

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008-2009

課題番号：20790059

研究課題名 (和文) 原癌遺伝子 Akt の選択的機能制御と創薬への応用

研究課題名 (英文) Regulation and function of the proto-oncogene Akt

研究代表者

樋口麻衣子 (HIGUCHI MAIKO)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：30420235

研究成果の概要 (和文)：

Akt は、細胞の増殖・生存・運動・極性・小胞輸送・グルコース代謝など、実に様々な過程において必須の役割を果たすキナーゼである。このような様々な機能を発揮する際、Akt は異なる基質をターゲットとしているが、それぞれのコンテキストにおいて Akt がどのようにして必要な基質を選択しているのか、というメカニズムは不明であった。本研究では、我々が発見した新規スキャフォールド分子 PAK が Akt の基質特異性を制御することにより、Akt の細胞運動性/浸潤能に関わる機能を選択的に制御することを示した。多くの重要な機能を持つ Akt がコンテキストによりどのようにその機能の使い分けをしているのかは非常に興味深い問題であったが、本研究によってそのメカニズムの一端を明らかにすることが出来た。

研究成果の概要 (英文)：

Many extracellular signals stimulate phosphatidylinositol 3-kinase, which in turn activates the Rac1 GTPase, the protein kinase Akt and the Akt T308 upstream kinase, PDK1. Active Rac1 stimulates a number of events, including substrate phosphorylation by a subgroup of the PAK family of kinases. The combined effects of Rac1, PDK1 and Akt are critical for cell migration, growth, survival, metabolism and tumorigenesis. Here we show that Rac1 stimulates a second, kinase-independent role of PAK1. The PAK1 kinase domain serves as a scaffold to facilitate Akt stimulation by PDK1 and to aid recruitment of Akt to the membrane. PAK differentially activates sub-populations of Akt. These findings reveal scaffolding functions of PAK that regulate the efficiency, localization and specificity of the PDK1-Akt pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：PAK、Akt、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

Akt は原癌遺伝子であり、乳癌、膵癌、子宮癌等、様々な癌で異常な活性化が高頻度に観察されている。また、Akt の異常な活性化は癌の悪性度や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・代謝に重要である上に、Akt2 のノックアウトマウスがインスリン抵抗性糖尿病の症状を示すことから、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。実際に、Akt のキナーゼ活性を阻害する薬剤を全身投与すると、様々な副作用が起こることがいくつかのグループから報告されている。このように、Akt 経路をターゲットとした薬剤の開発は難しいという問題を抱えていた。

2. 研究の目的

前述のように、Akt のキナーゼ活性全体を阻害することは生体にとって有害となることがわかってきた。そこで申請者は「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選択的に抑制する」という戦略が Akt 依存的な癌悪性化を制圧するのに有効であると考えた。

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申請者は、Akt が低分子量 GTPase Rac および 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. 2001, 2003)。また、細胞運動性の制御の際、Rac は細胞の移動先端

(leading edge) に局在しているが、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が明らかとなった。さらに PAK による Akt の活性化メカニズムの詳細について検討した結果、PAK が増殖因子刺激依存的に PDK1-Akt の「足場 (scaffold) 分子」として働くことによって Akt の活性化を促進していることを示唆する結果を得た。ここで重要なことに、PAK をノックダウンした細胞においては、増殖因子による Akt の活性化は「部分的に」抑制される一方で、Rac による Akt の活性化に関しては、PAK のノックダウンによって「ほぼ完全に」抑制される、ということである。従って、「PAK に依存した Akt の活性化のみを抑制する」あるいは「細胞運動・浸潤性に関わる Akt の機能のみを抑制する」という戦略が、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考えた。

そこで本研究では、これらの戦略を実現するために、(1) PAK が Akt の基質特異性を制御する可能性、(2) PAK が Akt の一部の機能を選択的に制御する可能性、(3) PAK-Akt 経路の癌浸潤における重要性、について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) PAK による Akt の基質特異性制御について
Akt 以外のシグナル伝達経路においてはいくつも scaffold 分子が同定されており、シグナル分子を空間的に接近させることで、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。そこで申請者は、PAK が scaffold 分子として働くことにより、Akt 活性化の効率だけでなく、シグナル伝達の特異性も制御している可能性があるのではないかと考えた。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、GSK3、Bad などのリン酸化がどのように変化するのかを調べた。また、PAK が Akt の基質の特異性を制御するメカニズムについても検討を行った。

(2) PAKによるAktの生物学的機能の選択的制御について

Akt は細胞生存、タンパク質翻訳、細胞運動性など、様々な重要な機能を持つことが知られているが、PAK が Akt の基質特異性を制御することに関連して、PAK が Akt の一部の生物学的機能のみを選択的に制御する可能性について検討を行った。具体的には、PAK と Akt の結合を阻害することが期待される PAK 上の Akt 結合部位断片 (350-407aa) を細胞に導入し、細胞増殖、生存、タンパク質翻訳および運動性/浸潤能などの機能に対する影響について検討した。

4 . 研究成果

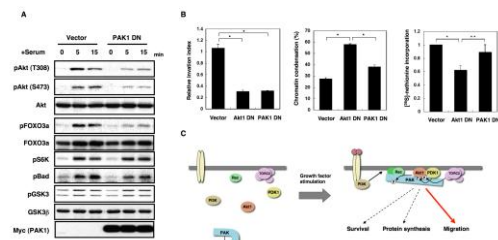
(1) PAKによるAktの基質特異性制御について

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のリン酸化は部分的に抑制される一方で、GSK3およびBadのリン酸化は抑制されない、という結果が得られた (図A)。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ている可能性が強く示唆された。

(2) PAKによるAktの生物学的機能の選択的制御について

PAKがAktの基質特異性を制御することに関連して、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。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がわかった (図B)。さらに、PAKがAktの機能を選択的に制御するメカニズムにつ

いて、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可能性に注目して検討を行った。我々の用いている繊維芽細胞にはAkt1とAkt2が発現しているが、Akt1が細胞運動性を促進するのに対し、Akt2は細胞運動性への関与が少ないことをまず明らかにした。そこで、PAKとAkt1、Akt2の関係について調べたところ、PAKがAkt2に比べてAkt1とより強く結合すること、Akt2に比べてAkt1をより強く活性化することが明らかとなった。従って、PAKがAkt1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、Akt1が持つ細胞運動性に関わる機能を選択的に制御している可能性が考えられた。



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3件)

1. 樋口麻衣子、大西啓介、後藤由季子
Scaffolding function of PAK in the Akt signaling pathway
実験医学 (査読無し) 2009, 27, 540-544

2. 森靖典、樋口麻衣子、平林祐介、福田光則、後藤由季子
JNK phosphorylates synaptotagmin-4 and enhances Ca²⁺-evoked release.
EMBO Journal (査読有り) 2008, 27, 76-87

3. 樋口麻衣子、大西啓介、菊池知佳子、後藤由季子
Scaffolding function of PAK in the PDK1-Akt pathway.
Nature Cell Biology (査読有り) 2008, 10, 1356-64

〔学会発表〕（計 3 件）

1. 樋口麻衣子、大西啓介、韓英讚、鬼原里奈、西川紗織、後藤由季子：原癌遺伝子Aktのアイソフォーム特異的機能制御、第82回日本生化学会大会 シンポジウム、平成21年10月、神戸国際会議場（神戸市）

2. 樋口麻衣子、大西啓介、鬼原里奈、後藤由季子：Scaffolding function of PAK in the PDK1-Akt pathway、第61回日本細胞生物学会大会、平成21年6月、名古屋国際会議場（名古屋市）

3. 樋口麻衣子、大西啓介、後藤由季子：スキャフォールド分子PAKによるAktの選択的機能制御、BMB2008 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会、平成20年12月、神戸国際会議場（神戸市）

4. 樋口麻衣子、後藤由季子：原癌遺伝子Aktの活性制御メカニズムの解明、東京大学工学系研究科科学生命工学専攻2008年度第1回談話会、平成20年8月、東京大学先端科学技術研究センター（東京）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樋口麻衣子（HIGUCHI MAIKO）

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：30420235

(2) 研究分担者

なし（ ）

(3) 連携研究者

なし（ ）

(4) 研究協力者

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