

平成 31 年 4 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20872

研究課題名(和文)新規リソソーム局在性Akt結合因子によるオートファジー誘導

研究課題名(英文)Induction of autophagy via novel lysosomal localized Akt binding molecule

研究代表者

平田 徳幸(Noriyuki, HIRATA)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教

研究者番号：40595956

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、新規Akt結合分子としてリソソーム膜分画に存在するリン酸化酵素VRK2を同定し、オートファジーを制御すると予想される。本研究ではリソソーム上に存在するAktとVRK2の活性に依存した、新規のオートファジー誘導分子メカニズムを解明することを目的とした。まず、VRK2発現抑制細胞株を、蛍光顕微鏡とイムノプロットイングにて解析すると、代表的なオートファジー測定分子であるLC3 punctaの数及びLC3II/Iの比、p62の減少が抑制された。また、VRK2はリソソーム酵素活性を増加させており、オートファジー最終段階である蛋白分解に関与することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、一般的にAktの下流のシグナルに存在するmTORC1が介するオートファジー誘導機構に、mTORC1を介さず、リソソーム膜上においてVRK2にAktが結合した複合体によりAkt活性を維持して誘導される機構が解明され、新たなオートファジー誘導の仕組みとして学術的な意義を持つと考える。また、この成果により、オートファジー異常の代表疾患、特に中枢神経系疾患であるアルツハイマー病、ハンチントン病、パーキンソン病に悩む患者に対する新たな治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：I identified VRK2 as the serine/threonine kinase binding lysosomal localized Akt. VRK2 is predicted control of induction of autophagy. In this study, I performed a research project aimed at the novel mechanism of autophagy induction via activity of Akt and VRK2 on lysosomal membrane. The index of autophagy induction (LC3 puncta, LC3II/I conversion and p62 reduction) in VRK2 shRNA-treated cells were reduced as compare to control cells. And also, I determined that the lysosomal enzymatic activity to protein degradation as the final step of autophagy is enhanced by VRK2.

研究分野：癌生物学、分子生物学、免疫学

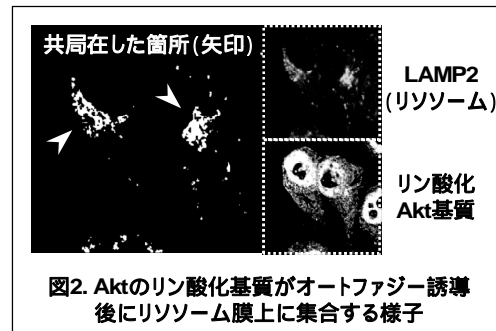
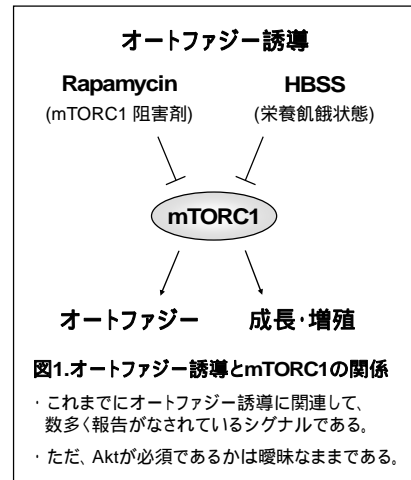
キーワード：オートファジー PI3K-Akt-mTORシグナル伝達経路 リソソーム シグナル伝達 神経科学 ウィルス 感染症 免疫学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体恒常性は、細胞の蛋白質合成と分解のバランスで保たれている。細胞内の蛋白分解は、ユビキチン・プロテアソーム系に代表される選択的分解と、オートファジー・リソソーム系に代表される非選択的分解とに大別される。近年、哺乳動物におけるオートファジー関連遺伝子群が解析され、発生段階や細胞死、代謝異常、神経変性などのオートファジーの生理的な役割が解明されてきた(Choi et al., *N Engl J Med* 2013)。オートファジーはアミノ酸の栄養飢餓状態等で mechanistic target of rapamycin complex (mTORC)1 が不活性化して誘導される(図1:Rubinsztein et al., *Nat Rev Drug Discov* 2007)。

最近、我々は mTORC1 を活性化させる Akt の結合分子として Phafin2 を同定した(Noguchi, Hirata et al., *BBA Rev on Cancer* 2014, Matsuda-Lennikov, Hirata et al., *PLoS ONE* 2014)。この研究で申請者は、Phafin2 及び Akt の細胞内局在と RNA 干渉の実験を行い、Phafin2 がエンドソームやオートファゴソームに存在する膜リン脂質 PtdIns(3)P に結合し、リソソーム膜上に形成される Phafin2-Akt 複合体がオートファジー誘導に不可欠であることを解明した。その後、アミノ酸飢餓状態でオートファジーを誘導した HeLa 細胞株において、リソソーム上に Akt のリン酸化基質が集合する結果を得た(図2写真:未発表)。しかしながら、このリソソーム上に存在する Akt のリン酸化及びそのリン酸化基質のオートファジー誘導への関与、その分子機構の詳細についてはいまだ不明である。



### 2. 研究の目的

mTORC1 を活性化させる Akt とオートファジー誘導機構との関係を明らかにするため、Akt2 と Phafin2 の遺伝子導入後、オートファジーを誘導した 293T 細胞株のリソソーム分画の Akt を免疫共沈して質量分析を行った結果、数ある分子の中で Vaccinia-related kinase (VRK)2 を同定した。この VRK2 は、膜貫通領域を持つリソソーム局在性のリン酸化酵素 (Nichols and Traktman, *JBC* 2004)で、この酵素を発現させる Vaccinia virus の感染は、Akt 活性で誘導されるエンドサイトーシスにより成立する報告がある(Izmailian et al., *J. Virol.* 2012)。このエンドサイトーシスは最終的にオートファジーの蛋白分解系とつながることから、まだ報告はされていないが、VRK2 の活性がオートファジーに関与すると申請者は考えた。最近、VRK2 遺伝子の変異がてんかんや統合失調症などに関与する報告もなされ、(International League Against Epilepsy Consortium on Complex Epilepsies., *Lancet Neurol* 2014, Sohn et al., *PLoS ONE* 2014)、中枢神経疾患に特異的に関与するオートファジーにおいて主要な役割を担う可能性が強く、この機構について研究を進めることにした。

### 3. 研究の方法

本研究は Akt と VRK2 による新たなオートファジー誘導機構を解明するため、これまでのオートファジーに関する研究背景および我々の研究成果をもとに、研究期間内に以下の点に着目して実験を進めた。

- (1) Akt および VRK2 の蛋白結合領域と Akt もしくは VRK2 のリン酸化部位を明らかにする。
- (2) Akt または VRK2 のリン酸化部位の変異体を作成し、その活性メカニズムを解明する。
- (3) オートファジー誘導前後における、Akt と VRK2 の分子間相互作用(活性修飾)を解明する。
- (4) オートファジー誘導後における、Akt-VRK2 複合体とリソソームやオートファゴソームとの細胞内局在を示す。
- (5) VRK2 の発現抑制や、野生型や変異体の過剰発現によるオートファジー誘導作用を明らかにする。

#### 4. 研究成果

VRK2 を shRNA により発現抑制した細胞株を、共焦点レーザー顕微鏡と免疫プロットティングを用いて解析したところ、代表的なオートファジー測定分子である LC3 puncta の数及び LC3II/I の比、p62 の減少が抑制されていた。そして、VRK2 発現抑制細胞株の Lysotracker によるリソソーム活性及びリソソーム内酵素のカテプシン D の測定により、VRK2 はリソソーム内の酵素活性を増加させることが明らかとなり、Akt 結合分子として新規に同定された VRK2 は、オートファジー最終段階である蛋白分解に関与することを示した。

また、VRK2 はマクロファージにおける貪食活性及びインフルエンザウイルスの増殖を高めることを示した。さらに、この VRK2 がリソソーム膜上の Akt 活性を限局的に維持することにより、mTORC1 を介さない分子機構を用いてオートファジーを誘導すること、及びリソソームの生合成に必要な転写因子 Transcription factor EB(TFEB)の核内移行、アポトーシスに関連するミトコンドリア膜電位の脱分極に必要であることが判明した。

本研究により、一般的に Akt の下流のシグナルに存在する mTORC1 が介するオートファジー誘導機構に、リソソーム膜上において VRK2 が Akt に結合して、Akt 活性を維持することによる機構が解明されたため、新たなオートファジー誘導の仕組みとして学術的な意義を有すると考える。また、この成果により、オートファジー異常の代表疾患、特に中枢神経系疾患であるアルツハイマー病、ハンチントン病、パーキンソン病、及び VRK2 と Akt の分子において、悪性腫瘍の発症に関与することが数多く報告されていることから、このような疾患に悩む患者に対して、新たな治療法の開発につながることを期待される。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

- Hirata N, Suizu F, Matsuda-Lennikov M, Tanaka T, Edamura T, Ishigaki S, Donia T, Lithanatudom P, Obuse C, Iwanaga T, Noguchi M, Oncogene, 査読有、Vol.37、2018、5367-5386、  
DOI: 10.1038/s41388-018-0330-0
- Noguchi M, Hirata N, Suizu F, AKT keeps the beat in CLOCK's circadian rhythm, Journal of Biological Chemistry, 査読有、Vol.293, No.23, 2018、9137-9138  
DOI: 10.1074/jbc.RA117.000773
- Suizu F, Hirata N, Kimura K, Edamura T, Tanaka T, Ishigaki S, Donia T, Noguchi H, Iwanaga T, Noguchi M, Phosphorylation-dependent Akt-Inversin interaction at the basal body of primary cilia. The EMBO journal, 査読有、Vol. 35, No.12, 2016、346-1363  
DOI: 10.15252/embj.201593003

[学会発表](計12件)

- Noguchi M, Hirata N, Suizu F, Interaction of VRK2 with Akt at lysosomes controls induction of autophagy, An AACR Special Conference on TARGETING PI3K/mTOR SIGNALING, 2018
- Hirata N, Suizu F, Matsuda-Lennicov M, Tanaka T, Edamura T, Ishigaki S, Donia T, Lithanatudom P, Obuse C, Iwanaga T, Noguchi M, Functional characterization of lysosomal interaction of Akt with VRK2, 第41回日本分子生物学会年会, 2018
- 水津 太, 平田 徳幸, Thoria Donia, Bala Jyoti, 石垣 聡子, 野口 昌幸, 細胞膜リン脂質 PI3P の新規追跡技術の開発, 第41回日本分子生物学会年会, 2018
- 野口 昌幸, 平田 徳幸, 水津 太, リソゾームにおける AKT-VRK2 複合体におけるオートファジー制御の仕組み, 第11回オートファジー研究会, 2018
- 平田 徳幸, 野口 昌幸, 水津 太, リソソーム局在性 Akt-VRK2 複合体によるオートファジー誘導機構, 第77回日本癌学会学術総会, 2018
- Hirata N, Suizu F, Matsuda-Lennicov M, Tanaka T, Edamura T, Ishigaki S, Donia T, Lithanatudom P, Obuse C, Iwanaga T, Noguchi M, Functional characterization of lysosomal interaction of Akt with VRK2, The 37th Sapporo International Cancer Symposium, 2018
- 平田 徳幸, 水津 太, レニコフ-松田 真実, 田中 努, 枝村 達磨, 石垣 聡子, Donia Thoria, Lithanatudom Pathrapol, 小布施 力史, 岩永 敏彦, 野口 昌幸, Interaction of Akt with VRK2 at lysosomes controls induction of autophagy, 第3回北大・部局横断シンポジウム 研究ネットワーク促進プログラム ~Young Researchers in Cutting-edge Life Science~, 2018
- Noguchi M, Hirata N, Suizu F, Matsuda-Lennikov M, Tanaka T, Edamura T, Ishigaki S, Donia T, Obuse C, Iwanaga T, Keystone Symposia-Autophagy Network Integration in Health and Disease, 2017
- 野口 昌幸, 平田 徳幸, 水津 太, 異なる結合因子による Akt の多様な生物機能, 第39回日本分子生物学会年会, 2016

水津 太, 平田 徳幸, 木村 光輝, 枝村 達磨, 田中 努, 石垣 聡子, Thoria Donia, 野口 寛子, 岩永 敏彦, 野口 昌幸, Akt リン酸化依存的な Inversin 機能制御機構の解明、第 39 回日本分子生物学会年会、2016

Suizu F, Hirata N, Kimura K, Edamura T, Tanaka T, Ishigaki S, Donia T, Noguchi H, Iwanaga T, Noguchi M, Phosphorylation-dependent interaction of Akt and inversin at basal body of primary cilia, The 28th CDB Meeting Cilia and Centrosomes, Current Advances and Future Directions, 2016

水津 太, 平田 徳幸, 田中 努, 野口 昌幸、一次繊毛における AKT と Inversin とのリン酸化依存的結合とその機能解析、第 75 回日本癌学会学術総会、2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.igm.hokudai.ac.jp/hu\\_ifgm\\_cb/index.html](http://www.igm.hokudai.ac.jp/hu_ifgm_cb/index.html)

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：野口 昌幸、水津 太

ローマ字氏名： Noguchi Masayuki, Suizu Futoshi

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。