

学 位 論 文 題 名

Characterization of Akt Interacting Molecules

(Akt結合因子の機能解析)

学位論文内容の要旨

(背景と目的)

生体細胞における生理機能の恒常性は、構成成分であるタンパク質の合成と分解のバランスによって保たれている。細胞内におけるたんぱく質の分解は、ユビキチンプロテアソーム系に代表される選択的タンパク質分解と、オートファジーに代表される非選択的分解とに大別される。オートファジーは細胞が持っている、自食とも呼ばれる細胞内のタンパク質を分解するための仕組みの1つでライソゾームにおける細胞質成分の分解の総称である。オートファジーは飢餓や細菌感染などによって誘導されるだけでなく、細胞機能維持のためのクリアランス機能としても働くことが知られている。哺乳類においては、細菌感染防御、免疫応答、異常性タンパク質蓄積を伴う神経変性疾患、癌化や細胞死などの多くの病態、現象に関与している。近年、次々とオートファジー関連遺伝子(Atg)が同定されてきてからオートファジーの分子機構の解明も進み、哺乳動物においてオートファジーの生理的な役割が明らかになりつつある。またその中で、オートファジーの制御に PI3K-Akt-mTOR シグナル伝達に関与を強く示唆する報告が相次いでいる。しかしこれらの詳細な分子機構についてはまだ詳細が明らかではない。また、タイプ1細胞死とタイプ2細胞死がどのような分別され制御されているのか未だ不明のため、その生理的な意義や分子学的な仕組みを明らかにする必要がある

今回我々は Yeast two hybrid を用いたスクリーニングにおいて Akt 新規結合因子として PH ドメインと Fyve ドメインを有するライソゾーム蛋白の Phafin2 を同定した。Phafin2 は Fyve ドメインを介して PI(3)P に結合することが予想された。そこで Phafin2 は PI3K-Akt-mTOR シグナル伝達のオートファジー制御の分子機構解明の鍵を握る重要な分子として注目し解析を進めた。

(方法)

Yeast two hybrid 法を用いて Akt 結合因子を同定した。免疫沈降法を用いて Phafin2 と Akt の結合能を検証した。さらに Phafin2 の Akt リン酸化依存性および結合部位を検証するために pull-down assay を用いて調べた。また、Phafin2 の細胞内における局在部位および Akt との共局在を検証するため、蛍光抗体法と共焦点顕微鏡を用いた実験によって Akt と Phafin2 の局在を観察した。BiFC 法、電子顕微鏡を用いた解析により、Akt と目的分子の細胞内でのさらに詳細な局在を検証した。また、FRET 法を用いて Akt と Phafin2 の結合が細胞内でどのように変化するかを検証した。またスクロース勾配法を用いてライソゾームの分画を集め、ウェスタンブロットでライソゾーム内の Akt と Phafin2 の挙動をオートファジー誘導前と誘導後で比較した。オートファジーの誘導には Rapamycin(10 μ M) もしくはアミノ酸飢餓状態にするため HBSS で4時間細胞を処理し、オートファジーマーカーである LC3 の分布を共焦点顕微鏡と共にウェスタンブロットにて LC3-I から 11 への変化を確認した。また

SiRNA による、Phafin2 もしくは Akt の発現抑制の影響について検証を行った。

(結果)

Yeast two hybrid 法を用いて Akt に結合する新規分子として同定した Phafin2 は免疫沈降法を用いた実験から 細胞内で Akt と結合していることが分かった。さらにスクロース勾配法により分離したライソゾーム分画を用いた実験ではオートファジー誘導後、誘導前と比較してライソゾームに Phafin2 と Akt の強いシグナルが見られた。また蛍光抗体を用いて共焦点顕微鏡で確認した結果オートファジー誘導後に Akt と Phafin2 の共局在レベルが亢進していた。また BiFC を用いた結果より、Akt と Phafin2 の複合体がライソゾーム上に位置することを確認した。FRET を用いた解析においては、オートファジー誘導後に、ライソゾームにおいて Akt と Phafin2 の結合が強くなることを確認した。さらにオートファジー誘導後に Phafin2 がライソゾーム膜上で PI (3)P と結合していることが分かった。一方 Phafin2 に結合できない PI3P 変異体では、Akt と Phafin2 が結合しにくくなると同時に、オートファジーを誘導することができなかった。さらに、Phafin2 SiRNA を用いて Phafin2 をノックダウンした実験から、Phafin2 が存在しない状態では、刺激後 Akt がライソゾームに移行しにくいことが分かった。また、Phafin2 をノックダウンした細胞ではオートファジーが誘導レベルが減少した。Phafin2 をノックダウンした細胞に Phafin2 を再導入するとオートファジー誘導能が回復した。また Akt SiRNA を用いた実験から Akt が不在の状態では、オートファジー刺激後 Phafin2 はライソゾームに移行するが、オートファジー誘導レベルが低い値を示すことがわかった。さらに、Phafin2 同様、Akt ノックダウン細胞に Akt を再導入すると、オートファジーの誘導能が回復することを確認した。実際、Akt を欠損した MEF でもオートファジーが誘導されにくいことを確認した。

(考察と結論)

Akt の新規結合因子として同定されたライソゾームタンパク質の Phafin2 は、オートファジー誘導時において、ライソゾーム上で Akt と共局在することから、細胞質内の Akt がオートファジー誘導刺激によって Phafin2 を介してライソゾームに移行していると考えられる。これまでに PI3K のインヒビターである 3MA や Wortmannin はオートファジーを抑制することが知られていたがその作用機序は明らかになっていなかった。今回の解析から、Phafin2 はライソゾームの膜状で PI3P と結合することが示唆された。また、PI3P に結合できない Phafin2 変異体では、Akt と Phafin2 の共局在レベルが減少した。このことから、これらのインヒビターは Phafin2 と lysosome 内の PI3P の結合を阻害することで、Akt のライソゾームの移行が阻害されオートファジーを抑制していると考えられる。また SiRNA を用いた実験から、Phafin2 または Akt をノックダウンした際にオートファジーの誘導能が低下することから、Rapamycin や HBSS を用いて細胞をアミノ酸飢餓の状態にした際に、Phafin2 が Akt と結合し、その複合体がライソゾームに移行し、ライソゾーム内の PI3P と結合することがオートファジー誘導に必要であることが示唆された。

オートファジーが代謝調節、細胞内浄化、免疫、腫瘍抑制などのさまざまな生命機能において重要な役割を果たしていることから、自然免疫系として機能するオートファジーの誘導因子や細胞内の標的分子を明らかにすることで様々な疾患の治療法の糸口になると期待できる。

学位論文審査の要旨

主査	教授	大場雄介
副査	教授	畠山鎮次
副査	教授	佐邊壽孝
副査	教授	野口昌幸

学位論文題名

Characterization of Akt Interacting Molecules

(Akt結合因子の機能解析)

生体細胞における生理機能の恒常性は、構成成分であるタンパク質の合成と分解のバランスによって保たれている。細胞内におけるタンパク質の分解は、ユビキチンプロテアソーム系に代表される選択的タンパク質分解と、オートファジーに代表される非選択的分解とに大別される。オートファジーは細胞が持っている細胞質成分の分解の総称で、自食とも呼ばれる細胞内タンパク質を分解するための仕組みの1つである。オートファジーは飢餓や細菌感染などによって誘導されるだけでなく、細胞機能維持のためのクリアランス機能としても働くことが知られている。哺乳類においては、細菌感染防御、免疫応答、異常タンパク質蓄積を伴う神経変性疾患、癌化や細胞死などの多くの病態に関与している。近年、オートファジー関連遺伝子 (Atg) が次々と同定され、オートファジーの分子機構の解明も進み、哺乳動物におけるオートファジーの生理的役割が明らかになりつつある。またその中で、PI3K-Akt-mTOR シグナル伝達のオートファジー制御への関与を強く示唆する報告が相次いでいる。しかしその詳細な分子機構についてはいまだ明らかではない。

本研究では、酵母ツーハイブリッドスクリーニングにより新規 Akt 結合因子として、PH ドメインと FYVE ドメインを有するライソゾームタンパク質 Phafin2 を同定した。Phafin2 は Akt と結合しライソゾーム膜へと移行、ライソゾーム膜上での PI(3)P との結合がオートファジー誘導に重要であること、Phafin2 と Akt の存在自体がオートファジー誘導に重要であることを明らかにした。

口頭発表後、副査の畠山教授から内在性 Akt と Phafin2 の結合について、HT1080 以外の細胞における定常状態 (オートファジー誘導無し) での両者の結合について質問があった。

また、酵母に Akt や Phafin2、mTOR が存在するかどうか、この実験で見られる Akt と Phafin2 を介した現象が酵母でも起こりうるかどうかについて質問があった。さらに、オートファゴソームの形成やライソゾームとの融合などオートファジー誘導過程のどの段階に Phafin2 と Akt の結合を介した機構が関与するかについての質問があり、電子顕微鏡を用いて Phafin2 やオートファジーの局在、オートファゴソームや二重膜の形成について詳細に解析すべきであると言うアドバイスがあった。また、その際にはオートファゴソームを観察するために適切なサンプルの処理等を専門家から詳しく学ぶべきであるとの指摘があった。最後に Akt ノックアウトマウスではオートファジーがどのようになっているかという質問があった。続いて副査の佐邊教授から、Akt と Phafin2 の結合部位を明らかにし、結合が阻害されたときのオートファジーへの影響を見ることが大変重要であるとアドバイスがあった。また学位論文は thesis であるため、分子の説明、語源、どのように問題を解決したか、どのような失敗があったのかなどネガティブデータを含んだ詳細な記述が必要であるという指摘があった。主査の大場教授からは、Phafin2 は Akt1、2 と結合し Akt3 とは結合しないため、三者の配列を比較し、Akt と Phafin2 の結合部位を探ってみてはどうかというアドバイスがあった。また、Phafin2 のみではなく Phafin1 やこれまで同定されてきた様々な Akt 結合因子に関して共通配列が存在するか、またはそれについて解析したかと言う質問があった。さらに、class III PI3K inhibitor である 3MA がオートファジーを抑制する機序についての質問があった。申請者は、自身の実験結果や過去の文献を引用しつつ、これらの質問に適切に解答した。なお、副査の野口教授は体調不良で審査会（平成 25 年 2 月 6 日）を欠席したが、後日（平成 25 年 2 月 8 日）主査の研究室において本論文を厳正に別途精査した。

この論文は、新規 Akt 結合タンパク質 Phafin2 とオートファジーにおける関与を明らかにしたものであり、今後の細胞生物学研究に新たな展開をもたらすものと期待される。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。