

論文の内容の要旨

論文題目 **原癌遺伝子 Akt による DNA 損傷依存的アポトーシスの抑制機構**

氏名 小川原 陽子

1 緒言

Akt は種々の増殖因子やサイトカインの刺激などにより活性化し、基質のリン酸化を介して生存、増殖を促進することが様々な系で知られている。Akt はウイルス性癌遺伝子 v-Akt の細胞性ホモログとして同定されたセリン/スレオニンキナーゼであり、様々な癌において活性化や遺伝子増幅していることが報告されている。Akt による癌化においては、その生存・増殖促進能が寄与していると考えられる。生存促進の際の Akt の標的として複数の因子が報告されているが、Akt が生存、増殖を促進するメカニズムの全容は必ずしも明らかになっていない。

細胞は DNA 損傷を受けると、その損傷が少ない場合には細胞周期の停止を誘導し DNA 損傷の修復を行う。損傷が甚大な場合にはアポトーシスを誘導し、DNA に変異が蓄積して細胞が癌化することを防いでいる。その際に中心的な役割を果たしているのが癌抑制遺伝子 p53 と E2F1 である。p53 は細胞が DNA 損傷を受けた際に活性化し、細胞周期の停止やアポトーシス、DNA 損傷の修復を誘導する転写因子である。また、細胞周期の G1→S 期の進行に重要な E2F1 も、細胞が DNA 損傷を受けた際に活性化してアポトーシスを誘導する転写因子である。当研究室では、Akt が DNA 損傷により誘導されるアポトーシスを抑制することを見い出している。この役割は Akt による癌化促進に寄与していると考えられ、そのメカニズムを解明することは癌治療への応用につながると期待される。そこで本研究では、Akt が DNA 損傷依存的なアポトーシスを抑制するメカニズムを解明することを試み、p53 と E2F1 に着目して解析を行った。

2 Akt による Mdm2 リン酸化を介した p53 の制御

当研究室では、Akt が p53 を発現することにより誘導されるアポトーシスを抑制することを見い出している。Akt がどのようなメカニズムで p53 により誘導されるアポトーシスを抑制しているのかを検討した。

2-1 Akt による p53 タンパク質の分解促進

まず、p53 の持つ転写活性をレポータープラスミドを用いて調べたところ、恒常的活性型 Akt を MCF7 細胞に発現させることにより p53 の転写活性が減少した。そして MCF7 細胞に恒常的活性型の Akt を発現させると、内在性 p53 のタンパク質量は減少することがわかった。さらに当研究室の岸下が Akt は p53 の mRNA の量に影響を及ぼさないこと、p53 タンパク質の安定性を低下させることを示した。これらのことから、Akt が p53 タンパク質の分解を促進することが

明らかになった。

2-2 Akt による Mdm2 リン酸化を介した p53 分解の制御

Akt が p53 タンパク質の分解を促進する際の基質を検討した。Akt は p53 をリン酸化しなかったため、p53 に対するユビキチンリガーゼ Mdm2 に注目した。Mdm2 は p53 をユビキチン化し、26S プロテアソーム系による分解を促進する。Mdm2 ノックアウトマウスは胎生致死であるが、p53 と Mdm2 のダブルノックアウトマウスは正常に発生することから、Mdm2 の p53 分解における重要性が示唆されている。Mdm2 のアミノ酸配列には Akt によるリン酸化の基質のコンセンサス配列が Ser166 と Ser186 に存在し種間で幅広く保存されていた。そこでバキュロウイルス由来の活性型 Akt を用いて大腸菌から精製した Mdm2 をリン酸化するキナーゼアッセイを行ったところ、Mdm2 の Ser166 がリン酸化された。また、当研究室の岸下が Akt による Mdm2 の Ser186 の *in vitro* でのリン酸化、および Mdm2 の Ser166 と Ser186 の *in vivo* でのリン酸化を示した。次に、リン酸化による Mdm2 の p53 に対するユビキチンリガーゼ活性への影響を調べるために、MCF7 細胞において p53 の *in vivo* ユビキチン化アッセイを行った。野生型の Mdm2 発現により誘導された p53 のユビキチン化は、恒常的活性型 Akt の共発現により顕著に亢進した。しかし、Mdm2 の Ser186 を Ala に置換した変異体 S186A Mdm2 は恒常的活性型 Akt と共発現させても p53 のユビキチン化を誘導しなかった。このことから、Akt は Mdm2 の Ser186 をリン酸化することにより p53 のユビキチン化を促進することが示唆された。Mdm2 の Ser166 を Ala に置換した S166A Mdm2 変異体は野生型の Mdm2 と同程度に p53 のユビキチン化を誘導したことから、p53 ユビキチン化においては Ser166 ではなく Ser186 が重要であると考えられる。次に、Akt が Mdm2 リン酸化を介して p53 のタンパク質量を制御しているかどうかを調べた。MCF7 細胞に恒常的活性型の Akt もしくは野生型の Mdm2 を発現させると p53 タンパク質の量は著しく減少した。しかし、S186A Mdm2 は p53 タンパク質を減少させず、また恒常的活性型 Akt 発現により減少した p53 の量を元のレベルにまで戻したことから優性抑制的に働いていると考えられる。以上の結果から、Akt が Mdm2 の Ser186 をリン酸化することにより Mdm2 の p53 に対するユビキチンリガーゼ活性を上昇させ、p53 タンパク質の分解を促進することが示唆された。

3 Akt による Mdm2 リン酸化を介した E2F1 の制御

E2F1 は細胞が DNA 損傷を受けた際に活性化して、p53 やそのホモログの p73、Apaf-1 等の転写を誘導し、アポトーシスを引き起こす。Akt が p53 のみならず E2F1 をも制御しているかどうかを検討した。

3-1 Akt による E2F1 タンパク質の制御

AktによるE2F1タンパク質量への影響を調べた。COS-1細胞にE2F1と共にAktを発現させるとE2F1タンパク質の量が減少したため、そのメカニズムについて検討を行った。E2F1タンパク質の制御において、その安定性の制御は重要な役割を果たしている。例えば、細胞がDNA損傷を受けた際にE2F1依存的に誘導されるアポトーシスにおいて、E2F1タンパク質の安定化が重要であることが示唆されている。E2F1はユビキチン-プロテアソーム系により分解されることが知られているが、E2F1の生理的なユビキチンリガーゼは未だ特定されていない。p53に対するユビキチンリガーゼMdm2はE2F1に結合することが報告されているため、Mdm2がE2F1に対してもユビキチンリガーゼとして働いている可能性が考えられる。そして、Aktがp53の時と同様に、Mdm2のE2F1に対するユビキチンリガーゼ活性を上昇させることによりE2F1タンパク質の量を減少させている可能性が考えられる。そこで、Mdm2がE2F1に対するユビキチンリガーゼであるかどうか、そしてAktがMdm2リン酸化によりその活性を制御しているかどうかを検討した。

3-2 Akt-Mdm2経路によるE2F1ユビキチン化と分解の制御

Mdm2がE2F1のユビキチンリガーゼであるかどうかを*in vitro*のユビキチン化アッセイを用いて検出した。ユビキチン化に必要な各種因子に基質のE2F1とMdm2を加えるとE2F1がユビキチン化されたことから、Mdm2がE2F1に対するユビキチンリガーゼとして働くことが初めて明らかになった。さらに、バキュロウイルス由来の活性型Aktでリン酸化したMdm2を用いたところ、Mdm2のE2F1に対するユビキチンリガーゼ活性が顕著に上昇した。次に、Mdm2リン酸化の影響を調べるために、S166AおよびS186A Mdm2を用いて同様の実験を行ったところ、どちらの変異体でもAktによるユビキチンリガーゼ活性の上昇は見られなかった。このことから、AktはMdm2のSer166とSer186依存的にE2F1に対するMdm2のユビキチンリガーゼ活性を上昇させていることが明らかになった。

次に、E2F1の*in vivo*ユビキチン化アッセイを行った。野生型のMdm2と恒常的活性型のAktを共発現させるとE2F1のユビキチン化が見られたが、S166AもしくはS186A Mdm2を恒常的活性型Aktと共発現させた場合にはE2F1のユビキチン化は顕著に減少した。このことから、Aktが*in vivo*でもMdm2のSer166およびSer186依存的にE2F1に対するMdm2のユビキチンリガーゼ活性を上昇させていることが示された。

Mdm2のE2F1タンパク質量への制御を調べるためにCOS-1細胞においてRNAiによりMdm2をノックダウンしたところ、内在性のE2F1タンパク質の量が増加した。このことから、Mdm2がE2F1タンパク質の量を生理的条件下で減少させていることが明らかになった。以上の結果から、AktがMdm2のSer166とSer186をリン酸化することによりMdm2のE2F1に対するユビキチンリガーゼ活性を上昇させ、E2F1タンパク質の分解を促進することが示唆された。

4 結論

一連の実験結果から、Akt が Mdm2 のリン酸化を介しユビキチンリガーゼ活性を上昇させることにより、p53 と E2F1 の分解を促進していることが示唆された。p53 と E2F1 はそれぞれ DNA 損傷により活性化し、アポトーシスを誘導することにより癌抑制の働きをする因子であり、それらの分解を促進することが Akt による生存および癌化促進に貢献していると考えられる。前述のように Akt の活性化や遺伝子増幅は癌の悪性化と密接に相関していることから、その癌化メカニズムを明らかにすることは癌の予防・治療法の発展において非常に重要である。即ち、Akt の癌化に関わる標的あるいは Akt と標的の特異的相互作用を阻害するような抗がん剤の開発が可能であると考えられ、その意味で本研究の結果が新たな癌治療法の開発につながることを期待したい。