

令和元年6月7日現在

機関番号：32686

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K06990

研究課題名(和文) 原癌遺伝子Aktによる微小管安定化を介した細胞極性制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Regulation of cell polarity by proto-oncogene Akt

研究代表者

樋口 麻衣子 (HIGUCHI, Maiko)

立教大学・理学部・助教

研究者番号：30420235

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：炎症部位への免疫細胞の動員や創傷治癒など、生体内で起こる多くの現象において細胞が正しい方向に遊走することが重要であるが、そのメカニズムには不明な点が多く残されている。本研究では、PI3K-Akt経路が微小管の安定化を介して細胞の運動方向を制御する可能性について検討し、EB2/RP1という微小管結合分子を介して細胞の運動方向を制御する可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、細胞外の環境に応じて細胞が運動方向を決定する、という細胞にとって非常に重要な機構の解明に貢献することが出来た。さらに、Aktの異常な活性化は癌悪性化と関連が深いため、本研究の成果はAkt依存的な癌悪性化を制圧するための薬剤ターゲットの提供にもつながると考えている。

研究成果の概要(英文)：Directed cell migration is important for various cellular processes including immune response, tissue development and tissue repair. However, the underlying mechanisms are still not fully understood. In this study, we examined the roles of the PI3K-Akt pathway in the regulation of microtubule dynamics and found Akt1 can phosphorylate EB2/RP1, a member of EB family microtubule associated proteins. We are now trying to understand the molecular mechanisms by which EB2/RP1 regulates microtubule dynamics and the relationships between Akt1 and EB2/RP1.

研究分野：細胞生物学

キーワード：Akt 微小管 細胞極性 細胞運動

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

化学物質(走化性因子)によって導かれる方向性を持った運動は、炎症部位への免疫細胞の動員や創傷治癒など生体内で起こる多くの現象に関与している。細胞は正しい方向に遊走するために、細胞外にある走化性因子の濃度差を感知して前後の極性を形成する。好中球など、運動性が非常に高い細胞においては、前後の極性形成が運動方向の決定に重要である。一方、繊維芽細胞のように比較的ゆっくり動く細胞においては、細胞外の走化性因子の濃度勾配に応じた前後の極性形成とそれに引き続く細胞極性の維持が重要である。繊維芽細胞の極性維持には細胞前方における微小管の選択的な安定化が重要な役割を果たすと考えられているが、細胞前方の微小管が安定化されるメカニズムについてはほとんど明らかになっていなかった。

### 2. 研究の目的

研究代表者は、PI3Kの下流で活性化したPDK1-Akt1経路が、繊維芽細胞の運動に必須の役割を果たしていること、さらに運動方向先端部で活性化したPI3K-Akt1経路が微小管の安定化に必須であることを報告していた。そこで本研究では、Akt1による微小管安定化メカニズムの詳細を明らかにすることにより、細胞外の環境に応じて細胞が前後の極性を形成・維持するメカニズムを解明することを目的とした。

また、運動方向前方における微小管の選択的な安定化については、先端部に局在する何らかの分子が一部の微小管を捕捉することで選択的な安定化が引き起こされる、というモデルが古くから提唱されているものの、その分子メカニズムについては不明な点が多く残されている。本研究においてAkt1が微小管を安定化するメカニズムを明らかにすることで、古くからの課題である微小管動態の分子的基盤の重要な部分を解明することにもつながると考えた。

### 3. 研究の方法

PI3K-Akt1経路が微小管の安定化を制御する際の基質分子について検討するため、Akt1結合分子の探索を行った。得られた基質候補分子について、実際にAkt1によってリン酸化されるかどうか、リン酸化されることで分子の機能にどのような変化が起きるのか、について生化学的な実験を行い検討した。

また、微小管動態を観察するため、微小管可視化プローブ EMTB-GFP および tubulin-GFP 発現細胞のライブイメージングを行い、微小管動態の詳細な観察および計測を行った。

### 4. 研究成果

研究代表者は、PI3K-Akt1経路が微小管の安定化に重要な役割を果たすことを明らかにしていたが、Akt1が微小管の安定化を促進するメカニズムについては分かっていなかった。そこでまず、Akt1が微小管動態を制御する際の基質分子について検討するため、Akt1の結合分子の探索を行った。得られたAkt1結合分子の中で、微小管関連分子であり、かつAkt1のリン酸化コンセンサス配列を有する分子、という条件で絞り込みを行ったところ、Akt1の基質候補分子としてEBファミリーに属する分子EB2/RP1が得られた。そこで、実際にEB2/RP1がAkt1によってリン酸化されるかどうか検討したところ、EB2/RP1の2カ所のセリン/スレオニン残基がAkt1によって効率良くリン酸化されることが分かり、EB2/RP1がAkt1の新規基質であることが明らかとなった。

同じEBファミリーに属するEB1が微小管の重合を促進し、微小管を安定化する機能を持つことが明らかにされているのに対し、EB2/RP1はその機能がほとんど分かっていない分子であった。

そこで次に、EB2/RP1 の機能を明らかにすることを目指した。EB2/RP1 をノックダウンした細胞の微小管を観察したところ、非常に興味深いことに、微小管が著しく安定化していることが明らかとなった。さらに、微小管沈降アッセイを行うことにより、EB2/RP1 ノックダウン細胞において安定化微小管の量が増えていることも確かめられ、EB2/RP1 は微小管を不安定化する分子であることが示唆された。これは、同じ EB ファミリーに属する EB1 が微小管を安定化するのに対し、EB2/RP1 は逆の機能を持つという、非常に興味深い結果であった。

微小管は常に伸長と退縮を繰り返す非常に動的な細胞骨格で、その動態は微小管の伸長 (growth) と短縮 (shrink)、伸長から短縮への変換 (catastrophe)、短縮から伸長への変換 (rescue) という4つのパラメータで表すことが出来る。この微小管動態の詳細な観察、計測を行うために、微小管可視化プローブとして EMTB-GFP および tubulin-GFP を、また微小管のプラス端に結合する EB1 の可視化プローブ EB1-GFP を用いて、これらのプローブの発現細胞のライブイメージングを行った。その結果、EB2/RP1 ノックダウン細胞の微小管では微小管の短縮 (shrink) および伸長から短縮への変換 (catastrophe) が阻害されている、という予備的な結果が得られた。

以上、本研究ではまず Akt1 が微小管を制御する際の基質候補分子として EB2/RP1 を見出した。EB2/RP1 は機能がほとんど分かっていない分子であったが、本研究の結果より、EB2/RP1 が微小管を不安定化する分子であること、さらに微小管動態のうち微小管の短縮 (shrink) および伸長から短縮への変換 (catastrophe) を制御する分子であることが明らかとなった。これらの結果をもとに、今後は Akt1 によるリン酸化を受けることにより EB2/RP1 の機能がどのように変化するのかについて明らかにし、Akt1 が微小管動態を制御する分子メカニズムについてより詳細に検討を行うことで、細胞外環境(走化性因子の濃度勾配)に応じて細胞が運動方向を決定するという、細胞にとって非常に重要な機構の解明に貢献出来ると考えている。さらに、Akt の異常な活性化は癌悪性化と関連が深いため、本研究の成果は Akt 依存的な癌悪性化を制圧するための薬剤ターゲットの提供にもつながると考えている。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Itoh Y., Higuchi M., Oishi K., Kishi Y., Okazaki T., Sakai H., Miyata T., Nakajima K. and Gotoh Y. : PDK1-Akt pathway regulates radial neuronal migration and microtubules in the developing mouse neocortex., 査読有, Proceedings of the National Academy of Sciences 113, E2955-2964, 2016
- ② Okazaki T., Higuchi M., Takeda K., Iwatsuki-Horimoto K., Kiso M., Miyagishi M., Yanai H., Kato A., Yoneyama M., Fujita T., Taniguchi T., Kawaoka Y., Ichijo H. and Gotoh Y. : The ASK family kinases differentially mediate induction of type I interferon and apoptosis during the antiviral response., 査読有, Science Signaling 8, RA78, 2015

[学会発表] (計 4 件)

- ① 樋口麻衣子、大西啓介、後藤由季子: Novel mechanism of regulation of microtubule dynamics by EB2/RP1 microtubule binding protein、第70回日本細胞生物学会大会、2018
- ② 西春佳、カン洪月、西川紗織、後藤由季子、樋口麻衣子 : 原癌遺伝子 Akt による上皮細胞間

接着の制御機構の解明、2017 年度生命科学系学会合同年次大会（第 40 回分子生物学会年会）、2017

③ 樋口麻衣子、大西啓介、久保田紘史、後藤由季子：微小管結合分子 EB2/RP1 による微小管動態制御、第 69 回日本細胞生物学会大会、2017

④ カン洪月、西川沙織、後藤由季子、樋口麻衣子：原癌遺伝子 Akt による E-カドヘリンを介した細胞間接着制御メカニズムの解明、第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会、2015

〔図書〕（計 1 件）

① 樋口麻衣子 他、医学書院、生体の科学 66(5)、2015、614(418-419)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。