウイルスの宿主である細胞の生存率を上げ、ウイルスの増殖に寄与している可能性が示唆された。



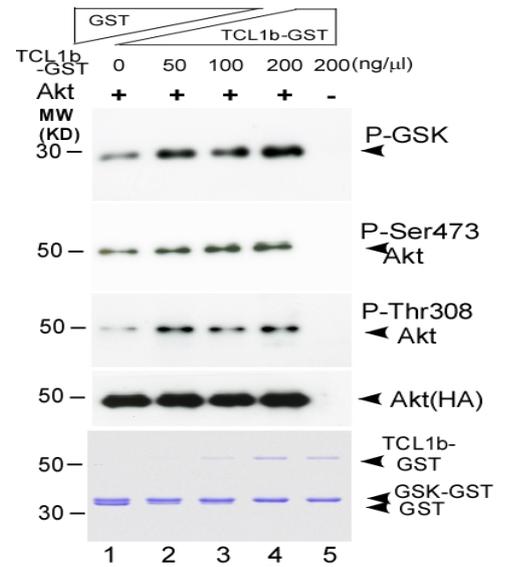
### Protooncogene TCL1b の発がんに関する機能解析について

(1) まず、HEK293 細胞を用いた免疫共沈法により AKT と TCL1b との結合性を検証した。その結果、AKT と TCL1b との結合性が確認できた。



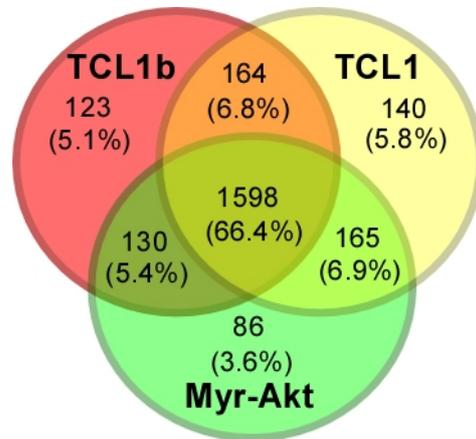
(2) 次に TCL1b による AKT 活性化に及ぼす効果を検証した。その結果リコンビナント TCL1b を用いた in vitro Kinase assay に

おいて TCL1b は容量依存的に AKT を活性化することが判明した。



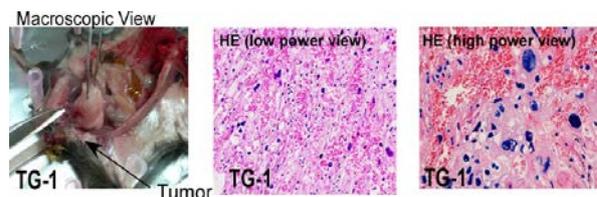
(3) Transcriptome 解析に基づく Bioinformatics を用いた解析により、AKT 活性化との関係を検証した。

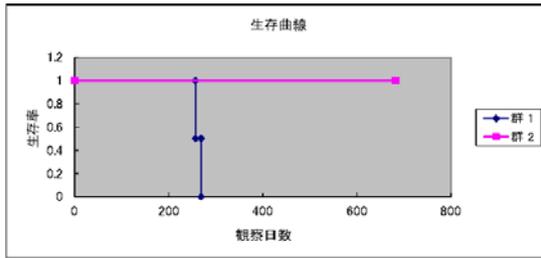
その結果、TCL1b は恒常活性化型 AKT と類似した遺伝子群を誘導した。



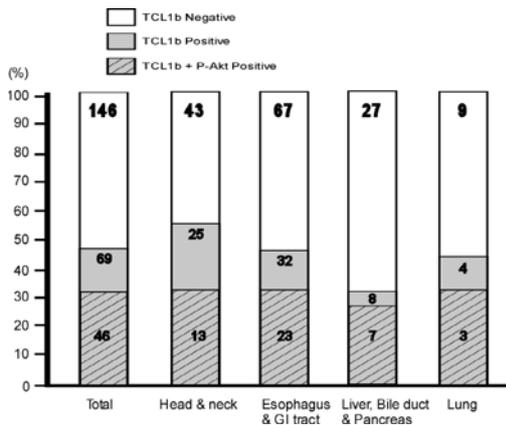
(4) TCL1b を過剰発現する transgenic mouse を作製し、その in vivo での解析を行った。

その結果、独立した 2 つの founder ラインで小腸血管由来の angiosarcoma を呈し 8 か月で死亡した。

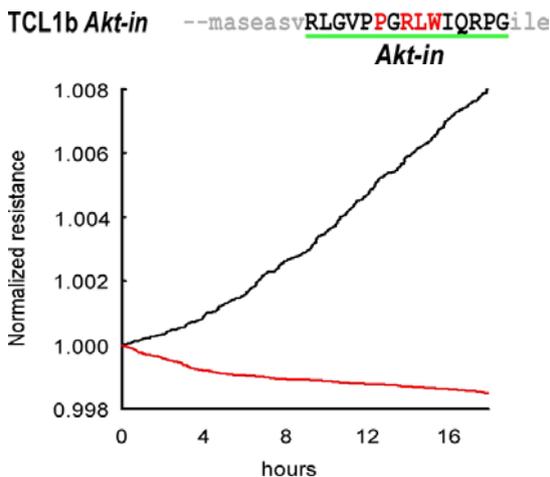




(5) ヒト sarcoma をふくめた悪性腫瘍における TCL1b と AKT 活性化の比較検証を行った。69/146 の症例で TCL1b がそのうち 46 例ではリン酸化 TCL1b と AKT も共に陽性であった。



(6) TCL1b の構造に基づく AKT 活性化阻害剤を用いて腫瘍増殖効果を検証した。TCL1b の構造に基づく AKT 活性化阻害剤 TCL1b-Akt-in は sarcoma 細胞の増殖を効果的に抑制した。



以上の結果より、TCL1b は AKT 活性化補助因子として angiosarcoma をはじめとする悪性腫瘍の発症に関与しており、治療の分子標的となる可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- ① N. Hirata, H. Ogura, M. Satoh, M. Noguchi, M. Matsumoto, H. Togashi, K. Onoe, K. Iwabuchi, Y. Yanagawa: The role of tumor necrosis factor- $\alpha$  for interleukin-10 production by murine dendritic cells. Cell Immunol. 266, 165-171 ; 2011

査読有

- ② M. Matsuda, F. Suizu, N. Hirata, T. Miyazaki, C. Obuse, M. Noguchi: Characterization of the interaction of Influenza virus NS1 with Akt. Biochem Biophys Res Commun. 2010;395:312-317 査読有

- ③ N. Hirata, Y. Yanagawa, M. Satoh, H. Ogura, T. Ebihara, M. Noguchi, M. Matsumoto, H. Togashi, T. Seya, K. Onoe, K. Iwabuchi: Dendritic cell-derived TNF- $\alpha$  is responsible for development of IL-10-producing CD4+ T cells. Cell Immunol. 2010;261: 37-4 査読有

査読有

〔学会発表〕(計 17 件)

- ① 野口昌幸: ウィルス感染症における TCL1B による AKT シグナル伝達系の活性化機構 第 86 回日本感染症学会 2012/4/25 長崎市・長崎ブリックホール

- ② M. Hashimoto, M. Matsuda F. Suizu, T. Nagamine, N. Hirata, H. Noguchi, S. Tanaka, W. Tokuyama, M. Noguchi: Protooncogene TCL1b functions as an AKT kinase co-activator that exhibits oncogenic potency in vivo. 第 71 回日本癌学会学術集会 2012/9/19~21 札幌市・札幌コンベンションセンター

- ③ 野口昌幸, 水津太: Modulation of the Akt signal by its binding proteins. 第 35 回分子生物学会 2012/12/11~14 福岡市・福岡国際会議場

- ④ M Hashimoto, F. Suizu, W. Tokuyama, H. Noguchi, M. Matsuda, N. Hirata, T. Nagamine, S. Tanaka, M. Noguchi: Protooncogene TCL1b Functions as An Akt Kinase Co-activator that Exhibits Oncogenic Potency In Vivo. 第 35 回分子生物学会 2012/12/11~14 福岡市・福岡国際会議場

- ⑤ M. Matsuda, Suizu F, Hirata N, Miyazaki T, Obuse C, Noguchi M :  
Characterization of the interaction of Akt with virus NS1. Keystone Symposia, 2011/2/13~18 Keystone Resort (コロラド・米)
- ⑥ M. Hashimoto, F. Suizu, W. Tokuyama, H. Noguchi, M. Matsuda, N. Hirata, T. Nagamine, S. Tanaka, M. Noguchi :  
Characterization of protooncogene TCL1b as an Akt kinase co-activator. CSHL Meeting. 2011/10/11~15 Cold Spring Harbor Laboratory. (ニューヨーク・米)
- ⑦ M. Matsuda, F. Suizu, N. Hirata, T. Miyazaki, C. Obuse, M. Noguchi :  
Characterization of the interaction of influenza virus NS1 with Akt. 国際微生物学連合 2011 会議 2011/9/11~16 札幌市・札幌コンベンションセンター
- ⑧ 野口 昌幸 : インフルエンザウイルス感染症における感染宿主細胞の AKT とインフルエンザ NS1 蛋白結合の機能的解析 第 85 回日本感染症学会総会 2011/4/21~22 東京・ザ・プリンス パークタワー東京
- ⑨ M. Matsuda, F. Suizu, N. Hirata, T. Miyazaki, C. Obuse, M. Noguchi :  
Characterization of the interaction of influenza virus NS1 with Akt. 国際微生物学連合 2011 会議 2011/9/11~16 札幌市・札幌コンベンションセンター
- ⑩ M. Hashimoto, F. Suizu, M. Matsuda, N. Hirata, M. Noguchi : プロトオンコジーン TCL1b の生物機能解析 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011/10/3~5 名古屋市・名古屋国際会議場
- ⑪ Hirata, Y. Yanagawa, K. Iwabuchi, M. Sato, H. Ogura, K. Onoe, M. Noguchi :  
TNF- $\alpha$  drives IL-10 production in murine dendritic cells. 第 40 回日本免疫学会学術集会 2011/11/27~29 千葉市 (幕張メッセ)
- ⑫ M. Hashimoto, F. Suizu, M. Matsuda, N. Hirata, M. Noguchi : プロトオンコジーン TCL1b の AKT 活性化補助因子としての役割につ
- いて第 34 回日本分子生物学会年会 2011/12/13~16 横浜市・パシフィコ横浜
- ⑬ Hirata, Y. Yanagawa, K. Iwabuchi, M. Satoh, H. Ogura, T. Seya, K. Onoe, M. Noguchi :  
The role of dendritic cell-produced TNF- $\alpha$  in generation of IL-10-producing CD4+T cells. 14TH INTERNATIONAL CONGRESS OF IMMUNOLOGY, Kobe, Japan, 2010/8/24 神戸市・神戸国際展示場
- ⑭ 野口 昌幸 : ユビキチン化による AKT の活性化制御の仕組み 第 69 回日本癌学会学術総会, 2010/9/22~24 大阪市・大阪国際会議場
- ⑮ 水津 太 : TTC による Akt 活性調節機構の解析 第 69 回日本癌学会学術総会, 2010/9/22~24 大阪市・大阪国際会議場
- ⑯ F. Suizu, Y. Hiramuki, F. Okumura, M. Matsuda, A. Okumura, N. Hirata, M. Narita, T. Kohono, J. Yokota, M. Bohgaki, C. Obuse, S. Hatakeyama T. Obata, M. Noguchi : ユビキチン化による AKT 活性の調節メカニズムの解析 第 33 回日本分子生物学会, 2010/12/7~10 神戸市・神戸ポートアイランド
- ⑰ M. Matsuda, F. Suizu, N. Hirata, T. Miyazaki, C. Obuse, M. Noguchi :  
Characterization of the interaction of influenza virus NS1 with Akt 第 33 回日本分子生物学会, 2010/12/7~10 神戸市・神戸ポートアイランド
- [図書] (計 1 件)  
M. Noguchi & F. Suizu. Regulation of Akt by phosphorylation of distinct threonine and serine residues Threonine:Structure, Biosynthesis and Functions; Advances in Medicine and Biology. 47 Nova Science Publishers, New York. USA ,139-162;2011
6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
野口 昌幸 (NOGUCHI MASAYUKI)  
北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授  
研究者番号 : 40359477  
(2) 研究分担者  
水津 太 (SUIDU FUTOSHI)  
北海道大学・遺伝子病制御研究所・講師  
研究者番号 : 90431379