

## 論文の内容の要旨

論文題目 PI3K-Akt シグナル伝達経路の活性制御機構の解析

指導教員 宮園 浩平 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 徳田恵美

通常、細胞は生存とアポトーシスのシグナル伝達経路をバランスよく制御している。しかし、がん細胞ではアポトーシスシグナル伝達経路が抑制され、生存シグナル伝達経路が亢進していることが知られている。このような細胞において活性化が見られる主要な経路に PI3K-Akt シグナル伝達経路がある。Akt は T 細胞リンパ腫を引き起こすレトロウイルス AKT8 の原癌遺伝子 *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る。増殖因子刺激などにより活性化した PI3K は細胞膜上に PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> および PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> を産生する。Akt とそのキナーゼである PDK1 はこれらのイノシトールリン脂質と結合することで細胞膜に移行し、Akt は膜上でリン酸化されることにより活性化する。活性化した Akt はさまざまな基質をリン酸化することでアポトーシスを抑制し、生存、増殖を促進する。これまでに Akt の下流については多くの基質が同定されており詳細な機構が明らかにされつつある。しかし、Akt の活性化がどのように制御されているかについてはほとんど明らかになっていない。そこで、本研究では Akt の活性制御機構の解析を行った。

Akt は PH ドメインと呼ばれるイノシトールリン脂質に結合するドメインを持ち、ここで PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> および PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> と結合する。PH ドメインにイノシトールリン脂質と結合出来ない変異を持つ Akt の変異体では活性化が起

こらないことから、Aktの活性化において、PHドメインとイノシトールリン脂質との結合が重要であることが知られている。PHドメインはイノシトールリン脂質と結合するドメインとしてよく知られている。しかし、PHドメインはたんぱく質とも結合することが報告されている。そこで、AktのPHドメインに結合し、Aktの活性化を制御する因子が存在するのではないかと考え、その探索を行った。方法としてはAktのPHドメインをbaitとし、human fetal brain cDNA libraryをpreyとして大腸菌を用いたtwo-hybrid systemによるスクリーニングを行った。その結果、新規Akt結合たんぱく質としてCKIP-1(casein kinase-interacting protein-1)を見いだした。CKIP-1はcasein kinase 2 $\alpha$ の結合たんぱく質として同定されたたんぱく質である。CKIP-1はPHドメインやleucine zipper(LZ)ドメインなどの多くのドメインを持つことから、アダプターたんぱく質として働くのではないかと考えられている。その機能としては、casein kinase 2やATM kinaseを細胞膜に局在させることが報告されている。また、アポトーシス刺激時にcaspaseにより切断を受け、切断された断片のうちLZドメインを含む切断断片がc-Junと結合して転写活性を抑制することでアポトーシスを促進することも報告されている。しかし、CKIP-1に関する論文は少なく、その機能はほとんど明らかになっていない。そこで、CKIP-1のAktに対する機能を調べた。

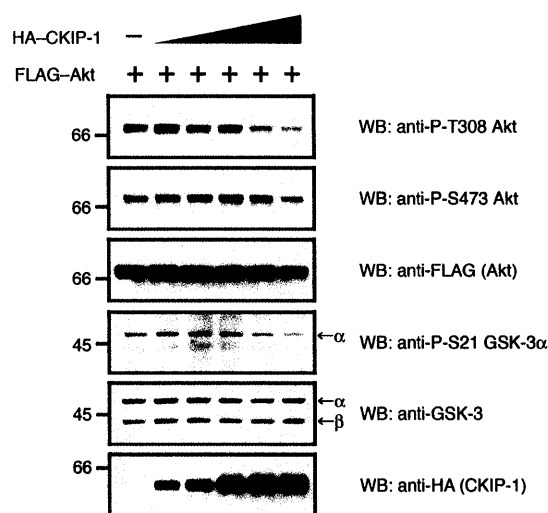
まず、CKIP-1をクローニングし、ヒト胎児腎由来293T細胞においてAktとの結合を調べた。その結果、過剰発現の系でも内在性のものでもCKIP-1とAktは結合していた。また、CKIP-1はAkt1, 2, 3いずれのアイソフォームのPHドメインとも結合した。さらにリコンビナントたんぱく質を用いた結合実験により、AktとCKIP-1が直接結合していることが示された。これらの結果から、

CKIP-1はAktのPHドメイン結合たんぱく質であることが示された。

次に、CKIP-1とAktを細胞に過剰発現させたところ、Aktの活性化に必須で

### Figure 1. CKIP-1によるAktのリン酸化抑制

CKIP-1とAktを293T細胞に過剰発現させるとCKIP-1の濃度依存的にAktのリン酸化が抑制された



ある 308 番目のスレオニンと 473 番目のセリンのリン酸化が減少していた。また、このとき Akt の基質である GSK-3 のリン酸化も減少していたことから、Akt の活性が減少している可能性が考えられた (figure 1)。以上より、CKIP-1 が Akt と結合し Akt の活性を抑制している可能性が考えられた。

CKIP-1 は PH ドメインを持ち、イノシトールリン脂質と結合することが報告されている。そこでまず、CKIP-1 がどのイノシトールリン脂質と結合するかを調べた。その結果、CKIP-1 は PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>、PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> および PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> と結合することが明らかとなった。Akt は PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> および PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> と結合することから、CKIP-1 が Akt と競合して PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> と結合することで Akt の活性を抑制している可能性が考えられた。そこで、イノシトールリン脂質と結合出来ない CKIP-1 の mutant を用いて実験を行った。

CKIP-1 (W123A) mutant および CKIP-1 (K42C/K44C/W123A) (KRW) mutant はイノシトールリン脂質と結合出来ず、細胞膜にも局在できないことが報告されている。これらの mutant を細胞に発現させたところ、CKIP-1 wt と同様に Akt のリン酸化とキナーゼ活性を抑制した (figure 2)。これらの結果より、CKIP-1 は Akt と競合してイノシトールリン脂質と結合することで Akt の活性化を抑制しているのではないと考えられた。

次に、CKIP-1 の deletion mutant を作製し Akt 結合部位を調べたところ、N 端側部位で Akt と結合することが明らかとなった。さらに、これらの deletion mutant を発現させた時の Akt のリン酸化状態を調べたところ、CKIP-1 の C 端側を欠損させた変異体では Akt のリン酸化に変化は見られなかった。逆に、CKIP-1 の N 端側を欠損させた変異体 (ΔN mutant) では Akt と結合しないにも関わらず、Akt のリン酸化とキナーゼ活性の上昇が見られた (figure 3)。CKIP-1 は C 端側に LZ ドメインを持ち、ここで多量体を形成することが知られている。

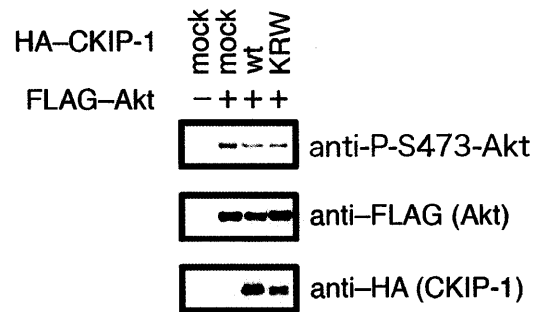


Figure 2 CKIP-1 PH ドメイン変異体による Akt リン酸化への影響  
イノシトールリン脂質に結合出来ない CKIP-1 変異体 CKIP-1 (KRW) も Akt のリン酸化を抑制した

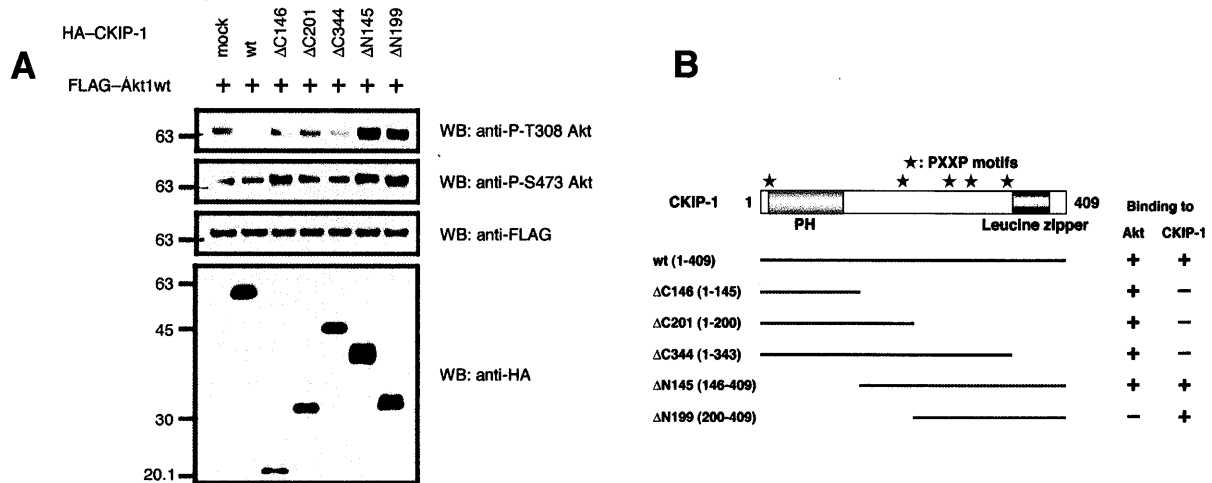


Figure 3. CKIP-1 deletion mutantによるAktのリン酸化制御

A. CKIP-1の各mutantとAktを293T細胞に過剰発現させるとCKIP-1のN端側欠損mutantではAktのリン酸化が上昇していた. B. CKIP-1の各mutantの模式図

CKIP-1 wt と deletion mutant を用いて結合実験を行った結果, CKIP-1 wt と LZ ドメインを持つ $\Delta$ N mutant は多量体を形成していた. 以上より CKIP-1 の Akt の活性抑制に LZ ドメインが関与している可能性が考えられた. そこで,  $\Delta$ N mutant からさらに LZ ドメインを欠損させた変異体 CKIP-1 (200-343)を作製したところ, Akt のリン酸化上昇が見られなくなった. さらに,  $\Delta$ N199-CKIP-1 を発現させると Akt と wt-CKIP-1 の結合が減少した(figure 4). これらの結果より,  $\Delta$ N mutant はドミナントナガティブとして働き, 内在性の CKIP-1 と結合することで Akt との結合を阻害し, それにより Akt の活性が上昇したのではないかと考えられた. 以上より, CKIP-1 による Akt の活性抑制には N 端側領域で Akt と結合すること, LZ ドメインで多量体を形成することの2つが重要であると

考えられた.

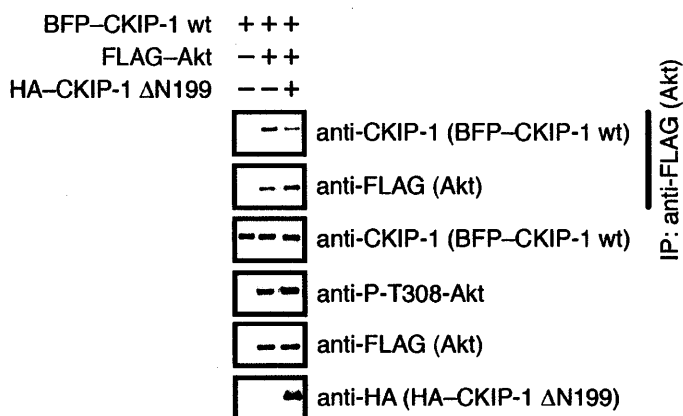


Figure 4  $\Delta$ N199-CKIP-1 によるAktとwt-CKIP-1の結合阻害  
 $\Delta$ N199-CKIP-1を発現させると Aktとwt-CKIP-1の結合が減少した

さらに、より生理的な条件下で CKIP-1 の機能を調べるために、ヒト線維肉腫由来 HT1080 細胞において CKIP-1 の恒常発現株を作成した。これらの CKIP-1 恒常発現株での Akt のリン酸化状態を調べたところ、parent や mock と比較して CKIP-1 恒常発現株では Akt のリン酸化が減少していた。また、これらの細胞株で細胞の増殖能を調べた結果、CKIP-1 恒常発現株では parent や mock よりも著しく細胞増殖能が低下していた (figure 5)。Akt は細胞増殖、細胞周期の進行を促進することが知られている。CKIP-1 恒常発現株においては、CKIP-1 が Akt の活性を抑制することで細胞増殖能が低下した可能性が考えられた。

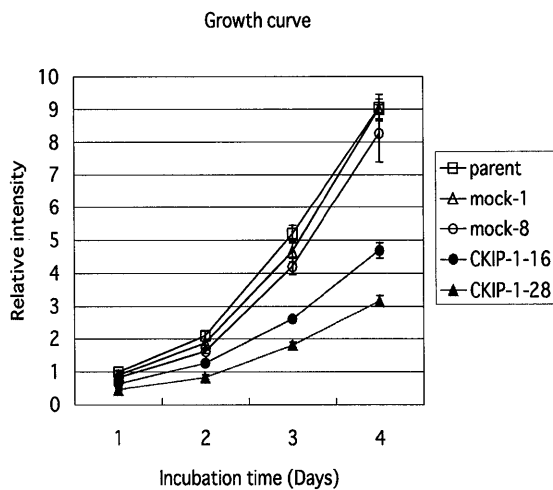


Figure 5. CKIP-1恒常発現株での細胞増殖

MTT assayにより各細胞の増殖能を調べた。CKIP-1 恒常発現株 (CKIP-1-16および-28) は parent や mock (mock-1および-8) と比較して細胞増殖能が低下していた。

次に、CKIP-1 恒常発現株での抗癌剤に対する感受性を調べた。VP-16 (エトポシド) 処理した細胞においてアポトーシスの指標である PARP および caspase-3 の切断を調べた結果、CKIP-1 恒常発現株では mock と比較して両者の切断断片量が増加していた (figure 6)。さらに、VP-16 処理時の細胞でアポトーシスの指標である sub-G<sub>1</sub> 量を測定したところ、CKIP-1 恒常発現株では parent や mock と比較して sub-G<sub>1</sub> 量が増加していた。これらの結果より、CKIP-1 恒常発現株では VP-16 に対する感受性が増加していると考えられた。VP-16 処理により、Bad などのアポトーシス促進因子が活性化し、アポトーシスが起きることが知られている。Akt は Bad など多くのアポトーシス促進因子をリン酸化することで不活性化し、アポトーシスを抑制している。CKIP-1 恒常発現株では CKIP-1 が Akt の活性を抑制しているためアポトーシス抑制機構が働かず、感受性が増加している可能性が考えられた。

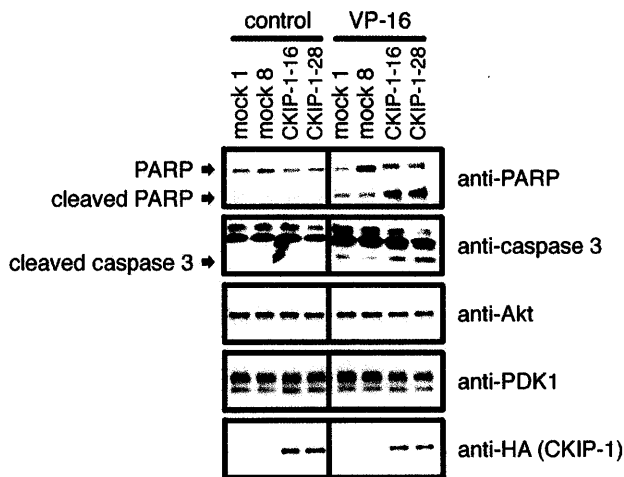


Figure 6. CKIP-1恒常発現株の抗癌剤への感受性

VP-16処理をしたCKIP-1恒常発現株 (CKIP-1-16 および -28) では mock (mock-1および-8)と比較してPARPと caspase-3の切断断片量が増加していた

本研究により、AktのPHドメインの新規結合たんぱく質としてCKIP-1を見いだした。CKIP-1はAktと結合することでAktの活性化を抑制する。また、CKIP-1のN端側を欠いたmutantはLZドメインで内在性のCKIP-1と結合することでドミナントネガティブとして働き、Aktの活性を上昇させると考えられる。このことから、CKIP-1は1)N端側領域でAktと結合すること、2)LZドメインを介して多量体を形成することでAktの活性を抑制している可能性が示唆された。CKIP-1の恒常発現株ではAktのリン酸化が減少しており、細胞増殖能の低下が見られる。さらに、これらの恒常発現株では抗癌剤に対する感受性も増加していた。以上のことから、CKIP-1はAktの活性制御因子としての機能を持つと考えられた。本研究によるCKIP-1によるAktの活性制御機構の解明は、生存シグナル伝達機構の解明だけでなく、がん治療の観点からも大きな貢献を得ることが出来ると考えられる。