

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 1 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22770118

研究課題名（和文） Akt 修飾因子 TTC3 による PI3K-Akt シグナル伝達制御機構の解明

研究課題名（英文） Analysis of regulatory mechanism of PI3K-Akt signaling pathway by TTC3

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

本研究では、研究代表者が新規に同定した Akt ユビキチンリガーゼ TTC3 の生物機能の解析に重点をおいた。TTC3 を細胞に強発現すると細胞増殖を抑制し、また逆に TTC3 siRNA 導入によりタンパク発現を抑えると、Akt 活性化を伴う細胞増殖の亢進が見られた。内在性 TTC3 の発現亢進がみられる 21 トリソミーダウン症由来の細胞株では、Akt 活性が著しく低下しており、増殖速度も比較的遅い。この細胞株に上記 TTC3 siRNA を導入すると、TTC3 の発現抑制と逆相関して Akt 活性化が亢進した。このことから TTC3 が細胞内において Akt 活性の修飾因子であり、その結果細胞増殖の調節因子として機能している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In order to elucidate the biological function of TTC3, which we previously identified as a novel ubiquitin ligase of Akt kinase, we analyzed an effect of ectopic expression of TTC3 into HEK 293T cells. Overexpression of TTC3 into 293T cells resulted in reduction of cell growth rate. Conversely, induction of siRNA of TTC3 into HT1080 caused acceleration of cell growth, meaning that TTC3 function as negative regulator of cell growth by inhibiting of Akt activity. By using 21 trisomy Down syndrome-derived cell lines, which TTC3 protein is spontaneously overexpressed, TTC3 knock down by siRNA induced enhancement of Akt activity. Collectively, TTC3 may function as a cell growth regulator by modulating PI3K-Akt pathway in mammalian cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物科学

キーワード：タンパク分解，リン酸化，AKT，ユビキチン，セリンスレオニンキナーゼ，ダウン症，21Trisomy, TTC3

1. 研究開始当初の背景

セリンスレオニンキナーゼ Akt (Protein Kinase B の別称) は細胞死 (アポトーシス) を抑制し、細胞生存を促進する要の細胞内シグナル伝達因子である。Akt は細胞外成長因子などの刺激で PI3K (Phosphoinositide Dependent 3 kinase) によって活性化される。この PI3K-Akt シグナル伝達系は細胞死と増殖の制御、細胞周期、タンパク合成、糖代謝、血管新生などの多岐にわたる細胞反応制御に重要な役割を果たす細胞内シグナル伝達系である。最近相次いで PI3K-Akt シグナル伝達系のマウスモデルを用いた *in vivo* での機能解析が行われた。興味深いことに Akt3 遺伝子ノックアウトマウスの解析では 21 トリソミー (ヒト 21 番染色体を 3 本もつ染色体異常) によるダウン症候群に特徴的な脳の発達障害が見られた。一方 PI3K-Akt シグナル伝達系のトランスジェニックマウス (PI3K, p27, Akt など) には心臓肥大などの心奇形、発達障害 (short stature) などの 21 トリソミーによって発症する循環器系異常に類似する臨床症候が見られた。また PI3K-Akt シグナル伝達系の活性化は白血病の重要な原因として知られ、この事実も実に 21 トリソミーにおいて小児期に各種白血病の発症頻度が高い事と合致する。さらに poly-Transgenic 21 トリソミーマウスモデルを用いたタンパク発現の検討において Heat shock protein Hsp90 や NG, NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase などの PI3K-Akt family キナーゼと結合する分子の発現の亢進が指摘された (Antonarakis et al., *Nature Rev Genet* 2004; Shin et al., *J Proteome Res* 2006)。これらの事象を総括的にかんがみ、研究代表者は PI3K-Akt シグナル伝達系の異常に認められる症候は、心臓奇形、白血病、脳発達障害、short stature、さらに細胞レベルではアポトーシスの亢進などの 21 トリソミーによるダウン症候群においても高頻度に認められる症候と極めて類似する点に注目した。

2. 研究の目的

研究代表者はこれまでに、活性型 Akt をポリユビキチン化し、プロテアソーム系を介して不活性化 (分解) する E3 ユビキチンリガーゼ TTC3 (Tetratricopeptide Repeat Domain 3) を同定した (Suizu et al. *Developmental*

Cell, 2009)。TTC3 遺伝子は、21 トリソミー (ヒト 21 番染色体を 3 本持つ染色体異常) によって引き起こされるダウン症候群の原因遺伝子の一つと考えられている。本研究では、i) TTC3 が、脳などの神経系組織を中心に発現分布する点、ii) 21 トリソミーでは TTC3 の発現が亢進していると共に、脳発達障害や若年性アルツハイマー病が高率的に発症する点、iii) Akt3 遺伝子欠損によっても脳発達障害が生じる点などに注目し、それらの類似性・関連性を総括的にかんがみ、脳発達障害やアルツハイマー病発症における TTC3、および PI3K-Akt シグナル伝達の生物機能の解明を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、新規 Akt ユビキチンリガーゼとして同定された TTC3 の生物機能の解析を行う。特に Akt 活性の亢進を伴った細胞に対する細胞増殖や細胞増殖における生物効果、および TTC3 タンパクの発言更新が見られるダウン症由来の細胞株を用い、TTC3-Akt 制御機構の細胞生物学的役割について検証する。さらに、発生工学的手法を用いて TTC3 遺伝子改変マウスを作成し、*in vivo* での TTC3 の生物学的機能の解析を行い、21 トリソミーによって高率的に発症するアルツハイマー病の分子メカニズム解明に向けた総合的な生物効果の評価を行う。

4. 研究成果

TTC3 の生物効果を知る上でまず、細胞強発現による細胞増殖の効果を観察した。TTC3 の強発現は明らかに細胞増殖を抑制した。(図 1

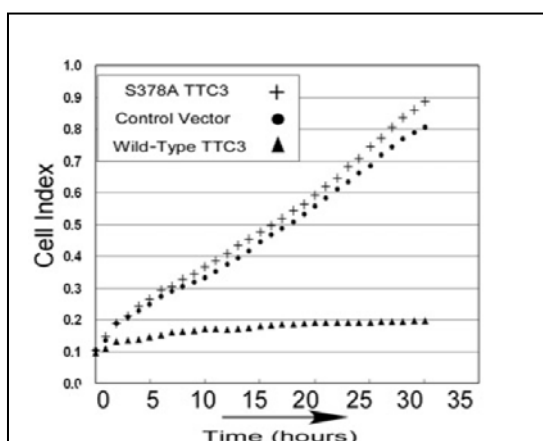


図 1. TTC3 強発現による細胞増殖の効果。HEK293T 細胞に Human TTC3 を強発現させると著しい細胞増殖の抑制が見られる。しかし、Akt によるリン酸化サイトに変異を入れるとその抑制効果は無くなり、正常な増殖曲線を描く。これは、Akt の活性化シグナルが TTC3 に伝わり、負のフィードバックによって TTC3 が Akt を分解 (抑制) に導く分子相互作用の関係が予想される。

参照) これは PI3K-Akt シグナル伝達系の抑制によるものと考えられる。

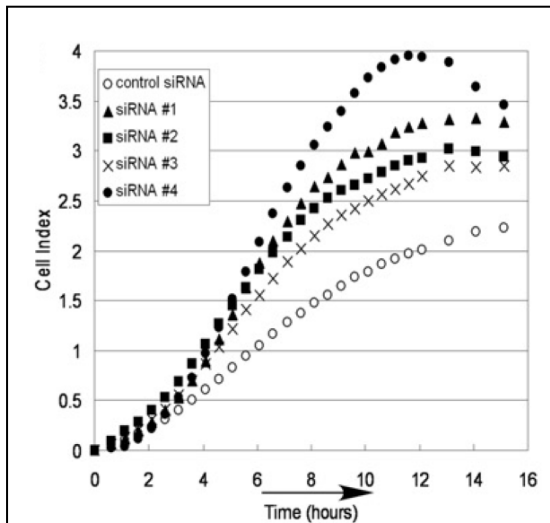


図 2. TTC3 ノックダウンによる細胞増殖の効果。HT1080 ヒト線維肉腫細胞に TTC3 siRNA を導入すると増殖促進効果が見られる。これは siRNA により本来内在する TTC3 による Akt 抑制効果が減弱するため、PI3K-Akt シグナルの増強が生じ、細胞増殖、細胞生存の促進が観察されたことによる。

また逆に、TTC3 siRNA により細胞の内在性 TTC3 のタンパク発現を抑えると、細胞増殖が促進された。(図 2 参照) これは、Akt をユビキチン化する活性が減弱したために、Akt 活性亢進による効果が現れたと考えられる。

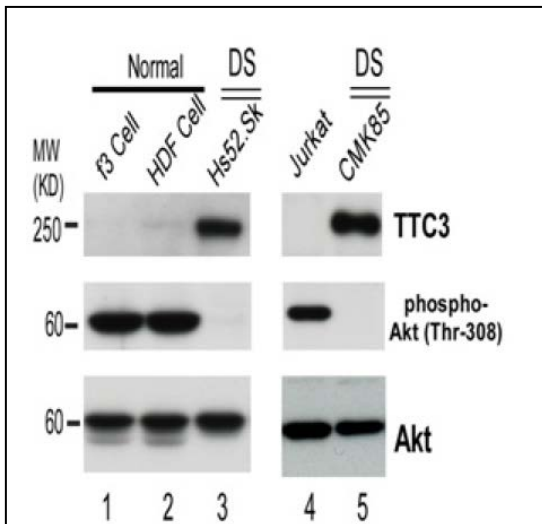


図 3. TTC3 ノックダウンによる細胞増殖の効果。HT1080 ヒト線維肉腫細胞に TTC3 siRNA を導入すると増殖促進効果が見られる。これは siRNA により本来内在する TTC3 による Akt 抑制効果が減弱するため、PI3K-Akt シグナルの増強が生じ、細胞増殖、細胞生存の促進が観察されたことによる。

この効果が 21 トリソミーによって自然増幅されているダウン症由来の細胞株においても同現象が見られるかを検討した。ダウン症由来の細胞株 (Hd52.Sk および CMK85 細

胞) では、他の細胞株に比べ著しい TTC3 タンパクの発現亢進が見られた。それと逆相関しリン酸化 Akt (Thr-308) がほぼ見られないことが明らかとなった。(図 3 参照) このダウン症由来の細胞株 CMK85 に図 3 で用いた TTC3 siRNA を導入したところ TTC3 タンパクの発現の抑制に逆相関し、Akt 活性 (Thr-308 のリン酸化) が亢進するデータを得た。(図 4 参照) この実験からも TTC3 が Akt の活性調整を担う因子であることが予想される。

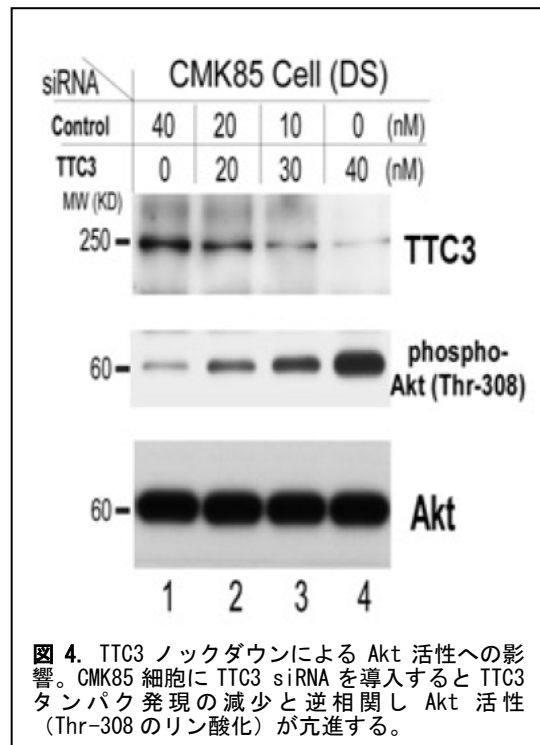


図 4. TTC3 ノックダウンによる Akt 活性への影響。CMK85 細胞に TTC3 siRNA を導入すると TTC3 タンパク発現の減少と逆相関し Akt 活性 (Thr-308 のリン酸化) が亢進する。

当初計画していた TTC3 トランスジェニックマウスは、生体内での外来性の TTC3 タンパクの発現が見られるマウスが得られず現在も作成中である。さらに、TTC3 遺伝子ノックアウトマウスに関してはキメラマウス作成までは成功しているが、germ line transmission が見られるマウスを得られず現在も進行中である。今後これらのマウスを用い、TTC3 の PI3K-Akt シグナル伝達系の調節因子としての生物機能のより詳細な解析を進めていく。

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 1 件)

M. Matsuda, F. Suizu,

N. Hirata, T. Miyazaki, C. Obuse, M. Noguchi :

Characterization of the interaction of

Influenza virus NS1 with Akt. 査読有
Biochem Biophys Res Commun.
2010;395:312-317

[学会発表] (計 11 件)

- ① Manabu Hashimoto, Mami Matsuda Futoshi Suizu, Tadashi Nagamine, Noriyuki Hirata, Hiroko Noguchi, Sinya Tanaka, Wataru Tokuyama, Masayuki 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・ロイトン札幌
- ② 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
- ③ Manabu Hashimoto, Futoshi Suizu, Wataru Tokuyama, Hiroko Noguchi, Mami Matsuda, Noriyuki Hirata, Tadashi Nagamine, Shinya Tanaka, Masayuki 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
- ④ 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),
- ⑤ M. Matsuda, Futoshi Suizu, Noriyuki Hirata, Tadaaki Miyazaki, Chikashi 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
- ⑥ M. Matsuda, Futoshi Suizu, Noriyuki Hirata, Tadaaki Miyazaki, Chikashi

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

- ⑦ 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・名古屋国際会議場
- ⑧ 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
- ⑨ 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

⑩ Futoshi Suizu, Yosuke Hiramuki, Fumihiko Okumura, Mami Matsuda, Akiko

Okumura, Noriyuki Hirata,

Masumi Narita, Takashi Kohono, Jun

Yokota, Miyuki Bohgaki, Chikashi

Obuse, Shigetsugu Hatakeyama

Toshiyuki Obata, Masayuki 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

⑪ Mami Matsuda, Futoshi Suizu, Noriyuki Hirata, Tadaaki Miyazaki, Chikashi Obuse, Masayuki 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

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