

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏名 徳田 恵美

本研究は様々ながんで活性化していることが知られており、細胞の生存・増殖を促進する主要な経路の一つである PI3K-Akt 経路の解明を目的として Akt の活性制御タンパク質の同定を行ったものであり、下記の結果を得ている。

1. Akt は細胞の生存・増殖において重要な役割を果たしているキナーゼであるが、その活性化機構については不明な点が多い。そこで、Akt に結合し活性を制御する因子の探索を行った。大腸菌を用いた two-hybrid システムを用いて、Akt の活性化において重要な役割を果たす PH ドメインの結合タンパク質をスクリーニングした。その結果、新規 Akt PH ドメイン結合タンパク質として CKIP-1 (casein kinase-interacting protein-1) を同定した。CKIP-1 は Akt と直接結合し、また、ヒト胎児腎由来 293T 細胞内においても Akt の PH ドメインと結合した。さらに、293T 細胞において生理的条件下での結合も見られたことから、CKIP-1 が Akt の新規結合タンパク質であることが示された。
2. 293T 細胞において CKIP-1 を発現させることで Akt の活性化に必須である 308 番目のスレオニンと 473 番目のセリンのリン酸化の減少が見られた。また、Akt の基質である GSK-3 のリン酸化も減少したことから、CKIP-1 が Akt の活性を抑制していることが示された。
3. CKIP-1 は PH ドメインを持つが、この部位で PtdIns(3,5)P₂, PtdIns(4,5)P₂, PtdIns(3,4,5)P₃ と結合することを示した。Akt の PH ドメインも PtdIns(3,4)P₂, PtdIns(3,4,5)P₃ と結合し、Akt の活性化には PH ドメインとこれらの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。そのため、CKIP-1 は Akt と競合してイノシトールリン脂質に結合することで活性を抑制している可能性が考えられたが、イノシトールリン脂質と結合しない CKIP-1 の変異体も Akt の活性を抑制することを示した。このことから、CKIP-1 は競合してイノシトールリン脂質と結合することで Akt の活性を抑制するわけではないと考えられた。
4. CKIP-1 はアミノ末端側で Akt と結合していることを示した。また、Akt と結合しないカルボキシル末端側の変異体(ΔN199)を発現させると Akt の活

性の上昇が見られた。CKIP-1 はカルボキシル末端側にロイシンジッパー(LZ)ドメインを持ち、この部位で多量体化することが知られている。LZドメインの変異体を用いた実験により、CKIP-1 が LZドメインで多量体化することが Akt の活性抑制に重要であることが示された。また、 Δ N199-CKIP-1 変異体は野生型 CKIP-1 と Akt との結合を阻害することを示し、これにより Akt の活性が上昇した可能性が考えられた。

5. ヒト線維肉腫由来 HT1080 細胞において CKIP-1 の恒常的発現株を作製したところ、Akt のリン酸化の減少が見られた。これらの細胞株において細胞の増殖能を調べたところ、CKIP-1 恒常的発現株では増殖能が著しく低下していた。がん細胞では、抗癌剤処理時に PI3K-Akt 経路により生存シグナルが活性化されていると言われている。そこで、これらの細胞株にエトポシド処理をしたところ、CKIP-1 恒常的発現株ではアポトーシスが亢進していることが示された。以上から、CKIP-1 は Akt の活性を抑制することで細胞の増殖能を低下させ、エトポシド処理によるアポトーシスの感受性を増強させていることが示唆された。

以上、本論文は Akt の PH ドメインの新規結合タンパク質として CKIP-1 を同定し、CKIP-1 が Akt の活性制御因子であることを明らかにした。Akt はがん細胞の生存や増殖に重要な因子であるが、その活性の制御については不明な点が残されていた。本研究で CKIP-1 による Akt の活性制御を明らかにしたことで、PI3K-Akt シグナル伝達経路の解明だけでなく、この経路が関与しているがんの治療という観点からも重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。