

論文の内容の要旨

論文題目 原癌遺伝子 Akt による細胞運動制御機構の解析
氏名 大西 啓介

1. 緒言

細胞運動は発生過程や創傷時における傷の修復や免疫細胞の動員などに関わる、生体を形成・維持していく上で必須な細胞の機能である。また、癌悪性化の顕著な特徴の一つである浸潤・転移にも細胞運動は密接に関わっている。この細胞運動制御を司る分子として PI3K とその生成物である phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3) が重要な役割を果たしていることが知られている。増殖因子や走化性因子の下流で活性化された PI3K は Rho ファミリー GTPase の Rac, Cdc42 の活性化を介してアクチン骨格の再編成を促し、細胞の運動性を上昇させていることが知られている。一方、PI3K の別の下流因子である Akt は細胞の生存に重要な役割を果たすことが知られている原癌遺伝子であり、Akt は癌細胞の悪性化に密接に関わっていることが知られている。近年 Akt もまた哺乳類細胞の運動に密接に関わっていることが当研究室を含めいくつかのグループから報告されている。従って Akt は細胞の生存という面からだけでなく、細胞の運動という面においても癌細胞の悪性化に影響を与えていると考えられる。これまでに当研究室において Rac, Cdc42 の下流で Akt が活性化され、Rac, Cdc42 による細胞の運動性の上昇に Akt の活性化が必要であることが示された。しかし Akt がどのような機構で Rac によって活性化され、また Akt がどのようにして細胞運動に関与しているのか、については全くわかっていなかった。そこで本研究はこの 2 点について明らかにし、細胞運動という生命に必須の現象の解明を試みることを目的とした。

2. Rac による Akt 活性化機構の解析

Rac が下流のどのエフェクター分子を介して Akt を活性化しているかを調べたところ、CRIB ドメインを持つエフェクター分子を介して Akt を活性化していることを見出した。そのような分子の一つに PAK (p21-activated kinase) が挙げられる。そこで PAK が Akt のリン酸化に関与する可能性について検討した。すると PAK の優性抑制型の発現や、RNA 干渉法 (RNAi) による PAK1/2 のノックダウンによって、増殖因子刺激や Rac による Akt の活性化が抑制されることから、増殖因子や Rac は、PAK を介して Akt を活性化していることが示唆された。また PAK による Akt の活性化には PAK のキナーゼ活性は不要であること、さらに増殖因子刺激依存的に Akt と PDK1 が PAK と複合体形成をすることが明らかになった。従って、PAK は PDK1-Akt を結ぶ scaffold 分子として機能している可能性が示唆された。PDK1-Akt 経路の活性化を制御する scaffold 分子の存在はこれまでに知られておらず、本研究で示した PAK がはじめての候補である。本研究では増殖因子刺激による Akt の十分な活性化に PAK が必要であるという結果を得ており、PAK が生理的条件下での Akt の活性制御において重要な位置を占めていると考えている。

3. Akt による細胞運動制御機構の解析

(3-1) Akt と PIP3 のフィードバックによる極性形成

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。しかし生体内では走化性因子の濃度勾配は通常余り大きくはなく、細胞の前後の幅で感知する走化性因子の濃度の差は非常に小さい。そこで細胞はこの小さい濃度 (シグナル) の差を「増幅」し、前後の極性を形成するシステムを有していることが予想され、実際に細胞が前後で PIP3 シグナルの差を「増幅」していることが報告されている。しかしどのようなメカニズムが PIP3 のシグナルを増幅しているのかについては未だ解明されていない。

一方、活性化された Akt は細胞が運動する進行方向先端 (先端端) に局在しているが、どのような役割を担っているのかについては不明であった。そこで Akt が PIP3 シグナルの増幅に関与する可能性について検討した。Akt の上流キナーゼである PDK1 をノックアウトしたマウス胎児繊維芽細胞 (MEF) や優性抑制型 Akt を NIH3T3 細胞に発現させ、Akt の必要性を検討したとこ

る、PIP3 の集積、極性形成とそれに引き続く細胞運動に PDK1-Akt 経路が必要であることを見出した。従って PDK1-Akt 経路は PIP3 のフィードバックを制御し、極性形成に必須の役割を担っていることが示唆された。

(3-2) 細胞前後の「差づけ」メカニズム

前述のように細胞運動の際の極性形成においてシグナル PIP3 シグナルが増幅していることが示されているが、単に細胞全体で増幅するだけでは細胞の前後でシグナルの「差」が広がることを説明できない。そこで細胞の前後の「差づけ」を説明するのに次に示したモデルが考えられる。「A」と「B」が自身を活性化しつつ互いに抑制し合うことである空間内で異なる領域に住み分けされるというモデルである。「A」が「前方」で活性化している PI3K-PDK1-Akt 経路であるとすると、もしこのモデルが正しいならば、PI3K-Akt 経路と互いに抑制し合い、且つ細胞の「後方」を規定する分子「B」が存在するはずである。「B」の候補としては好中球においては運動中に細胞の後方で活性化している低分子量 GTPase の RhoA が考えられる。そこで RhoA と Akt が互いに抑制し合い、その結果細胞の前方-後方の極性が形成されるのではないかと考えた。そこで RhoA と Akt が互いに抑制するかについて検討したところ、Akt と RhoA は互いに抑制し合っていることが示され、仮説が支持された。

(3-3) Akt による Rho の抑制機構の解析

次に Akt がどのようにして RhoA を抑制しているかについて検討した。活性化された Akt は細胞の先端端に局在するので、同様の局在を示す分子に Akt が作用する可能性が考えられる。そこでわれわれは既に先端端への局在が報告されている p190RhoGAP という GAP に注目し、検討した。p190RhoGAP は p120RasGAP が結合することによって活性が抑制されている。まず Akt が p190RhoGAP と p120RasGAP の結合を制御するかについて検討した。すると Akt は p120RasGAP の S239 をリン酸化することで p190RhoGAP を乖離させていることが示唆された。従って Akt は p120RasGAP のリン酸化を介して p190RhoGAP をはずし、フリーになった p190RhoGAP が RhoA の活性を抑制している可能性が示唆された。

4. Akt と微小管の関係

微小管は先端端付近で+末端が安定化しており、運動方向に沿って方向性をもって伸びた構築を示す。微小管のダイナミクスを阻害すると、繊維芽細胞は運動できなくなることが示されている。従って 3 章で明らかにした前後の極性形成メカニズムが何らかの形で微小管のダイナミクスと相互作用している可能性が考えられる。そこで Akt が微小管安定性を制御するかについて検討した。NIH3T3 細胞において、PDGF 刺激後時間を追って安定化した微小管の量を比較したところ、刺激後に安定化された微小管の量が増加することが示された。さらに PI3K 阻害剤を添加した細胞、あるいは優性抑制型 Akt を発現した細胞では PDGF 刺激による微小管の安定化が抑制された。また活性型 Akt を発現した細胞ではわずかに安定化した微小管の量の増加が見られた。従って Akt は微小管の安定化を制御している可能性が示唆された。

以上の結果から、3 章で示した前後極性が確立すると、先端端で活性化した Akt が細胞前方における微小管安定化を誘導し、より安定的な前後極性の獲得が達成するという仮説を考えている。

5. 結言

本研究はシグナル増幅の機構を分子レベルで明らかにしようというものである。これまで哺乳類細胞において PI3K→Rac→アクチン骨格制御の系が細胞運動制御に重要な役割を果たしていることは知られていたが、当研究室などにより、PI3K-Rac の下流で Akt が細胞運動制御に関することが示されたことを基に、私はまず Rac による Akt 活性化メカニズムを明らかにした(2 章)。次に Akt がいかなるメカニズムで細胞運動制御に貢献しているかを検討し、すでに Akt が PI3K のシグナル増幅に関与することを示唆する結果を得ている。さらに細胞の前後のシグナルの「差づけ」を説明するメカニズムとして前方で活性化している Akt と、おそらく後方で活性化している Rho が互いに抑制し合うことで差づけを生み出しているという仮説を立てた

(3章)。さらに、繊維芽細胞などの極性形成・運動に微小管が重要であると考えられていたが、増殖因子刺激による細胞運動誘導時にどのようなメカニズムで微小管にシグナルが伝わっているかはわかっていなかった。本研究は Akt が微小管の安定化を制御し、極性・運動に貢献している可能性をはじめて示したものである(4章)。

細胞の運動は、発生過程や免疫系においてだけでなく癌細胞の悪性化など様々な場面において必須の役割を果たしている基本的な生命現象の一つである。Akt は原癌遺伝子であり、癌の悪性化とも密接な関係がある。本研究において Akt によるシグナル増幅、及び細胞運動制御のメカニズムが明らかになれば、Akt による癌の悪性化作用の理解にも多大な影響を与えるものと考えている。