

細胞外刺激に対するキナーゼとホスファターゼの
生理学的応答メカニズムの解明

山口大学大学院共同獣医学研究科

北村 菜央

2024年3月

目次

第1章 諸言	1
1-1 タンパク質間相互作用とリン酸化	2
1-2 本研究の目的	4
第2章 神経突起形成における PP6 の役割	5
2-1 背景および目的	6
2-1-1 神経突起形成の意義	6
2-1-2 神経突起形成シグナル	6
2-1-3 Type 2A protein phosphatase と神経	7
2-1-4 研究目的	7
2-2 実験結果	8
2-2-1 神経突起形成時の type 2A protein phosphatase タンパク質発現量 の変化	8
2-2-2 神経突起形成時の PP6 調節サブユニットタンパク質発現量の変 化	10
2-2-3 神経分化時の type 2A protein phosphatase タンパク質発現量の変 化	12
2-2-4 PP6 タンパク質の発現増加メカニズムの検討	14
2-2-5 PP6 発現抑制が神経分化に与える影響	16
2-2-6 PP6 発現抑制が神経突起伸長に与える影響	18

2-2-7 PP6 複合体が神経突起形成に与える影響	20
2-2-8 PP6 発現抑制が神経分化シグナルに与える影響	22
2-2-9 PP6 と mTORC2 の相互作用の解析	24
2-2-10 PP6 複合体と SIN1 の相互作用の解析	26
2-2-11 SIN1 Thr86 リン酸化を担うキナーゼの同定	28
2-3 考察	30
2-3-1 神経突起形成時の PP6 発現の上昇	30
2-3-2 神経細胞におけるオートファジー	31
2-3-3 PP6 による mTORC2 制御	32
2-3-4 総括	33
第 3 章 TGF-β シグナルにおける PP6 の役割	34
3-1 背景および目的	35
3-2 実験結果	36
3-2-1 TGF- β 刺激による PP6 タンパク質発現量の変化	36
3-2-2 TGF- β による PP6 タンパク質増加の分子機構の検討	38
3-2-3 PP6 欠損が TGF- β シグナルの古典的経路に与える影響	40
3-2-4 PP6 欠損が TGF- β シグナルの非古典的経路に与える影響	42
3-2-5 PP6 欠損が TGF- β 誘導性の細胞遊走に与える影響	44
3-3 考察	46
3-3-1 TGF- β 刺激による PP6 タンパク質発現増加の分子機構	46

3-3-2 PP6による TGF- β シグナルの制御機構.....	46
3-3-3 総括.....	47
第4章 NanoBiT システムを用いた PDK1-Akt タンパク質相互作用メカニ	
ズムの解明	48
4-1 背景および目的	49
4-1-1 PI3K/Akt シグナル	49
4-1-2 研究目的.....	52
4-2 実験結果	53
4-2-1 LgBiT/SmBiT の最適な組み合わせの検討	53
4-2-2 MCF7 PDK1/Akt 細胞の EGF に対する反応性の検討.....	56
4-2-3 EGF による PDK1/Akt 結合に PIF 阻害が与える影響.....	58
4-2-4 EGF による PDK1/Akt 結合に Akt の細胞膜移行が与える影響 ...	60
4-2-5 EGF による PDK1/Akt 結合に PTEN 阻害が与える影響	63
4-2-6 EGF による PDK1/Akt 結合に SHIP2 阻害が与える影響.....	66
4-2-7 EGF による PDK1/Akt 結合に Akt のリン酸化状態が与える影響	68
4-2-8 EGF による PDK1/Akt 結合に PP1 阻害が与える影響.....	70
4-2-9 EGF による PDK1/Akt 結合に PP2A 阻害が与える影響	73
4-3 考察.....	75
4-3-1 NanoBiT システムにおいて付加したタグの構造的妥当性.....	75
4-3-2 刺激の違いによる結合動態の変化.....	76
4-3-3 PDK1/Akt 不活性複合体の検出.....	77

4-3-4 PDK1/Akt 結合にホスファターゼが与える影響.....	78
4-3-5 EGF 刺激時の PDK1/Akt 結合と Akt のリン酸化状態	79
第 5 章 総合考察	81
5-1 PP6 発現および機能の調節機構	82
5-2 ホスファターゼを標的とした創薬戦略.....	84
第 6 章 実験材料および実験方法	87
6-1 細胞培養法.....	88
6-2 プラスミド DNA およびレンチウイルスベクターの作製.....	88
6-2-1 プラスミドの作製.....	88
6-2-2 プラスミドのトランスフォメーションおよびミニプレップ.....	89
6-2-3 プラスミドのトランスフェクション.....	89
6-2-4 レンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入.....	90
6-3 Western blotting によるタンパク質発現量測定	90
6-3-1 タンパク質抽出.....	90
6-3-2 Western blotting	91
6-4 免疫沈降法および pull down assay.....	91
6-5 免疫蛍光染色法	92
6-6 In vitro kinase assay.....	93
6-7 Real-time PCR 法.....	93

6-8 神経分化誘導法	94
6-8-1 N2a 細胞における神経突起解析	94
6-8-2 マウス胚性幹細胞の神経分化誘導 (SDIA 法)	94
6-9 Luciferase Reporter Assay	94
6-10 Wound healing assay	95
6-11 NanoBiT 法	95
6-12 統計処理	96
6-12 使用抗体および薬物	96
引用文献	99
謝辞	120

第 1 章 諸言

1-1 タンパク質間相互作用とリン酸化

生体を構成する細胞は常に適切な情報を受け取り、その恒常性を支えている。細胞が外部から成長因子や増殖因子などの刺激を受けると、細胞内の様々なタンパク質同士が結合と解離を繰り返すことでその構造変化や反応が誘起される。その結果、生体として多岐に渡る機能を綿密に制御することが可能となり、生命活動が維持されている。この結合・解離、すなわちタンパク質間相互作用の異常はがんをはじめとした様々な疾患の原因となる。タンパク質間相互作用の理解は生命現象のメカニズムだけでなく疾患原因の解明に向けた重要な足掛かりとなることから、近年、タンパク質間相互作用に焦点を当てた創薬が注目されている。

タンパク質のリン酸化は、真核生物においてタンパク質間相互作用を制御する最も一般的な翻訳後修飾であり (1)、全細胞タンパク質の 30~70%に影響を及ぼしている。細胞周期や細胞増殖、アポトーシスなどの細胞反応には何千ものリン酸化イベントが関与している (2, 3)。タンパク質のリン酸化は、リン酸化酵素 (protein kinase: キナーゼ) および脱リン酸化酵素 (protein phosphatase: ホスファターゼ) によって可逆的に調節されている。リン酸化の 98%以上がセリン (Ser) とスレオニン (Thr) 残基で起こり、protein kinase B (Akt)をはじめとした約 400種類のカナーゼによって制御されている (4-6)。一方、Ser/Thr残基のホスファターゼは約 40種類存在し、大きく PPP、PPM、Asp phosphatase の3つのスーパーファミリーに分類される (7)。PPPスーパーファミリーに分類されるホスファターゼは、細胞内の Ser/Thr ホスファターゼの大部分を占めており、protein phosphatase (PP) 1、PP5、そして type 2A protein phosphatase である PP2A、PP4、PP6 が属する (8)。これらのうち、PP1 と PP2A は細胞内の脱リン酸化活性

の約 90%を担う主要なホスファターゼである (9)。キナーゼとホスファターゼは互いに協調して働くことで均衡を保っているが、キナーゼの過度な活性化やホスファターゼ活性の低下によりそのバランスが崩れリン酸化が過剰になると、がんや神経変性疾患、糖尿病など様々な疾患の発生や悪性化の原因になる (10–12)。そのため、各種疾患において過剰なリン酸化の抑制は有効な創薬標的になると考えられることから、キナーゼ阻害剤の開発が進められてきた。しかし、持続的な治療効果をもたらすキナーゼ阻害剤はごく僅かであり、そのほとんどはリン酸化シグナル伝達経路の再構築によって薬剤耐性が生じる (13–15)。また、キナーゼは活性部位の構造が類似しており、阻害剤は多数のキナーゼを *off-target* として阻害することから副作用が問題となっている (16)。そのため、近年ではホスファターゼの活性化による過剰なリン酸化の抑制というアプローチが有効であると考えられるようになってきた。しかし、ホスファターゼは基質選択性が低いため、長い間創薬標的として不適であるとされ、その構造や機能の解明がキナーゼと比較して進んでいない (17, 18)。分子標的薬開発におけるこうした問題の解決には、キナーゼとホスファターゼ双方が織りなす細胞内のリン酸化ネットワークを分子レベルで詳細に解明することが極めて重要である。

1-2 本研究の目的

本研究では、生命維持において重要なキナーゼとホスファターゼの関係に着目し、その詳細な生理学的機能を明らかにすることで、がんをはじめとした生活習慣病や神経変性疾患といった様々な病態理解の基盤となり、新たな創薬戦略の創出に寄与することを目的とした。

第2章 神経突起形成における PP6 の役割

2-1 背景および目的

2-1-1 神経突起形成の意義

神経細胞は、長い軸索と複雑に分岐した樹状突起と呼ばれる神経突起を有する脳や脊髄の主要な構成細胞である。神経突起を介して膨大な神経細胞が連絡し合うことで複雑な神経回路ネットワークが形成され、運動、記憶、学習などの高度な機能を可能にしている。しかし、脳卒中や外傷などの急性損傷後の中枢神経系の再生能力は限られており、修復過程の停止によって神経細胞間のネットワークが破綻することで、麻痺などの機能不全が引き起こされる。そのため、神経突起形成などの再生メカニズムを解明することは神経損傷治療のアプローチにおいて極めて重要である。

2-1-2 神経突起形成シグナル

脂溶性ビタミン A 誘導体である retinoic acid (RA) は、phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) / Akt シグナルの活性化を通じて、神経突起伸長の誘導に重要な役割を果たしている (19–23)。Mammalian target of rapamycin (mTOR) は2つの異なる複合体、mTOR complex (mTORC) 1 と mTORC2 として存在し、それぞれ固有の構成因子 Raptor と Rictor によって区別される。mTORC2 は、PI3K の重要な下流エフェクターであり、Akt の Ser473 をリン酸化することで Akt を活性化する (24)。mTORC2 の構成要素である SIN1 は、pleckstrin homology (PH) ドメインを持ち、これを介してリン脂質と結合することで mTORC2 と細胞膜との結合を促進し、Akt に対する mTORC2 活性を促進する (25)。p70 S6K または Akt による SIN1 Thr86 のリン酸化は、SIN1 を mTORC2 から解離させ、mTORC2 活

性を抑制するネガティブフィードバックとして働く (26)。

多くの転写因子が神経突起伸長に影響を及ぼすが、特に脳に豊富に存在する cAMP response element binding protein (CREB) は代表的な神経活動依存的転写因子である (27–29)。Akt が CREB の Ser133 をリン酸化すると、CREB の転写活性が 10 倍以上上昇する (30, 31)。したがって、PI3K/mTORC2/Akt/CREB シグナルは RA による神経突起形成において重要な役割を果たしている。

2-1-3 Type 2A protein phosphatase と神経

近年、神経細胞機能における type 2A protein phosphatase の重要性が明らかになってきた。神経突起内部に存在する微小管は突起構造の維持や細胞内輸送などの重要な役割を持つ。PP2A は微小管結合タンパク質 tau の脱リン酸化を司る主要な因子であり、アルツハイマー病では PP2A の活性が低下することで tau の過剰なリン酸化が引き起こされる (32, 33)。また、PP2A は神経突起の形成に重要であることが報告されているが、その詳細な機構は明らかにされていない (34)。PP4 は微小管形成の中心として働く中心体に局在する脱リン酸化酵素であり (35)、微小管の安定化に寄与する (36)。PP6 は中枢神経系に発現し (37)、グリオーマ (神経膠芽腫) の悪性化に関与することが報告されているが (38)、神経突起の形成における役割は報告されていない。

2-1-4 研究目的

本研究は、type 2A protein phosphatase に着目し、神経突起形成における役割とその分子機構を明らかにすることを目的とした。

2-2 実験結果

2-2-1 神経突起形成時の type 2A protein phosphatase タンパク質発現量の変化

マウス神経芽腫細胞株 N2a 細胞を低血清条件下において、RA で処置すると神経突起が伸長することから、N2a 細胞は神経突起形成モデルとして広く用いられている (34, 39)。初めに、RA 処置による N2a 細胞の神経分化を、細胞の形態変化および神経細胞マーカー β -tubulin III の発現増加によって確認した (図 1A, B)。神経分化刺激時の type 2A protein phosphatase のタンパク質発現変化を western blotting により解析した。神経突起形成にともない PP6 タンパク質発現量の顕著な上昇が観察されたのに対して、PP2A および PP4 のタンパク質発現量に変化は認められなかった (図 1B-E)。

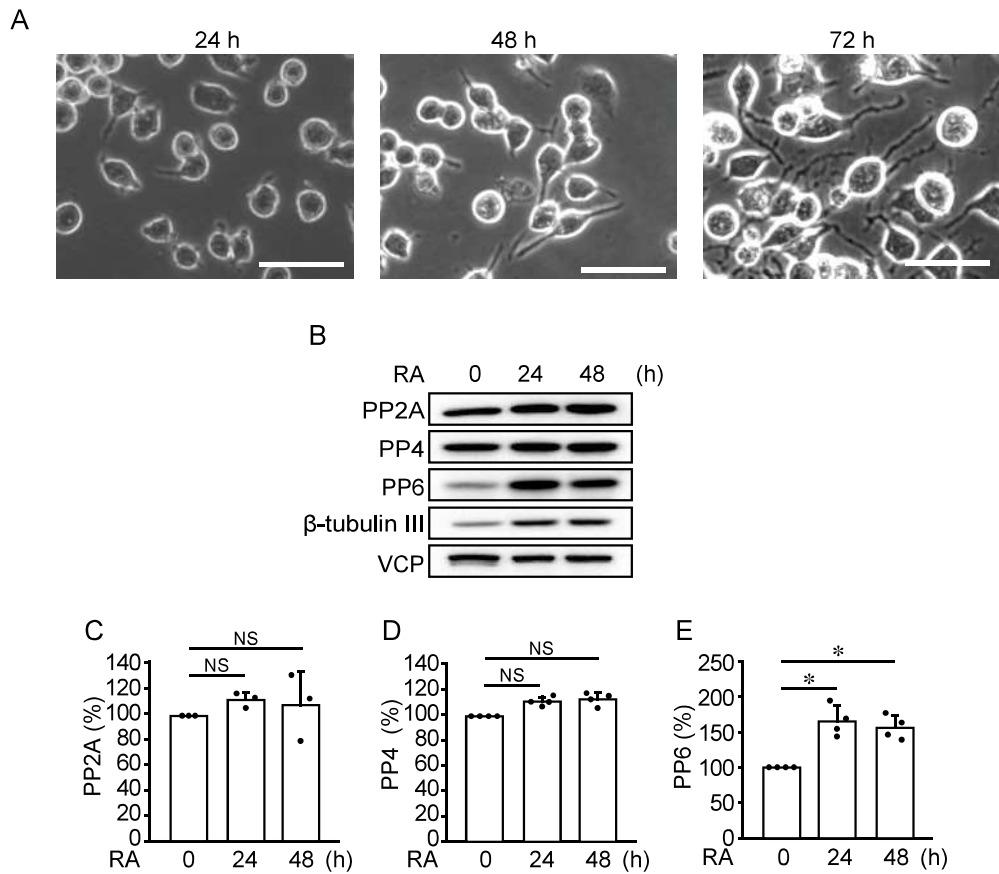


図1 神経突起形成時の type 2A protein phosphatase タンパク質発現量の変化

(A) マウス神経芽腫細胞株 N2a を RA (20 nM) で処置し、神経突起形成を経時的に観察した。N=3。スケールバー：50 μ m。

(B-E) Type 2A protein phosphatase タンパク質発現量の変化を western blotting を用いて検討した代表例 (B) と PP2A (C)、PP4 (D)、PP6 (E) の無処置 (0 h) のタンパク質発現量を 100%として相対値で表した定量図。N=3-4。*: $P < 0.05$ 。

NS: not significantly different.

2-2-2 神経突起形成時の PP6 調節サブユニットタンパク質発現量の変化

PP6 は、調節サブユニット (SAPS) との複合体として機能するホロ酵素であり、活性を持つ触媒サブユニットに PP6R1、R2、R3 の 3 種類が存在する SAPS のうちの 1 つが結合することで基質を特定する (37, 40) (図 2A)。

RA 処置で PP6 タンパク質発現量が上昇したことから、SAPS のタンパク質発現量を検討した。N2a 細胞を RA で 48 時間処置して神経突起を形成させ、調節サブユニットのタンパク質発現量を western blotting で解析した。神経突起形成にともない、PP6R1 タンパク質発現量は顕著に上昇し、R2、R3 タンパク質発現量も上昇傾向であることが観察された (図 2B-E)。

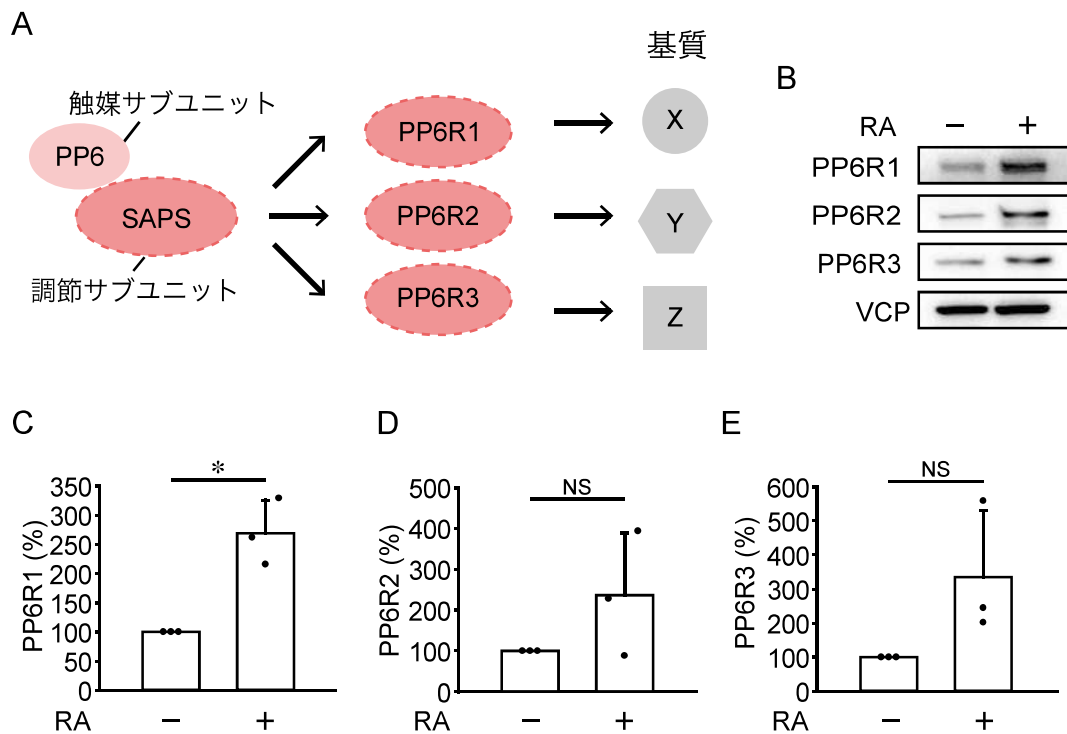


図2 神経突起形成時のPP6調節サブユニットタンパク質発現量の変化

(A) PP6は調節サブユニットであるSAPSのいずれか1つと結合することで、特異的な基質へとリクルートされる。

(B-E) N2a細胞をRA (20 nM) で48時間処置し、SAPSのタンパク質発現量の変化をwestern blottingを用いて検討した典型例(A)とPP6R1(B)、PP6R2

(C)、PP6R3(D)の、無処置のタンパク質発現量を100%として相対値で表した定量図。N=3。*: $P < 0.05$ 。NS: not significantly different.

2-2-3 神経分化時の type 2A protein phosphatase タンパク質発現量の変化

神経分化刺激による PP6 タンパク質の増加が N2a 細胞特異的な現象である可能性を排除するため、マウス胚性幹細胞 (mESC) の神経分化モデルを用いて解析した。本研究で用いた SDIA 法では、mESC は誘導 4 日後に神経前駆細胞になり、10 日後に神経細胞に分化する (41)。神経分化誘導 10 日後に、 β -tubulin III の発現量が増加し、mESC 細胞が神経細胞に分化したことを確認した (図 3A)。この条件下においても PP6 タンパク質の増加が誘導された (図 3A, B)。他の type 2A protein phosphatase である PP2A と PP4 タンパク質発現量も有意に増加したが、増加率は PP6 よりはるかに小さかった (図 3A, B)。

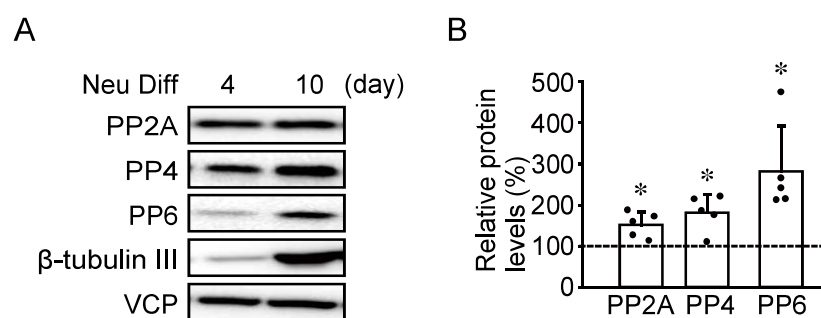


図3 神経分化時の type 2A protein phosphatase タンパク質発現量の変化

(A, B) マウス胚性幹細胞 mESC を SDIA 法で神経細胞に分化させ (Neu Diff)、type 2A protein phosphatase タンパク質発現量の変化を western blotting を用いて解析した代表例 (A) と 4 日目のタンパク質発現量を 100%として 10 日目の発現量を相対値で表した定量図 (B)。N=5。*: $P < 0.05$ (4 日目との比較)。

2-2-4 PP6 タンパク質の発現増加メカニズムの検討

タンパク質の発現は mRNA の合成（転写）、翻訳、翻訳後の多段階で調節される。神経突起形成時の PP6 タンパク質増加の分子機構を明らかにするため、N2a 細胞を RA で 48 時間処置し、PP6 mRNA 発現を解析した（図 4A）。PP6 mRNA 発現は RA 処置で減少傾向を示したことから、神経分化時の PP6 発現は転写レベルではなく翻訳後の段階で制御されていることが示唆された。

PP6 タンパク質は、アダプタータンパク質である p62 介在性の選択的オートファジーによって分解される (42)。オートファジーが進行すると、LC3-I から LC3-II へと段階的変換を経ることから、この変換率はオートファジー活性の指標となる。そこで、N2a 細胞を RA で処置し、p62 と LC3-I、II の発現量を解析することで、神経分化誘導によるオートファジー活性への影響を解析した。RA によって p62 と LC3-I の蓄積が観察されたことから（図 4B, C）、RA による PP6 タンパク質の増加はオートファジー活性の抑制によるものであることが示唆された。

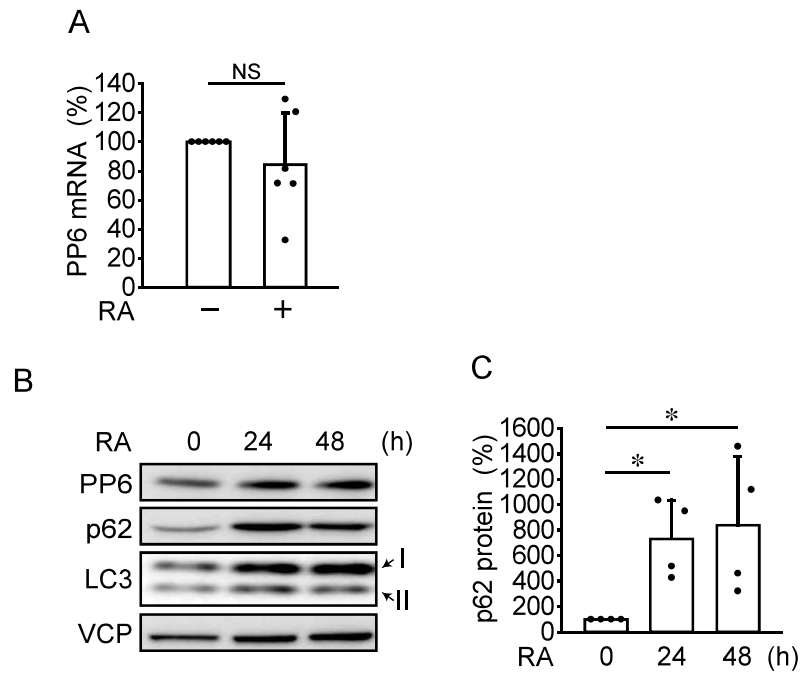


図4 PP6タンパク質の発現増加メカニズムの検討

(A) N2a細胞をRA (20 nM) で48時間処置し、PP6のmRNA発現量をreal-time PCRで解析した。RA無処置のPP6 mRNA発現量を100%として相対値で表した定量図。N=6。NS: not significantly different.

(B, C) N2a細胞をRA (20 nM) で24、48時間処置し、オートファジー活性をwestern blottingにより検討した代表例(B)とp62のRA無処置のタンパク質発現量を100%として相対値で表した定量図(C)。N=4。*: P < 0.05。

2-2-5 PP6 発現抑制が神経分化に与える影響

神経分化における PP6 の機能を検討するため、non-target shRNA (shNT) または PP6 targeting shRNA (shPP6) を安定発現させた N2a 細胞を作製し、PP6 発現抑制が神経分化に与える影響を解析した。PP6 発現抑制が神経関連マーカーの発現量に与える影響を検討したところ、神経細胞極性マーカーの一つである α -tubulin の Lys40 アセチル化 (43, 44) が、PP6 発現抑制により低下することが認められた (図 5A, B)。さらに、免疫蛍光染色法を用いて、PP6 の発現抑制が神経分化マーカーである MAP2A/B/C 発現量 (45) に与える影響を解析したところ、同様に発現の減少が観察された (図 5C)。以上の結果から、N2a 細胞において、PP6 発現抑制により神経分化が抑制されることが示唆された。

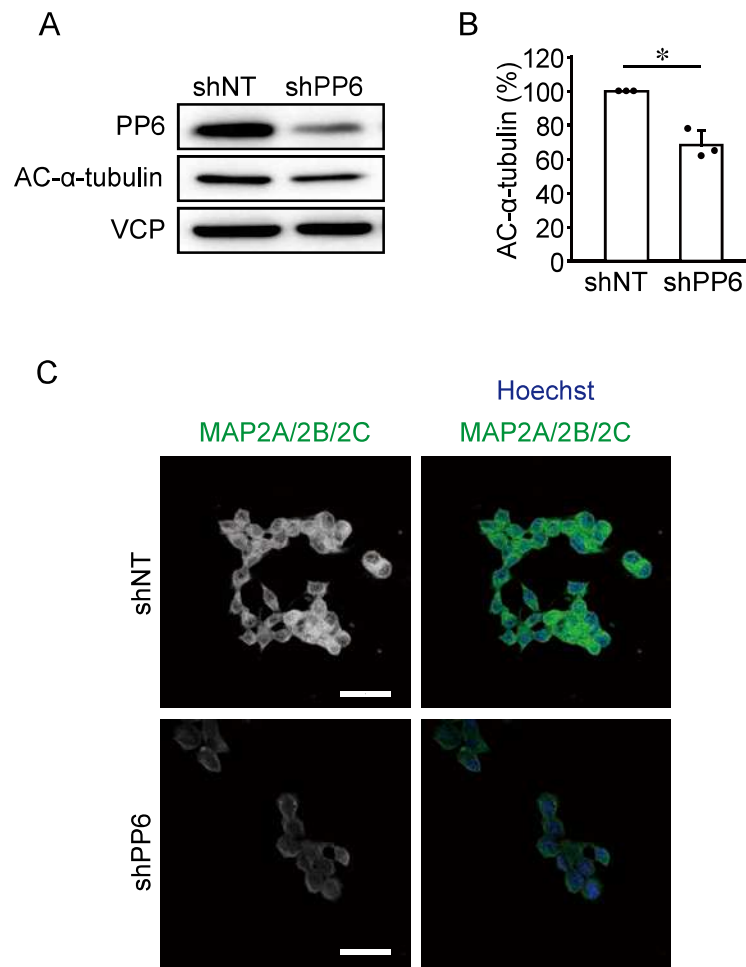


図5 PP6発現抑制が神経分化に与える影響

(A, B) N2a 細胞に、non-target shRNA (shNT) または PP6 targeting shRNA (shPP6) を安定的に発現させ、PP6 および acetyl- α -tubulin (AC- α -tubulin) 発現量を western blotting により解析した代表例 (A) と shNT を発現させた細胞の AC- α -tubulin のタンパク質発現量を 100%として相対値で表した定量図 (B)。N=3。*: $P < 0.05$ 。

(C) N2a 細胞に、shNT または shPP6 を安定的に発現させ、MAP2A/B/C 抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。核染色には Hoechst 33342 を用いた。N=3。スケールバー : 20 μ m。

2-2-6 PP6 発現抑制が神経突起伸長に与える影響

PP6が神経分化に関与する可能性が示されたことから、PP6発現抑制が神経突起伸長に与える影響を検討した。N2a 細胞を RA で処置し、72 時間後に位相差顕微鏡下で撮影し、神経突起形成を解析した (図 6A)。PP6 発現抑制細胞では神経突起の長さ、細胞あたりの神経突起数、神経突起形成細胞の割合が有意に減少し (図 6B-D)、PP6 発現抑制が神経分化能を低下させる可能性が示された。

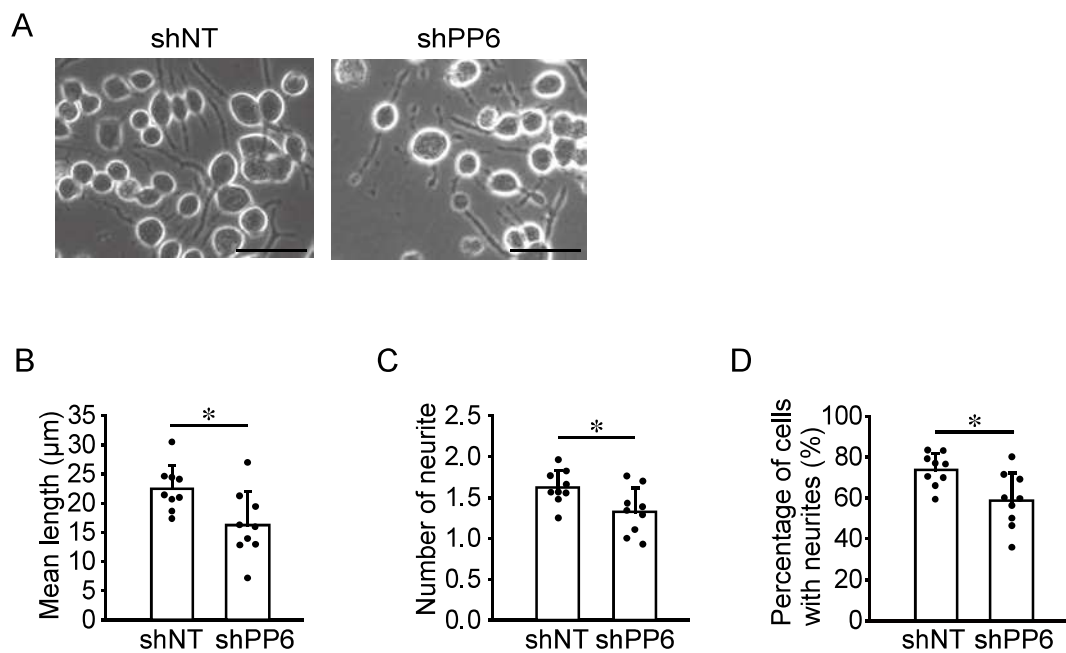


図6 PP6発現抑制が神経突起伸長に与える影響

(A–D) shNTまたはshPP6を安定的に発現させたN2a細胞をRAで72時間処置し、位相差顕微鏡下で撮影した代表図(A)と、細胞の神経突起の長さ(B)、細胞あたりの神経突起の数(C)、神経突起を持つ細胞の割合(D)の定量図。N=9。スケールバー：50 μm 。*: $P < 0.05$ 。

2-2-7 PP6 複合体が神経突起形成に与える影響

いずれの PP6 複合体が神経突起形成に関与しているのかを検討するために、N2a 細胞に PP6 と各種の SAPS タンパク質を一過性に過剰発現させ、神経突起形成に与える影響を検討した。神経分化刺激なしで、全ての SAPS 導入細胞において神経突起形成が促進傾向であったが、PP6R2 とともに PP6 を過剰発現させた場合のみ、神経突起形成割合が有意に上昇した (図 7)。したがって、PP6-PP6R2 複合体が神経細胞の分化と伸長の誘導に関与している可能性が考えられる。

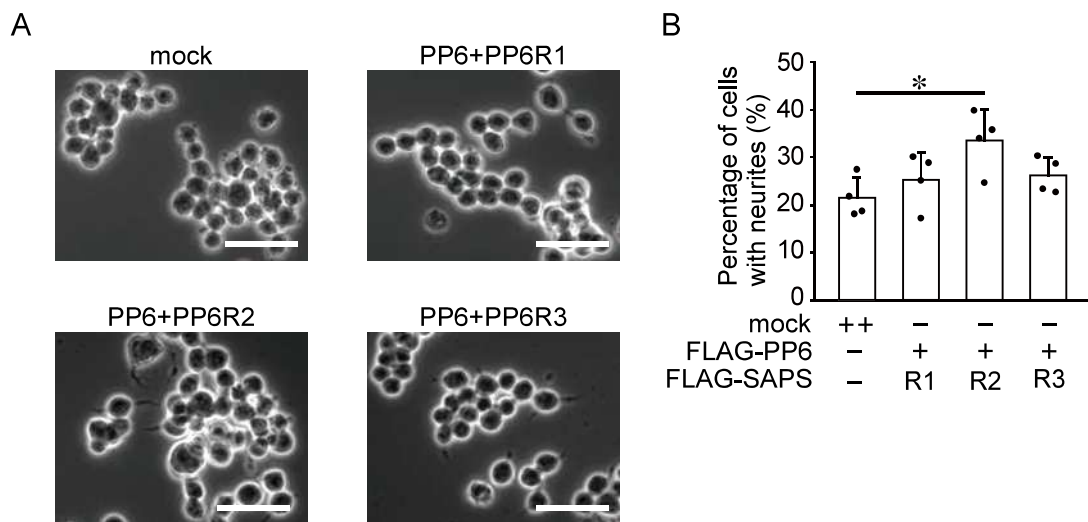


図7 PP6複合体が神経突起形成に与える影響

(A, B) N2a細胞にFLAG-PP6およびFLAG-SAPS (PP6R1, PP6R2, PP6R3)を発現するプラスミドを導入し、24時間後に位相差顕微鏡下で形態変化を撮影し (A)、神経突起を持つ細胞の割合を算出した (B)。N=4。スケールバー：50 μm 。*: $P < 0.05$ 。

2-2-8 PP6 発現抑制が神経分化シグナルに与える影響

PP6 が神経分化を促進する可能性が示されたことから、PP6 発現抑制が神経分化シグナル伝達に与える影響を検討した。N2a 細胞において、PP6 発現抑制は CREB Ser133 リン酸化を顕著に抑制した (図 8A, B)。さらに、PP6 発現抑制は Akt Ser473 リン酸化も抑制した (図 8C, D)。したがって、PP6 発現抑制は Akt/CREB 活性を抑制することが示唆された。

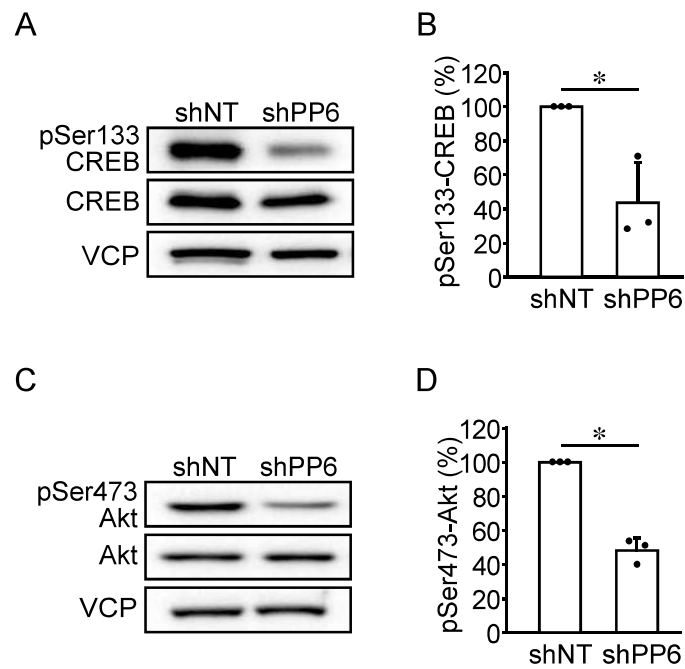


図8 PP6 発現抑制が神経分化シグナルに与える影響

(A–D) N2a 細胞に、shNT または shPP6 を安定的に発現させ、CREB (A, B) および Akt (C, D) のリン酸化レベルおよびタンパク質発現量を western blotting により解析した。それぞれの代表例 (A, C) と shNT を発現させた細胞のリン酸化レベルを 100% として相対値で表した定量図 (B, D)。N=3。*: $P < 0.05$ 。

2-2-9 PP6 と mTORC2 の相互作用の解析

Akt Ser473 は mTORC2 の基質であることから (46)、Akt Ser473 リン酸化レベルの低下は mTORC2 の活性低下を示唆する。そこで、PP6 と mTORC2 の相互作用の可能性を pull-down 法および免疫沈降法を用いて解析した。HEK293T 細胞に HA-mTOR および Stag-PP6 を発現させ、Stag ビーズで pull-down を行い、western blotting により解析したところ、mTOR と PP6 の結合が観察された (図 9A)。また、mTORC2 の構成因子である Rictor と PP6 の結合を検討した。HEK293T 細胞に HA-PP6、FLAG-Rictor を発現させ、FLAG M2 ビーズで免疫沈降を行い、western blotting により解析したところ、Rictor と PP6 の結合が観察された (図 9B)。したがって、PP6 は mTORC2 と相互作用し、その活性を制御する可能性が示された。

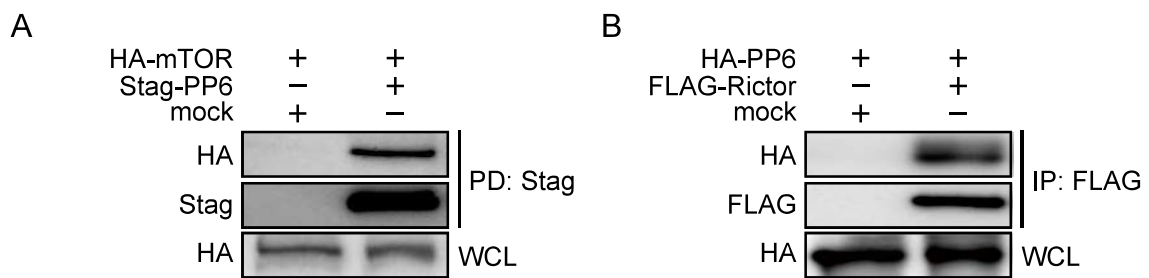


図9 PP6 と mTORC2 の相互作用の解析

(A) HEK293T 細胞に、HA-mTOR および Stag-PP6 を発現させ、Stag ビーズで pull-down を行い、western blotting により mTOR と PP6 の結合を解析した代表例。

PD: pull down、WCL: whole cell lysate。N=3。

(B) HEK293T 細胞に、HA-PP6 および FLAG-Rictor を発現させ、FLAG M2 ビーズで免疫沈降を行い、western blotting により PP6 と Rictor の結合を解析した代表例。

IP: immunoprecipitation。N=3。

2-2-10 PP6 複合体と SIN1 の相互作用の解析

mTORC2 の構成因子である SIN1 の Thr86 リン酸化は、SIN1 を mTORC2 から解離させ、mTORC2 活性を抑制する (26)。PP6 が mTORC2 と相互作用することから、SAPS と SIN1 の相互作用を、免疫沈降法を用いて解析した。HEK293T 細胞に各種の FLAG-SAPS を発現させ、FLAG M2 ビーズで免疫沈降を行い、western blotting により解析したところ、全ての SAPS タンパク質が mTOR および SIN1 と結合することが観察された (図 10A)。さらに PP6 発現抑制が SIN1 Thr86 リン酸化レベルに与える影響を検討したところ、PP6 発現抑制細胞では SIN1 のリン酸化レベルの顕著な上昇が認められた (図 10B, C)。以上の結果から、PP6 は SIN1 を脱リン酸化することで mTORC2 を活性化する可能性が示された。

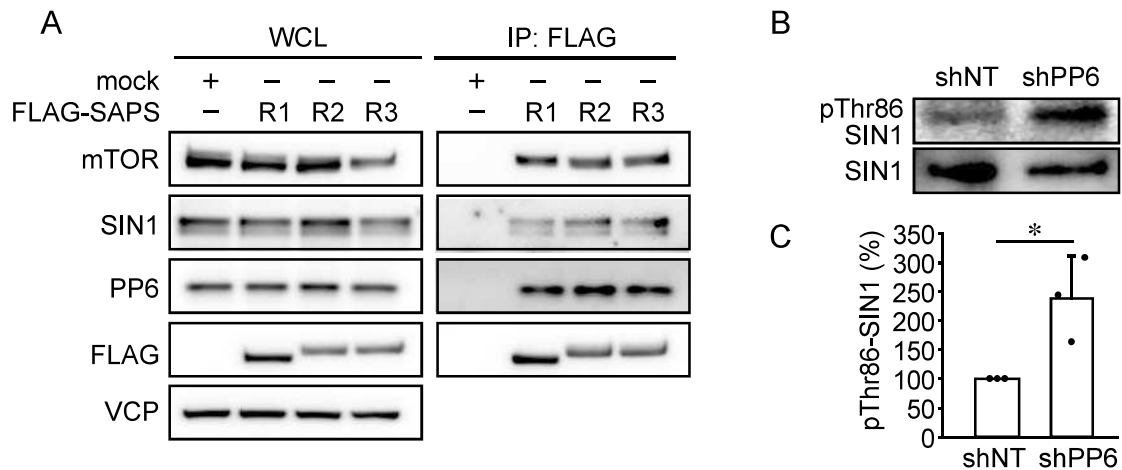


図 10 PP6 複合体と SIN1 の相互作用の解析

(A) HEK293T 細胞に、FLAG-SAPS (R1 : PP6R1、R2 : PP6R2、R3 : PP6R3) を一過性に発現させ、FLAG-M2 ビーズで免疫沈降を行い、western blotting により SAPS と mTORC2 の結合を解析した。N=3。

(B, C) N2a 細胞に shNT または shPP6 を安定発現させ、SIN1 のリン酸化レベルおよびタンパク質発現量を western blotting により解析した代表例 (B) と shNT を発現させた細胞の SIN1 リン酸化レベルを 100% として相対値で表した定量図 (C)。N=3。*: $P < 0.05$ 。

2-2-11 SIN1 Thr86 リン酸化を担うキナーゼの同定

SIN1 の Thr86 は、p70 S6K や Akt によりリン酸化を受ける (26)。リコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* キナーゼアッセイにより、p70 S6K と Akt の両方が SIN1 を直接リン酸化することを確認したが、Akt の方がより強力にリン酸化を誘導した (図 11A, B)。N2a 細胞において、PP6 発現抑制が p70 S6K 活性に与える影響を検討したところ、p70 S6K のリン酸化レベルに変化は認められなかった (図 11C, D)。また、PP6 発現抑制は Akt 活性を抑制したことから (図 8C, D)、PP6 は上流のキナーゼの活性を抑制するのではなく、直接 SIN1 を脱リン酸化して mTORC2/Akt/CREB シグナルを活性化する可能性が示された。

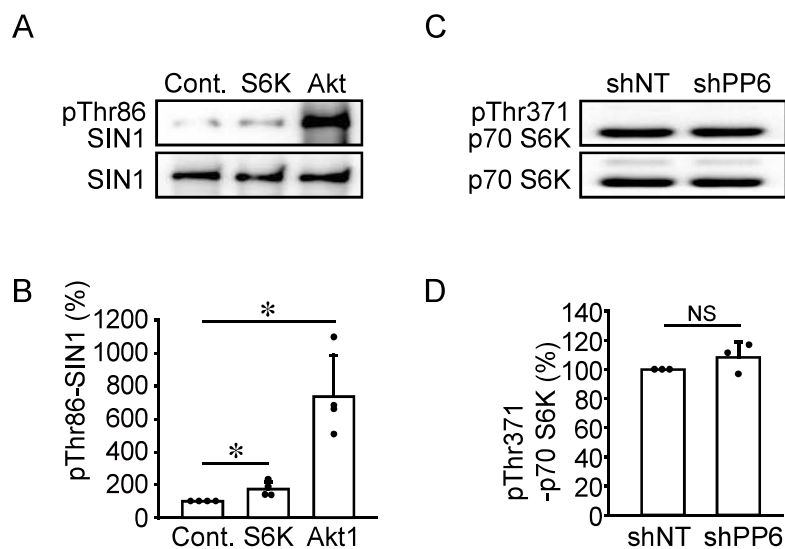


図 11 SIN1 Thr86 リン酸化を担うキナーゼの同定

(A, B) リコンビナント SIN1 を活性型 p70 S6K または Akt と 1 時間反応させ、SIN1 Thr86 リン酸化レベルを western blotting により解析した代表例 (A) と滅菌水処置 (Cont.) におけるリン酸化レベルを 100%として相対値で表した定量図 (B)。N=4。*: $P < 0.05$ 。

(C, D) N2a 細胞に shNT または shPP6 を安定発現させ、p70 S6K リン酸化レベルおよびタンパク質発現量を western blotting により解析した代表例 (C) と shNT を発現させた細胞のリン酸化レベルを 100%として相対値で表した定量図 (D)。N=3。NS: not significantly different。

2-3 考察

2-3-1 神経突起形成時の PP6 発現の上昇

近年、type 2A protein phosphatase ファミリーの神経細胞機能における重要性が注目されている。本研究では、神経分化刺激が N2a 細胞において、PP2A および PP4 タンパク質発現量に影響を与えることなく、PP6 タンパク質発現量のみを増加させることを明らかにした。結腸上皮細胞株では、細胞密度依存的に PP6 の mRNA 発現量が増加することでタンパク質発現量が増加することが報告されている (47)。一方、本研究では PP6 の mRNA レベルは神経分化刺激に影響されなかったことから、転写後の制御機構が関与していると考えられる。PP2A タンパク質がユビキチン/プロテアソーム系によって制御されているのに対して、PP6 タンパク質は選択的オートファジーにより分解される (42, 48)。神経分化刺激下では p62 と LC3-I の蓄積が誘導されたことから、オートファジー活性が低下していると推測される。したがって、神経分化刺激がオートファジーを抑制することによって PP6 タンパク質を増加させた可能性がある。PP6 は 3 つの調節サブユニット (SAPS) のうちの 1 つと複合体を形成し、特定の基質へとリクルートされる (49)。本研究では、神経分化刺激時に SAPS のタンパク質発現量が上昇傾向を示した。以前の報告では、SAPS のタンパク質発現は PP6 タンパク質発現とよく相関しており (40, 47)、PP6 の発現量が上昇することで SAPS が安定化した可能性が考えられる。この点を明らかにするためには、SAPS の mRNA 発現量の解析や、発現上昇が起こるタイミングの比較解析を行う必要がある。

2-3-2 神経細胞におけるオートファジー

オートファジーは、終末分化した神経細胞から凝集したタンパク質や損傷したオルガネラを除去するための重要なメカニズムである (50)。神経細胞は、軸索のように細胞体から極端に離れた細胞内コンパートメントを有しており、他の細胞と比較して高度に区画化されている。有糸分裂後の細胞であるため、生涯にわたってタンパク質やオルガネラを除去することによって、離れた区画にかかるストレスをしっかりと管理する必要がある。そのため、神経細胞は他の細胞種とは異なる方法で飢餓に対するオートファジー反応を制御しなければならず、神経系特有のオートファジー制御機構が必要とされる (51)。オートファジー関連タンパク質 Atg5 と Atg7 の神経細胞特異的ノックアウトマウスでは、加齢に伴う神経細胞の脱落が見られ (52, 53)、Atg5 を過剰発現させたマウスでは運動機能の改善が認められた (54)。これらの報告は、オートファジーの活性化が神経保護につながることを示唆する。本研究では、神経分化刺激によるオートファジー活性の低下が観察されたが、神経突起伸長におけるオートファジーの役割については議論の余地がある。オートファジーが神経突起伸長に正に働く、負に働く、あるいは関与しないことを示す報告がそれぞれ存在する (55-57)。最近の報告では、オートファゴソーム形成を制御する Rab26 の guanosine exchange factor (GEF) である Plekhg5 をノックアウトすると、シナプス小胞のオートファジーが損なわれ、軸索の伸長が抑制される (58)。また、オートファゴソーム形成時に膜融合を促進する VAMP7 を遺伝的に欠損させると、神経突起の伸長が抑制され (59)、Atg12 をコードする Mir-505p を過剰に投与すると、*in vivo* および *in vitro* で軸索が過剰に伸長する (60)。一方、ヒト神経芽腫細胞株 SH-SY5Y 細胞では、パーキンソン病に見られる leucine rich-repeat kinase 2

(LRRK2) の G2019S 変異体を発現させるとオートファジーが活性化するが軸索伸長は抑制され、Atg7 ノックアウトによりオートファジーを抑制すると軸索伸長が回復する (61)。N2a 細胞に関しては、Zeng らが、class III PI3K に対する阻害剤を用いてオートファジーを阻害すると RA による神経分化が阻害されるのに対して、mTORC1 阻害剤である rapamycin 処置によるオートファジーの促進も RA 誘導性神経分化を阻害することを報告している (62)。これらの結果は、N2a 細胞の神経分化にはオートファジーが適度に活性化していることが必要であることを示唆している。

2-3-3 PP6 による mTORC2 制御

N2a 細胞において PP6 の発現を抑制すると、SIN1 Thr86 リン酸化レベルの増加が認められた。p70 S6K または Akt による SIN1 Thr86 のリン酸化は、SIN1 を mTORC2 から解離させ、Akt に対する mTORC2 活性の低下につながる (25, 26)。mTORC2 活性化における SIN1 リン酸化の役割については議論があるが (63)、本研究の PP6 発現抑制が Akt Ser473 リン酸化レベルを低下させるという結果は、SIN1 リン酸化が mTORC2 活性を低下させるという考えを支持している。

In vitro キナーゼアッセイにより、p70 S6K と Akt の両方が SIN1 Thr86 をリン酸化することが明らかになった。Akt の方がより強力にリン酸化を誘導するが、PP6 発現抑制では Akt 活性が低下することから、SIN1 のリン酸化レベルの増加は Akt によるものではないと考えられる。p70 S6K は脳の成長に重要な役割を果たす mTORC1 の下流にある。Raptor ノックアウトマウス (mTORC1 活性不全) は脳のサイズが小さく、出生後数時間で死亡する (64)。神経細胞特異的 (CaMKII α -Cre) Raptor ノックアウトマウスでは、樹状突起の形成が阻害され

脳の重量が減少する (65)。mTORC1 の活性化は軸索成長の誘導に重要であり、その下流因子である p70 S6K の活性化は軸索再生を促進する (66)。PP6 は E3 リガーゼ ZNRF2 を脱リン酸化することで mTORC1 を正に制御するが (67)、N2a 細胞では、PP6 発現抑制は p70 S6K 活性に影響を与えなかった。したがって、PP6 発現抑制による SIN1 のリン酸化の増加は、その責任キナーゼの活性化によって媒介されるものではないと考えられる。すべての SAPS が mTORC2 と結合したことからも、PP6 が SIN1 を直接脱リン酸化していると予想される。

2-3-4 総括

本章では、type 2A protein phosphatase の 1 つである PP6 が SIN1 を脱リン酸化して mTORC2 を活性することで、Akt-CREB シグナルを介した神経分化を促進することを明らかにした。mTORC2 は細胞代謝において重要な役割を果たしており、mTORC2 活性の調節異常は代謝異常やがんなどの疾患にも関わる (68, 69)。PP6 による mTORC2 制御の分子機構が、これらの疾患にも関与しているか興味深い。

第3章 TGF- β シグナルにおけるPP6の役割

3-1 背景および目的

Transforming growth factor β (TGF- β) は発生初期から発現し、細胞遊走、分化、増殖などの細胞プロセスを制御する多面的なサイトカインである (70)。TGF- β は Ser/Thr キナーゼ受容体である I 型および II 型 TGF- β 受容体に結合し、Smad3 のリン酸化を誘導する (71)。Smad3 は Smad4 と複合体を形成して核に移行し、標的遺伝子の転写を制御する (70)。この古典的な TGF- β /Smad 経路に加えて、TGF- β は、非古典的経路と呼ばれる PI3K/Akt、MAPK、mTOR シグナル伝達を含む複数の細胞内経路を、古典的経路と協調または独立して活性化する (72)。

Type 2A protein phosphatase である PP2A、PP4、PP6 は進化的に高度に保存されており、PP6 は、PP2A および PP4 とアミノ酸配列で 58.1%と 62.6%の相同性を持つ (49)。PP6 は生体内でユビキタスに発現しており、マウス胚発生に必須であり (73)、細胞周期進行 (74–76)、DNA 損傷応答 (77–79)、炎症応答など (80, 81)、多様な細胞プロセスを制御する。TGF- β は PP2A を直接活性化し、p70S6K を脱リン酸化することで細胞周期の進行を阻害することが知られている (82)。また、低酸素条件下においてのみ PP2A は Smad3 を脱リン酸化することが報告されており (83)、TGF- β シグナル伝達の制御における PP2A の複雑な制御機能が示唆されているが、PP6 の TGF- β シグナルにおける役割は全く明らかにされていない。そこで本章では、PP6 の TGF- β シグナル制御機構を解明することを目的とした。

3-2 実験結果

3-2-1 TGF- β 刺激による PP6 タンパク質発現量の変化

マウス胎児線維芽細胞 MEF を TGF- β で 8 時間刺激し、PP6 および各種 SAPS のタンパク質発現量を western blotting により解析した。TGF- β 刺激により、PP6 タンパク質発現量は約 40% 上昇することが認められた (図 12A, B)。また、SAPS のうち PP6R1 の発現の有意な増加が認められた (図 12A, C)。

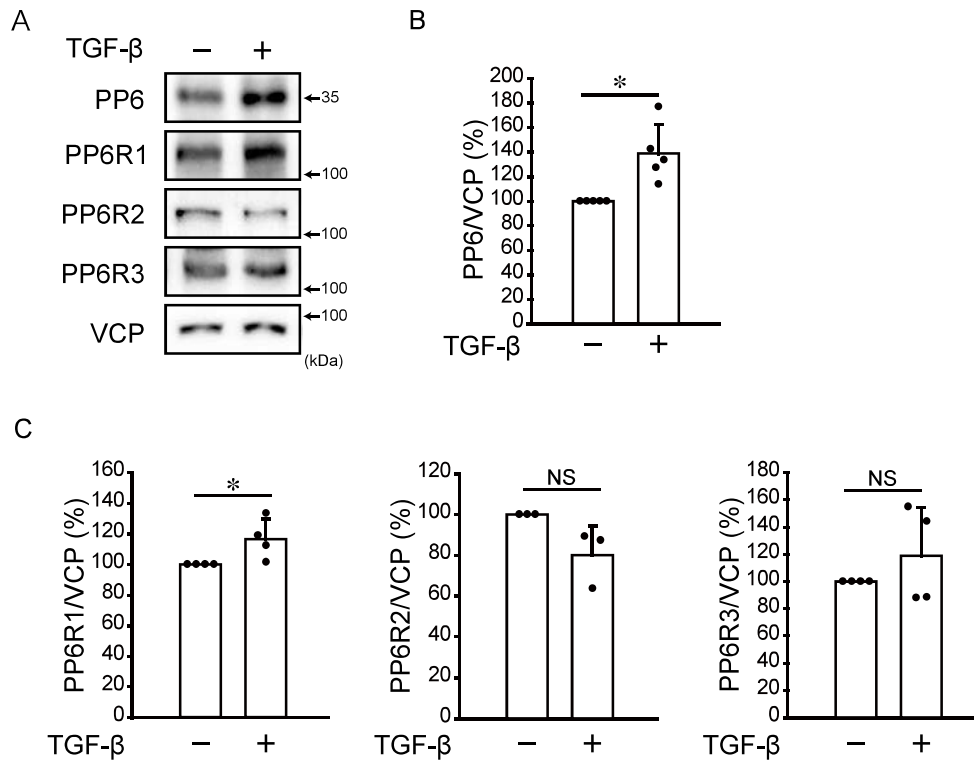


図 12 TGF-β 刺激による PP6 タンパク質発現量の変化

(A-C) マウス胎児線維芽細胞 MEF を TGF-β (10 ng/mL) で 8 時間処置し、PP6 および SAPS (PP6R1, PP6R2, PP6R3) のタンパク質発現量を western blotting により検討した代表例 (A) と各バンド濃度をローディングコントロールである VCP で補正し、TGF-β 無処置を 100% として相対値で表した PP6 (B) および SAPS (C) の定量図。N=3-4。*: $P < 0.05$ 。NS: not significantly different.

3-2-2 TGF- β による PP6 タンパク質増加の分子機構の検討

PP6 タンパク質の発現増加メカニズムを明らかにするため、TGF- β 刺激 8 時間後の PP6 mRNA 発現を解析した (図 13A)。PP6 mRNA 発現の増加は約 110% に留まったことから (図 13A)、転写以外の制御機構の関与が示唆された。PP6 タンパク質は p62 依存的に選択的オートファジーによって分解されることから (84)、TGF- β 刺激時の p62 タンパク質発現量を western blotting により解析した。TGF- β 刺激による p62 の蓄積が確認され (図 13B, C)、オートファジー活性の低下が PP6 タンパク質の増加に関与していることが示唆された。以上の結果から、TGF- β 刺激は、転写および翻訳後の制御機構を介して PP6 タンパク質を増加させることが示唆された。

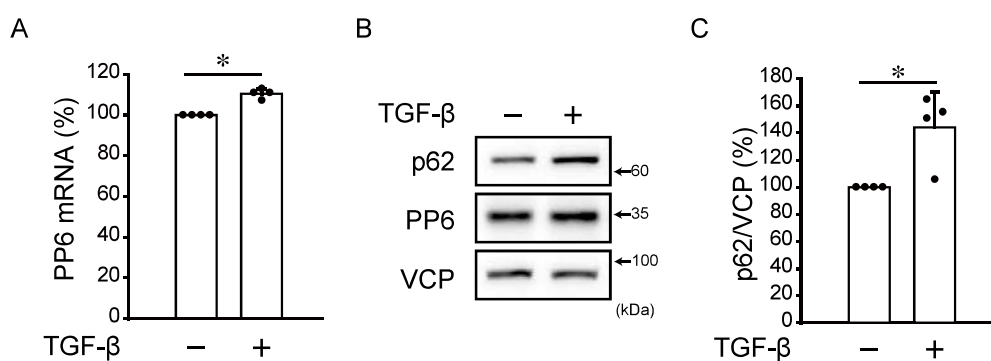


図 13 TGF-β による PP6 タンパク質増加の分子機構の検討

(A) MEF を TGF-β (10 ng/mL) で 8 時間処置し、PP6 mRNA 発現量を real-time PCR で解析した。TGF-β 無処置の PP6 mRNA 発現量を 100% として相対値で表した定量図。N=4。*: $P < 0.05$ 。

(B, C) MEF を TGF-β (10 ng/mL) で 8 時間処置し、p62 タンパク質および PP6 タンパク質発現量を western blotting により検討した代表例 (B) と各バンド濃度を VCP で補正し、TGF-β 無処置を 100% として相対値で表した定量図。N=4。*: $P < 0.05$ 。

3-2-3 PP6 欠損が TGF- β シグナルの古典的経路に与える影響

PP6 の TGF- β シグナル伝達における役割を明らかにするために、CreERT-PP6^{flox/flox} MEF を用いて実験を行った (42)。CreERT-PP6^{flox/flox} MEF を 4-hydroxytamoxifen (4HT) で処理すると、PP6 遺伝子の欠失が誘導される。この細胞を 4HT で 48 時間処置し、さらに TGF- β で 1 時間刺激し、Smad3 のリン酸化レベルを western blotting により解析した。無刺激下では、Smad3 のリン酸化はほとんど観察できなかったが、TGF- β 刺激による Smad3 リン酸化の増加が PP6 欠損によって抑制された (図 14A, B)。

Smad 複合体は標的遺伝子の転写調節領域に存在する smad binding element (SBE) に結合して標的遺伝子の発現を誘導する (70)。PP6 の欠損が Smad3 の転写活性に与える影響を、SBE ルシフェラーゼレポーターアッセイにより解析した (図 14C)。CreERT-PP6^{flox/flox} MEF を 4HT で 48 時間後、TGF- β で 8 時間刺激したところ、PP6 欠損は基底状態および TGF- β 刺激時の SBE ルシフェラーゼ活性を低下させた。したがって、PP6 欠損が TGF- β 古典的経路を抑制し、標的遺伝子の発現を抑制することが示された。

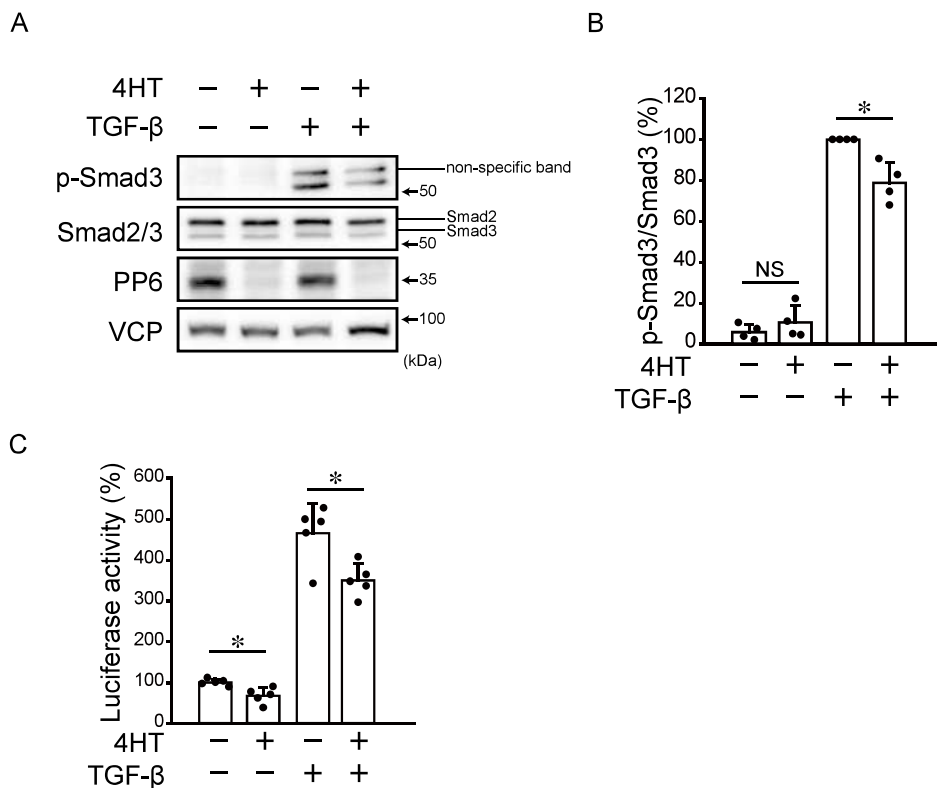


図 14 PP6 欠損が TGF-β シグナルの古典的経路に与える影響

(A, B) CreERT-PP6^{flox/flox} MEF を、4-hydroxytamoxifen (4HT : 500 nM) で処置または無処置で 48 時間培養した後に、TGF-β (10 ng/mL) で 1 時間刺激し、Smad3 リン酸化レベルと Smad2/3 タンパク質発現量を western blotting により解析した。代表例 (A) と Smad3 リン酸化レベルを Smad3 タンパク質発現量で補正し、4HT-/TGF-β+ を 100% として相対値で表した定量図 (B)。N=4。*: $P < 0.05$ 。NS: not significantly different。

(C) CreERT-PP6^{flox/flox} MEF を、4HT (500 nM) 処置または無処置で 48 時間培養した後に、TGF-β (10 ng/mL) で 8 時間刺激し、smad binding element (SBE) ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。4HT-/TGF-β- を 100% として相対値を示した。N=5。*: $P < 0.05$ 。

3-2-4 PP6 欠損が TGF- β シグナルの非古典的経路に与える影響

TGF- β シグナルには Smad 非依存的な非古典的経路が存在する (72)。CreERT-PP6^{flox/flox} MEF を 4HT で 48 時間処置した後に、TGF- β で 1 時間刺激し、PP6 が TGF- β 非古典的経路に与える影響を western blotting により解析した。MEF において TGF- β は、非古典的経路の下流因子のうち、p38 リン酸化レベルのみを増加させた (図 15A)。また、TGF- β 誘導性の p38 リン酸化レベルの上昇は、PP6 欠損により顕著に抑制された (図 15B)。以上の結果から、PP6 の欠損は、TGF- β シグナルの古典的経路だけでなく、非古典的経路の p38 MAPK 経路を抑制することが示された。

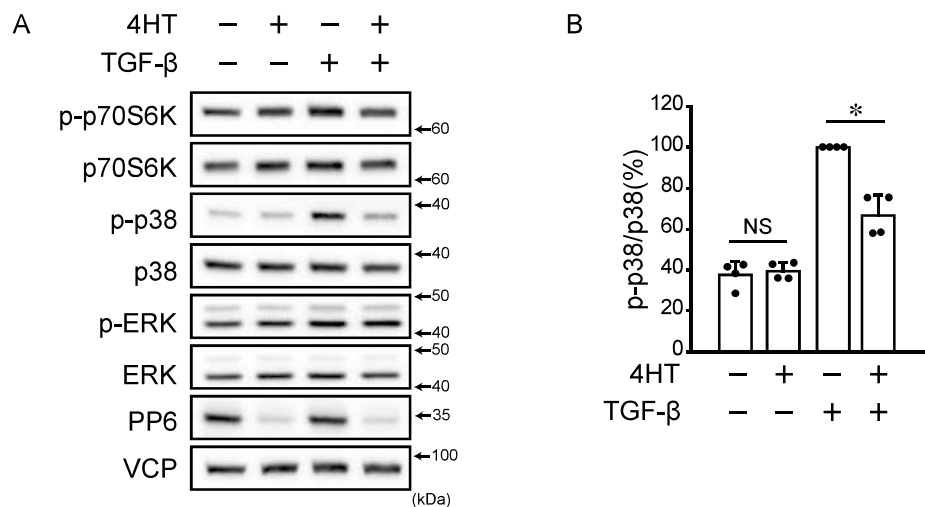


図 15 PP6 欠損が TGF- β シグナルの非古典的経路に与える影響

(A, B) CreERT-PP6^{flox/flox} MEF を、4HT (500 nM) 処置または無処置で 48 時間培養した後に、TGF- β (10 ng/mL) で 1 時間刺激し、非古典的経路の下流因子 (p70 S6K、p38、ERK) のリン酸化レベルとタンパク質発現量を western blotting により解析した。代表例 (A) と p38 のリン酸化レベルを p38 タンパク質発現量で補正し、4HT-/TGF- β +を 100%として相対値で表した定量図 (B)。N=4。*: $P < 0.05$ 。NS: not significantly different。

3-2-5 PP6 欠損が TGF- β 誘導性の細胞遊走に与える影響

TGF- β は MEF において細胞遊走を促進する (85, 86)。最後に、TGF- β によって誘導される細胞遊走に対する PP6 欠損の影響を検討した。CreERT-PP6^{flox/flox} MEF を 4HT で 48 時間処置した後に、TGF- β で 8 時間刺激し、細胞遊走能を wound healing assay により解析した。PP6 欠損は、基底状態の細胞遊走には影響を与えなかったが、TGF- β 誘導性の細胞遊走を阻害した (図 16)。これらの結果から、PP6 欠損が TGF- β シグナルを抑制することで細胞遊走を阻害することが示された。

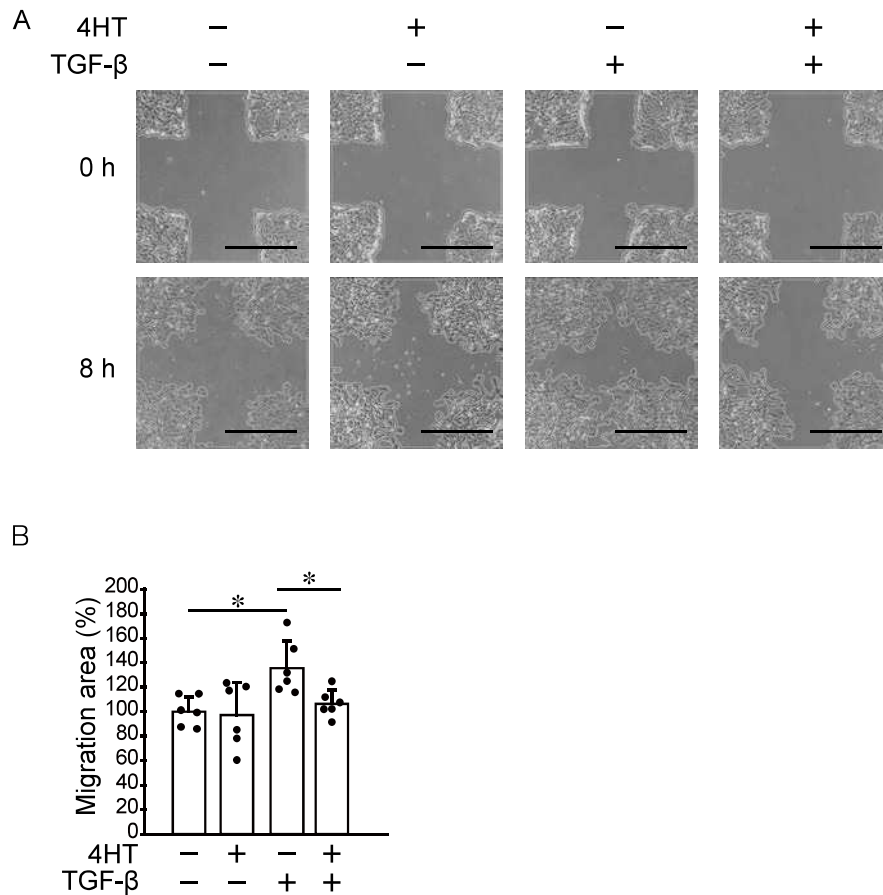


図 16 PP6 欠損が TGF- β 誘導性の細胞遊走に与える影響

(A, B) CreERT-PP6^{flox/flox} MEF を、4HT (500 nM) 処置または無処置で 48 時間培養した後に、TGF- β (10 ng/mL) で 8 時間刺激し、wound healing assay を用いた細胞遊走能を解析した。創傷直後 (0 h) および 8 時間後の代表的な写真 (A) と 4HT-/TGF- β -の平均値を 100% として相対値で表した定量図 (B)。N=6。スケールバー: 50 μ m。*: $P < 0.05$ 。

3-3 考察

3-3-1 TGF- β 刺激による PP6 タンパク質発現増加の分子機構

TGF- β 刺激は、PP6 タンパク質と PP6 mRNA の発現を増加させた。タンパク質発現の増加率と比較して mRNA 量の増加率は小さく、大部分が翻訳後制御に依存すると考えられる。以前当研究室では、PP6 タンパク質が p62 依存性の選択的オートファジーによって分解されることを報告したが (42)、本研究においても、TGF- β 刺激によって p62 が蓄積しており、オートファジーが阻害されている可能性が示された。TGF- β は、多くの組織においてオートファジーと線維化の両方を誘導することが古くから報告されている (87-89)。また、MEF においてこのオートファジーの誘導は TGF- β で長時間 (48 時間以上) 処置した後に観察されている (90)。本研究では、TGF- β の処置時間が 8 時間までに制限されているため、オートファジー誘導は観察されなかった可能性が考えられる。近年、転写因子 Hes1 の活性化が immunoglobulin binding protein 1 (IGBP1) の転写を促進し、IGBP1 が E3 ユビキチンリガーゼ CHIP と PP6 の結合を阻害することで、PP6 のユビキチン化を抑制することが報告された (91)。MEF において、Hes1 は TGF- β によって活性化されることから (92)、この機構が PP6 タンパク質発現を増加させている可能性も考えられる。

3-3-2 PP6 による TGF- β シグナルの制御機構

本研究では、PP6 欠損が Smad3 Ser423/425 リン酸化レベルを減少させる分子機構は明らかにできていない。TGF- β シグナル伝達は、Smad3 のリンカー領域に位置する Ser 残基のリン酸化が C 末端に位置する Ser423/425 リン酸化を阻害

することで抑制される (93)。また、II 型 TGF- β 受容体 (TGFB2) の Ser416 リン酸化は、受容体のキナーゼ活性を阻害する (94)。したがって、PP6 欠損はこれらのリン酸化レベルを増加させることで、TGF- β シグナル伝達を抑制している可能性が考えられる。p38 の上流キナーゼである TGF- β -activated kinase1 (TAK1) は PP6 の基質であり、PP6 は TAK1 を脱リン酸化することで interleukin-1 (IL-1) や tumor necrosis factor α (TNF- α) 刺激による p38 リン酸化を抑制する (94–96)。一方で、メサンギウム細胞における TGF- β 刺激後の TAK1 の脱リン酸化は、PP6 ではなく PP2A が制御することが報告されている (97)。本研究の結果、PP6 欠損は p38 リン酸化レベルを低下させたことから、MEF においても、PP6 は TGF- β 刺激下での TAK1 脱リン酸化には関与していない可能性がある。

3-3-3 総括

本章では、PP6 が TGF- β シグナル伝達を正に制御することを初めて示した。TGF- β は、正常組織や早期がんでは分化を誘導することから腫瘍抑制因子として働く。また、PP6 もドライバー遺伝子の変異が原因のがんにおいて、がん抑制因子として働く (98–101)。本研究の結果から、PP6 による TGF- β シグナルの増強が、がんの発生初期における PP6 の抗腫瘍作用の一因になっている可能性が示された。

第4章 NanoBiTシステムを用いた PDK1-Akt タンパク質相互作用メカニ
ズムの解明

4-1 背景および目的

4-1-1 PI3K/Akt シグナル

PI3K/ Akt シグナルは、細胞外シグナルに応答して細胞の成長、増殖、生存を広く制御している (102)。がん、糖尿病、自己免疫疾患、神経疾患などさまざまな疾患でこの経路の異常が起こることから、その制御機構を理解することは極めて重要である (103)。Ser/Thr キナーゼである Akt は、PI3K/ Akt シグナルの中心的存在であり、Akt1、Akt2、Akt3 の3種類の相同性の高いアイソフォームを持つ。それぞれのアイソフォームは細胞内局在と組織特異的な発現レベルが異なり (104)、Akt1 はユビキタスに発現し、細胞質および細胞膜に存在するのに対し、Akt2 は筋肉組織のミトコンドリア内に多く存在し、Akt3 は核に局在し、神経細胞で高発現を示す (105–107)。現在受け入れられている古典的 Akt 活性化モデル (図 17) では、成長因子である epidermal growth factor (EGF) などの刺激が PI3K を活性化すると、phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PI(3,4,5)P₃) が細胞膜で合成される。PI(3,4,5)P₃ は、3-phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1) やその基質である Akt などの PH ドメインを持つタンパク質に結合する (108)。Akt の PH ドメインが PI(3,4,5)P₃ に結合すると立体構造が変化して活性化ループが露出し、PDK1 によって Akt の Thr308 がリン酸化される (109, 110)。さらに、mTORC2 が Akt の C 末端に存在する疎水性モチーフの Ser473 をリン酸化することで、Akt が完全に活性化し、mTORC1 など下流の基質がリン酸化される (111)。この経路の活性化は、phosphatase and tensine homolog (PTEN) や src homology 2-containing inositol phosphatase 2 (SHIP2) などの PI(3,4,5)P₃ 脂質ホスファターゼの働きで終息する (112)。また、PP1 と PP2A も Akt を直接脱リン酸化することで Akt シグナル伝達の終結に関与している (113, 114)。しかし、

PDK1/Aktの結合とそれに続く Aktの活性化メカニズムは完全には解明されておらず、さらに Akt のリン酸化がこの結合にどのような影響を及ぼすのかは不明である。

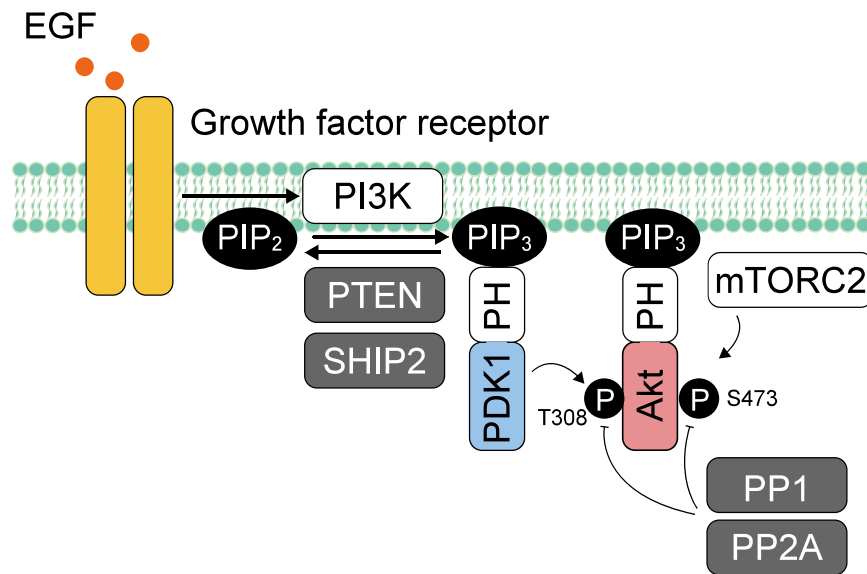


図 17 古典的な Akt 活性化モデル

Epidermal growth factor (EGF) などの外部からの刺激により PI3K が活性化されると、細胞膜で PI(3,4,5)P₃ (PIP₃) が合成される。PIP₃ は、PDK1 や Akt など PH ドメインを持つタンパク質と結合して細胞膜へリクルートする。PDK1 が Akt Thr308 をリン酸化し、さらに mTORC2 が Ser473 をリン酸化することで、Akt の完全な活性化が引き起こされる。これらの反応はホスファターゼ (phosphatase and tensine homolog: PTEN, src homology 2-containing inositol phosphatase 2: SHIP2, PP1, PP2A) によって PIP₃ や Akt が脱リン酸化されることで終息する。

4-1-2 研究目的

本研究では、生細胞内で生じる EGF 刺激時の PDK1/Akt 結合の時間変化を NanoBiT システムを用いて解析し、Akt のリン酸化状態との関係を明らかにすることで、PDK1-Akt タンパク質相互作用メカニズムを解明することを目的とした。

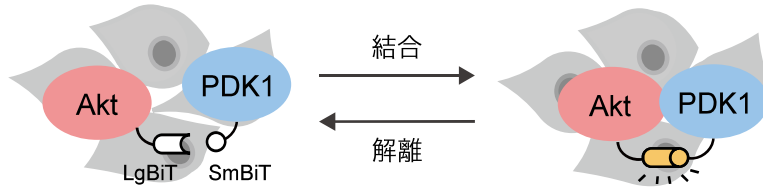
4-2 実験結果

4-2-1 LgBiT/SmBiT の最適な組み合わせの検討

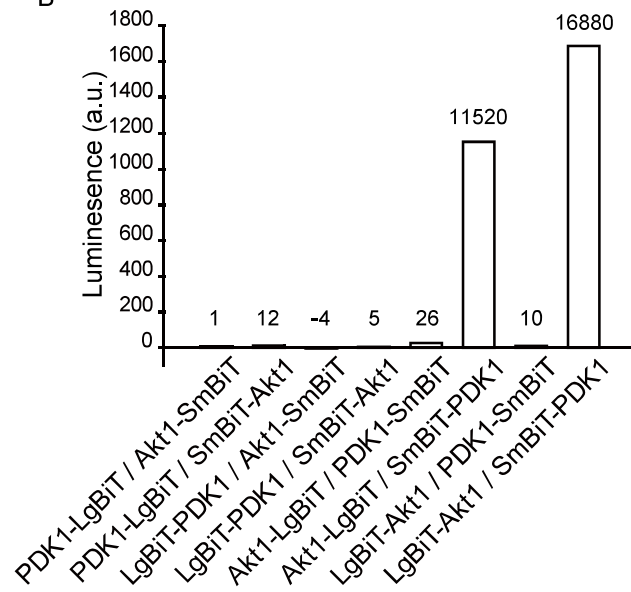
NanoLuc Binary Technology (NanoBiT) は、NanoLuc ルシフェラーゼを分割したタンパク質間相互作用解析システムであり、生細胞におけるタンパク質間相互作用の動態をリアルタイムに解析するために開発された (115)。このシステムでは、Large-BiT (LgBiT) サブユニットと Small-BiT (SmBiT) サブユニットの 2 つのタグを標的タンパク質に融合し、細胞内に発現させる。LgBiT と SmBiT の親和性は非常に低く、融合タンパク質が十分に密接に相互作用すると、機能的なルシフェラーゼが再構成され発光を生じる (図 18A)。LgBiT と SmBiT の相互作用は迅速で可逆的であるため、このシステムは標的タンパク質の結合・解離をリアルタイムに解析するのに有用である。

NanoBiT システムでは、LgBiT タグおよび SmBiT タグを、標的タンパク質の N 末端または C 末端に融合させるため、8 種類の組み合わせから立体的に適切な位置にある組み合わせを同定する必要がある。293T 細胞を用いて、各種プラスミドを一過性に発現させ、8 種類の組み合わせの発光強度を測定したところ、N 末端 LgBiT-Akt1 と N 末端 SmBiT-PDK1 の組み合わせで最も強い発光が観察された (図 18B)。興味深いことに、LgBiT は Akt1 の PH ドメイン側に、SmBiT は PDK1 の N 末端側、すなわち PH ドメインとは反対側に融合しており距離がある (図 18C)。SmBiT と PDK1 キナーゼドメイン間をつなぐ 21 残基のリンカー配列と 70 残基の非構造化領域の存在が、ルシフェラーゼの再構成を可能にしていると推定される (図 18D)。

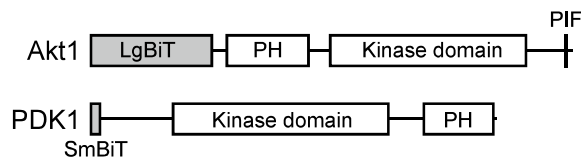
A



B



C



D

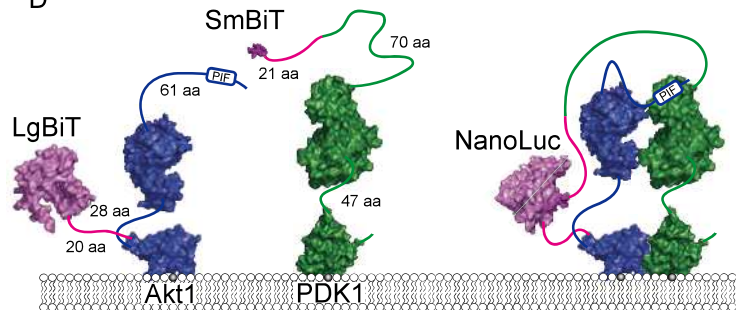


図 18 293T 細胞における LgBiT/SmBiT の最適な組み合わせの検討

(A) NanoLuc Binary Technology (NanoBiT) システムの原理。LgBiT 融合 Akt と SmBiT 融合 PDK1 が結合すると、ルシフェラーゼが再構成され発光する。

(B) 293T 細胞に LgBiT タグおよび SmBiT タグを N 末端または C 末端に付加した PDK1 および Akt1 を発現させ、24 時間後に発光強度を測定した。Duplicate で 1 回解析した平均値をグラフ化した。

(C) LgBiT-Akt1 および SmBiT-PDK1 の構造図。PH は PH ドメイン、PIF は疎水性 PDK1-interacting fragment モチーフを示す。

(D) LgBiT-Akt1 および SmBiT-PDK1 結合のモデル。Akt1 (PDB_ID: 4EKK および 1UNQ)、PDK1 (PDB_ID: 4RRV および 1W1D)、および NanoLuc (PDB_ID: 7SNS)。LgBiT と SmBiT の構造は AlphaFold2_Advanced (116)を用いて予測した。

4-2-2 MCF7 PDK1/Akt 細胞の EGF に対する反応性の検討

EGF 刺激による PDK1/Akt の結合変化をリアルタイムに測定するために、LgBiT-Akt1 および SmBiT-PDK1 を安定的に発現させたヒト乳がん細胞株 MCF7 (MCF7 PDK1/Akt 細胞) を樹立した。MCF7 細胞を EGF で処置したところ、Akt Thr308 リン酸化レベルの上昇が観察され、3-6 分の間をピークに、速やかに減少した (図 19A, B)。また、安定発現した LgBiT-Akt1 は、内因性 Akt と同じ動態でリン酸化することを確認した (図 19C)。そこで、MCF7 PDK1/Akt 細胞を EGF で刺激し、NanoBiT システムを用いて PDK1/Akt 結合の変化を 30 分間測定した。結合は EGF 刺激後速やかに増加し、約 3 分でピークに達した後、約 15 分で基底レベルまで徐々に減少した (図 20D)。PDK1 による Akt Thr308 リン酸化は、PDK1 と Akt の相互作用の後に起こること、western blotting ではタンパク質の抽出が完了するまでに若干のタイムラグがあることを考慮すると、NanoBiT システムによって観察された PDK1/Akt 結合がより早いピークを示したことは理にかなっている。これらの結果から、EGF 刺激後の PDK1/Akt 結合をリアルタイムに解析するための細胞株が樹立されたと考えられる。

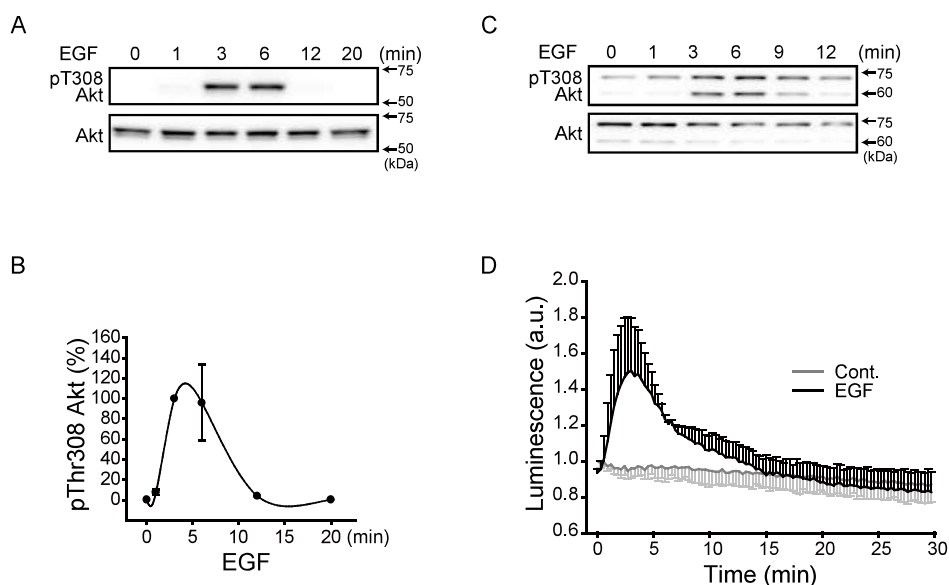


図 19 MCF7 PDK1/Akt 細胞の EGF に対する反応性の検討

(A, B) ヒト乳がん細胞株 MCF7 を無血清培地に交換して 4 時間後、EGF (50 ng/ml) で 1–20 分間刺激し、Akt の Thr308 リン酸化レベルとタンパク質発現量を western blotting により解析した。代表例 (A) と Akt のリン酸化レベルのピーク値を 100% として相対値で表した定量図 (B)。N=3。

(C) LgBiT-Akt1 および SmBiT-PDK1 を安定的に発現させた MCF7 細胞 (MCF7 PDK1/Akt 細胞) を無血清培地に交換して 4 時間後、EGF (50 ng/ml) で 1–12 分間刺激し、Akt の Thr308 リン酸化レベルとタンパク質発現量を western blotting により解析した。上部バンドが LgBiT-Akt、下部バンドが内因性 Akt を示す。N=3。

(D) MCF7 PDK1/Akt 細胞を EGF (50 ng/ml) で刺激し、EGF 刺激後の PDK1/Akt 結合を、NanoBiT システムを用いて 30 分間測定した。滅菌水処置 (Cont.) 直前の発光強度を 1.0 として相対値で表した。N=3。

4-2-3 EGFによる PDK1/Akt 結合に PIF 阻害が与える影響

PDK1 と Akt は、PDK1 のキナーゼドメインに存在する PIF ポケットと Akt1 の C 末端側に存在する PIF モチーフ間の相互作用によって安定化されたヘテロ二量体を形成する (117, 118)。PS48 は PDK1 の PIF ポケットに入る低分子化合物であり、飽和レベルで処置すると PDK1 と Akt の結合が阻害されることから (118)、PS48 を処置し作製した細胞の妥当性を検討した。MCF7 細胞を PS48 で前処置し、その後 EGF で刺激し、Akt Thr308 リン酸化レベルを western blotting により解析した。また、MCF7 PDK1/Akt 細胞において同様の処置を行い、PDK1/Akt 結合を、NanoBiT システムを用いて解析した。PS48 処置により Akt のリン酸化レベルに大きな変化は認められなかったが (図 20A, B)、NanoBiT システムにおいて、PS48 を高用量で処置すると、PDK1/Akt 結合の減少が認められた (図 20C-F)。本研究で用いた NanoBiT タグの組み合わせが、PDK1 の PIF ポケットと Akt の PIF モチーフの結合に影響を与えないことが示唆された。

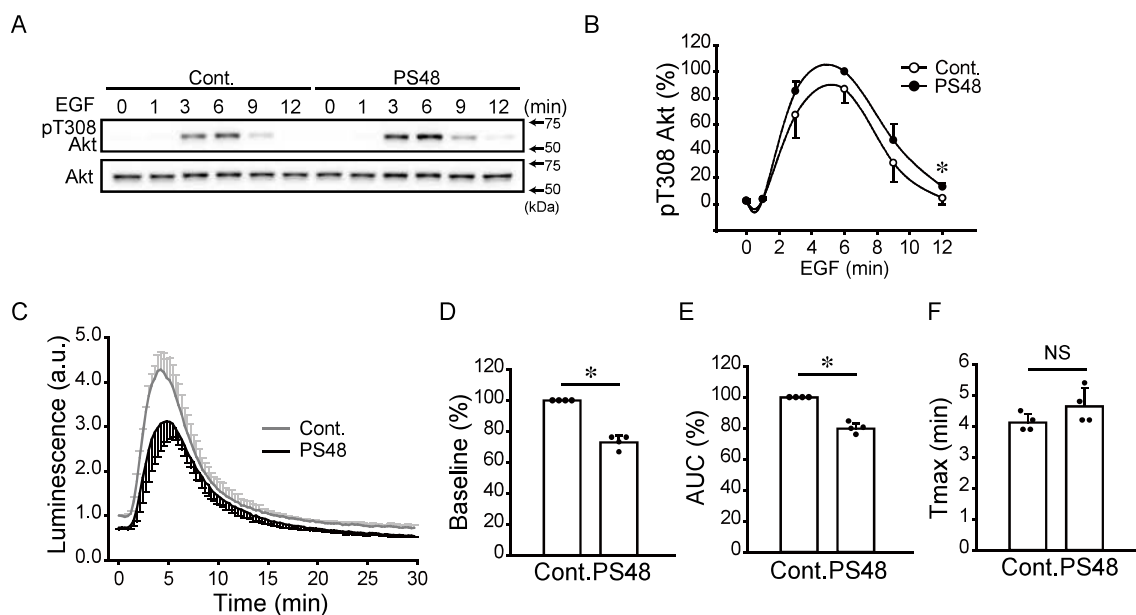


図 20 EGF による PDK1/Akt 結合に PIF 阻害が与える影響

(A, B) MCF7 細胞を無血清培地に交換し、PS48 (100 μ M) で 4 時間処置後、EGF (50 ng/ml) で 1–12 分間刺激し、Akt Thr308 リン酸化レベルとタンパク質発現量を western blotting により解析した。代表例 (A) と PS48 処置時の Akt のリン酸化レベルのピーク値を 100% として相対値で表した定量図 (B)。N=3。*: $P < 0.05$ (同時間の Cont. との比較)。

(C–F) MCF7 PDK1/Akt 細胞を無血清培地に交換し、PS48 (100 μ M) で 4 時間処置後、EGF (50 ng/ml) で刺激し、PDK1/Akt 結合を、NanoBiT システムを用いて 30 分間測定した (C)。発光強度は DMSO 処置 (Cont.) 0 秒時の発光強度を 1.0 として相対値で表した。EGF 刺激前の発光強度 (D)、EGF 刺激後の PDK1/Akt の結合量 (Area Under the Curve: AUC) (E)、EGF 刺激から発光強度の最高値に到達するまでの時間 (Tmax) (F) の定量図をそれぞれ示した。N=4。*: $P < 0.05$ 。NS: not significantly different。

4-2-4 EGF による PDK1/Akt 結合に Akt の細胞膜移行が与える影響

EGF 刺激で PI3K が活性化すると、細胞膜において PI(3,4,5)P₃ が合成される (図 17)。PI(3,4,5)P₃ の存在は PDK1 と Akt の細胞膜への局在に必須であることが報告されている (119)。そこで、PI(3,4,5)P₃ の合成抑制が、PDK1/Akt 結合に与える影響を検討した。MCF7 細胞を PI3K 阻害剤である LY294002 (LY) で前処置し、その後 EGF で刺激し、Akt Thr308 リン酸化レベルを western blotting により解析した。また、MCF7 PDK1/Akt 細胞において同様の処置を行い、PDK1/Akt 結合を、NanoBiT システムを用いて解析した。LY 処置により Akt のリン酸化は顕著に抑制され (図 21A, B)、PDK1/Akt 結合は静止細胞および EGF 刺激細胞の両方で減少した (図 21C-E)。リン酸化と同様に、LY 処置下での PDK1/Akt 結合は EGF によってわずかに上昇し、ピークまでの時間に差は認められなかった (図 21F)。

Akt は、PH ドメインを介して細胞膜上の PI(3,4,5)P₃ に結合する。PH ドメインの細胞膜結合が PDK1/Akt 結合に与える影響を検討した。PH ドメイン依存性のアロステリック Akt 阻害剤である AKT inhibitor VIII (AKTi) で処置した後に EGF で刺激し、Akt リン酸化レベルを western blotting、PDK1/Akt 結合を NanoBiT システムにより解析した。AKTi は、EGF 誘導性の Akt リン酸化と PDK1/Akt 結合をほぼ完全に阻害した (図 21G-K)。

以上の結果から、PH ドメインと PI(3,4,5)P₃ の結合を介した Akt の細胞膜移行が、EGF による PDK1/Akt 結合に必須である可能性が示された。

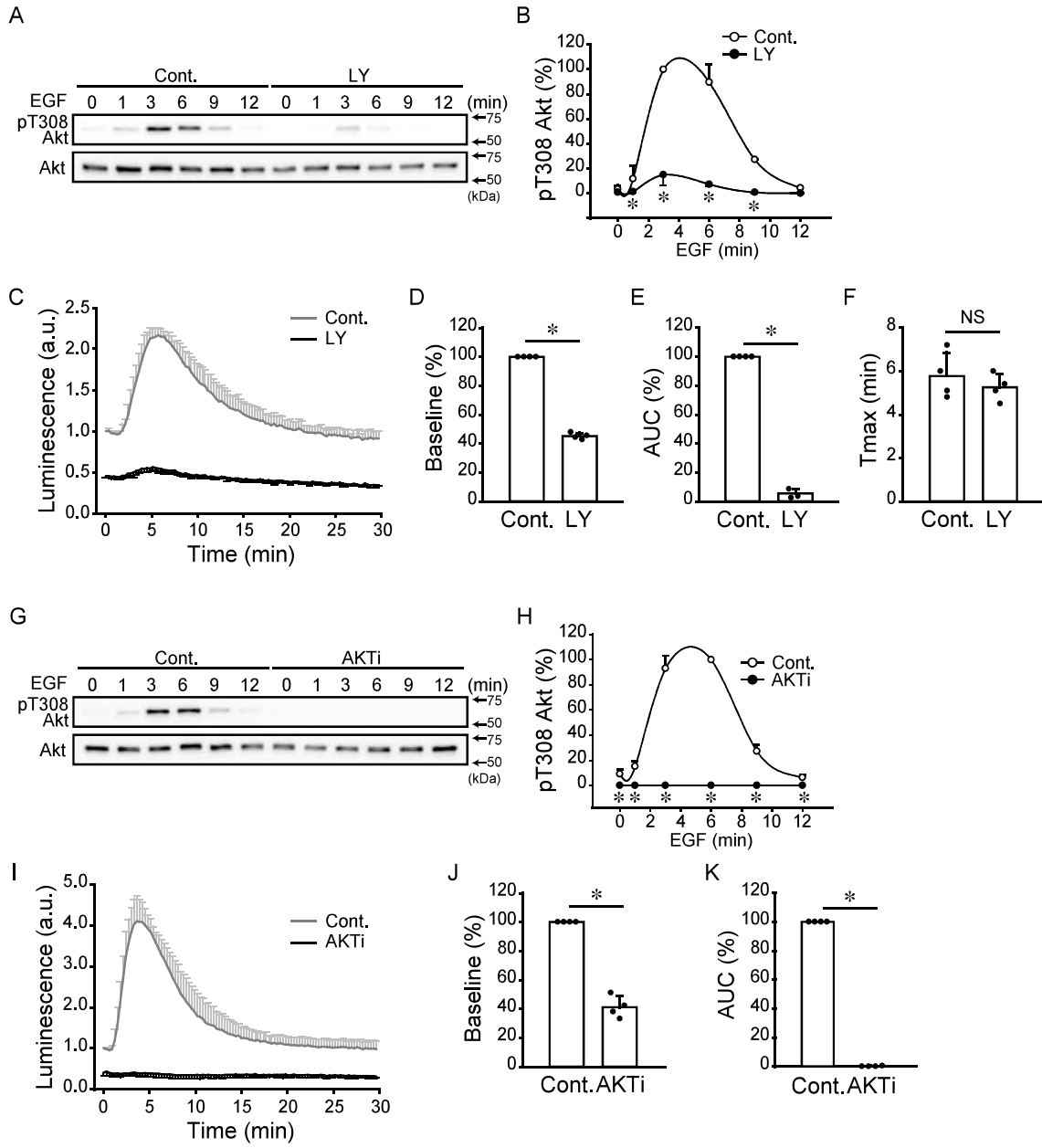


図 21 EGF による PDK1/Akt 結合に Akt の細胞膜移行が与える影響

(A, B, G, H) MCF7 細胞を無血清培地に交換し、LY294002 (LY: 10 μ M) で 2 時間 (A および B) または AKT inhibitor VIII (AKTi: 1 μ M) で 4 時間 (G および H) 処置後、EGF (50 ng/ml) で 1–12 分間刺激し、Akt の Thr308 リン酸化レベルとタンパク質発現量を western blotting により解析した。代表例 (A および G) と DMSO 処置 (Cont.) 時の Akt のリン酸化レベルのピーク値を 100% として相対値で表した定量図 (B および H)。N=3。*: $P < 0.05$ (同時間の Cont. との比較)。

(C–F, I–K) MCF7 PDK1/Akt 細胞を無血清培地に交換し、LY (10 μ M) で 2 時間 (A および B) または AKTi (1 μ M) で 4 時間 (G および H) 処置後、EGF (50 ng/ml) で刺激し、PDK1/Akt 結合を、NanoBiT システムを用いて 30 分間測定した (C および I)。発光強度は DMSO 処置 (Cont.) 0 秒時の発光強度を 1.0 として相対値で表した。EGF 刺激前の発光強度 (D および J)、EGF 刺激後の PDK1/Akt の結合量 (AUC) (E および K)、EGF 刺激から発光強度の最高値に到達するまでの時間 (Tmax) (F) の定量図をそれぞれ示した。N=4。*: $P < 0.05$ 。

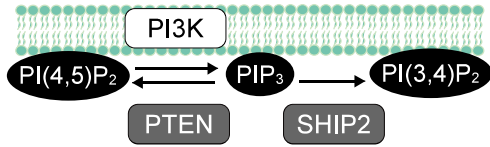
NS: not significantly different.

4-2-5 EGF による PDK1/Akt 結合に PTEN 阻害が与える影響

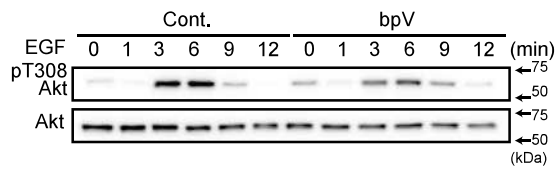
PTEN は PI(3,4,5)P₃ の 3'位を脱リン酸化して PI(4,5)P₂ を形成する (図 22A)。PTEN を阻害すると、PI(3,4,5)P₃ の蓄積を通じて PDK1/Akt 結合が促進され、Akt のリン酸化が上昇することが予想された。MCF7 細胞を PTEN 阻害剤 bpV(HOpic) (bpV) で処置した後に EGF で刺激し、Akt Thr308 リン酸化レベルを western blotting により解析した。bpV 処置により静止状態の Akt リン酸化レベルは有意に上昇したが、EGF 誘導性の Akt リン酸化は阻害された (図 22A, B)。MCF7 PDK1/Akt 細胞において同様の処置を行い、PDK1/Akt 結合を NanoBiT システムにより解析したところ、bpV による PTEN 阻害は静止状態においても EGF 刺激下においても PDK1/Akt 結合に影響を与えなかった (図 22C-F)。

bpV による PTEN 阻害が PDK1/Akt 結合に影響を与えないという現象が EGF 刺激に特異的である可能性を検討するため、EGF と比較して PI3K/Akt シグナル伝達に対する選択性の高い insulin で細胞を刺激し PDK1/Akt 結合を解析した。Insulin は PDK1/Akt 結合を二峰性に増加させ、EGF 刺激と反応様式が異なることが明らかになった (図 22G, H)。bpV 処置により、insulin 誘導性の PDK1/Akt 結合は増加する傾向ではあったが、有意な差は認められなかった (図 22H)。これらの結果は、PTEN 阻害による PI(3,4,5)P₃ の蓄積が EGF や insulin によって誘導される PDK/Akt 結合において重要な役割を果たしていないことを示唆している。

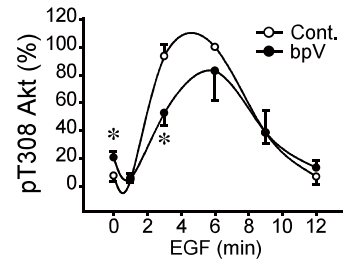
A



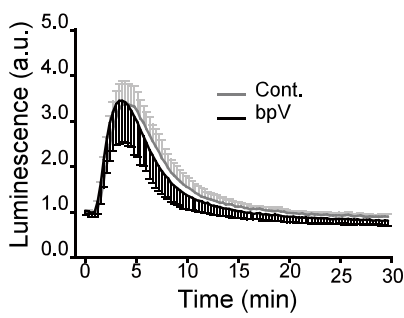
B



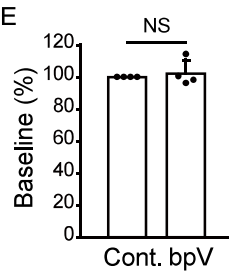
C



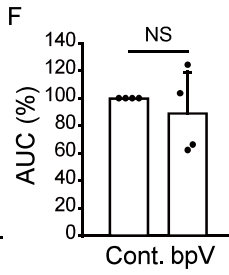
D



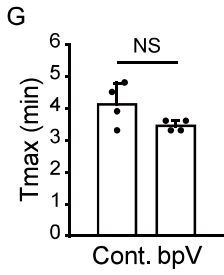
E



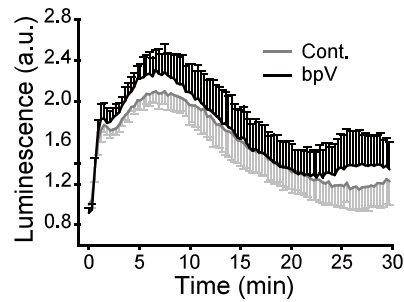
F



G



H



I

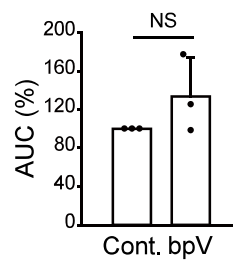


図 22 EGF による PDK1/Akt 結合に PTEN 阻害が与える影響

(A) PI(3,4,5)P₃ (PIP₃) は PTEN によって 3'位を脱リン酸化され PI(4,5)P₂ に、SHIP2 によって 5'位を脱リン酸化され PI(3,4)P₂ に変換される。

(B, C) MCF7 細胞を無血清培地に交換し bpV(HOpic) (bpV: 1 μM) で 4 時間処置後、EGF (50 ng/ml) で 1–12 分間刺激し、Akt Thr308 リン酸化レベルとタンパク質発現量を western blotting により解析した。代表例 (B) と DMSO 処置 (Cont.) 時の Akt のリン酸化レベルのピーク値を 100%として相対値で表した定量図 (C)。N=3。*: $P < 0.05$ (同時間の Cont.との比較)。

(D–I) MCF7 PDK1/Akt 細胞を無血清培地に交換し bpV (1 μM) で 4 時間処置後、EGF (50 ng/ml) (D–G) または insulin (200 nM) (H および I) で刺激し、PDK1/Akt 結合を、NanoBiT システムを用いて 30 分間測定した (D および H)。発光強度は DMSO 処置 (Cont.) 0 秒時の発光強度を 1.0 として相対値で表した。EGF 刺激前の発光強度 (E)、EGF (F) または insulin (I) 刺激後の PDK1/Akt の結合量 (AUC)、EGF 刺激から発光強度の最高値に到達するまでの時間 (Tmax) (G) の定量図をそれぞれ示した。N=4 (D–G)、N=3 (H および I)。*: $P < 0.05$ 。

NS: not significantly different.

4-2-6 EGF による PDK1/Akt 結合に SHIP2 阻害が与える影響

SHIP2 は PI(3,4,5)P₃ の 5'位を脱リン酸化し、PI(3,4)P₂ を合成する (図 22A)。MCF7 細胞の EGF 刺激時には、PTEN よりも SHIP2 の PI(3,4,5)P₃ の脱リン酸化への貢献が高い可能性が考えられることから、MCF7 細胞を SHIP2 阻害剤 AS1938909 (AS) で前処置し、その後 EGF で刺激し、Akt Thr308 リン酸化レベルを western blotting により解析した。AS 処置は、静止細胞と EGF 刺激細胞の両方で Akt リン酸化レベルを増加させた (図 23B, C)。MCF7 PDK1/Akt 細胞において同様の処置を行い、PDK1/Akt 結合を NanoBiT システムにより解析したところ、予想に反して PDK1/Akt 結合は有意に減少した (図 23D-G)。以上の結果から、SHIP2 阻害による PI(3,4,5)P₃ の蓄積は Akt のリン酸化レベルを増加させる一方で、PDK/Akt 結合能を低下させる可能性が示された。

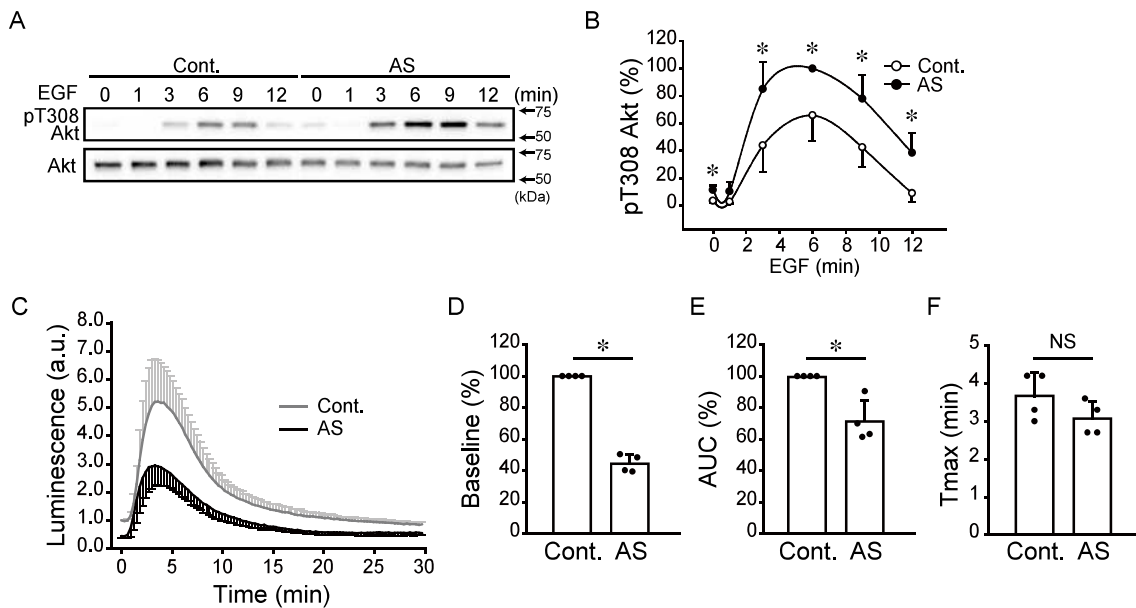


図 23 EGF による PDK1/Akt 結合に SHIP2 阻害が与える影響

(A, B) MCF7 細胞を無血清培地に交換し、AS1938909 (AS: 10 μ M) で 4 時間処置後、EGF (50 ng/ml) で 1–12 分間刺激し、Akt Thr308 リン酸化レベルとタンパク質発現量を western blotting により解析した。代表例 (A) と AS 処置時の Akt のリン酸化レベルのピーク値を 100% として相対値で表した定量図 (B)。N=3。*: $P < 0.05$ (同時間の Cont. との比較)。

(C–F) MCF7 PDK1/Akt 細胞を無血清培地に交換し、AS (10 μ M) で 4 時間処置後、EGF (50 ng/ml) で刺激し、PDK1/Akt 結合を、NanoBiT システムを用いて 30 分間測定した (C)。発光強度は DMSO 処置 (Cont.) 0 秒時の発光強度を 1.0 として相対値で表した。EGF 刺激前の発光強度 (D)、EGF 刺激後の PDK1/Akt の結合量 (AUC) (E)、EGF 刺激から発光強度の最高値に到達するまでの時間 (Tmax) (F) の定量図をそれぞれ示した。N=4。*: $P < 0.05$ 。NS: not significantly different.

4-2-7 EGF による PDK1/Akt 結合に Akt のリン酸化状態が与える影響

PI(3,4,5)P₃ ホスファターゼ阻害剤に対する反応性の検討から、Akt リン酸化の変化と PDK1/Akt 結合は必ずしも相関しないことが示唆された。ATP 競合型 Akt 阻害剤である afuresertib (AFU) は、Akt の脱リン酸化を防ぐことで Akt リン酸化レベルを上昇させる (120, 121)。Akt の過剰なリン酸化状態が EGF による PDK1/Akt 結合に与える影響を検討するために、MCF7 細胞を AFU で前処置した後に EGF で刺激し、Akt Thr308 リン酸化レベルを western blotting により解析した。以前の報告と一致して、AFU によって Akt リン酸化レベルの顕著な増加が観察された (図 24A, B)。AFU によって誘導された Akt のリン酸化レベルは、EGF 刺激時のピークよりも高く、EGF 刺激によってリン酸化レベルがさらに上昇することはなかった。MCF7 PDK1/Akt 細胞において同様の処置を行い、PDK1/Akt 結合を NanoBiT システムにより解析した。AFU 処置により、静止状態の PDK1/Akt 結合は著しく低下したが、EGF 誘導性の PDK1/Akt 結合には大きな影響を及ぼさなかった (図 24C-F)。この結果は、EGF による PDK1 と Akt の膜局在とそれに続く結合において、Akt のリン酸化状態は重要な役割を果たしていないことを示唆している。

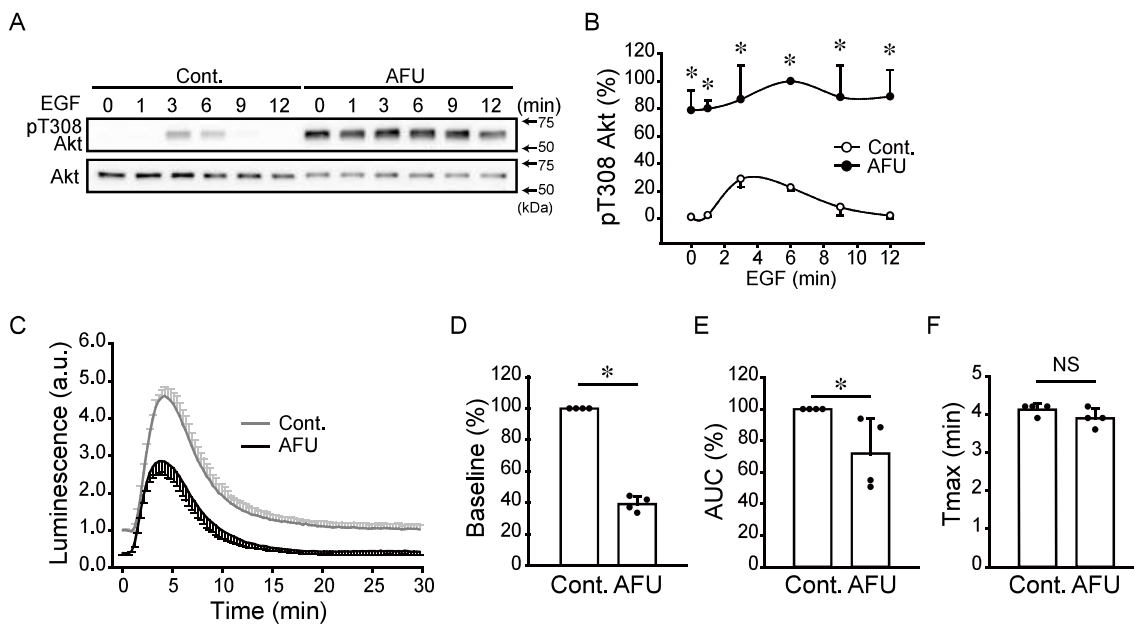


図 24 EGF による PDK1/Akt 結合に Akt のリン酸化状態が与える影響

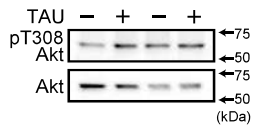
(A, B) MCF7 細胞を無血清培地に交換し、afuresertib (AFU: 1 μ M) で 4 時間処置後、EGF (50 ng/ml) で 1–12 分間刺激し、Akt Thr308 リン酸化レベルとタンパク質発現量を western blotting により解析した。代表例 (A) と AFU 処置時の Akt のリン酸化レベルのピーク値を 100% として相対値で表した定量図 (B)。N=3。*: $P < 0.05$ (同時間の Cont. との比較)。

(C–F) MCF7 PDK1/Akt 細胞を無血清培地に交換し、AFU (1 μ M) で 4 時間処置後、EGF (50 ng/ml) で刺激し、PDK1/Akt 結合を、NanoBiT システムを用いて 30 分間測定した (C)。発光強度は DMSO 処置 (Cont.) 0 秒時の発光強度を 1.0 として相対値で表した。EGF 刺激前の発光強度 (D)、EGF 刺激後の PDK1/Akt の結合量 (AUC) (E)、EGF 刺激から発光強度の最高値に到達するまでの時間 (Tmax) (F) の定量図をそれぞれ示した。N=4。*: $P < 0.05$ 。NS: not significantly different。

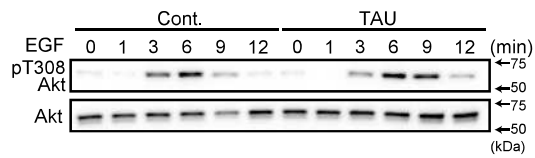
4-2-8 EGF による PDK1/Akt 結合に PP1 阻害が与える影響

Akt のリン酸化状態は EGF による PDK1/Akt 結合促進に影響を与えなかったことから、次に Akt の脱リン酸化を担うホスファターゼに対する阻害剤の効果を検討した。PP1 は Thr308 と Ser473 で Akt を脱リン酸化する (113, 122)。MCF7 細胞を PP1 阻害剤 tautomycin (TAU) で処置し、その後 EGF で刺激し、Akt Thr308 リン酸化レベルを western blotting により解析した。静止状態の MCF7 細胞において、TAU は Akt のリン酸化レベルを増加させたが、EGF 刺激時の増加に比べると無視できる程度であった (図 25A, B)。TAU 処置により EGF 誘導性の Akt リン酸化が持続したことから、PP1 が EGF 刺激後の Akt リン酸化の終息に関与していることが示唆された (図 25B, C)。MCF7 PDK1/Akt 細胞において同様の処置を行い、PDK1/Akt 結合を NanoBiT システムにより解析したところ、興味深いことに、EGF によって誘導された PDK1/Akt 結合は、TAU 処置によって早期に終結した (図 25D-G)。したがって、PP1 阻害によるリン酸化 Akt の増加は、PDK1/Akt 結合を上昇させないことが示された。

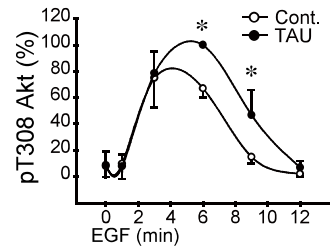
A



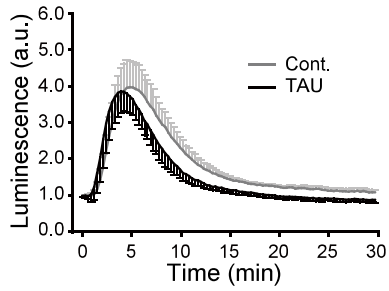
B



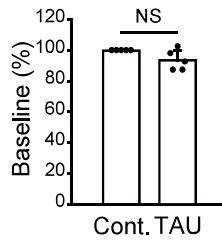
C



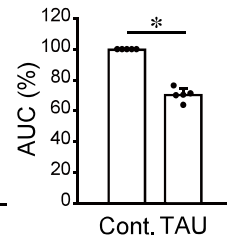
D



E



F



G

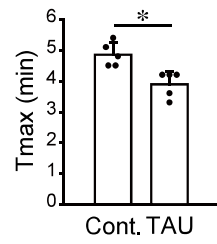


図 25 EGF による PDK1/Akt 結合に PP1 阻害が与える影響

(A–C) MCF7 細胞を無血清培地に交換し、tautomycin (TAU: 1 μ M) で 4 時間処置後、EGF (50 ng/ml) で 1–12 分間刺激し、Akt Thr308 リン酸化レベルとタンパク質発現量を western blotting により解析した。TAU 処置のみの代表例 (A)、EGF 処置時の代表例 (B) と TAU 処置時の Akt のリン酸化レベルのピーク値を 100%として相対値で表した定量図 (C)。N=3。*: $P<0.05$ (同時間の Cont.との比較)。

(D–G) MCF7 PDK1/Akt 細胞を無血清培地に交換し、TAU (1 μ M) で 4 時間処置後、EGF (50 ng/ml) で刺激し、PDK1/Akt 結合を、NanoBiT システムを用いて 30 分間測定した (D)。発光強度は DMSO 処置 (Cont.) 0 秒時の発光強度を 1.0 として相対値で表した。EGF 刺激前の発光強度 (E)、EGF 刺激後の PDK1/Akt の結合量 (AUC) (F)、EGF 刺激から発光強度の最高値に到達するまでの時間 (Tmax) (G) の定量図をそれぞれ示した。N=4。NS: not significantly different。

4-2-9 EGF による PDK1/Akt 結合に PP2A 阻害が与える影響

PP2A は、Akt Thr308 と Ser473 の両方を脱リン酸化する (123, 124)。MCF7 細胞を PP2A 阻害剤 okadaic acid (OA) で処置した後に EGF で刺激し、Akt Thr308 リン酸化レベルを western blotting により解析した。静止状態の MCF7 細胞では、OA は TAU よりも強く Akt のリン酸化を誘導したが、その程度は EGF 刺激による増加よりも低かった (図 26A-C)。MCF7 PDK1/Akt 細胞において同様の処置を行い、PDK1/Akt 結合を NanoBiT システムにより解析した。OA 処置は静止状態での PDK1/Akt 結合を顕著に増強した (図 26D-F)。EGF 刺激下では、OA が Akt のリン酸化を遅らせ、その持続時間をわずかに延長させる一方で (図 26B, C)、PP1 同様に PDK1/Akt の結合をより早く終結させた (図 26G)。以上の結果から、ホスファターゼ阻害による Akt リン酸化レベルの上昇と PDK1/Akt 結合は相関しない可能性が示された。

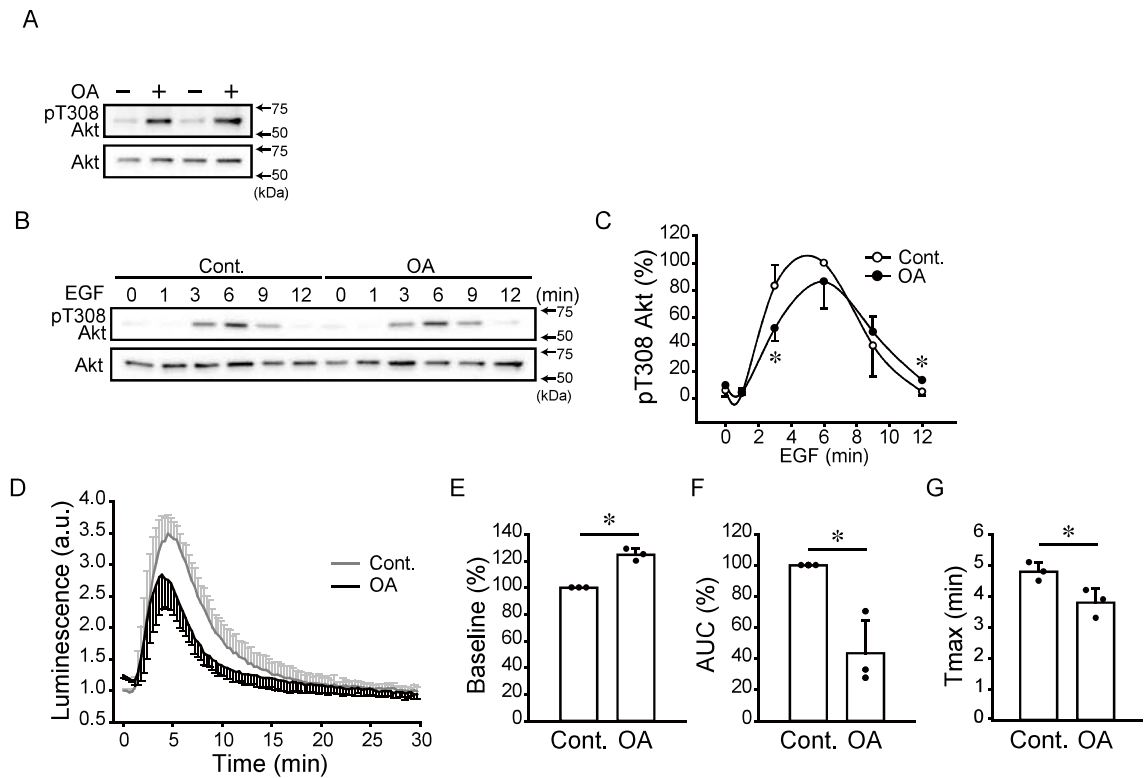


図 26 EGF による PDK1/Akt 結合に PP2A 阻害が与える影響

(A–C) MCF7 細胞を無血清培地に交換し、okadaic acid (OA: 100 nM) で 4 時間処置後、EGF (50 ng/ml) で 1–12 分間刺激し、Akt Thr308 リン酸化レベルとタンパク質発現量を western blotting により解析した。OA 処置のみの代表例 (A)、全体の代表例 (B)、DMSO 処置 (Cont.) 時の Akt のリン酸化レベルのピーク値を 100% として相対値で表した定量図 (C)。N=3。*: $P < 0.05$ (同時間の Cont. との比較)。

(D–G) MCF7 PDK1/Akt 細胞を無血清培地に交換し OA (100 nM) で 4 時間処置後、EGF (50 ng/ml) で刺激し、PDK1/Akt 結合を、NanoBiT システムを用いて 30 分間測定した (D)。発光強度は DMSO 処置 (Cont.) 0 秒時の発光強度を 1.0 として相対値で表した。EGF 刺激前の発光強度 (E)、EGF 刺激後の PDK1/Akt の結合量 (AUC) (F)、EGF 刺激から発光強度の最高値に到達するまでの時間 (Tmax) (G) の定量図をそれぞれ示した。N=3。

4-3 考察

PI3K/Akt シグナル伝達経路の活性亢進は、がんで最も頻繁に観察される変化のひとつであり、腫瘍の浸潤性、生存、増殖に関連している。数十年もの間、PI3K/Akt シグナルの制御機構を解明するために様々なアプローチが取られてきたが、細胞が刺激を受けた直後のシグナル動態は完全には理解されていない。本章では、NanoBiT システムを用いて PDK1/Akt 結合を生細胞内でモニターし、そのダイナミックな結合変化をリアルタイムで検出することに成功した。このシステムを用いて、EGF 刺激による PDK1 と Akt の結合は Akt のリン酸化状態ではなく、PI(3,4,5)P₃ の形成に強く依存していることを明らかにした。また、Akt のリン酸化および脱リン酸化は PDK1 との結合・解離によってのみ制御されているのではなく、様々な因子が複雑に関わり合っており今後さらなる研究が必要である。

4-3-1 NanoBiT システムにおいて付加したタグの構造的妥当性

Calleja らは、二光子蛍光寿命イメージング顕微鏡を用いた Förster resonance energy transfer (FRET) によって、PDK1 と Akt の相互作用を解析した(125)。彼らの FRET アッセイは、PDK1/Akt 結合が生じる局在を顕微鏡下で解析できるという利点がある一方で、成長因子での刺激から分析開始までに 2 分かかっており、その後の検出も 54 秒毎であるため、刺激直後の結合変化や連続した解析はできていない(125)。本研究では、ルミノメーターと NanoBiT システムを用いることにより、刺激前後の相互作用の変化を 18 秒毎の検出頻度でシームレスに解析することを可能にした。

Calleja らの FRET アッセイにおいて、PDK1 と Akt の N 末端にそれぞれ GFP と RFP がタグ付けされており、これらのタグの位置は本研究の NanoBiT システムにおいて発光強度の最高値を示した組み合わせと一致している。PDK1 と Akt は、PDK1 の PIF ポケットと Akt1 の PIF モチーフ間の相互作用によって安定化されたヘテロ二量体を形成する (117, 118)。タグの付加によって構造が変化する可能性を排除するために PIF 阻害剤を飽和レベルで処置したところ、NanoBiT システムにおいて PDK1/Akt 結合の減少が認められたことから、本研究で用いた NanoBiT タグの組み合わせが、PDK1 と Akt の結合に影響を与えないことが示唆された。他の組み合わせの発光強度が極端に低い理由は不明だが、PH ドメインと PI(3,4,5)P₃、または PIF モチーフと PIF ポケット間の結合を阻害しているのかもしれない。

4-3-2 刺激の違いによる結合動態の変化

本研究において、NanoBiT システムは EGF 刺激に加えて insulin 刺激による PDK1/Akt のダイナミックな結合変化を検出した。結合は EGF 刺激では一峰性に上昇し速やかに基底レベルまで低下したが、insulin 刺激では二峰性に反応し緩やかな低下を示した。解析の煩雑さを避けるため、本研究では主に EGF 刺激を用いたが、EGF 刺激と insulin 刺激の結合動態は明らかに異なっており、この違いを生み出す分子メカニズムを解析することは重要である。EGF 刺激に伴う epidermal growth factor receptor (EGFR) と PI3K/Akt シグナルを含む下流のシグナル伝達経路の活性化は、受容体の急速な内在化とダウンレギュレーションによって一過性を示すことが、いくつかの異なる細胞モデルにおいて示されている (126–130)。これを裏付けるように、bioluminescence resonance energy transfer

(BRET) システムを用いた、間接的に PI(3,4,5)P₃ の産生をモニタリングした研究では、EGF 刺激後に PI(3,4,5)P₃ 産生は 5–10 分でピークに達し、20 分以内に基底レベルにまで戻った (131)。一方、insulin 刺激では、プラトーに達した後も産生量は維持されており (131)、本研究の結合動態の変化に類似していた。したがって、刺激下における PDK1/Akt 結合変化は細胞膜における PI(3,4,5)P₃ の産生に依存している可能性が考えられる。

4-3-3 PDK1/Akt 不活性複合体の検出

静止細胞の細胞質では、PDK1 と Akt は不活性複合体として存在することが報告されている (125, 132)。Akt は、PH ドメインとキナーゼドメインの分子内相互作用によって不活性化された構造、いわゆる「PH-in」と呼ばれる自己抑制型構造で PDK1 と結合している。細胞質内不活性複合体の形成は脂質結合とは無関係であり、Akt の Thr308 と Ser473 のリン酸化を必要としない (125, 132)。NanoBiT システムの発光は LgBiT と SmBiT の構造的近接性に依存するため、本研究で用いたタグの組み合わせが不活性複合体の形成を検出するかは不明である。しかし、EGF 刺激後に発光の顕著な増加が観察されること、LY と AKTi による Akt の膜移行阻害によって発光が著しく減少することから、本システムが不活性複合体を検出したとしても、その影響は非常に小さいことが推測される。

PI3K 阻害剤と PH ドメイン依存性アロステリック Akt 阻害剤が静止状態においても結合を顕著に低下させたという事実は、無刺激下においてもかなりの量の PDK1/Akt 複合体が存在することを示唆している。それにもかかわらず、Akt リン酸化レベルは低く保たれている。PP1 阻害剤と PP2A 阻害剤の両方が静止状態での Akt リン酸化レベルを上昇させたことから、Akt はこれらのホスファター

ぜによって速やかに脱リン酸化されるのかもしれない。

4-3-4 PDK1/Akt 結合にホスファターゼが与える影響

PI(3,4,5)P₃ は、少なくとも2つの経路で脱リン酸化される。PI3-ホスファターゼである PTEN と PI5-ホスファターゼである SHIP2 は、それぞれ PI(4,5)P₂ と PI(3,4)P₂ を産生する (112)。PTEN 阻害剤 bpV と SHIP2 阻害剤 AS19 はどちらも PI(3,4,5)P₃ の蓄積を誘導することから、PDK1/Akt 結合を促進すると予想した。しかし、bpV は PDK1/Akt 結合に影響を与えず、AS19 はこれを抑制した。一方で、いずれの阻害剤も Akt リン酸化レベルを上昇させた。このことは、Akt のリン酸化が膜移行や膜における PDK1 との結合を阻害する負の調節機構として機能している可能性を示唆するが、OA は Akt のリン酸化レベルと PDK1/Akt 結合の両方を増加させたことから、これだけでは説明することができない。

EGF 刺激による Akt リン酸化は、TAU と OA 処置によって延長されたことから、PP1 と PP2A が Akt の脱リン酸化に関与していることが示唆された。しかし、TAU も OA も EGF 刺激後の Akt 脱リン酸化を完全には阻害しなかったことから他のホスファターゼの関与が示唆されるが、Akt Thr308 を基質とするホスファターゼに関する報告は限られている。PTEN は Akt Thr308 を脱リン酸化することが報告されているが (133)、本研究では PTEN 阻害剤は EGF 刺激後の Akt 脱リン酸化を阻害しなかった。

リン酸化とは対照的に、EGF 誘導性の PDK/Akt 結合は TAU および OA で処置により終息までの時間が短縮される。PDK1 はリン酸化状態に関係なく自己抑制型構造をとっており、PI(3,4,5)P₃ との結合のみがその抑制を解除でき、PDK1 が PI(3,4,5)P₃ と解離すると速やかに自己抑制型構造に戻る (134)。Akt/mTORC1

の下流標的である p70 S6K は、PDK1 の PH ドメインの中にある Ser549 をリン酸化し、PDK1 を PI(3,4,5)P₃ から解離させることで Akt との結合を阻害する (134)。したがって、PP1 や PP2A は PDK1 Ser549 を脱リン酸化することで、PDK1 を細胞膜上に留めている可能性が考えられるが、抗 pSer549 PDK1 抗体は市販されていないため、TAU や OA 処置がこのリン酸化部位に与える影響は解析できなかった。Akt のリン酸化は、Akt の立体構造をホスファターゼがアクセスできない状態に変化させることから (135)、リン酸化された Akt へのホスファターゼの結合は何らかの因子によって媒介されている可能性がある。EGF 刺激後の Akt 活性化を停止させる分子機構についてはさらなる研究が必要である。

4-3-5 EGF 刺激時の PDK1/Akt 結合と Akt のリン酸化状態

ATP 競合的 Akt 阻害剤 AFU は、活性型 Akt を標的として ATP を模倣し、ホスファターゼのリン酸化部位へのアクセスを阻害することで Akt 自身の過剰なリン酸化を誘導する (135)。AFU が誘導した高リン酸化状態の Akt においても、EGF 刺激により PDK1 と Akt の結合が促進された。したがって、PDK1/Akt 結合は Akt の Thr308 リン酸化状態には影響を受けず、PI(3,4,5)P₃ 合成に依存していると考えられる。この理由として考えられるのは、Akt kinase-interacting protein 1 (Aki1/Frued-1) や IQ motif containing GTPase activating protein 1 (IQGAP1) などの足場タンパク質の関与である (136)。PI3K 阻害剤 LY は、Aki1/Frued-1 と Akt の会合を抑制することから (137)、Akt と Aki1/Frued-1 の相互作用は PI(3,4,5)P₃ に依存している。また、EGF は IQGAP1 の Ser1443 リン酸化レベルを上昇させることで構造変化をもたらし、PI3K、PDK1、Akt を含む Akt 活性化に必要なすべての因子が IQGAP1 にリクルートされる。したがって、これらの足場タンパク

質の関与が、PDK1/Akt 結合と Akt リン酸化状態が相関しない理由の一つになる可能性がある。

第5章 総合考察

5-1 PP6 発現および機能の調節機構

第2章および3章において、PP6のタンパク質発現がRAおよびTGF- β の2つの細胞外刺激によって誘導され、その後の細胞内シグナル応答を促進することが示された。PP6は炎症性サイトカインであるTNF- α が誘導する細胞死を抑制するが、TNF- α 刺激はPP6の発現を誘導しないことから(138, 139)、本研究で観察された発現誘導は特異性を持った反応であると考えられる。細胞内では、PP2Aタンパク質の発現が厳密に制御されているのに対して(140)、PP6タンパク質の発現量は状況に応じて大きく変動する。ヒト結腸上皮細胞株Caco-2では、PP6タンパク質発現量は細胞密度の増加によって約18倍上昇する(47)。細胞密度依存的な増加は、ヒト色素性網膜上皮細胞ARPE-19でも観察される。また、PP6の発現増加は、インスリン抵抗性モデルマウスの脂肪組織(138)や炎症性腸疾患(141)、膠芽腫(38)や浸潤性膵管がん(142)、悪性中皮腫(143)などのがんでも観察されている。そのほかにも、電離放射線(IR)によるDNA損傷は、いくつかの細胞種でPP6の発現を増加させることが報告されている(144, 145)。反対に、PP6タンパク質発現量の低下も、いくつかの癌種で報告されている(79, 146)。このようにPP6の発現は、正常細胞やがん細胞、刺激など様々な状況に応じて容易に変化する。当研究室では以前、PP2Aタンパク質の分解は主にユビキチン/プロテアソーム系によって(48)、PP6タンパク質の分解は主に選択的オートファジーによって制御されていることを報告しており(42)、分解機構の違いが発現変動の差の原因になっている可能性がある。本研究においても、RAおよびTGF- β 刺激がオートファジー活性を低下させることが、PP6タンパク質の蓄積に寄与している可能性が示された。

本研究では、TGF- β 刺激がPP6 mRNA発現を上昇させることが明らかになっ

たが、PP6 の転写メカニズムはほとんど明らかになっておらず、転写因子の同定も進んでいない。2種の micro RNA (miRNA)、miR-31 および miR-373 が PP6 mRNA の発現量を制御することが明らかとなっており、がんや炎症性疾患において、これらの miRNA 発現が PP6 のタンパク質発現を低下させることが報告されている (143, 146, 147)。ヒト正常組織における PP6 の mRNA 発現とタンパク質量には相関が認められないことから (81)、PP6 タンパク質のレベルは転写、mRNA の翻訳やタンパク質の安定性など、様々な段階で調節されていると考えられる。

第2章および3章では、SAPS のうち PP6R1 のみ TGF- β 刺激によって発現が誘導された。第2章では PP6R2 を過剰発現させた場合のみ神経突起形成が促進されたが、全ての SAPS が SIN1 と結合することが認められ、脱リン酸化に関与する SAPS の同定には至らなかった。PP6 は、SAPS に加えて3種類の ankyrin repeat domain (Ankrd) サブユニット (Ankrd28、Ankrd44、Ankrd52) のうちの1つと結合することでヘテロ三量体を形成し、基質特異的な脱リン酸化を引き起こす。また、ヘテロ二量体としても機能し、PP6/PP6R2 二量体は Ankrd を介さずに γ -H2AX を脱リン酸化する (79)。最近、Rab40c が Ankrd28 のユビキチン化を促進して分解を誘導することで、PP6/PP6R1/Ankrd28 複合体の形成と活性を阻害することが報告された (148)。これらの報告から、単純に SAPS の違いだけで基質が選択されているのではなく、Ankrd の発現・結合や複合体の組み合わせによって制御されていることが推測される。今後は、SAPS および Ankrd のそれぞれのサブユニットの発現を単独で抑制することで、より詳細に PP6 複合体の複雑な機能の解明を進めることができると考える。

5-2 ホスファターゼを標的とした創薬戦略

ヒトの全遺伝子の約 20%が関与するともいわれる細胞内シグナル伝達は、複雑で巨大なネットワークを形成する。シグナル伝達系は想像以上にダイナミクスに富み、未だ明らかにされていない分子制御機構が隠されている。そのため、細胞外から刺激を受けた際には予想もつかない経路が働くこともあり、刺激下において反応をリアルタイムに検証することは、生体内の状態を知る上で重要である。第 2 章および 3 章ではそれぞれ神経分化因子および増殖因子刺激細胞外刺激下で観察し、第 4 章では生体内のシグナル変化をより詳細に観察するために生細胞で解析を行った。

一般的にタンパク質同士の結合面は広く浅いため、タンパク質間相互作用 (protein-protein interaction: PPI) を阻害する化合物の開発は難しいと考えられてきた。しかし、個々の PPI の分子機構の解明が進んだことで、ベンゾジアゼピンや ICG-001、IL-2、MDM2、BCL-2-BCL-XL、XAIP 阻害剤などいくつかの成功例が報告されつつあり (149)、PPI を制御する薬剤の開発に期待が集まっている。これらの薬の多くは、薬剤が結合したときにのみ形成される特異的なポケット (クリプトサイト) に結合する特徴を持っている。クリプトサイトは偶然発見されたものであり、探し当てて創薬につなげることは難しいが、この発見はタンパク質の構造的柔軟性こそが PPI 阻害薬開発において重要であると考えられる契機となった (150)。タンパク質のリン酸化反応は、PPI の主要な制御機構であり基質の微細な構造変化をも引き起こすため、キナーゼとホスファターゼの新たな基質の同定や反応メカニズムを解明することは PPI 創薬において必須であると考えられる。ホスファターゼはタンパク質の脱リン酸化を担い、多くのがんでその活性が抑制されているため、活性回復が治療標的として有用であると考

えられているが、基質選択性が低いことから長い間創薬標的として不適とされてきた。しかし、近年、PP2A の機能解析が進み、複合体の構成変化による機能差が明らかとなり、予想を超えた新たな生理機能と疾患との関わりが注目されている。成長因子などの外部からの刺激によって細胞内の PI3K/Akt シグナルが活性化し、その下流に存在する mTOR や p70 S6K の活性が持続されると、負のフィードバック機構によって Akt 活性が減弱する (151, 152)。最近、インスリンやグルコース刺激時に、PP2A B55 および B56 γ 3 複合体が mTOR や p70 S6K を脱リン酸化することで活性を低下させ、負のフィードバックを抑制することが明らかになった (153, 154)。この新たな PP2A の機能は、Akt の活性を上昇させることでシグナル伝達を促進すると考えられ、従来「がん抑制因子」として知られてきた PP2A が「がん促進因子」としての側面を持つことを示している。第 3 章において、PP2A 阻害剤処置により、予想に反して EGF 刺激による Akt のリン酸化が抑制された。したがって、EGF 刺激下において PP2A が負のフィードバックを抑制している可能性が考えられる。このような PP2A 阻害剤による負のフィードバックの増強はリン酸化だけでなく、PDK1/Akt 結合に影響を与えているのかもしれない。そのため、阻害剤だけでなく、様々な PP2A 複合体の発現抑制が Akt のリン酸化および PDK1/Akt 結合に与える影響を検討することで負のフィードバック機構の詳細な解明につながり、ホスファターゼの創薬開発において重要であると考えられる。

第 2 章および 3 章では PP6 が PI3K/Akt および TGF- β シグナルを正に制御することを初めて明らかにした。PP6 ノックアウトマウスの胚は E7.5 までに退化し、E8.5 で明らかな発生障害を示し、胎性致死となる (73)。PP6 が着床後のマウス胚形成に必須であることが示されており、PP6 ノックアウト MEF では、細胞増殖が顕著に抑制される (73)。この報告から、PP6 は発生段階のシグナル伝達におい

て正の働きを持つことが推測され、成長に応じて、また組織に応じてその役割が異なると考えることが妥当である。

本研究は、ホスファターゼの新たな生理機能を提示し、がんをはじめとした生活習慣病や神経変性疾患などとの関わりを持つ可能性を示した。これはホスファターゼを標的とした創薬開発の実現に貢献するものである。

第6章 実験材料および実験方法

6-1 細胞培養法

マウス神経芽腫細胞株 N2a、レンチウイルス産生用細胞株 Lenti-X HEK293T (Takara Bio)、マウス胎児線維芽細胞 MEF、ヒト乳がん細胞株 MCF7 は、1% antibiotic-antimycotic (AA、Thremo Scientific)、10% fetal bovine serum (FBS) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を培地として用い、37°C、5% CO₂に保ったインキュベーター (MCO-5AC、SANYO) 内で培養した。細胞の継代は培地を除去して HEPES buffered saline (HBS: 25 mM HEPES、150 mM NaCl、pH 7.4) で 1 回洗浄した後、trypsin/EDTA (0.5% trypsin、0.53mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) 含有) HBS) を加えてピペッティングすることにより細胞を剥がし行った。

マウス胚性幹細胞 (mESC) は、5% FBS、15% Serum Replacement、100 mM β -mercaptoethanol、2 mM L-グルタミン、1 mM nonessential amino acids (Wako)、15 ng/ml 白血病抑制因子 (Oriental Yeast) を添加した DMEM 中で、ゼラチンコートしたディッシュ (Sigma) 上で培養した。PA6 細胞は、文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクトを通じて理研 BRC から提供された。なお、培養に必要な器具は全て滅菌して用いた。

6-2 プラスミド DNA およびレンチウイルスベクターの作製

6-2-1 プラスミドの作製

pLVSIN nFLAG3 human PP6 は、ヒト肝臓 cDNA を鋳型に PCR で増幅した PP6 遺伝子を pLVSIN nFLAG3 の BamHI/EcoRI サイトに InFusion (Takara Bio) を用いて導入することで作製した。LgBiT タグまたは SmBiT タグを N 末端および C 末端に付加させた Akt1、PDK1 は鋳型として PCR で増幅し、InFusion を用いて

pBiT1.1-C[TK/LgBiT]、pBiT2.1-C[TK/SmBiT]、pBiT1.1-N[TK/LgBiT]、pBiT2.1-N[TK/SmBiT]に組み込んだ。

shRNA 発現プラスミドは、標的因子の配列に合わせ設計したプライマーをアニーリングした後に、pLVmC の ClaI/MluI サイトに T4 DNA ligase (Takara Bio) を用いてライゲーションすることで作製した。shRNA の標的配列は以下の通りである。

Non-target shRNA (shNT) : 5'-CAACAAGATGAGAGCACCA-3'

PP6 target shRNA (shPP6) : 5'-GACACAAACTACATATTTA-3'

6-2-2 プラスミドのトランスフォーメーションおよびミニプレップ

大腸菌 (XL10GOLD、Stratagene または HST08、Takara Bio) 10 μ l に 1 μ l のプラスミド溶液を加え、on ice で 30 分間静置した。ドライバス (Dry Bath Incubator、Major Science) で 42°C、45 秒間ヒートショックを加えた後、on ice で 2 分間静置し、100 μ l の LB Broth または super optimal broth with catabolite repression (SOC) Medium を加え、37°C で 30 分間振とう培養 (BioShaker BR-22FP、Taitec) した。その後、LB agar (ampicillin 100 μ g/ml 添加) プレートに播種し 37°C で一晩培養した。出芽したコロニーを単離し、5.0 ml の LB Broth (ampicillin 100 μ g/ml 添加) に加え 37°C、200 rpm で一晩振とう培養した。培養液をチューブに移し、室温にて 4,000 rpm で 10 分間遠心 (卓上小型遠心機 2420、KUBOTA) して、上清を除いた後、Plasmid Mini Kit I (Omega) を使用してプラスミドを抽出した。

6-2-3 プラスミドのトランスフェクション

12 穴プレートに細胞を 2.0×10^5 cell/well で播き一晩培養した。200 μ l の Opti-MEM にプラスミド 1.0 μ g および 2.5 μ l の Polyethylenimine "MAX" (PEI、

Polysciences) を混合した後 30 分間静置し、1.0 ml の培地 (10% FBS・1% AA 含有 DMEM) に加え 24 時間培養し使用した。上記は最小単位であり、使用する細胞培養プレートの表面積に応じて、適宜調整し使用した。

6-2-4 レンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入

6 穴プレートに HEK293T 細胞を 4.0×10^5 cell/well で播き一晚培養した。各種 レンチウイルスベクタープラスミド (1.0 μ g)、packaging plasmid (psPAX2: 0.77 μ g)、VSVG coat protein plasmid (pMD2.G: 0.43 μ g) と 2.5 μ l の PEI を 333 μ l の Opti-MEM に混合した後 30 分間静置した。その後、1.5 ml の培地 (10%FBS・1%AA 含有 DMEM) に加え、8 時間培養したのちに除去し、1.5 ml の培地に交換した。40 時間後、ウイルスを含む培地を 0.22 μ m のフィルター (Millipore) でろ過し、レンチウイルスベクターを得た。その後細胞を、ウイルスベクターを含む培地で 8 時間処置または振とうし、目的のタンパク質および shRNA を恒常的に発現する細胞を作出した。

6-3 Western blotting によるタンパク質発現量測定

6-3-1 タンパク質抽出

培地を除去した細胞を、on ice で冷却した HBS で洗浄し、triton X-100 含有 lysate buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、5 mM EDTA、5 mM EGTA、1 mM Na_3VO_4 、20 mM sodium pyrophosphate、1% Triton X-100、protease inhibitor cocktail (Roche) 1 tablet/50 ml) もしくは SDS 含有 lysate buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、5 mM EDTA、5 mM EGTA、1 mM Na_3VO_4 、20 mM sodium pyrophosphate、1% SDS、protease inhibitor cocktail 1 tablet/50 ml) を加えて細胞を可溶化した。得られた細胞溶解液を on ice で 5 分間静置した後に、4°C、15,000 rpm で 15 分間遠

心し、上清をタンパク質抽出液として使用した。

6-3-2 Western blotting

得られたサンプルのタンパク質濃度は DC protein assay kit (Bio-Rad) を用いて Lowry 法により測定した。タンパク質サンプル 10–40 µg を SDS ポリアクリルアミドゲル (8-15%) で泳動して分離した後に、転写装置 (Bio-Rad または ATTO) を用いて PVDF 膜 (Bio-Rad) もしくはニトロセルロース膜 (Wako) に転写した。PVDF 膜もしくはニトロセルロース膜を 0.5% もしくは 3% スキムミルク含有 TBS-T (25 mM Tris-HCl (pH 7.4)、150 mM NaCl、0.05% Tween 20) により室温で 30–60 分間ブロッキングした後に、一次抗体を 4°C で振とうしながら一晩反応させた。

洗浄後、二次抗体を室温で 1 時間反応させ、ECL Pro western blotting Detection Reagent (PerkinElmer) で発光させ、LAS3000mini (FUJIFILM) または Amersham ImageQuant 800 (Cytiva) または LuminoGraph II EM (ATTO) で観察した。イメージスキャナーで取り込んだバンドは、ImageJ (National Institutes of Health) を用いて測定し数値化した。ローディングコントロールには p97/VCP 抗体を用いた。

6-4 免疫沈降法および pull down assay

培養細胞の培地を除去した後に、on ice で冷却した HBS で 1 回洗浄し、triton-X 100 含有 IP 用 lysate buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、5 mM EDTA、5 mM EGTA、1 mM Na₃VO₄、20 mM sodium pyrophosphate、1% triton X-100、protease inhibitor cocktail 1 tablet/50 ml) もしくは CHAPS lysate buffer (40 mM HEPES (pH 7.4)、2 mM EDTA、10 mM disodium glycerophosphate、0.3%

CHAPS、10 mM sodium pyrophosphate、1 tablet/50 ml Roche Complete protease inhibitor) を加えて可溶化した。得られた細胞溶解液を on ice で5分間静置した後に 4°C、15,000 rpm で10分間遠心し、上清を採取してタンパク質サンプルとして使用した。Triton-X 100 含有 wash buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、5 mM EDTA、5 mM EGTA、1 mM Na₃VO₄、20 mM sodium pyrophosphate、1% triton X-100) もしくは CHAPS wash buffer (40 mM HEPES (pH 7.4)、150 mM NaCl、2 mM EDTA、10 mM disodium glycerophosphate、0.3% CHAPS、10 mM sodium pyrophosphate) を用いて洗浄したビーズ (FLAG M2 Affinity Gel、SIGMA もしくは Stag protein Agarose、Novagen) にサンプルを加え、4°C で2時間反応させた。ビーズを洗浄後、結合タンパク質を SDS sample buffer (50 mM Tris-HCl (pH 6.8)、0.4% SDS、6% β-mercaptoethanol、2% glycerol) もしくは FLAG peptide (SIGMA) で溶出し、western blotting により検出した。

6-5 免疫蛍光染色法

細胞を microscope cover glass (Fisherbrand) 上に播き、1日培養した。PBS (137 mM NaCl、2.7 mM KCl、1.76 mM KH₂PO₄、10 mM Na₂HPO₄) で洗浄後、4% paraformaldehyde (Wako) を用いて室温で20分間固定し、PBS で洗浄した。0.05% Triton-X 含有 PBS で、室温で1分間振とう (Wave-SI、TAITEC) することで脱膜化を行った後に、0.2%ゼラチン含有 PBS を用いて室温で20分間、もしくは3%スキムミルク含有 PBS を用いて室温で30分間振とうすることでブロッキングを行った。一次抗体を0.2%ゼラチン含有 PBS もしくは PBS で希釈し、4°C で一晩反応させた。PBS で洗浄後、遮光して二次抗体を60分間反応させた。標本は aqueous permanent mounting medium (Diagnostic BioSystems) を用いて micro slide glass (Matunami) に封入し、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM710、Carl

Zeiss) を用いて観察した。

6-6 In vitro kinase assay

キナーゼアッセイバッファー (50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、400 μ M ATP、10 mM MgCl₂、0.1 mM EDTA、0.005% Tween 20、2 mM DTT) に約 200 ng の His タグ SIN1/MAPKAP1 (CUSABIO) および 100 ng の His タグ活性 p70 S6 kinase (R&D : 活性 73 nmol/min/mg) または 70 ng の GST タグ活性 Akt1 (R&D : 活性 103 nmol/min/mg) を加えて、30°C、200 rpm で 1 時間反応させた。反応は SDS sample buffer を加えることで停止され、western blotting により検出した。

6-7 Real-time PCR 法

TRIzol Reagents (Invitrogen) を用いて細胞から全 RNA を抽出し、RNA 0.5 μ g を QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN) を用いて逆転写した。合成された cDNA を QuantiTect SYBR Green I Kit (QIAGEN) または THUNDERBIRD Next SYBR qPCR Kit (TOYOBO) および CFX96 Touch (Bio-Rad) を用いて PCR を行った。PCR 反応は、熱変性 (94°C、15 秒間)、アニーリング (60°C、30 秒間)、伸長 (72°C、30 秒間) を 45 サイクルまで行った。PP6c 発現量は GAPDH または TBP により規準化し、比較した相対値は comparative Ct ($2^{-(\Delta Ct-Cc)}$)method を用いて表した。使用したプライマーは、表 1 にまとめた。

表 1 Real-time PCR に使用したプライマー

プライマー		配列
PP6	forward	CGCCAGTAACAGTGTGGTGA
	reverse	GGCCACTTAGCCTTTAGTGCAAGA

GAPDH	forward	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC
	reverse	TGGTGAAGACGCCAGTGGA
TBP	forward	CATTCTCAAACCTCTGACCACTGCAC
	reverse	CAGCCAAGATTCACGGTAGATACAA

6-8 神経分化誘導法

6-8-1 N2a 細胞における神経突起解析

35 mm ディッシュに N2a 細胞を 2.0×10^5 個/well で播き、24 時間培養後、培地を 2% FBS、1% AA を含む DMEM に交換し、RA (20 nM) で処置した。24–72 時間培養し、神経突起の形成を、オールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-9000、KEYENCE) を用いて撮影した。1 つの細胞に複数の突起を形成する細胞においては、最も伸長している突起を軸索様突起として、撮影した範囲に存在する全ての細胞の軸索様突起の長さを計測した。またこの際、1 神経細胞あたりの神経突起形成数と神経突起形成細胞数を計数した。

6-8-2 マウス胚性幹細胞の神経分化誘導 (SDIA 法)

PA6 細胞を 10 cm ディッシュにプレーティングし、10%FBS 添加 MEMa で 5 日間培養した。細胞が馴染んだ後、FBS の混入を最小限にするため、細胞表面を 10 mL のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 3 回洗浄した。その後、mESC (1.7×10^3 個/cm²) を、10% FBS、0.1 mM nonessential amino acids、0.1 mM β -mercaptoethanol を添加した G-MEM (Wako) 中で、PA6 フィーダー細胞上で培養した。培養液は 4 日目に交換し、以後 2 日ごとに交換した。

6-9 Luciferase Reporter Assay

24 穴プレートに MEF を培地 390 μ L 中に約 5,000 個で播いた。24 時間後、ル

シフェラーゼ発現プラスミド、PEI 0.6 μ L、Opti-MEM 78 μ L を混合して培養液中に添加した。各種ルシフェラーゼ発現ベクターは、標的である NanoLuc ルシフェラーゼを 300 ng/well、内部標準であるホタルルシフェラーゼを 60 ng/well 加えて、総 DNA 量 360 ng/well とした。16 時間後、細胞を recombinant mouse TGF- β 1 (10 ng/ml) で処置し、8 時間後、標的および内部標準のルシフェラーゼを Nano-Glo Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて発光させ、蛍光強度を GloMax Explorer (Promega) により測定した。内部標準であるホタルルシフェラーゼの蛍光強度からトランスフェクション効率を算出し、標的である NanoLuc の蛍光強度を補正して転写活性を算出した。

6-10 Wound healing assay

MEF を 35mm ディッシュでコンフルエントに単層培養した。単層を 200 μ L のピペットチップで十字に切り取った。FBS フリー/DMEM で洗浄後、細胞を滅菌水または TGF- β (10 ng/ml) を含有した 0.5% FBS/DMEM で 8 時間インキュベートした。画像は 0 時間と 8 時間に撮影し、傷の大きさは ImageJ を用いて測定した。

6-11 NanoBiT 法

96 穴プレート (ViewPlate 96, Perkin Elmer) に N 末端 LgBiT-Akt および N 末端 SmBiT-PDK1 を安定に発現する MCF7 細胞を 5.0×10^4 個/well で播き、20–24 時間培養後、培地を DMSO または阻害剤を添加した 100 μ L FBS フリー培地に交換した。2–4 時間培養後、各ウェルに 25 μ L の NanoGlo Solution を添加し、37°C に設定した GloMax Explorer を用いて発光が定常状態になるまで 1 分毎に発光を測定した。1.3 μ g/mL の EGF または 5.2 μ M の insulin を各ウェルに 5 μ L ずつ添加し

(最終濃度はそれぞれ 50 ng/mL と 200 nM)、発光を 18 秒ごとに 30 分間測定した。ベースラインは EGF 刺激直前の値、AUC は刺激後 0 分から 30 分までのベースラインからの増加分を加算して算出、Tmax は発光強度が最も高くなった時点の値とした。

6-12 統計処理

実験成績は、平均±標準偏差で示した。有意差検定は 2 群間の比較では Student *t*-test を用い、危険率 (*P*) が 5%未満の場合を有意差ありとした。

6-12 使用抗体および薬物

使用した抗体を表 2、薬物を表 3 に示した。

表 2 使用抗体リスト

抗体	メーカー	型番
AC- α -Tublin	Cell Signaling	3971
Akt	Cell Signaling	2920
p-Akt Thr308	Cell Signaling	13038
p-Akt Ser473	Cell Signaling	4060
CREB	Cell Signaling	4820
p-CREB Ser133	Cell Signaling	9198
FLAG	SIGMA	F7425
HA	Aves	ET-HA 100
LC3	MBL	PM-036
mTOR	Cell Signaling	2983
p62	MBL	PM-045
p70 S6K	Santa Cruz	sc-5605
p-p70 S6K Thr371	Cell Signaling	9208
SIN1	Cell Signaling	12860
p-SIN1 Thr86	Cell Signaling	14716
PP2A	Millipore	07-324
PP4	Bethyl	A300-835A
PP6	Dr.David Brautiganより供与	
PP6R1	Dr.David Brautiganより供与	
PP6R2	Bethyl	970
PP6R3	Bethyl	972
S-tag	Novus	NBP2-13804
β 3-tubulin	Cell Signaling	5568
Smad2/3	Cell Signaling	8685
p-Smad3 Ser423/425	Cell Signaling	9520
p38 MAPK	Cell Signaling	9212
p-p38 MAPK Thr180/182	Cell Signaling	9216
ERK1/2	Cell Signaling	9107

p-ERK1/2	Cell Signaling	9101
VCP	Gene Tex	GTX113030

表 3 使用薬物リスト

抗体	購入/供給源
Retinoic acid	Wako
LY294002	BIOMOL
Akt inhibitor VIII	Cell Signaling
bpV (HOpic)	Wako
AS1938909	Echelon Biosciences
afuresertib	Cayman Chemical
tautomycin	Wako
okadaic acid	LC Laboratories
PS48	Santa Cruz

引用文献

1. Pawson, T., and Scott, J. D. (2005) Protein phosphorylation in signaling--50 years and counting. *Trends Biochem Sci.* **30**, 286–290
2. Ubersax, J. A., and Ferrell, J. E. (2007) Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **8**, 530–541
3. Olsen, J. V., Vermeulen, M., Santamaria, A., Kumar, C., Miller, M. L., Jensen, L. J., Gnad, F., Cox, J., Jensen, T. S., Nigg, E. A., Brunak, S., and Mann, M. (2010) Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. *Sci Signal.* **3**, ra3
4. Schönthal, A. H. (2001) Role of serine/threonine protein phosphatase 2A in cancer. *Cancer Lett.* **170**, 1–13
5. von Lindern, M., van Baal, S., Wiegant, J., Raap, A., Hagemeijer, A., and Grosveld, G. (1992) Can, a putative oncogene associated with myeloid leukemogenesis, may be activated by fusion of its 3' half to different genes: characterization of the set gene. *Mol Cell Biol.* **12**, 3346–3355
6. Olsen, J. V., Blagoev, B., Gnad, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., and Mann, M. (2006) Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell.* **127**, 635–648
7. Brautigan, D. L. (2013) Protein Ser/Thr phosphatases--the ugly ducklings of cell signalling. *FEBS J.* **280**, 324–345
8. Slupe, A. M., Merrill, R. A., and Strack, S. (2011) Determinants for Substrate Specificity of Protein Phosphatase 2A. *Enzyme Res.* **2011**, 398751
9. Zhang, Q., and Claret, F. X. (2012) Phosphatases: the new brakes for cancer development? *Enzyme Res.* **2012**, 659649

10. Cordeiro, M. H., Smith, R. J., and Saurin, A. T. (2018) A fine balancing act: A delicate kinase-phosphatase equilibrium that protects against chromosomal instability and cancer. *Int J Biochem Cell Biol.* **96**, 148–156
11. Westermarck, J., and Hahn, W. C. (2008) Multiple pathways regulated by the tumor suppressor PP2A in transformation. *Trends Mol Med.* **14**, 152–160
12. Ardito, F., Giuliani, M., Perrone, D., Troiano, G., and Lo Muzio, L. (2017) The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). *Int J Mol Med.* **40**, 271–280
13. Gillies, R. J., Verduzco, D., and Gatenby, R. A. (2012) Evolutionary dynamics of carcinogenesis and why targeted therapy does not work. *Nat Rev Cancer.* **12**, 487–493
14. Smith, M. P., and Wellbrock, C. (2016) Molecular Pathways: Maintaining MAPK Inhibitor Sensitivity by Targeting Nonmutational Tolerance. *Clin Cancer Res.* **22**, 5966–5970
15. Westermarck, J. (2018) Targeted therapies don't work for a reason; the neglected tumor suppressor phosphatase PP2A strikes back. *FEBS J.* **285**, 4139–4145
16. Klaeger, S., Heinzlmeir, S., Wilhelm, M., Polzer, H., Vick, B., Koenig, P.-A., Reinecke, M., Ruprecht, B., Petzoldt, S., Meng, C., Zecha, J., Reiter, K., Qiao, H., Helm, D., Koch, H., Schoof, M., Canevari, G., Casale, E., Depaolini, S. R., Feuchtinger, A., Wu, Z., Schmidt, T., Rueckert, L., Becker, W., Huenges, J., Garz, A.-K., Gohlke, B.-O., Zolg, D. P., Kayser, G., Vooder, T., Preissner, R., Hahne, H., Tönisson, N., Kramer, K., Götze, K., Bassermann, F., Schlegl, J., Ehrlich, H.-C., Aiche, S., Walch, A., Greif, P. A., Schneider, S., Felder, E. R., Ruland, J., Médard, G., Jeremias, I., Spiekermann, K., and Kuster, B. (2017) The target landscape of clinical kinase drugs.

Science. **358**, eaan4368

17. Shi, Y. (2009) Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell*. **139**, 468–484
18. Virshup, D. M., and Shenolikar, S. (2009) From promiscuity to precision: protein phosphatases get a makeover. *Mol Cell*. **33**, 537–545
19. Corcoran, J., and Maden, M. (1999) Nerve growth factor acts via retinoic acid synthesis to stimulate neurite outgrowth. *Nat Neurosci*. **2**, 307–308
20. Corcoran, J., Shroot, B., Pizzey, J., and Maden, M. (2000) The role of retinoic acid receptors in neurite outgrowth from different populations of embryonic mouse dorsal root ganglia. *J Cell Sci*. **113 (Pt 14)**, 2567–2574
21. Masiá, S., Alvarez, S., de Lera, A. R., and Baretino, D. (2007) Rapid, nongenomic actions of retinoic acid on phosphatidylinositol-3-kinase signaling pathway mediated by the retinoic acid receptor. *Mol Endocrinol*. **21**, 2391–2402
22. Ohashi, E., Kogai, T., Kagechika, H., and Brent, G. A. (2009) Activation of the PI3 kinase pathway by retinoic acid mediates sodium/iodide symporter induction and iodide transport in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res*. **69**, 3443–3450
23. Puttagunta, R., Schmandke, A., Floriddia, E., Gaub, P., Fomin, N., Ghyselinck, N. B., and Di Giovanni, S. (2011) RA-RAR- β counteracts myelin-dependent inhibition of neurite outgrowth via Lingo-1 repression. *J Cell Biol*. **193**, 1147–1156
24. Yudushkin, I. (2020) Control of Akt activity and substrate phosphorylation in cells. *IUBMB Life*. **72**, 1115–1125
25. Berchtold, D., and Walther, T. C. (2009) TORC2 plasma membrane localization is essential for cell viability and restricted to a distinct domain. *Mol Biol Cell*. **20**, 1565–1575

26. Liu, P., Gan, W., Inuzuka, H., Lazorchak, A. S., Gao, D., Arojo, O., Liu, D., Wan, L., Zhai, B., Yu, Y., Yuan, M., Kim, B. M., Shaik, S., Menon, S., Gygi, S. P., Lee, T. H., Asara, J. M., Manning, B. D., Blenis, J., Su, B., and Wei, W. (2013) Sin1 phosphorylation impairs mTORC2 complex integrity and inhibits downstream Akt signalling to suppress tumorigenesis. *Nat Cell Biol.* **15**, 1340–1350
27. Cañón, E., Cosgaya, J. M., Scsucova, S., and Aranda, A. (2004) Rapid effects of retinoic acid on CREB and ERK phosphorylation in neuronal cells. *Mol Biol Cell.* **15**, 5583–5592
28. Moore, D. L., and Goldberg, J. L. (2011) Multiple transcription factor families regulate axon growth and regeneration. *Dev Neurobiol.* **71**, 1186–1211
29. Chen, L., Feng, P., Peng, A., Qiu, X., Zhu, X., He, S., and Zhou, D. (2018) cAMP response element-binding protein and Yes-associated protein form a feedback loop that promotes neurite outgrowth. *J Cell Mol Med.* **22**, 374–381
30. Mayr, B., and Montminy, M. (2001) Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2**, 599–609
31. Li, X.-Y., Zhan, X.-R., Liu, X.-M., and Wang, X.-C. (2011) CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB in the differentiation of pancreatic ductal cells into islet β -cells mediated by hepatocyte growth factor. *Biochem Biophys Res Commun.* **404**, 711–716
32. Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., and Gong, C.-X. (2005) Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur J Neurosci.* **22**, 1942–1950
33. Liu, R., Zhou, X.-W., Tanila, H., Bjorkdahl, C., Wang, J.-Z., Guan, Z.-Z., Cao, Y., Gustafsson, J.-A., Winblad, B., and Pei, J.-J. (2008) Phosphorylated PP2A (tyrosine

307) is associated with Alzheimer neurofibrillary pathology. *J Cell Mol Med.* **12**, 241–257

34. Sontag, J.-M., Nunbhakdi-Craig, V., Mitterhuber, M., Ogris, E., and Sontag, E. (2010) Regulation of protein phosphatase 2A methylation by LCMT1 and PME-1 plays a critical role in differentiation of neuroblastoma cells. *J Neurochem.* **115**, 1455–1465

35. Ou, Y., and Rattner, J. B. (2004) The centrosome in higher organisms: structure, composition, and duplication. *Int Rev Cytol.* **238**, 119–182

36. Toyo-oka, K., Mori, D., Yano, Y., Shiota, M., Iwao, H., Goto, H., Inagaki, M., Hiraiwa, N., Muramatsu, M., Wynshaw-Boris, A., Yoshiki, A., and Hirotsune, S. (2008) Protein phosphatase 4 catalytic subunit regulates Cdk1 activity and microtubule organization via NDEL1 dephosphorylation. *J Cell Biol.* **180**, 1133–1147

37. Stefansson, B., and Brautigan, D. L. (2006) Protein phosphatase 6 subunit with conserved Sit4-associated protein domain targets IkappaBepsilon. *J Biol Chem.* **281**, 22624–22634

38. Shen, Y., Wang, Y., Sheng, K., Fei, X., Guo, Q., Larner, J., Kong, X., Qiu, Y., and Mi, J. (2011) Serine/threonine protein phosphatase 6 modulates the radiation sensitivity of glioblastoma. *Cell Death Dis.* **2**, e241

39. LePage, K. T., Dickey, R. W., Gerwick, W. H., Jester, E. L., and Murray, T. F. (2005) On the use of neuro-2a neuroblastoma cells versus intact neurons in primary culture for neurotoxicity studies. *Crit Rev Neurobiol.* **17**, 27–50

40. Stefansson, B., Ohama, T., Daugherty, A. E., and Brautigan, D. L. (2008) Protein phosphatase 6 regulatory subunits composed of ankyrin repeat domains. *Biochemistry.* **47**, 1442–1451

41. Kawasaki, H., Mizuseki, K., Nishikawa, S., Kaneko, S., Kuwana, Y.,

- Nakanishi, S., Nishikawa, S. I., and Sasai, Y. (2000) Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron*. **28**, 31–40
42. Fujiwara, N., Shibutani, S., Sakai, Y., Watanabe, T., Kitabayashi, I., Oshima, H., Oshima, M., Hoshida, H., Akada, R., Usui, T., Ohama, T., and Sato, K. (2020) Autophagy regulates levels of tumor suppressor enzyme protein phosphatase 6. *Cancer Sci*. **111**, 4371–4380
43. Fukushima, N., Furuta, D., Hidaka, Y., Moriyama, R., and Tsujiuchi, T. (2009) Post-translational modifications of tubulin in the nervous system. *J Neurochem*. **109**, 683–693
44. Perdiz, D., Mackeh, R., Poüs, C., and Baillet, A. (2011) The ins and outs of tubulin acetylation: more than just a post-translational modification? *Cell Signal*. **23**, 763–771
45. Dehmelt, L., and Halpain, S. (2005) The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol*. **6**, 204
46. Wullschleger, S., Loewith, R., and Hall, M. N. (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*. **124**, 471–484
47. Ohama, T., Wang, L., Griner, E. M., and Brautigan, D. L. (2013) Protein Ser/Thr phosphatase-6 is required for maintenance of E-cadherin at adherens junctions. *BMC Cell Biol*. **14**, 42
48. Yabe, R., Miura, A., Usui, T., Mudrak, I., Ogris, E., Ohama, T., and Sato, K. (2015) Protein Phosphatase Methyl-Esterase PME-1 Protects Protein Phosphatase 2A from Ubiquitin/Proteasome Degradation. *PLoS One*. **10**, e0145226
49. Ohama, T. (2019) The multiple functions of protein phosphatase 6. *Biochim*

Biophys Acta Mol Cell Res. **1866**, 74–82

50. Nixon, R. A. (2013) The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat Med.* **19**, 983–997
51. Stavoe, A. K. H., and Holzbaur, E. L. F. (2019) Autophagy in Neurons. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **35**, 477–500
52. Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H., and Mizushima, N. (2006) Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature.* **441**, 885–889
53. Sarraf, S. A., Shah, H. V., Kanfer, G., Pickrell, A. M., Holtzclaw, L. A., Ward, M. E., and Youle, R. J. (2020) Loss of TAX1BP1-Directed Autophagy Results in Protein Aggregate Accumulation in the Brain. *Mol Cell.* **80**, 779-795.e10
54. Pyo, J.-O., Yoo, S.-M., Ahn, H.-H., Nah, J., Hong, S.-H., Kam, T.-I., Jung, S., and Jung, Y.-K. (2013) Overexpression of Atg5 in mice activates autophagy and extends lifespan. *Nat Commun.* **4**, 2300
55. Ban, B.-K., Jun, M.-H., Ryu, H.-H., Jang, D.-J., Ahmad, S. T., and Lee, J.-A. (2013) Autophagy negatively regulates early axon growth in cortical neurons. *Mol Cell Biol.* **33**, 3907–3919
56. Feng, X., Lu, J., He, Z., Wang, Y., Qi, F., Pi, R., and Zhang, G. (2018) Mycobacterium smegmatis Induces Neurite Outgrowth and Differentiation in an Autophagy-Independent Manner in PC12 and C17.2 Cells. *Front Cell Infect Microbiol.* **8**, 201
57. He, M., Ding, Y., Chu, C., Tang, J., Xiao, Q., and Luo, Z.-G. (2016) Autophagy induction stabilizes microtubules and promotes axon regeneration after

spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **113**, 11324–11329

58. Lüningschrör, P., Binotti, B., Dombert, B., Heimann, P., Perez-Lara, A., Slotta, C., Thau-Habermann, N., R von Collenberg, C., Karl, F., Damme, M., Horowitz, A., Maystadt, I., Füchtbauer, A., Füchtbauer, E.-M., Jablonka, S., Blum, R., Üçeyler, N., Petri, S., Kaltschmidt, B., Jahn, R., Kaltschmidt, C., and Sendtner, M. (2017) Plekhg5-regulated autophagy of synaptic vesicles reveals a pathogenic mechanism in motoneuron disease. *Nat Commun*. **8**, 678

59. Wojnacki, J., Nola, S., Bun, P., Cholley, B., Filippini, F., Pressé, M. T., Lipecka, J., Man Lam, S., N'guyen, J., Simon, A., Ouslimani, A., Shui, G., Fader, C. M., Colombo, M. I., Guerrera, I. C., and Galli, T. (2020) Role of VAMP7-Dependent Secretion of Reticulon 3 in Neurite Growth. *Cell Rep*. **33**, 108536

60. Yang, K., Yu, B., Cheng, C., Cheng, T., Yuan, B., Li, K., Xiao, J., Qiu, Z., and Zhou, Y. (2017) Mir505-3p regulates axonal development via inhibiting the autophagy pathway by targeting Atg12. *Autophagy*. **13**, 1679–1696

61. Plowey, E. D., Cherra, S. J., Liu, Y.-J., and Chu, C. T. (2008) Role of autophagy in G2019S-LRRK2-associated neurite shortening in differentiated SH-SY5Y cells. *J Neurochem*. **105**, 1048–1056

62. Zeng, M., and Zhou, J.-N. (2008) Roles of autophagy and mTOR signaling in neuronal differentiation of mouse neuroblastoma cells. *Cell Signal*. **20**, 659–665

63. Szwed, A., Kim, E., and Jacinto, E. (2021) Regulation and metabolic functions of mTORC1 and mTORC2. *Physiol Rev*. **101**, 1371–1426

64. Cloëtta, D., Thomanetz, V., Baranek, C., Lustenberger, R. M., Lin, S., Oliveri, F., Atanoski, S., and Rüegg, M. A. (2013) Inactivation of mTORC1 in the developing brain causes microcephaly and affects gliogenesis. *J Neurosci*. **33**, 7799–7810

65. Zhang, Y., Xu, S., Liang, K.-Y., Li, K., Zou, Z.-P., Yang, C.-L., Tan, K., Cao, X., Jiang, Y., Gao, T.-M., and Bai, X.-C. (2017) Neuronal mTORC1 Is Required for Maintaining the Nonreactive State of Astrocytes. *J Biol Chem.* **292**, 100–111
66. Yang, L., Miao, L., Liang, F., Huang, H., Teng, X., Li, S., Nuriddinov, J., Selzer, M. E., and Hu, Y. (2014) The mTORC1 effectors S6K1 and 4E-BP play different roles in CNS axon regeneration. *Nat Commun.* **5**, 5416
67. Hoxhaj, G., Caddy, E., Najafov, A., Houde, V. P., Johnson, C., Dissanayake, K., Toth, R., Campbell, D. G., Prescott, A. R., and MacKintosh, C. (2016) The E3 ubiquitin ligase ZNRF2 is a substrate of mTORC1 and regulates its activation by amino acids. *Elife.* **5**, e12278
68. Luo, Y., Xu, W., Li, G., and Cui, W. (2018) Weighing In on mTOR Complex 2 Signaling: The Expanding Role in Cell Metabolism. *Oxid Med Cell Longev.* **2018**, 7838647
69. Grabiner, B. C., Nardi, V., Birsoy, K., Possemato, R., Shen, K., Sinha, S., Jordan, A., Beck, A. H., and Sabatini, D. M. (2014) A diverse array of cancer-associated MTOR mutations are hyperactivating and can predict rapamycin sensitivity. *Cancer Discov.* **4**, 554–563
70. Massagué, J. (2012) TGF β signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **13**, 616–630
71. Heldin, C.-H., and Moustakas, A. (2016) Signaling Receptors for TGF- β Family Members. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **8**, a022053
72. Zhang, Y. E. (2009) Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res.* **19**, 128–139
73. Ogoh, H., Tanuma, N., Matsui, Y., Hayakawa, N., Inagaki, A., Sumiyoshi, M.,

Momoi, Y., Kishimoto, A., Suzuki, M., Sasaki, N., Ohuchi, T., Nomura, M., Teruya, Y., Yasuda, K., Watanabe, T., and Shima, H. (2016) The protein phosphatase 6 catalytic subunit (Ppp6c) is indispensable for proper post-implantation embryogenesis. *Mech Dev.* **139**, 1–9

74. Assmann, P. F., and Summerfield, Q. (1989) Modeling the perception of concurrent vowels: vowels with the same fundamental frequency. *J Acoust Soc Am.* **85**, 327–338

75. Douglas, P., Ye, R., Trinkle-Mulcahy, L., Neal, J. A., De Wever, V., Morrice, N. A., Meek, K., and Lees-Miller, S. P. (2014) Polo-like kinase 1 (PLK1) and protein phosphatase 6 (PP6) regulate DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs) phosphorylation in mitosis. *Biosci Rep.* **34**, e00113

76. Zeng, K., Bastos, R. N., Barr, F. A., and Gruneberg, U. (2010) Protein phosphatase 6 regulates mitotic spindle formation by controlling the T-loop phosphorylation state of Aurora A bound to its activator TPX2. *J Cell Biol.* **191**, 1315–1332

77. Douglas, P., Zhong, J., Ye, R., Moorhead, G. B. G., Xu, X., and Lees-Miller, S. P. (2010) Protein phosphatase 6 interacts with the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit and dephosphorylates gamma-H2AX. *Mol Cell Biol.* **30**, 1368–1381

78. Dziegielewski, J., Bońkowska, M. A., Ponięcka, E. A., Heo, J., Du, K., Crittenden, R. B., Bender, T. P., Brautigan, D. L., and Larner, J. M. (2020) Deletion of the SAPS1 subunit of protein phosphatase 6 in mice increases radiosensitivity and impairs the cellular DNA damage response. *DNA Repair (Amst).* **85**, 102737

79. Zhong, J., Liao, J., Liu, X., Wang, P., Liu, J., Hou, W., Zhu, B., Yao, L., Wang, J., Li, J., Stark, J. M., Xie, Y., and Xu, X. (2011) Protein phosphatase PP6 is required

for homology-directed repair of DNA double-strand breaks. *Cell Cycle*. **10**, 1411–1419

80. Kajino, T., Ren, H., Iemura, S.-I., Natsume, T., Stefansson, B., Brautigan, D. L., Matsumoto, K., and Ninomiya-Tsuji, J. (2006) Protein phosphatase 6 down-regulates TAK1 kinase activation in the IL-1 signaling pathway. *J Biol Chem*. **281**, 39891–39896

81. Ziemcik, M. A., Bender, T. P., Larner, J. M., and Brautigan, D. L. (2017) Functions of protein phosphatase-6 in NF- κ B signaling and in lymphocytes. *Biochem Soc Trans*. **45**, 693–701

82. Derynck, R., and Zhang, Y. E. (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*. **425**, 577–584

83. Heikkinen, P. T., Nummela, M., Leivonen, S.-K., Westermarck, J., Hill, C. S., Kähäri, V.-M., and Jaakkola, P. M. (2010) Hypoxia-activated Smad3-specific dephosphorylation by PP2A. *J Biol Chem*. **285**, 3740–3749

84. Fujiwara, N., Shibutani, S., Ohama, T., and Sato, K. (2021) Protein phosphatase 6 dissociates the Beclin 1/Vps34 complex and inhibits autophagy. *Biochem Biophys Res Commun*. **552**, 191–195

85. Chou, P.-Y., Lin, S.-R., Lee, M.-H., Schultz, L., Sze, C.-I., and Chang, N.-S. (2019) A p53/TIAF1/WWOX triad exerts cancer suppression but may cause brain protein aggregation due to p53/WWOX functional antagonism. *Cell Commun Signal*. **17**, 76

86. Thakur, N., Hamidi, A., Song, J., Itoh, S., Bergh, A., Heldin, C.-H., and Landström, M. (2020) Smad7 Enhances TGF- β -Induced Transcription of c-Jun and HDAC6 Promoting Invasion of Prostate Cancer Cells. *iScience*. **23**, 101470

87. Xu, Y., Yang, S., Huang, J., Ruan, S., Zheng, Z., and Lin, J. (2012) Tgf- β 1

induces autophagy and promotes apoptosis in renal tubular epithelial cells. *Int J Mol Med.* **29**, 781–790

88. Kim, S. I., Na, H.-J., Ding, Y., Wang, Z., Lee, S. J., and Choi, M. E. (2012) Autophagy promotes intracellular degradation of type I collagen induced by transforming growth factor (TGF)- β 1. *J Biol Chem.* **287**, 11677–11688

89. Ghavami, S., Cunnington, R. H., Gupta, S., Yeganeh, B., Filomeno, K. L., Freed, D. H., Chen, S., Klonisch, T., Halayko, A. J., Ambrose, E., Singal, R., and Dixon, I. M. C. (2015) Autophagy is a regulator of TGF- β 1-induced fibrogenesis in primary human atrial myofibroblasts. *Cell Death Dis.* **6**, e1696

90. Ghavami, S., Cunnington, R. H., Gupta, S., Yeganeh, B., Filomeno, K. L., Freed, D. H., Chen, S., Klonisch, T., Halayko, A. J., Ambrose, E., Singal, R., and Dixon, I. M. C. (2015) Autophagy is a regulator of TGF- β 1-induced fibrogenesis in primary human atrial myofibroblasts. *Cell Death Dis.* **6**, e1696

91. Wang, Z., Sun, Y., Lou, F., Bai, J., Zhou, H., Cai, X., Sun, L., Yin, Q., Tang, S., Wu, Y., Fan, L., Xu, Z., Wang, H., Hu, X., and Wang, H. (2022) Targeting the transcription factor HES1 by L-menthol restores protein phosphatase 6 in keratinocytes in models of psoriasis. *Nat Commun.* **13**, 7815

92. Kennard, S., Liu, H., and Lilly, B. (2008) Transforming growth factor-beta (TGF-1) down-regulates Notch3 in fibroblasts to promote smooth muscle gene expression. *J Biol Chem.* **283**, 1324–1333

93. Liang, J., Zhou, Y., Zhang, N., Wang, D., Cheng, X., Li, K., Huang, R., Lu, Y., Wang, H., Han, D., Wu, W., Han, M., Miao, S., Wang, L., Zhao, H., and Song, W. (2021) The phosphorylation of the Smad2/3 linker region by nemo-like kinase regulates TGF- β signaling. *J Biol Chem.* **296**, 100512

94. Luo, K., and Lodish, H. F. (1997) Positive and negative regulation of type II TGF-beta receptor signal transduction by autophosphorylation on multiple serine residues. *EMBO J.* **16**, 1970–1981
95. Zhong, J., Liao, J., Liu, X., Wang, P., Liu, J., Hou, W., Zhu, B., Yao, L., Wang, J., Li, J., Stark, J. M., Xie, Y., and Xu, X. (2011) Protein phosphatase PP6 is required for homology-directed repair of DNA double-strand breaks. *Cell Cycle.* **10**, 1411–1419
96. Zou, Y., Zheng, Q., Jiang, B., Liu, Y., Xu, Y., Ma, L., Hu, Z., Wu, M., and Song, H. (2022) Deficiency of PPP6C protects TNF-induced necroptosis through activation of TAK1. *Cell Death Dis.* **13**, 618
97. Kim, S. I., Kwak, J. H., Wang, L., and Choi, M. E. (2008) Protein phosphatase 2A is a negative regulator of transforming growth factor-beta1-induced TAK1 activation in mesangial cells. *J Biol Chem.* **283**, 10753–10763
98. Hayashi, K., Momoi, Y., Tanuma, N., Kishimoto, A., Ogoh, H., Kato, H., Suzuki, M., Sakamoto, Y., Inoue, Y., Nomura, M., Kiyonari, H., Sakayori, M., Fukamachi, K., Kakugawa, Y., Yamashita, Y., Ito, S., Sato, I., Suzuki, A., Nishio, M., Suganuma, M., Watanabe, T., and Shima, H. (2015) Abrogation of protein phosphatase 6 promotes skin carcinogenesis induced by DMBA. *Oncogene.* **34**, 4647–4655
99. Kato, H., Kurosawa, K., Inoue, Y., Tanuma, N., Momoi, Y., Hayashi, K., Ogoh, H., Nomura, M., Sakayori, M., Kakugawa, Y., Yamashita, Y., Miura, K., Maemondo, M., Katakura, R., Ito, S., Sato, M., Sato, I., Chiba, N., Watanabe, T., and Shima, H. (2015) Loss of protein phosphatase 6 in mouse keratinocytes increases susceptibility to ultraviolet-B-induced carcinogenesis. *Cancer Lett.* **365**, 223–228
100. Kishimoto, K., Kanazawa, K., Nomura, M., Tanaka, T., Shigemoto-Kuroda, T., Fukui, K., Miura, K., Kurosawa, K., Kawai, M., Kato, H., Terasaki, K., Sakamoto, Y.,

Yamashita, Y., Sato, I., Tanuma, N., Tamai, K., Kitabayashi, I., Matsuura, K., Watanabe, T., Yasuda, J., Tsuji, H., and Shima, H. (2021) Ppp6c deficiency accelerates K-rasG12D -induced tongue carcinogenesis. *Cancer Med.* **10**, 4451–4464

101. Fukui, K., Nomura, M., Kishimoto, K., Tanuma, N., Kurosawa, K., Kanazawa, K., Kato, H., Sato, T., Miura, S., Miura, K., Sato, I., Tsuji, H., Yamashita, Y., Tamai, K., Watanabe, T., Yasuda, J., Tanaka, T., Satoh, K., Furukawa, T., Jingu, K., and Shima, H. (2022) PP6 deficiency in mice with KRAS mutation and Trp53 loss promotes early death by PDAC with cachexia-like features. *Cancer Sci.* **113**, 1613–1624

102. Manning, B. D., and Toker, A. (2017) AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell.* **169**, 381–405

103. Fruman, D. A., Chiu, H., Hopkins, B. D., Bagrodia, S., Cantley, L. C., and Abraham, R. T. (2017) The PI3K Pathway in Human Disease. *Cell.* **170**, 605–635

104. Gonzalez, E., and McGraw, T. E. (2009) The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle.* **8**, 2502–2508

105. Santi, S. A., and Lee, H. (2010) The Akt isoforms are present at distinct subcellular locations. *Am J Physiol Cell Physiol.* **298**, C580-591

106. Kupriyanova, T. A., and Kandrор, K. V. (1999) Akt-2 binds to Glut4-containing vesicles and phosphorylates their component proteins in response to insulin. *J Biol Chem.* **274**, 1458–1464

107. Tschopp, O., Yang, Z.-Z., Brodbeck, D., Dummler, B. A., Hemmings-Mieszczak, M., Watanabe, T., Michaelis, T., Frahm, J., and Hemmings, B. A. (2005) Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development.* **132**, 2943–2954

108. Vanhaesebroeck, B., and Alessi, D. R. (2000) The PI3K-PDK1 connection:

more than just a road to PKB. *Biochem J.* **346 Pt 3**, 561–576

109. Lučić, I., Rathinaswamy, M. K., Truebestein, L., Hamelin, D. J., Burke, J. E., and Leonard, T. A. (2018) Conformational sampling of membranes by Akt controls its activation and inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **115**, E3940–E3949

110. Truebestein, L., Hornegger, H., Anrather, D., Hartl, M., Fleming, K. D., Stariha, J. T. B., Pardon, E., Steyaert, J., Burke, J. E., and Leonard, T. A. (2021) Structure of autoinhibited Akt1 reveals mechanism of PIP3-mediated activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **118**, e2101496118

111. Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., and Sabatini, D. M. (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science.* **307**, 1098–1101

112. Ramos, A. R., Ghosh, S., and Erneux, C. (2019) The impact of phosphoinositide 5-phosphatases on phosphoinositides in cell function and human disease. *J Lipid Res.* **60**, 276–286

113. Xiao, L., Gong, L.-L., Yuan, D., Deng, M., Zeng, X.-M., Chen, L.-L., Zhang, L., Yan, Q., Liu, J.-P., Hu, X.-H., Sun, S.-M., Liu, J., Ma, H.-L., Zheng, C.-B., Fu, H., Chen, P.-C., Zhao, J.-Q., Xie, S.-S., Zou, L.-J., Xiao, Y.-M., Liu, W.-B., Zhang, J., Liu, Y., and Li, D. W.-C. (2010) Protein phosphatase-1 regulates Akt1 signal transduction pathway to control gene expression, cell survival and differentiation. *Cell Death Differ.* **17**, 1448–1462

114. Millward, T. A., Zolnierowicz, S., and Hemmings, B. A. (1999) Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. *Trends Biochem Sci.* **24**, 186–191

115. Dixon, A. S., Schwinn, M. K., Hall, M. P., Zimmerman, K., Otto, P., Lubben, T. H., Butler, B. L., Binkowski, B. F., Machleidt, T., Kirkland, T. A., Wood, M. G.,

Eggers, C. T., Encell, L. P., and Wood, K. V. (2016) NanoLuc Complementation Reporter Optimized for Accurate Measurement of Protein Interactions in Cells. *ACS Chem Biol.* **11**, 400–408

116. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., Silver, D., Vinyals, O., Senior, A. W., Kavukcuoglu, K., Kohli, P., and Hassabis, D. (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature.* **596**, 583–589

117. Biondi, R. M., Cheung, P. C., Casamayor, A., Deak, M., Currie, R. A., and Alessi, D. R. (2000) Identification of a pocket in the PDK1 kinase domain that interacts with PIF and the C-terminal residues of PKA. *EMBO J.* **19**, 979–988

118. Gordon, M. T., Ziemba, B. P., and Falke, J. J. (2021) Single-molecule studies reveal regulatory interactions between master kinases PDK1, AKT1, and PKC. *Biophys J.* **120**, 5657–5673

119. Alessi, D. R., James, S. R., Downes, C. P., Holmes, A. B., Gaffney, P. R., Reese, C. B., and Cohen, P. (1997) Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol.* **7**, 261–269

120. Dumble, M., Crouthamel, M.-C., Zhang, S.-Y., Schaber, M., Levy, D., Robell, K., Liu, Q., Figueroa, D. J., Minthorn, E. A., Seefeld, M. A., Rouse, M. B., Rabindran, S. K., Heerding, D. A., and Kumar, R. (2014) Discovery of novel AKT inhibitors with enhanced anti-tumor effects in combination with the MEK inhibitor. *PLoS One.* **9**,

e100880

121. Kinoshita, S., Ri, M., Kanamori, T., Aoki, S., Yoshida, T., Narita, T., Totani, H., Ito, A., Kusumoto, S., Ishida, T., Komatsu, H., and Iida, S. (2018) Potent antitumor effect of combination therapy with sub-optimal doses of Akt inhibitors and pomalidomide plus dexamethasone in multiple myeloma. *Oncol Lett.* **15**, 9450–9456

122. Thayyullathil, F., Chathoth, S., Shahin, A., Kizhakkayil, J., Hago, A., Patel, M., and Galadari, S. (2011) Protein phosphatase 1-dependent dephosphorylation of Akt is the prime signaling event in sphingosine-induced apoptosis in Jurkat cells. *J Cell Biochem.* **112**, 1138–1153

123. Kuo, Y.-C., Huang, K.-Y., Yang, C.-H., Yang, Y.-S., Lee, W.-Y., and Chiang, C.-W. (2008) Regulation of phosphorylation of Thr-308 of Akt, cell proliferation, and survival by the B55alpha regulatory subunit targeting of the protein phosphatase 2A holoenzyme to Akt. *J Biol Chem.* **283**, 1882–1892

124. Kim, K., Baek, A., Hwang, J.-E., Choi, Y. A., Jeong, J., Lee, M.-S., Cho, D. H., Lim, J.-S., Kim, K. I., and Yang, Y. (2009) Adiponectin-activated AMPK stimulates dephosphorylation of AKT through protein phosphatase 2A activation. *Cancer Res.* **69**, 4018–4026

125. Calleja, V., Alcor, D., Laguerre, M., Park, J., Vojnovic, B., Hemmings, B. A., Downward, J., Parker, P. J., and Larijani, B. (2007) Intramolecular and intermolecular interactions of protein kinase B define its activation in vivo. *PLoS Biol.* **5**, e95

126. Zhang, Y., and Akhtar, R. A. (1996) Effect of epidermal growth factor on phosphatidylinositol 3-kinase activity in rabbit corneal epithelial cells. *Exp Eye Res.* **63**, 265–275

127. Pinkas-Kramarski, R., Soussan, L., Waterman, H., Levkowitz, G., Alroy, I.,

- Klapper, L., Lavi, S., Seger, R., Ratzkin, B. J., Sela, M., and Yarden, Y. (1996) Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. *EMBO J.* **15**, 2452–2467
128. Kholodenko, B. N., Demin, O. V., Moehren, G., and Hoek, J. B. (1999) Quantification of short term signaling by the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem.* **274**, 30169–30181
129. Kiyatkin, A., Aksamitiene, E., Markevich, N. I., Borisov, N. M., Hoek, J. B., and Kholodenko, B. N. (2006) Scaffolding protein Grb2-associated binder 1 sustains epidermal growth factor-induced mitogenic and survival signaling by multiple positive feedback loops. *J Biol Chem.* **281**, 19925–19938
130. Toyoshima, Y., Kakuda, H., Fujita, K. A., Uda, S., and Kuroda, S. (2012) Sensitivity control through attenuation of signal transfer efficiency by negative regulation of cellular signalling. *Nat Commun.* **3**, 743
131. Kuo, M.-S., Auriiau, J., Pierre-Eugène, C., and Issad, T. (2014) Development of a human breast-cancer derived cell line stably expressing a bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based phosphatidyl inositol-3 phosphate (PIP3) biosensor. *PLoS One.* **9**, e92737
132. Calleja, V., Laguerre, M., Parker, P. J., and Larijani, B. (2009) Role of a novel PH-kinase domain interface in PKB/Akt regulation: structural mechanism for allosteric inhibition. *PLoS Biol.* **7**, e17
133. Phadngam, S., Castiglioni, A., Ferraresi, A., Morani, F., Follo, C., and Isidoro, C. (2016) PTEN dephosphorylates AKT to prevent the expression of GLUT1 on plasmamembrane and to limit glucose consumption in cancer cells. *Oncotarget.* **7**, 84999–85020

134. Jiang, Q., Zhang, X., Dai, X., Han, S., Wu, X., Wang, L., Wei, W., Zhang, N., Xie, W., and Guo, J. (2022) S6K1-mediated phosphorylation of PDK1 impairs AKT kinase activity and oncogenic functions. *Nat Commun.* **13**, 1548
135. Lin, K., Lin, J., Wu, W.-I., Ballard, J., Lee, B. B., Gloor, S. L., Vigers, G. P. A., Morales, T. H., Friedman, L. S., Skelton, N., and Brandhuber, B. J. (2012) An ATP-site on-off switch that restricts phosphatase accessibility of Akt. *Sci Signal.* **5**, ra37
136. Bao, F., Hao, P., An, S., Yang, Y., Liu, Y., Hao, Q., Ejaz, M., Guo, X.-X., and Xu, T.-R. (2021) Akt scaffold proteins: the key to controlling specificity of Akt signaling. *Am J Physiol Cell Physiol.* **321**, C429–C442
137. Nakamura, A., Naito, M., Tsuruo, T., and Fujita, N. (2008) Freud-1/Aki1, a novel PDK1-interacting protein, functions as a scaffold to activate the PDK1/Akt pathway in epidermal growth factor signaling. *Mol Cell Biol.* **28**, 5996–6009
138. Flowers, J. B., Oler, A. T., Nadler, S. T., Choi, Y., Schueler, K. L., Yandell, B. S., Kendzioriski, C. M., and Attie, A. D. (2007) Abdominal obesity in BTBR male mice is associated with peripheral but not hepatic insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **292**, E936-945
139. Garnett, C. T., Palena, C., Chakraborty, M., Tsang, K.-Y., Schlom, J., and Hodge, J. W. (2004) Sublethal irradiation of human tumor cells modulates phenotype resulting in enhanced killing by cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res.* **64**, 7985–7994
140. Baharians, Z., and Schönthal, A. H. (1998) Autoregulation of protein phosphatase type 2A expression. *J Biol Chem.* **273**, 19019–19024
141. Hagiwara, K., Yamaguchi, A., Tsuchiya, N., Kitamura, S., Iwadare, J., Sahara, R., Yamamoto, K., and Tokunaga, K. (2001) Identification of genes upregulated in the inflamed colonic lesions of Crohn's disease. *Biochem Biophys Res Commun.* **283**, 130–

142. Jury, R. P., Thibodeau, B. J., Fortier, L. E., Geddes, T. J., Ahmed, S., Pruetz, B. L., Farinola, M. A., and Wilson, G. D. (2012) Gene expression changes associated with the progression of intraductal papillary mucinous neoplasms. *Pancreas*. **41**, 611–618
143. Ivanov, S. V., Goparaju, C. M. V., Lopez, P., Zavadil, J., Toren-Haritan, G., Rosenwald, S., Hoshen, M., Chajut, A., Cohen, D., and Pass, H. I. (2010) Pro-tumorigenic effects of miR-31 loss in mesothelioma. *J Biol Chem*. **285**, 22809–22817
144. Garnett, C. T., Palena, C., Chakraborty, M., Tsang, K.-Y., Schlom, J., and Hodge, J. W. (2004) Sublethal irradiation of human tumor cells modulates phenotype resulting in enhanced killing by cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res*. **64**, 7985–7994
145. Mori, M., Benotmane, M. A., Vanhove, D., van Hummelen, P., Hooghe-Peters, E. L., and Desaintes, C. (2004) Effect of ionizing radiation on gene expression in CD4⁺ T lymphocytes and in Jurkat cells: unraveling novel pathways in radiation response. *Cell Mol Life Sci*. **61**, 1955–1964
146. Wu, N., Liu, X., Xu, X., Fan, X., Liu, M., Li, X., Zhong, Q., and Tang, H. (2011) MicroRNA-373, a new regulator of protein phosphatase 6, functions as an oncogene in hepatocellular carcinoma. *FEBS J*. **278**, 2044–2054
147. Yan, S., Xu, Z., Lou, F., Zhang, L., Ke, F., Bai, J., Liu, Z., Liu, J., Wang, H., Zhu, H., Sun, Y., Cai, W., Gao, Y., Su, B., Li, Q., Yang, X., Yu, J., Lai, Y., Yu, X.-Z., Zheng, Y., Shen, N., Chin, Y. E., and Wang, H. (2015) NF- κ B-induced microRNA-31 promotes epidermal hyperplasia by repressing protein phosphatase 6 in psoriasis. *Nat Commun*. **6**, 7652
148. Han, K.-J., Mikalayeva, V., Gerber, S. A., Kettenbach, A. N., Skeberdis, V. A.,

and Prekeris, R. (2022) Rab40c regulates focal adhesions and PP6 activity by controlling ANKRD28 ubiquitylation. *Life Sci Alliance*. **5**, e202101346

149. Cukuroglu, E., Engin, H. B., Gursoy, A., and Keskin, O. (2014) Hot spots in protein-protein interfaces: towards drug discovery. *Prog Biophys Mol Biol*. **116**, 165–173

150. Mizukoshi, Y., Takeuchi, K., Tokunaga, Y., Matsuo, H., Imai, M., Fujisaki, M., Kamoshida, H., Takizawa, T., Hanzawa, H., and Shimada, I. (2020) Targeting the cryptic sites: NMR-based strategy to improve protein druggability by controlling the conformational equilibrium. *Sci Adv*. **6**, eabd0480

151. Boura-Halfon, S., and Zick, Y. (2009) Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. **296**, E581-591

152. Julien, L.-A., Carriere, A., Moreau, J., and Roux, P. P. (2010) mTORC1-activated S6K1 phosphorylates Rictor on threonine 1135 and regulates mTORC2 signaling. *Mol Cell Biol*. **30**, 908–921

153. Hsiao, K.-C., Ruan, S.-Y., Chen, S.-M., Lai, T.-Y., Chan, R.-H., Zhang, Y.-M., Chu, C.-A., Cheng, H.-C., Tsai, H.-W., Tu, Y.-F., Law, B. K., Chang, T.-T., Chow, N.-H., and Chiang, C.-W. (2023) The B56γ3-containing protein phosphatase 2A attenuates p70S6K-mediated negative feedback loop to enhance AKT-facilitated epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer. *Cell Commun Signal*. **21**, 172

154. Sanz-Castillo, B., Hurtado, B., Vara-Ciruelos, D., El Bakkali, A., Hermida, D., Salvador-Barbero, B., Martínez-Alonso, D., González-Martínez, J., Santiveri, C., Campos-Olivas, R., Ximénez-Embún, P., Muñoz, J., Álvarez-Fernández, M., and Malumbres, M. (2023) The MASTL/PP2A cell cycle kinase-phosphatase module restrains PI3K-Akt activity in an mTORC1-dependent manner. *EMBO J*. **42**, e110833

謝辞

本研究および論文の作成を進めるにあたり、懇切なご指導および御助言を頂いた山口大学獣医薬理学研究室 佐藤晃一教授、大浜剛准教授、獣医公衆衛生学研究室 度会雅久教授、獣医臨床病理学研究室 水野拓也教授、鹿児島大学獣医薬理学研究室 宮本篤教授、宇野泰広准教授、獣医生理学研究室 白石光也准教授、岡山理科大学獣医学部創薬学講座 藤原信行講師、山口大学大学院医学系研究科薬理学講座 辻竣也助教に心より厚く感謝の意を表します。

岡山理科大学獣医学部毒性学講座 早川晃司准教授にはES細胞を提供していただきました。奈良女子大学自然科学系生物科学科 渡邊 利雄教授には CreERT-PP6^{flox/flox} MEF 細胞を提供していただき、多くの助言をいただきました。Virginia University の Dr. David Brautigan には PP6c 抗体を提供していただきました。心より厚く感謝の意を表します。

本論文を作成するにあたり懇切なご指導および御助言を頂いた山口大学獣医薬理学教室の皆様、また私を暖かく見守ってくれた夫・幸柳尚規、父・北村敏克、母・北村千恵、妹・山崎理央、弟・北村麟太郎に心より感謝の意を表します。

最後に、本研究で犠牲になった多くの動物たちに深く感謝するとともに、その霊が鎮められるよう心よりお祈り致します。

目次

第1章 諸言	1
1-1 タンパク質間相互作用とリン酸化	2
1-2 本研究の目的	4
第2章 神経突起形成における PP6 の役割	5
2-1 背景および目的.....	6
2-1-1 神経突起形成の意義.....	6
2-1-2 神経突起形成シグナル.....	6
2-1-3 Type 2A protein phosphatase と神経	7
2-1-4 研究目的.....	7
2-2 実験結果.....	8
2-2-1 神経突起形成時の type 2A protein phosphatase タンパク質発現量 の変化	8
2-2-2 神経突起形成時の PP6 調節サブユニットタンパク質発現量の変 化	10
2-2-3 神経分化時の type 2A protein phosphatase タンパク質発現量の変 化	12
2-2-4 PP6 タンパク質の発現増加メカニズムの検討	14
2-2-5 PP6 発現抑制が神経分化に与える影響	16
2-2-6 PP6 発現抑制が神経突起伸長に与える影響	18

2-2-7 PP6 複合体が神経突起形成に与える影響	20
2-2-8 PP6 発現抑制が神経分化シグナルに与える影響	22
2-2-9 PP6 と mTORC2 の相互作用の解析	24
2-2-10 PP6 複合体と SIN1 の相互作用の解析	26
2-2-11 SIN1 Thr86 リン酸化を担うキナーゼの同定	28
2-3 考察	30
2-3-1 神経突起形成時の PP6 発現の上昇	30
2-3-2 神経細胞におけるオートファジー	31
2-3-3 PP6 による mTORC2 制御	32
2-3-4 総括	33
第 3 章 TGF-β シグナルにおける PP6 の役割	34
3-1 背景および目的	35
3-2 実験結果	36
3-2-1 TGF- β 刺激による PP6 タンパク質発現量の変化	36
3-2-2 TGF- β による PP6 タンパク質増加の分子機構の検討	38
3-2-3 PP6 欠損が TGF- β シグナルの古典的経路に与える影響	40
3-2-4 PP6 欠損が TGF- β シグナルの非古典的経路に与える影響	42
3-2-5 PP6 欠損が TGF- β 誘導性の細胞遊走に与える影響	44
3-3 考察	46
3-3-1 TGF- β 刺激による PP6 タンパク質発現増加の分子機構	46

3-3-2 PP6による TGF- β シグナルの制御機構.....	46
3-3-3 総括.....	47
第4章 NanoBiT システムを用いた PDK1-Akt タンパク質相互作用メカニ	
ズムの解明.....	48
4-1 背景および目的.....	49
4-1-1 PI3K/Akt シグナル.....	49
4-1-2 研究目的.....	52
4-2 実験結果.....	53
4-2-1 LgBiT/SmBiT の最適な組み合わせの検討.....	53
4-2-2 MCF7 PDK1/Akt 細胞の EGF に対する反応性の検討.....	56
4-2-3 EGF による PDK1/Akt 結合に PIF 阻害が与える影響.....	58
4-2-4 EGF による PDK1/Akt 結合に Akt の細胞膜移行が与える影響 ...	60
4-2-5 EGF による PDK1/Akt 結合に PTEN 阻害が与える影響.....	63
4-2-6 EGF による PDK1/Akt 結合に SHIP2 阻害が与える影響.....	66
4-2-7 EGF による PDK1/Akt 結合に Akt のリン酸化状態が与える影響	68
4-2-8 EGF による PDK1/Akt 結合に PP1 阻害が与える影響.....	70
4-2-9 EGF による PDK1/Akt 結合に PP2A 阻害が与える影響.....	73
4-3 考察.....	75
4-3-1 NanoBiT システムにおいて付加したタグの構造的妥当性.....	75
4-3-2 刺激の違いによる結合動態の変化.....	76
4-3-3 PDK1/Akt 不活性複合体の検出.....	77

4-3-4 PDK1/Akt 結合にホスファターゼが与える影響.....	78
4-3-5 EGF 刺激時の PDK1/Akt 結合と Akt のリン酸化状態	79
第 5 章 総合考察	81
5-1 PP6 発現および機能の調節機構.....	82
5-2 ホスファターゼを標的とした創薬戦略	84
第 6 章 実験材料および実験方法	87
6-1 細胞培養法.....	88
6-2 プラスミド DNA およびレンチウイルスベクターの作製	88
6-2-1 プラスミドの作製.....	88
6-2-2 プラスミドのトランスフォメーションおよびミニプレップ.....	89
6-2-3 プラスミドのトランスフェクション.....	89
6-2-4 レンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入.....	90
6-3 Western blotting によるタンパク質発現量測定	90
6-3-1 タンパク質抽出.....	90
6-3-2 Western blotting	91
6-4 免疫沈降法および pull down assay	91
6-5 免疫蛍光染色法.....	92
6-6 In vitro kinase assay	93
6-7 Real-time PCR 法	93

6-8 神経分化誘導法.....	94
6-8-1 N2a 細胞における神経突起解析	94
6-8-2 マウス胚性幹細胞の神経分化誘導 (SDIA 法)	94
6-9 Luciferase Reporter Assay	94
6-10 Wound healing assay	95
6-11 NanoBiT 法.....	95
6-12 統計処理.....	96
6-12 使用抗体および薬物	96
引用文献.....	99
謝辞.....	120

第1章 諸言

1-1 タンパク質間相互作用とリン酸化

生体を構成する細胞は常に適切な情報を受け取り、その恒常性を支えている。細胞が外部から成長因子や増殖因子などの刺激を受けると、細胞内の様々なタンパク質同士が結合と解離を繰り返すことでその構造変化や反応が誘起される。その結果、生体として多岐に渡る機能を綿密に制御することが可能となり、生命活動が維持されている。この結合・解離、すなわちタンパク質間相互作用の異常はがんをはじめとした様々な疾患の原因となる。タンパク質間相互作用の理解は生命現象のメカニズムだけでなく疾患原因の解明に向けた重要な足掛かりとなることから、近年、タンパク質間相互作用に焦点を当てた創薬が注目されている。

タンパク質のリン酸化は、真核生物においてタンパク質間相互作用を制御する最も一般的な翻訳後修飾であり (1)、全細胞タンパク質の 30~70%に影響を及ぼしている。細胞周期や細胞増殖、アポトーシスなどの細胞反応には何千ものリン酸化イベントが関与している (2, 3)。タンパク質のリン酸化は、リン酸化酵素 (protein kinase: キナーゼ) および脱リン酸化酵素 (protein phosphatase: ホスファターゼ) によって可逆的に調節されている。リン酸化の 98%以上がセリン (Ser) とスレオニン (Thr) 残基で起こり、protein kinase B (Akt)をはじめとした約 400 種類のキナーゼによって制御されている (4-6)。一方、Ser/Thr 残基のホスファターゼは約 40 種類存在し、大きく PPP、PPM、Asp phosphatase の 3 つのスーパーファミリーに分類される (7)。PPP スーパーファミリーに分類されるホスファターゼは、細胞内の Ser/Thr ホスファターゼの大部分を占めており、protein phosphatase (PP) 1、PP5、そして type 2A protein phosphatase である PP2A、PP4、PP6 が属する (8)。これらのうち、PP1 と PP2A は細胞内の脱リン酸化活性

の約 90%を担う主要なホスファターゼである (9)。キナーゼとホスファターゼは互いに協調して働くことで均衡を保っているが、キナーゼの過度な活性化やホスファターゼ活性の低下によりそのバランスが崩れリン酸化が過剰になると、がんや神経変性疾患、糖尿病など様々な疾患の発生や悪性化の原因になる (10–12)。そのため、各種疾患において過剰なリン酸化の抑制は有効な創薬標的になると考えられることから、キナーゼ阻害剤の開発が進められてきた。しかし、持続的な治療効果をもたらすキナーゼ阻害剤はごく僅かであり、そのほとんどはリン酸化シグナル伝達経路の再構築によって薬剤耐性が生じる (13–15)。また、キナーゼは活性部位の構造が類似しており、阻害剤は多数のキナーゼを off-target として阻害することから副作用が問題となっている (16)。そのため、近年ではホスファターゼの活性化による過剰なリン酸化の抑制というアプローチが有効であると考えられるようになってきた。しかし、ホスファターゼは基質選択性が低いため、長い間創薬標的として不適であるとされ、その構造や機能の解明がキナーゼと比較して進んでいない (17, 18)。分子標的薬開発におけるこうした問題の解決には、キナーゼとホスファターゼ双方が織りなす細胞内のリン酸化ネットワークを分子レベルで詳細に解明することが極めて重要である。

1-2 本研究の目的

本研究では、生命維持において重要なキナーゼとホスファターゼの関係に着目し、その詳細な生理学的機能を明らかにすることで、がんをはじめとした生活習慣病や神経変性疾患といった様々な病態理解の基盤となり、新たな創薬戦略の創出に寄与することを目的とした。

第2章 神経突起形成における PP6 の役割

2-1 背景および目的

2-1-1 神経突起形成の意義

神経細胞は、長い軸索と複雑に分岐した樹状突起と呼ばれる神経突起を有する脳や脊髄の主要な構成細胞である。神経突起を介して膨大な神経細胞が連絡し合うことで複雑な神経回路ネットワークが形成され、運動、記憶、学習などの高度な機能を可能にしている。しかし、脳卒中や外傷などの急性損傷後の中枢神経系の再生能力は限られており、修復過程の停止によって神経細胞間のネットワークが破綻することで、麻痺などの機能不全が引き起こされる。そのため、神経突起形成などの再生メカニズムを解明することは神経損傷治療のアプローチにおいて極めて重要である。

2-1-2 神経突起形成シグナル

脂溶性ビタミン A 誘導体である retinoic acid (RA) は、phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) / Akt シグナルの活性化を通じて、神経突起伸長の誘導に重要な役割を果たしている (19–23)。Mammalian target of rapamycin (mTOR) は 2 つの異なる複合体、mTOR complex (mTORC) 1 と mTORC2 として存在し、それぞれ固有の構成因子 Raptor と Rictor によって区別される。mTORC2 は、PI3K の重要な下流エフェクターであり、Akt の Ser473 をリン酸化することで Akt を活性化する (24)。mTORC2 の構成要素である SIN1 は、pleckstrin homology (PH) ドメインを持ち、これを介してリン脂質と結合することで mTORC2 と細胞膜との結合を促進し、Akt に対する mTORC2 活性を促進する (25)。p70 S6K または Akt による SIN1 Thr86 のリン酸化は、SIN1 を mTORC2 から解離させ、mTORC2 活

性を抑制するネガティブフィードバックとして働く (26)。

多くの転写因子が神経突起伸長に影響を及ぼすが、特に脳に豊富に存在する cAMP response element binding protein (CREB) は代表的な神経活動依存的転写因子である (27-29)。Akt が CREB の Ser133 をリン酸化すると、CREB の転写活性が 10 倍以上上昇する (30, 31)。したがって、PI3K/mTORC2/Akt/CREB シグナルは RA による神経突起形成において重要な役割を果たしている。

2-1-3 Type 2A protein phosphatase と神経

近年、神経細胞機能における type 2A protein phosphatase の重要性が明らかになってきた。神経突起内部に存在する微小管は突起構造の維持や細胞内輸送などの重要な役割を持つ。PP2A は微小管結合タンパク質 tau の脱リン酸化を司る主要な因子であり、アルツハイマー病では PP2A の活性が低下することで tau の過剰なリン酸化が引き起こされる (32, 33)。また、PP2A は神経突起の形成に重要であることが報告されているが、その詳細な機構は明らかにされていない (34)。PP4 は微小管形成の中心として働く中心体に局在する脱リン酸化酵素であり (35)、微小管の安定化に寄与する (36)。PP6 は中枢神経系に発現し (37)、グリオーマ (神経膠芽腫) の悪性化に関与することが報告されているが (38)、神経突起の形成における役割は報告されていない。

2-1-4 研究目的

本研究は、type 2A protein phosphatase に着目し、神経突起形成における役割とその分子機構を明らかにすることを目的とした。

2-2 実験結果

2-2-1 神経突起形成時の type 2A protein phosphatase タンパク質発現量の変化

マウス神経芽腫細胞株 N2a 細胞を低血清条件下において、RA で処置すると神経突起が伸長することから、N2a 細胞は神経突起形成モデルとして広く用いられている (34, 39)。初めに、RA 処置による N2a 細胞の神経分化を、細胞の形態変化および神経細胞マーカー β -tubulin III の発現増加によって確認した (図 1A, B)。神経分化刺激時の type 2A protein phosphatase のタンパク質発現変化を western blotting により解析した。神経突起形成にともない PP6 タンパク質発現量の顕著な上昇が観察されたのに対して、PP2A および PP4 のタンパク質発現量に変化は認められなかった (図 1B-E)。

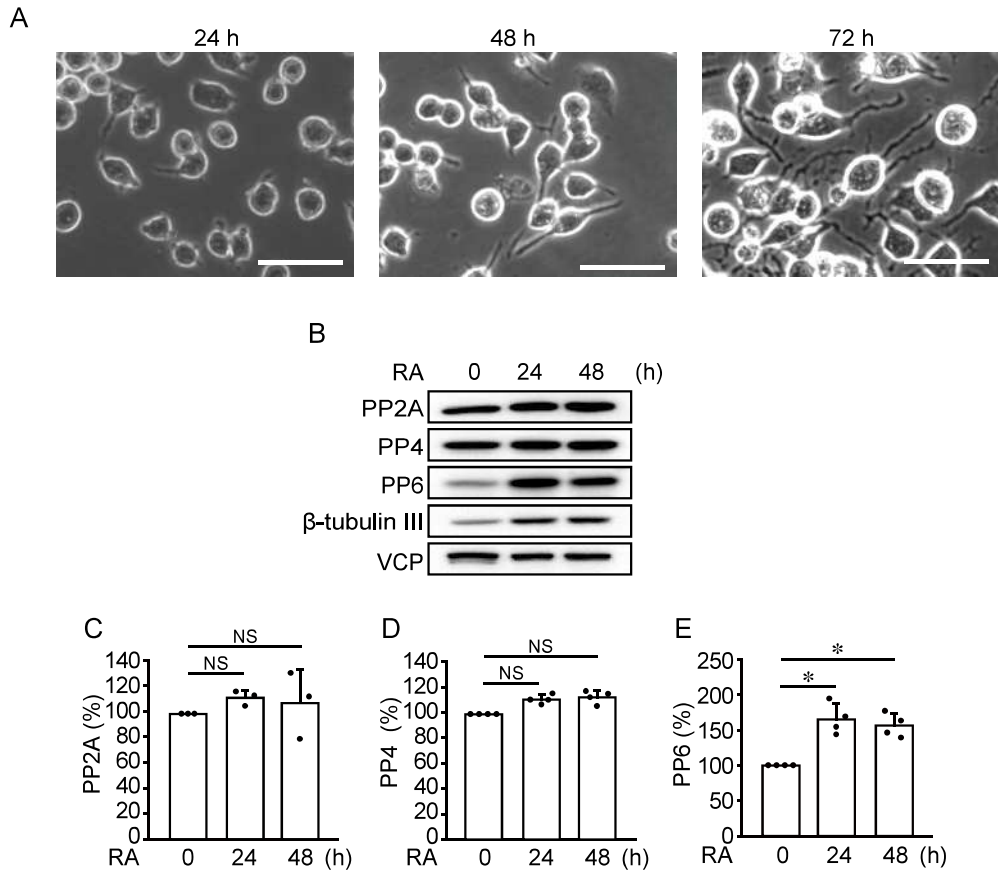


図1 神経突起形成時の type 2A protein phosphatase タンパク質発現量の変化

(A) マウス神経芽腫細胞株 N2a を RA (20 nM) で処置し、神経突起形成を経時的に観察した。N=3。スケールバー：50 μ m。

(B-E) Type 2A protein phosphatase タンパク質発現量の変化を western blotting を用いて検討した代表例 (B) と PP2A (C)、PP4 (D)、PP6 (E) の無処置 (0 h) のタンパク質発現量を 100% として相対値で表した定量図。N=3-4。*: $P < 0.05$ 。

NS: not significantly different.

2-2-2 神経突起形成時の PP6 調節サブユニットタンパク質発現量の変化

PP6 は、調節サブユニット (SAPS) との複合体として機能するホロ酵素であり、活性を持つ触媒サブユニットに PP6R1、R2、R3 の 3 種類が存在する SAPS のうちの 1 つが結合することで基質を特定する (37, 40) (図 2A)。

RA 処置で PP6 タンパク質発現量が上昇したことから、SAPS のタンパク質発現量を検討した。N2a 細胞を RA で 48 時間処置して神経突起を形成させ、調節サブユニットのタンパク質発現量を western blotting で解析した。神経突起形成にともない、PP6R1 タンパク質発現量は顕著に上昇し、R2、R3 タンパク質発現量も上昇傾向であることが観察された (図 2B-E)。

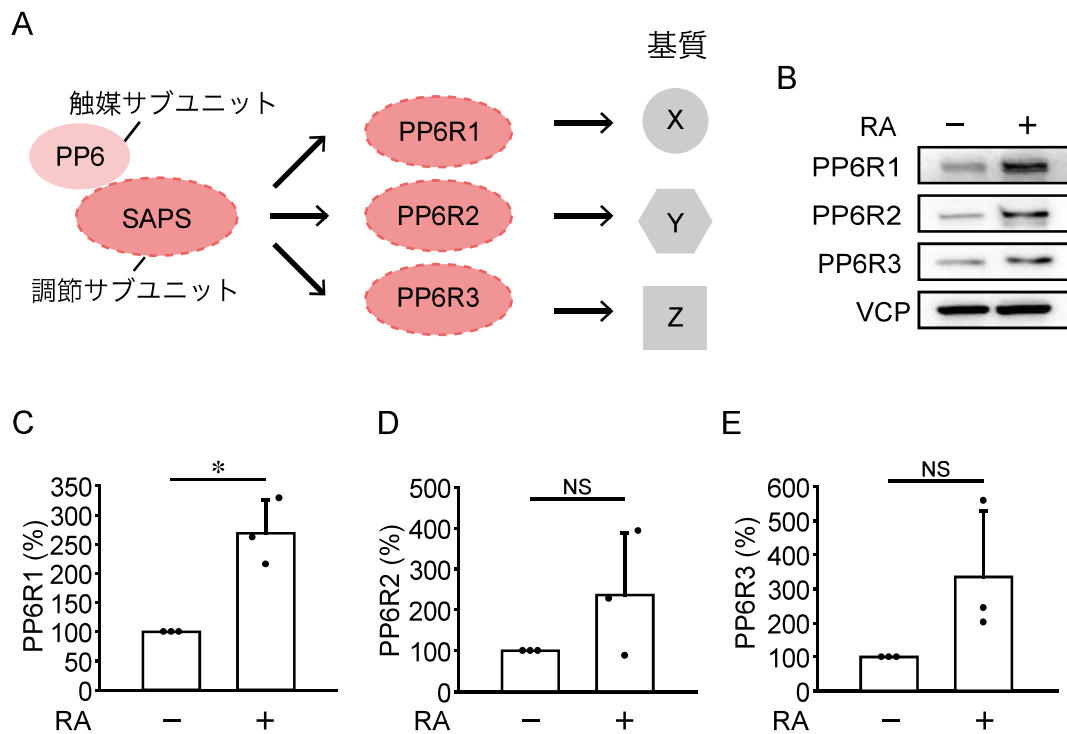


図2 神経突起形成時のPP6調節サブユニットタンパク質発現量の変化

(A) PP6は調節サブユニットであるSAPSのいずれか1つと結合することで、特異的な基質へとリクルートされる。

(B-E) N2a細胞をRA (20 nM) で48時間処置し、SAPSのタンパク質発現量の変化をwestern blottingを用いて検討した典型例(A)とPP6R1(B)、PP6R2

(C)、PP6R3(D)の、無処置のタンパク質発現量を100%として相対値で表した定量図。N=3。*: $P < 0.05$ 。NS: not significantly different.

2-2-3 神経分化時の type 2A protein phosphatase タンパク質発現量の変化

神経分化刺激による PP6 タンパク質の増加が N2a 細胞特異的な現象である可能性を排除するため、マウス胚性幹細胞 (mESC) の神経分化モデルを用いて解析した。本研究で用いた SDIA 法では、mESC は誘導 4 日後に神経前駆細胞になり、10 日後に神経細胞に分化する (41)。神経分化誘導 10 日後に、 β -tubulin III の発現量が増加し、mESC 細胞が神経細胞に分化したことを確認した (図 3A)。この条件下においても PP6 タンパク質の増加が誘導された (図 3A, B)。他の type 2A protein phosphatase である PP2A と PP4 タンパク質発現量も有意に増加したが、増加率は PP6 よりはるかに小さかった (図 3A, B)。

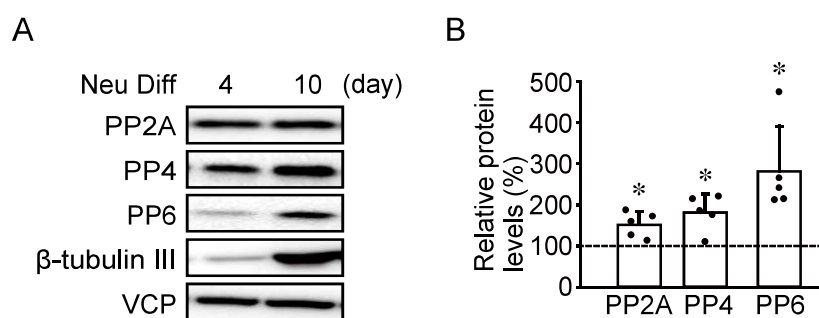


図3 神経分化時の type 2A protein phosphatase タンパク質発現量の変化

(A, B) マウス胚性幹細胞 mESC を SDIA 法で神経細胞に分化させ (Neu Diff)、type 2A protein phosphatase タンパク質発現量の変化を western blotting を用いて解析した代表例 (A) と 4 日目のタンパク質発現量を 100% として 10 日目の発現量を相対値で表した定量図 (B)。N=5。*: $P < 0.05$ (4 日目との比較)。

2-2-4 PP6 タンパク質の発現増加メカニズムの検討

タンパク質の発現は mRNA の合成（転写）、翻訳、翻訳後の多段階で調節される。神経突起形成時の PP6 タンパク質増加の分子機構を明らかにするため、N2a 細胞を RA で 48 時間処置し、PP6 mRNA 発現を解析した（図 4A）。PP6 mRNA 発現は RA 処置で減少傾向を示したことから、神経分化時の PP6 発現は転写レベルではなく翻訳後の段階で制御されていることが示唆された。

PP6 タンパク質は、アダプタータンパク質である p62 介在性の選択的オートファジーによって分解される (42)。オートファジーが進行すると、LC3-I から LC3-II へと段階的変換を経ることから、この変換率はオートファジー活性の指標となる。そこで、N2a 細胞を RA で処置し、p62 と LC3-I、II の発現量を解析することで、神経分化誘導によるオートファジー活性への影響を解析した。RA によって p62 と LC3-I の蓄積が観察されたことから（図 4B, C）、RA による PP6 タンパク質の増加はオートファジー活性の抑制によるものであることが示唆された。

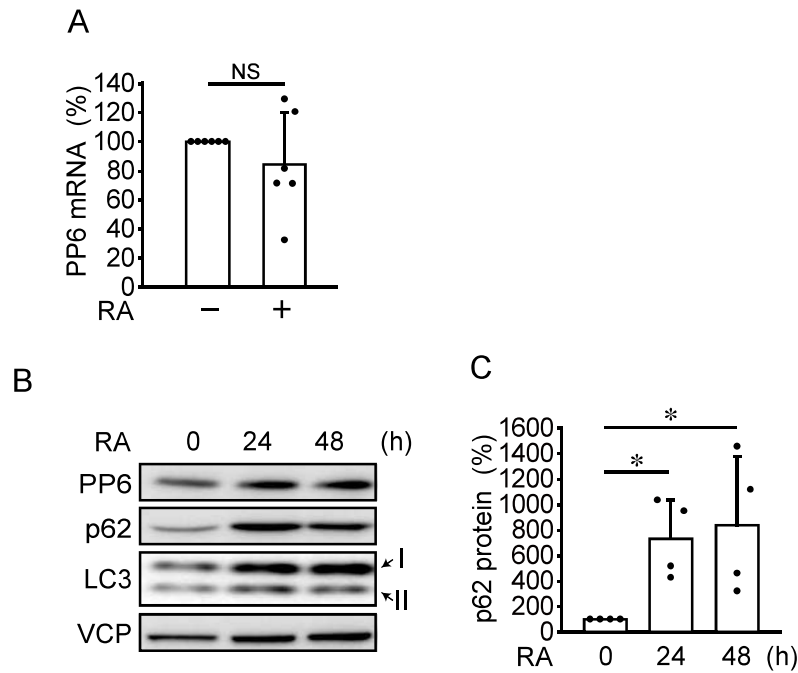


図4 PP6 タンパク質の発現増加メカニズムの検討

(A) N2a 細胞を RA (20 nM) で 48 時間処置し、PP6 の mRNA 発現量を real-time PCR で解析した。RA 無処置の PP6 mRNA 発現量を 100% として相対値で表した定量図。N=6。NS: not significantly different。

(B, C) N2a 細胞を RA (20 nM) で 24、48 時間処置し、オートファジー活性を western blotting により検討した代表例 (B) と p62 の RA 無処置のタンパク質発現量を 100% として相対値で表した定量図 (C)。N=4。*: $P < 0.05$ 。

2-2-5 PP6 発現抑制が神経分化に与える影響

神経分化における PP6 の機能を検討するため、non-target shRNA (shNT) または PP6 targeting shRNA (shPP6) を安定発現させた N2a 細胞を作製し、PP6 発現抑制が神経分化に与える影響を解析した。PP6 発現抑制が神経関連マーカーの発現量に与える影響を検討したところ、神経細胞極性マーカーの一つである α -tubulin の Lys40 アセチル化 (43, 44) が、PP6 発現抑制により低下することが認められた (図 5A, B)。さらに、免疫蛍光染色法を用いて、PP6 の発現抑制が神経分化マーカーである MAP2A/B/C 発現量 (45) に与える影響を解析したところ、同様に発現の減少が観察された (図 5C)。以上の結果から、N2a 細胞において、PP6 発現抑制により神経分化が抑制されることが示唆された。

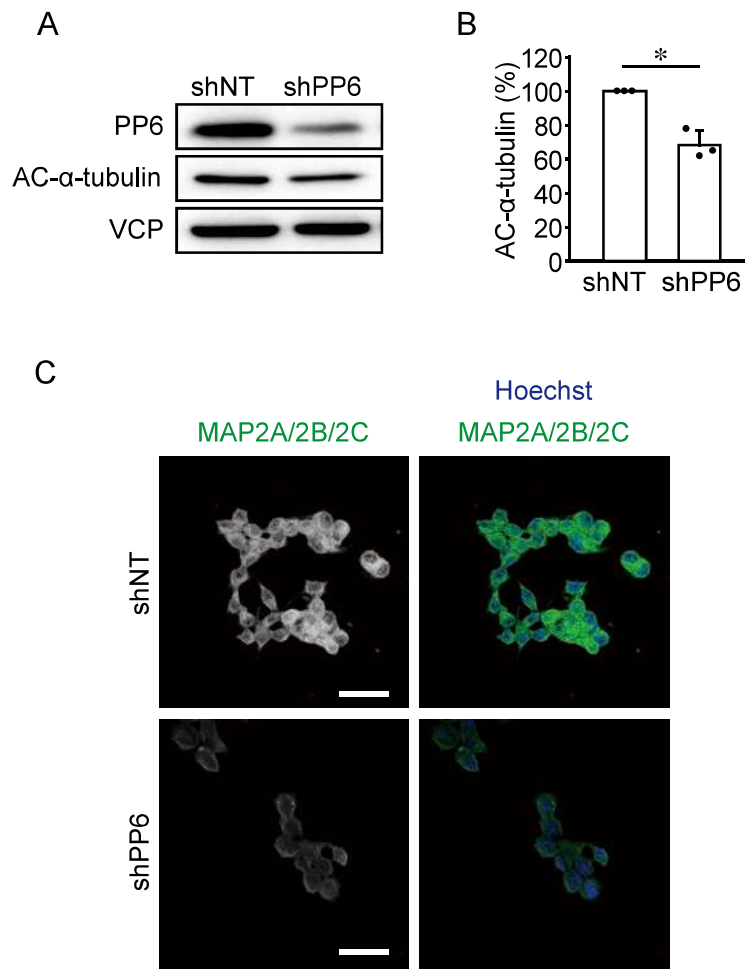


図5 PP6発現抑制が神経分化に与える影響

(A, B) N2a 細胞に、non-target shRNA (shNT) または PP6 targeting shRNA (shPP6) を安定的に発現させ、PP6 および acetyl- α -tubulin (AC- α -tubulin) 発現量を western blotting により解析した代表例 (A) と shNT を発現させた細胞の AC- α -tubulin のタンパク質発現量を 100%として相対値で表した定量図 (B)。N=3。*: $P < 0.05$ 。

(C) N2a 細胞に、shNT または shPP6 を安定的に発現させ、MAP2A/B/C 抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。核染色には Hoechst 33342 を用いた。N=3。スケールバー : 20 μm 。

2-2-6 PP6 発現抑制が神経突起伸長に与える影響

PP6が神経分化に関与する可能性が示されたことから、PP6発現抑制が神経突起伸長に与える影響を検討した。N2a 細胞を RA で処置し、72 時間後に位相差顕微鏡下で撮影し、神経突起形成を解析した (図 6A)。PP6 発現抑制細胞では神経突起の長さ、細胞あたりの神経突起数、神経突起形成細胞の割合が有意に減少し (図 6B-D)、PP6 発現抑制が神経分化能を低下させる可能性が示された。

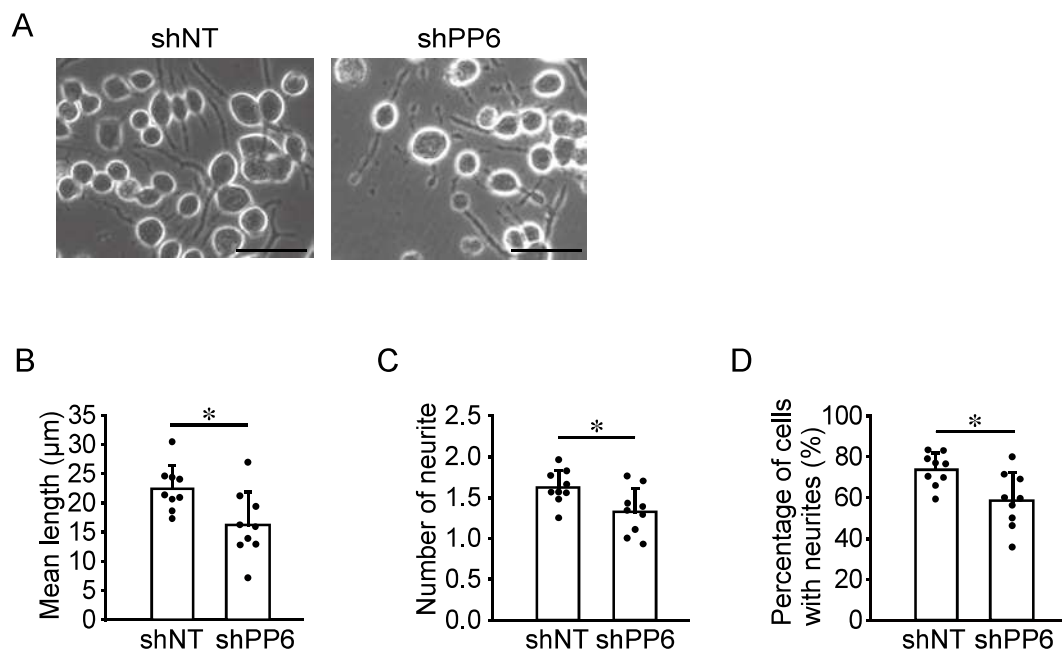


図6 PP6発現抑制が神経突起伸長に与える影響

(A–D) shNTまたはshPP6を安定的に発現させたN2a細胞をRAで72時間処置し、位相差顕微鏡下で撮影した代表図(A)と、細胞の神経突起の長さ(B)、細胞あたりの神経突起の数(C)、神経突起を持つ細胞の割合(D)の定量図。

N=9。スケールバー：50 μm。*: $P < 0.05$ 。

2-2-7 PP6 複合体が神経突起形成に与える影響

いずれの PP6 複合体が神経突起形成に関与しているのかを検討するために、N2a 細胞に PP6 と各種の SAPS タンパク質を一過性に過剰発現させ、神経突起形成に与える影響を検討した。神経分化刺激なしで、全ての SAPS 導入細胞において神経突起形成が促進傾向であったが、PP6R2 とともに PP6 を過剰発現させた場合のみ、神経突起形成割合が有意に上昇した (図 7)。したがって、PP6-PP6R2 複合体が神経細胞の分化と伸長の誘導に関与している可能性が考えられる。

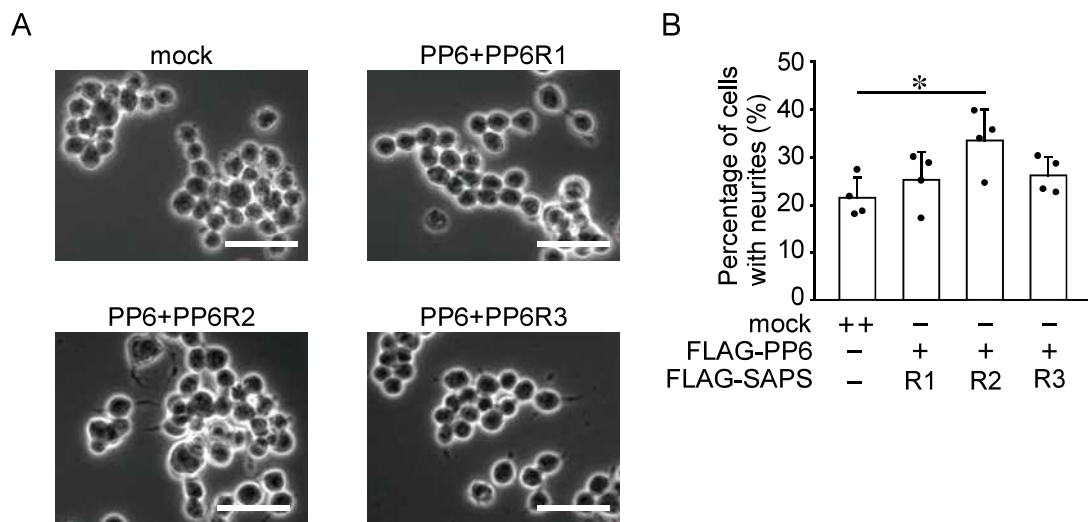


図7 PP6複合体が神経突起形成に与える影響

(A, B) N2a細胞にFLAG-PP6およびFLAG-SAPS (PP6R1, PP6R2, PP6R3)を発現するプラスミドを導入し、24時間後に位相差顕微鏡下で形態変化を撮影し

(A)、神経突起を持つ細胞の割合を算出した (B)。N=4。スケールバー：50 μm 。*: $P < 0.05$ 。

2-2-8 PP6 発現抑制が神経分化シグナルに与える影響

PP6 が神経分化を促進する可能性が示されたことから、PP6 発現抑制が神経分化シグナル伝達に与える影響を検討した。N2a 細胞において、PP6 発現抑制は CREB Ser133 リン酸化を顕著に抑制した (図 8A, B)。さらに、PP6 発現抑制は Akt Ser473 リン酸化も抑制した (図 8C, D)。したがって、PP6 発現抑制は Akt/CREB 活性を抑制することが示唆された。

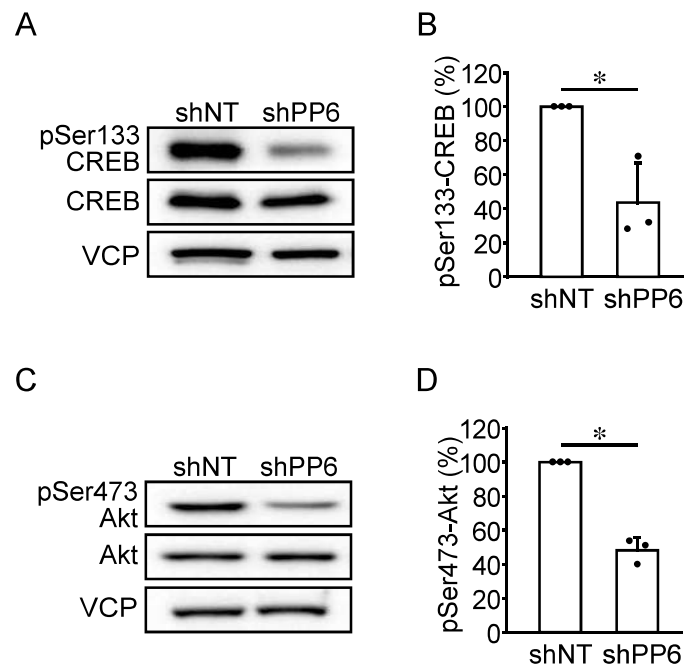


図8 PP6 発現抑制が神経分化シグナルに与える影響

(A–D) N2a 細胞に、shNT または shPP6 を安定的に発現させ、CREB (A, B) および Akt (C, D) のリン酸化レベルおよびタンパク質発現量を western blotting により解析した。それぞれの代表例 (A, C) と shNT を発現させた細胞のリン酸化レベルを 100% として相対値で表した定量図 (B, D)。N=3。*: $P < 0.05$ 。

2-2-9 PP6 と mTORC2 の相互作用の解析

Akt Ser473 は mTORC2 の基質であることから (46)、Akt Ser473 リン酸化レベルの低下は mTORC2 の活性低下を示唆する。そこで、PP6 と mTORC2 の相互作用の可能性を pull-down 法および免疫沈降法を用いて解析した。HEK293T 細胞に HA-mTOR および Stag-PP6 を発現させ、Stag ビーズで pull-down を行い、western blotting により解析したところ、mTOR と PP6 の結合が観察された (図 9A)。また、mTORC2 の構成因子である Rictor と PP6 の結合を検討した。HEK293T 細胞に HA-PP6、FLAG-Rictor を発現させ、FLAG M2 ビーズで免疫沈降を行い、western blotting により解析したところ、Rictor と PP6 の結合が観察された (図 9B)。したがって、PP6 は mTORC2 と相互作用し、その活性を制御する可能性が示された。

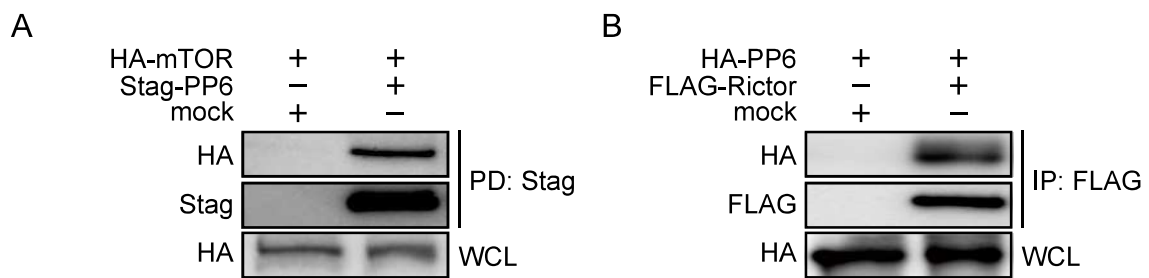


図9 PP6 と mTORC2 の相互作用の解析

(A) HEK293T 細胞に、HA-mTOR および Stag-PP6 を発現させ、Stag ビーズで pull-down を行い、western blotting により mTOR と PP6 の結合を解析した代表例。

PD: pull down、WCL: whole cell lysate。N=3。

(B) HEK293T 細胞に、HA-PP6 および FLAG-Rictor を発現させ、FLAG M2 ビーズで免疫沈降を行い、western blotting により PP6 と Rictor の結合を解析した代表例。

IP: immunoprecipitation。N=3。

2-2-10 PP6 複合体と SIN1 の相互作用の解析

mTORC2 の構成因子である SIN1 の Thr86 リン酸化は、SIN1 を mTORC2 から解離させ、mTORC2 活性を抑制する (26)。PP6 が mTORC2 と相互作用することから、SAPS と SIN1 の相互作用を、免疫沈降法を用いて解析した。HEK293T 細胞に各種の FLAG-SAPS を発現させ、FLAG M2 ビーズで免疫沈降を行い、western blotting により解析したところ、全ての SAPS タンパク質が mTOR および SIN1 と結合することが観察された (図 10A)。さらに PP6 発現抑制が SIN1 Thr86 リン酸化レベルに与える影響を検討したところ、PP6 発現抑制細胞では SIN1 のリン酸化レベルの顕著な上昇が認められた (図 10B, C)。以上の結果から、PP6 は SIN1 を脱リン酸化することで mTORC2 を活性化する可能性が示された。

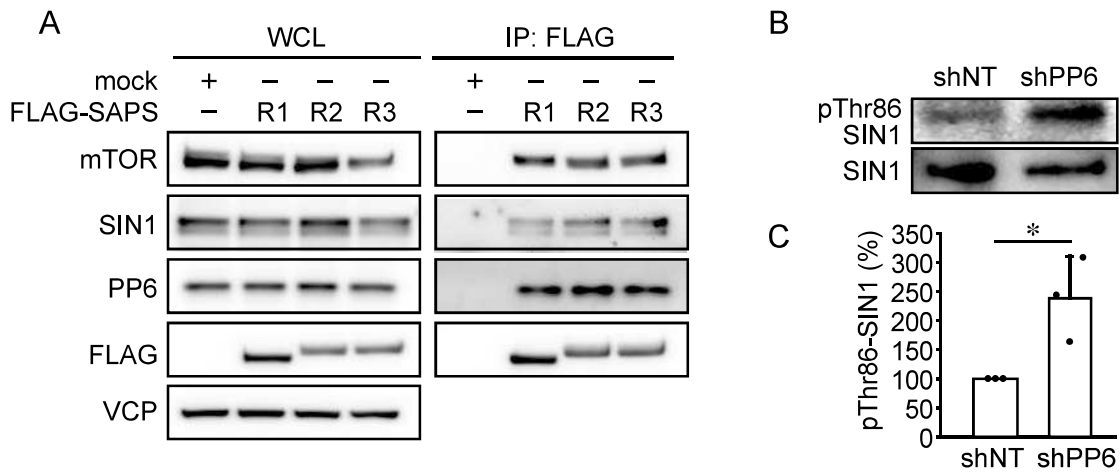


図 10 PP6 複合体と SIN1 の相互作用の解析

(A) HEK293T 細胞に、FLAG-SAPS (R1 : PP6R1、R2 : PP6R2、R3 : PP6R3) を一過性に発現させ、FLAG-M2 ビーズで免疫沈降を行い、western blotting により SAPS と mTORC2 の結合を解析した。N=3。

(B, C) N2a 細胞に shNT または shPP6 を安定発現させ、SIN1 のリン酸化レベルおよびタンパク質発現量を western blotting により解析した代表例 (B) と shNT を発現させた細胞の SIN1 リン酸化レベルを 100% として相対値で表した定量図 (C)。N=3。*: $P < 0.05$ 。

2-2-11 SIN1 Thr86 リン酸化を担うキナーゼの同定

SIN1 の Thr86 は、p70 S6K や Akt によりリン酸化を受ける (26)。リコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* キナーゼアッセイにより、p70 S6K と Akt の両方が SIN1 を直接リン酸化することを確認したが、Akt の方がより強力にリン酸化を誘導した (図 11A, B)。N2a 細胞において、PP6 発現抑制が p70 S6K 活性に与える影響を検討したところ、p70 S6K のリン酸化レベルに変化は認められなかった (図 11C, D)。また、PP6 発現抑制は Akt 活性を抑制したことから (図 8C, D)、PP6 は上流のキナーゼの活性を抑制するのではなく、直接 SIN1 を脱リン酸化して mTORC2/Akt/CREB シグナルを活性化する可能性が示された。

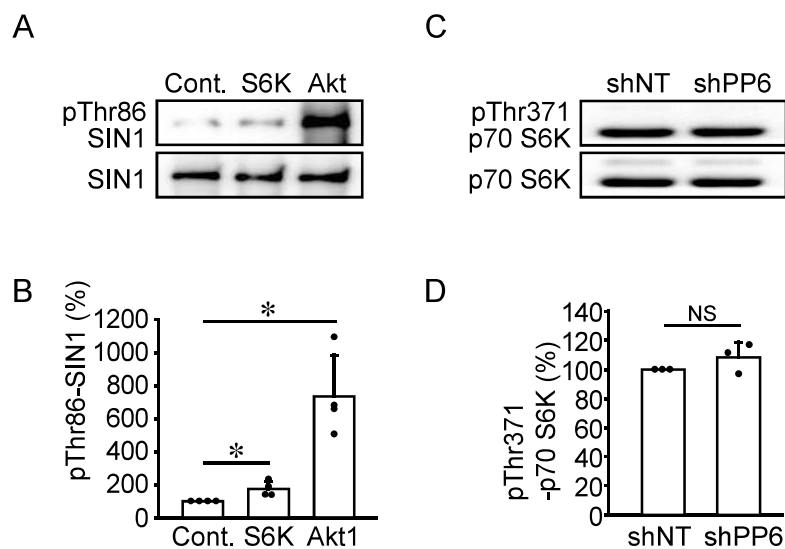


図 11 SIN1 Thr86 リン酸化を担うキナーゼの同定

(A, B) リコンビナント SIN1 を活性型 p70 S6K または Akt と 1 時間反応させ、SIN1 Thr86 リン酸化レベルを western blotting により解析した代表例 (A) と滅菌水処置 (Cont.) におけるリン酸化レベルを 100% として相対値で表した定量図 (B)。N=4。*: $P < 0.05$ 。

(C, D) N2a 細胞に shNT または shPP6 を安定発現させ、p70 S6K リン酸化レベルおよびタンパク質発現量を western blotting により解析した代表例 (C) と shNT を発現させた細胞のリン酸化レベルを 100% として相対値で表した定量図 (D)。N=3。NS: not significantly different。

2-3 考察

2-3-1 神経突起形成時の PP6 発現の上昇

近年、type 2A protein phosphatase ファミリーの神経細胞機能における重要性が注目されている。本研究では、神経分化刺激が N2a 細胞において、PP2A および PP4 タンパク質発現量に影響を与えることなく、PP6 タンパク質発現量のみを増加させることを明らかにした。結腸上皮細胞株では、細胞密度依存的に PP6 の mRNA 発現量が増加することでタンパク質発現量が増加することが報告されている (47)。一方、本研究では PP6 の mRNA レベルは神経分化刺激に影響されなかったことから、転写後の制御機構が関与していると考えられる。PP2A タンパク質がユビキチン/プロテアソーム系によって制御されているのに対して、PP6 タンパク質は選択的オートファジーにより分解される (42, 48)。神経分化刺激下では p62 と LC3-I の蓄積が誘導されたことから、オートファジー活性が低下していると推測される。したがって、神経分化刺激がオートファジーを抑制することによって PP6 タンパク質を増加させた可能性がある。PP6 は 3 つの調節サブユニット (SAPS) のうちの 1 つと複合体を形成し、特定の基質へとリクルートされる (49)。本研究では、神経分化刺激時に SAPS のタンパク質発現量が上昇傾向を示した。以前の報告では、SAPS のタンパク質発現は PP6 タンパク質発現とよく相関しており (40, 47)、PP6 の発現量が上昇することで SAPS が安定化した可能性が考えられる。この点を明らかにするためには、SAPS の mRNA 発現量の解析や、発現上昇が起こるタイミングの比較解析を行う必要がある。

2-3-2 神経細胞におけるオートファジー

オートファジーは、終末分化した神経細胞から凝集したタンパク質や損傷したオルガネラを除去するための重要なメカニズムである (50)。神経細胞は、軸索のように細胞体から極端に離れた細胞内コンパートメントを有しており、他の細胞と比較して高度に区画化されている。有糸分裂後の細胞であるため、生涯にわたってタンパク質やオルガネラを除去することによって、離れた区画にかかるストレスをしっかりと管理する必要がある。そのため、神経細胞は他の細胞種とは異なる方法で飢餓に対するオートファジー反応を制御しなければならず、神経系特有のオートファジー制御機構が必要とされる (51)。オートファジー関連タンパク質 Atg5 と Atg7 の神経細胞特異的ノックアウトマウスでは、加齢に伴う神経細胞の脱落が見られ (52, 53)、Atg5 を過剰発現させたマウスでは運動機能の改善が認められた (54)。これらの報告は、オートファジーの活性化が神経保護につながることを示唆する。本研究では、神経分化刺激によるオートファジー活性の低下が観察されたが、神経突起伸長におけるオートファジーの役割については議論の余地がある。オートファジーが神経突起伸長に正に働く、負に働く、あるいは関与しないことを示す報告がそれぞれ存在する (55-57)。最近の報告では、オートファゴソーム形成を制御する Rab26 の guanosine exchange factor (GEF) である Plekhg5 をノックアウトすると、シナプス小胞のオートファジーが損なわれ、軸索の伸長が抑制される (58)。また、オートファゴソーム形成時に膜融合を促進する VAMP7 を遺伝的に欠損させると、神経突起の伸長が抑制され (59)、Atg12 をコードする Mir-505p を過剰に投与すると、*in vivo* および *in vitro* で軸索が過剰に伸長する (60)。一方、ヒト神経芽腫細胞株 SH-SY5Y 細胞では、パーキンソン病に見られる leucine rich-repeat kinase 2

(LRRK2) の G2019S 変異体を発現させるとオートファジーが活性化するが軸索伸長は抑制され、Atg7 ノックアウトによりオートファジーを抑制すると軸索伸長が回復する (61)。N2a 細胞に関しては、Zeng らが、class III PI3K に対する阻害剤を用いてオートファジーを阻害すると RA による神経分化が阻害されるのに対して、mTORC1 阻害剤である rapamycin 処置によるオートファジーの促進も RA 誘導性神経分化を阻害することを報告している (62)。これらの結果は、N2a 細胞の神経分化にはオートファジーが適度に活性化していることが必要であることを示唆している。

2-3-3 PP6 による mTORC2 制御

N2a 細胞において PP6 の発現を抑制すると、SIN1 Thr86 リン酸化レベルの増加が認められた。p70 S6K または Akt による SIN1 Thr86 のリン酸化は、SIN1 を mTORC2 から解離させ、Akt に対する mTORC2 活性の低下につながる (25, 26)。mTORC2 活性化における SIN1 リン酸化の役割については議論があるが (63)、本研究の PP6 発現抑制が Akt Ser473 リン酸化レベルを低下させるという結果は、SIN1 リン酸化が mTORC2 活性を低下させるという考えを支持している。

In vitro キナーゼアッセイにより、p70 S6K と Akt の両方が SIN1 Thr86 をリン酸化することが明らかになった。Akt の方がより強力にリン酸化を誘導するが、PP6 発現抑制では Akt 活性が低下することから、SIN1 のリン酸化レベルの増加は Akt によるものではないと考えられる。p70 S6K は脳の成長に重要な役割を果たす mTORC1 の下流にある。Raptor ノックアウトマウス (mTORC1 活性不全) は脳のサイズが小さく、出生後数時間で死亡する (64)。神経細胞特異的 (CaMKII α -Cre) Raptor ノックアウトマウスでは、樹状突起の形成が阻害され

脳の重量が減少する (65)。mTORC1 の活性化は軸索成長の誘導に重要であり、その下流因子である p70 S6K の活性化は軸索再生を促進する (66)。PP6 は E3 リガーゼ ZNRF2 を脱リン酸化することで mTORC1 を正に制御するが (67)、N2a 細胞では、PP6 発現抑制は p70 S6K 活性に影響を与えなかった。したがって、PP6 発現抑制による SIN1 のリン酸化の増加は、その責任キナーゼの活性化によって媒介されるものではないと考えられる。すべての SAPS が mTORC2 と結合したことからも、PP6 が SIN1 を直接脱リン酸化していると予想される。

2-3-4 総括

本章では、type 2A protein phosphatase の 1 つである PP6 が SIN1 を脱リン酸化して mTORC2 を活性することで、Akt-CREB シグナルを介した神経分化を促進することを明らかにした。mTORC2 は細胞代謝において重要な役割を果たしており、mTORC2 活性の調節異常は代謝異常やがんなどの疾患にも関わる (68, 69)。PP6 による mTORC2 制御の分子機構が、これらの疾患にも関与しているか興味深い。

第3章 TGF- β シグナルにおけるPP6の役割

3-1 背景および目的

Transforming growth factor β (TGF- β) は発生初期から発現し、細胞遊走、分化、増殖などの細胞プロセスを制御する多面的なサイトカインである (70)。TGF- β は Ser/Thr キナーゼ受容体である I 型および II 型 TGF- β 受容体に結合し、Smad3 のリン酸化を誘導する (71)。Smad3 は Smad4 と複合体を形成して核に移行し、標的遺伝子の転写を制御する (70)。この古典的な TGF- β /Smad 経路に加えて、TGF- β は、非古典的経路と呼ばれる PI3K/Akt、MAPK、mTOR シグナル伝達を含む複数の細胞内経路を、古典的経路と協調または独立して活性化する (72)。

Type 2A protein phosphatase である PP2A、PP4、PP6 は進化的に高度に保存されており、PP6 は、PP2A および PP4 とアミノ酸配列で 58.1%と 62.6%の相同性を持つ (49)。PP6 は生体内でユビキタスに発現しており、マウス胚発生に必須であり (73)、細胞周期進行 (74–76)、DNA 損傷応答 (77–79)、炎症応答など (80, 81)、多様な細胞プロセスを制御する。TGF- β は PP2A を直接活性化し、p70S6K を脱リン酸化することで細胞周期の進行を阻害することが知られている (82)。また、低酸素条件下においてのみ PP2A は Smad3 を脱リン酸化することが報告されており (83)、TGF- β シグナル伝達の制御における PP2A の複雑な制御機能が示唆されているが、PP6 の TGF- β シグナルにおける役割は全く明らかにされていない。そこで本章では、PP6 の TGF- β シグナル制御機構を解明することを目的とした。

3-2 実験結果

3-2-1 TGF- β 刺激による PP6 タンパク質発現量の変化

マウス胎児線維芽細胞 MEF を TGF- β で 8 時間刺激し、PP6 および各種 SAPS のタンパク質発現量を western blotting により解析した。TGF- β 刺激により、PP6 タンパク質発現量は約 40% 上昇することが認められた (図 12A, B)。また、SAPS のうち PP6R1 の発現の有意な増加が認められた (図 12A, C)。

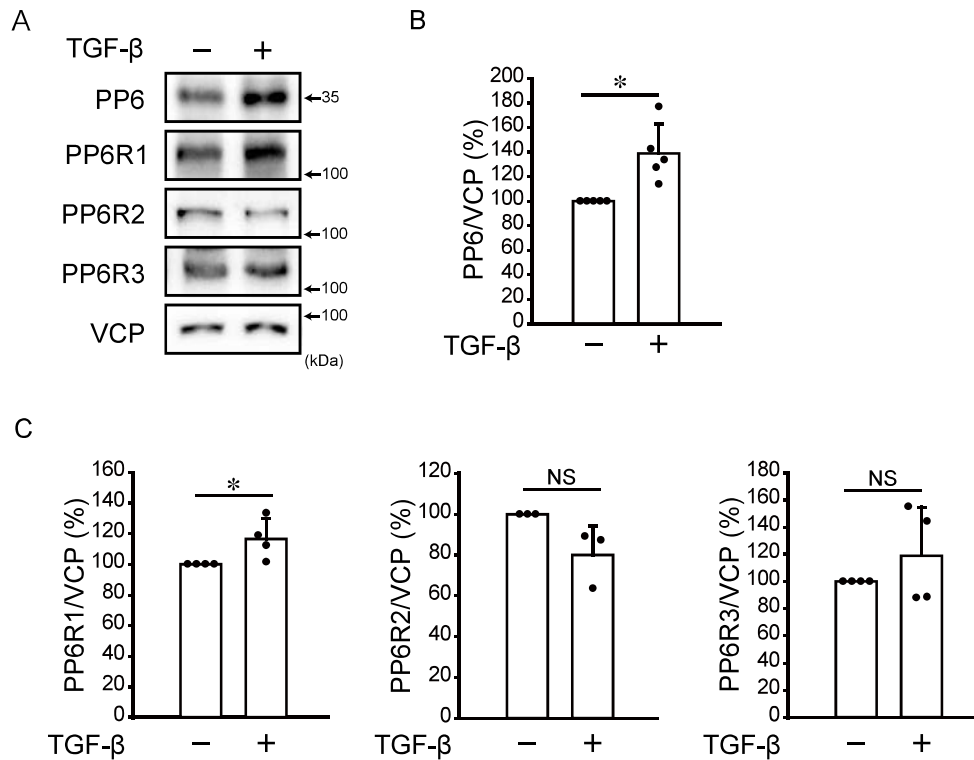


図 12 TGF-β 刺激による PP6 タンパク質発現量の変化

(A-C) マウス胎児線維芽細胞 MEF を TGF-β (10 ng/mL) で 8 時間処置し、PP6 および SAPS (PP6R1, PP6R2, PP6R3) のタンパク質発現量を western blotting により検討した代表例 (A) と各バンド濃度をローディングコントロールである VCP で補正し、TGF-β 無処置を 100% として相対値で表した PP6 (B) および SAPS (C) の定量図。N=3-4。*: $P < 0.05$ 。NS: not significantly different.

3-2-2 TGF- β による PP6 タンパク質増加の分子機構の検討

PP6 タンパク質の発現増加メカニズムを明らかにするため、TGF- β 刺激 8 時間後の PP6 mRNA 発現を解析した (図 13A)。PP6 mRNA 発現の増加は約 110% に留まったことから (図 13A)、転写以外の制御機構の関与が示唆された。PP6 タンパク質は p62 依存的に選択的オートファジーによって分解されることから (84)、TGF- β 刺激時の p62 タンパク質発現量を western blotting により解析した。TGF- β 刺激による p62 の蓄積が確認され (図 13B, C)、オートファジー活性の低下が PP6 タンパク質の増加に関与していることが示唆された。以上の結果から、TGF- β 刺激は、転写および翻訳後の制御機構を介して PP6 タンパク質を増加させることが示唆された。

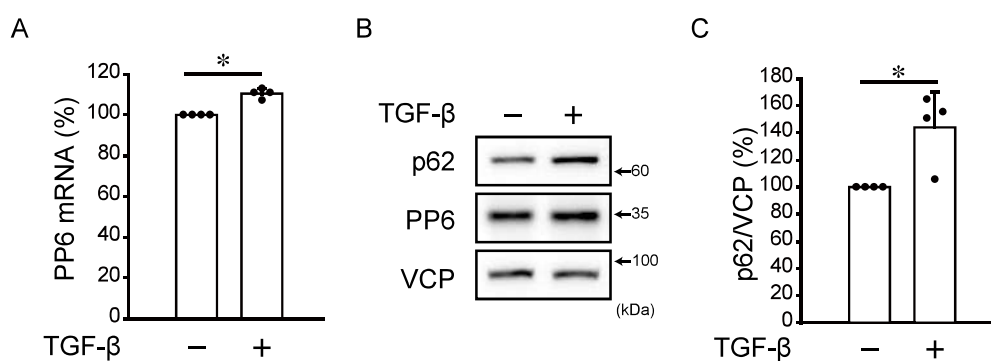


図 13 TGF-β による PP6 タンパク質増加の分子機構の検討

(A) MEF を TGF-β (10 ng/mL) で 8 時間処置し、PP6 mRNA 発現量を real-time PCR で解析した。TGF-β 無処置の PP6 mRNA 発現量を 100% として相対値で表した定量図。N=4。*: $P < 0.05$ 。

(B, C) MEF を TGF-β (10 ng/mL) で 8 時間処置し、p62 タンパク質および PP6 タンパク質発現量を western blotting により検討した代表例 (B) と各バンド濃度を VCP で補正し、TGF-β 無処置を 100% として相対値で表した定量図。N=4。*: $P < 0.05$ 。

3-2-3 PP6 欠損が TGF- β シグナルの古典的経路に与える影響

PP6 の TGF- β シグナル伝達における役割を明らかにするために、CreERT-PP6^{flox/flox} MEF を用いて実験を行った (42)。CreERT-PP6^{flox/flox} MEF を 4-hydroxytamoxifen (4HT) で処理すると、PP6 遺伝子の欠失が誘導される。この細胞を 4HT で 48 時間処置し、さらに TGF- β で 1 時間刺激し、Smad3 のリン酸化レベルを western blotting により解析した。無刺激下では、Smad3 のリン酸化はほとんど観察できなかったが、TGF- β 刺激による Smad3 リン酸化の増加が PP6 欠損によって抑制された (図 14A, B)。

Smad 複合体は標的遺伝子の転写調節領域に存在する smad binding element (SBE) に結合して標的遺伝子の発現を誘導する (70)。PP6 の欠損が Smad3 の転写活性に与える影響を、SBE ルシフェラーゼレポーターアッセイにより解析した (図 14C)。CreERT-PP6^{flox/flox} MEF を 4HT で 48 時間後、TGF- β で 8 時間刺激したところ、PP6 欠損は基底状態および TGF- β 刺激時の SBE ルシフェラーゼ活性を低下させた。したがって、PP6 欠損が TGF- β 古典的経路を抑制し、標的遺伝子の発現を抑制することが示された。

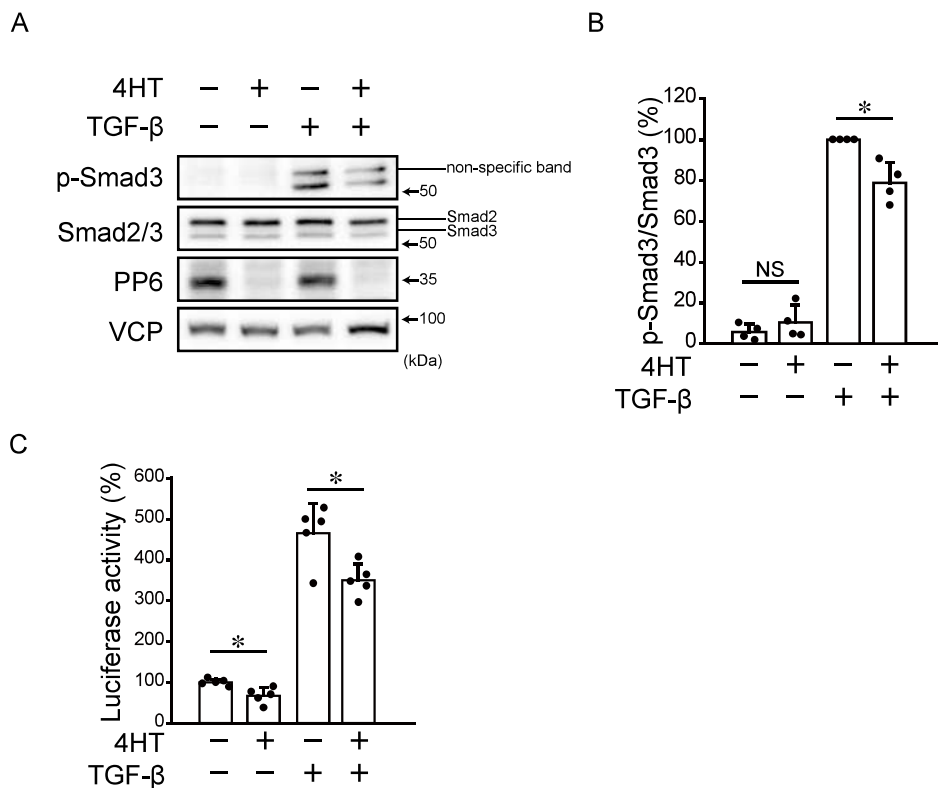


図 14 PP6 欠損が TGF-β シグナルの古典的経路に与える影響

(A, B) CreERT-PP6^{flox/flox} MEF を、4-hydroxytamoxifen (4HT : 500 nM) で処置または無処置で 48 時間培養した後に、TGF-β (10 ng/mL) で 1 時間刺激し、Smad3 リン酸化レベルと Smad2/3 タンパク質発現量を western blotting により解析した。代表例 (A) と Smad3 リン酸化レベルを Smad3 タンパク質発現量で補正し、4HT-/TGF-β+ を 100% として相対値で表した定量図 (B)。N=4。*: $P < 0.05$ 。NS: not significantly different。

(C) CreERT-PP6^{flox/flox} MEF を、4HT (500 nM) 処置または無処置で 48 時間培養した後に、TGF-β (10 ng/mL) で 8 時間刺激し、smad binding element (SBE) ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。4HT-/TGF-β- を 100% として相対値を示した。N=5。*: $P < 0.05$ 。

3-2-4 PP6 欠損が TGF- β シグナルの非古典的経路に与える影響

TGF- β シグナルには Smad 非依存的な非古典的経路が存在する (72)。CreERT-PP6^{flox/flox} MEF を 4HT で 48 時間処置した後に、TGF- β で 1 時間刺激し、PP6 が TGF- β 非古典的経路に与える影響を western blotting により解析した。MEF において TGF- β は、非古典的経路の下流因子のうち、p38 リン酸化レベルのみを増加させた (図 15A)。また、TGF- β 誘導性の p38 リン酸化レベルの上昇は、PP6 欠損により顕著に抑制された (図 15B)。以上の結果から、PP6 の欠損は、TGF- β シグナルの古典的経路だけでなく、非古典的経路の p38 MAPK 経路を抑制することが示された。

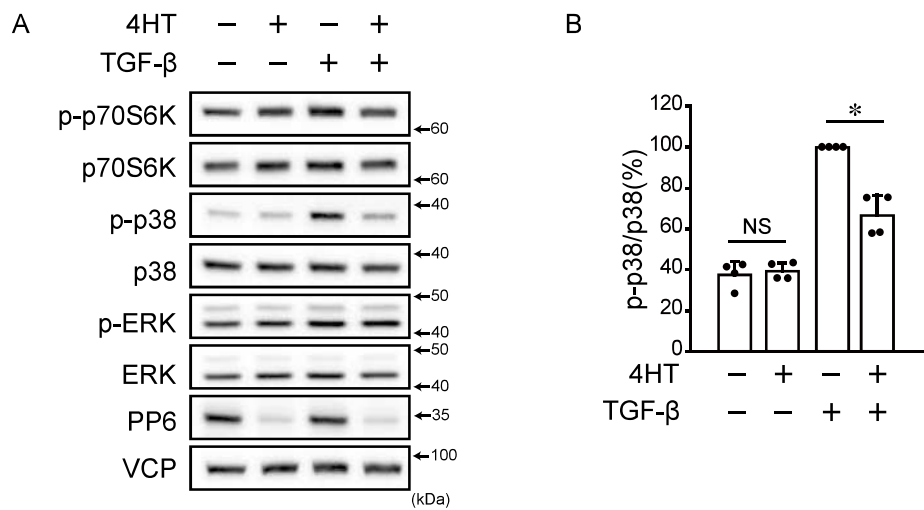


図 15 PP6 欠損が TGF- β シグナルの非古典的経路に与える影響

(A, B) CreERT-PP6^{flox/flox} MEF を、4HT (500 nM) 処置または無処置で 48 時間培養した後に、TGF- β (10 ng/mL) で 1 時間刺激し、非古典的経路の下流因子 (p70 S6K、p38、ERK) のリン酸化レベルとタンパク質発現量を western blotting により解析した。代表例 (A) と p38 のリン酸化レベルを p38 タンパク質発現量で補正し、4HT-/TGF- β +を 100%として相対値で表した定量図 (B)。N=4。*: $P < 0.05$ 。NS: not significantly different。

3-2-5 PP6 欠損が TGF- β 誘導性の細胞遊走に与える影響

TGF- β は MEF において細胞遊走を促進する (85, 86)。最後に、TGF- β によって誘導される細胞遊走に対する PP6 欠損の影響を検討した。CreERT-PP6^{flox/flox} MEF を 4HT で 48 時間処置した後に、TGF- β で 8 時間刺激し、細胞遊走能を wound healing assay により解析した。PP6 欠損は、基底状態の細胞遊走には影響を与えなかったが、TGF- β 誘導性の細胞遊走を阻害した (図 16)。これらの結果から、PP6 欠損が TGF- β シグナルを抑制することで細胞遊走を阻害することが示された。

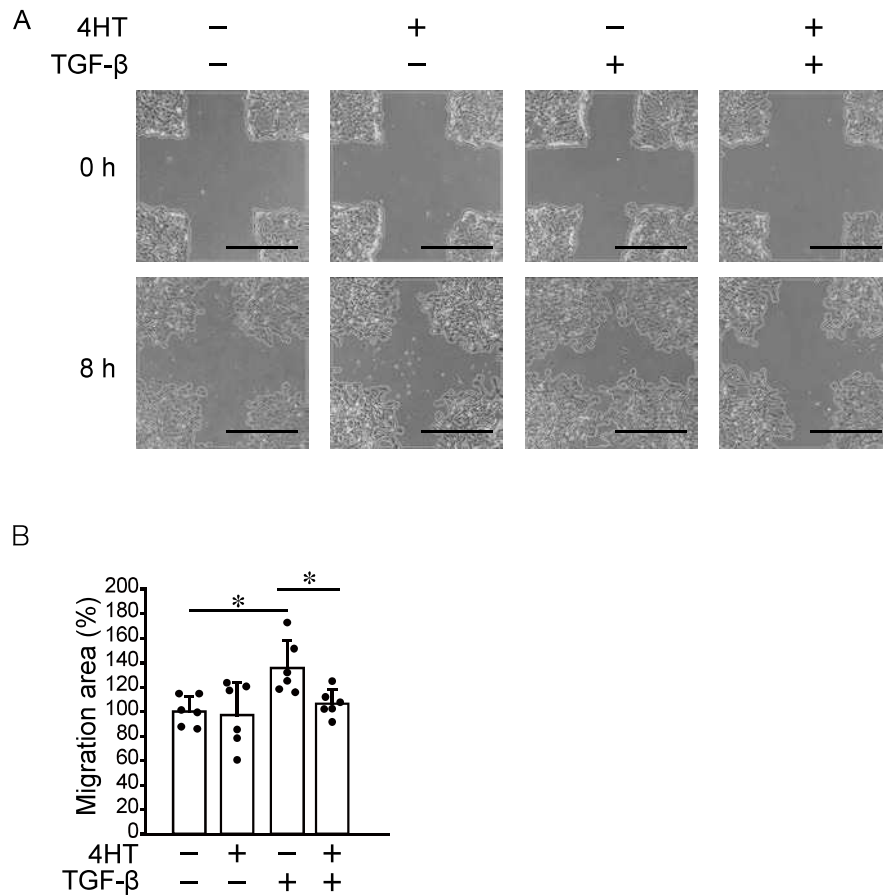


図 16 PP6 欠損が TGF- β 誘導性の細胞遊走に与える影響

(A, B) CreERT-PP6^{flox/flox} MEF を、4HT (500 nM) 処置または無処置で 48 時間培養した後に、TGF- β (10 ng/mL) で 8 時間刺激し、wound healing assay を用いた細胞遊走能を解析した。創傷直後 (0 h) および 8 時間後の代表的な写真 (A) と 4HT-/TGF- β - の平均値を 100% として相対値で表した定量図 (B)。N=6。スケールバー: 50 μ m。*: $P < 0.05$ 。

3-3 考察

3-3-1 TGF- β 刺激による PP6 タンパク質発現増加の分子機構

TGF- β 刺激は、PP6 タンパク質と PP6 mRNA の発現を増加させた。タンパク質発現の増加率と比較して mRNA 量の増加率は小さく、大部分が翻訳後制御に依存すると考えられる。以前当研究室では、PP6 タンパク質が p62 依存性の選択的オートファジーによって分解されることを報告したが (42)、本研究においても、TGF- β 刺激によって p62 が蓄積しており、オートファジーが阻害されている可能性が示された。TGF- β は、多くの組織においてオートファジーと線維化の両方を誘導することが古くから報告されている (87-89)。また、MEF においてこのオートファジーの誘導は TGF- β で長時間 (48 時間以上) 処置した後に観察されている (90)。本研究では、TGF- β の処置時間が 8 時間までに制限されているため、オートファジー誘導は観察されなかった可能性が考えられる。近年、転写因子 Hes1 の活性化が immunoglobulin binding protein 1 (IGBP1) の転写を促進し、IGBP1 が E3 ユビキチンリガーゼ CHIP と PP6 の結合を阻害することで、PP6 のユビキチン化を抑制することが報告された (91)。MEF において、Hes1 は TGF- β によって活性化されることから (92)、この機構が PP6 タンパク質発現を増加させている可能性も考えられる。

3-3-2 PP6 による TGF- β シグナルの制御機構

本研究では、PP6 欠損が Smad3 Ser423/425 リン酸化レベルを減少させる分子機構は明らかにできていない。TGF- β シグナル伝達は、Smad3 のリンカー領域に位置する Ser 残基のリン酸化が C 末端に位置する Ser423/425 リン酸化を阻害

することで抑制される (93)。また、II 型 TGF- β 受容体 (TGFB2) の Ser416 リン酸化は、受容体のキナーゼ活性を阻害する (94)。したがって、PP6 欠損はこれらのリン酸化レベルを増加させることで、TGF- β シグナル伝達を抑制している可能性が考えられる。p38 の上流キナーゼである TGF- β -activated kinase1 (TAK1) は PP6 の基質であり、PP6 は TAK1 を脱リン酸化することで interleukin-1 (IL-1) や tumor necrosis factor α (TNF- α) 刺激による p38 リン酸化を抑制する (94–96)。一方で、メサンギウム細胞における TGF- β 刺激後の TAK1 の脱リン酸化は、PP6 ではなく PP2A が制御することが報告されている (97)。本研究の結果、PP6 欠損は p38 リン酸化レベルを低下させたことから、MEF においても、PP6 は TGF- β 刺激下での TAK1 脱リン酸化には関与していない可能性がある。

3-3-3 総括

本章では、PP6 が TGF- β シグナル伝達を正に制御することを初めて示した。TGF- β は、正常組織や早期がんでは分化を誘導することから腫瘍抑制因子として働く。また、PP6 もドライバー遺伝子の変異が原因のがんにおいて、がん抑制因子として働く (98–101)。本研究の結果から、PP6 による TGF- β シグナルの増強が、がんの発生初期における PP6 の抗腫瘍作用の一因になっている可能性が示された。

第4章 NanoBiTシステムを用いた PDK1-Akt タンパク質相互作用メカニ ズムの解明

4-1 背景および目的

4-1-1 PI3K/Akt シグナル

PI3K/ Akt シグナルは、細胞外シグナルに応答して細胞の成長、増殖、生存を広く制御している (102)。がん、糖尿病、自己免疫疾患、神経疾患などさまざまな疾患でこの経路の異常が起こることから、その制御機構を理解することは極めて重要である (103)。Ser/Thr キナーゼである Akt は、PI3K/ Akt シグナルの中心的存在であり、Akt1、Akt2、Akt3 の3種類の相同性の高いアイソフォームを持つ。それぞれのアイソフォームは細胞内局在と組織特異的な発現レベルが異なり (104)、Akt1 はユビキタスに発現し、細胞質および細胞膜に存在するのに対し、Akt2 は筋肉組織のミトコンドリア内に多く存在し、Akt3 は核に局在し、神経細胞で高発現を示す (105–107)。現在受け入れられている古典的 Akt 活性化モデル (図 17) では、成長因子である epidermal growth factor (EGF) などの刺激が PI3K を活性化すると、phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PI(3,4,5)P₃) が細胞膜で合成される。PI(3,4,5)P₃ は、3-phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1) やその基質である Akt などの PH ドメインを持つタンパク質に結合する (108)。Akt の PH ドメインが PI(3,4,5)P₃ に結合すると立体構造が変化して活性化ループが露出し、PDK1 によって Akt の Thr308 がリン酸化される (109, 110)。さらに、mTORC2 が Akt の C 末端に存在する疎水性モチーフの Ser473 をリン酸化することで、Akt が完全に活性化し、mTORC1 など下流の基質がリン酸化される (111)。この経路の活性化は、phosphatase and tensine homolog (PTEN) や src homology 2-containing inositol phosphatase 2 (SHIP2) などの PI(3,4,5)P₃ 脂質ホスファターゼの働きで終息する (112)。また、PP1 と PP2A も Akt を直接脱リン酸化することで Akt シグナル伝達の終結に関与している (113, 114)。しかし、

PDK1/Aktの結合とそれに続くAktの活性化メカニズムは完全には解明されておらず、さらにAktのリン酸化がこの結合にどのような影響を及ぼすのかは不明である。

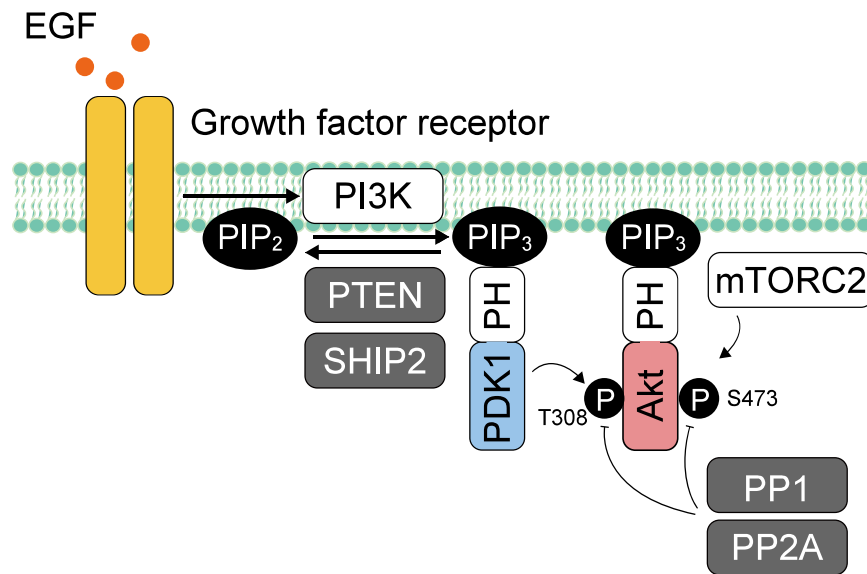


図 17 古典的な Akt 活性化モデル

Epidermal growth factor (EGF) などの外部からの刺激により PI3K が活性化されると、細胞膜で PI(3,4,5)P₃ (PIP₃) が合成される。PIP₃ は、PDK1 や Akt など PH ドメインを持つタンパク質と結合して細胞膜へリクルートする。PDK1 が Akt Thr308 をリン酸化し、さらに mTORC2 が Ser473 をリン酸化することで、Akt の完全な活性化が引き起こされる。これらの反応はホスファターゼ (phosphatase and tensine homolog: PTEN, src homology 2-containing inositol phosphatase 2: SHIP2, PP1, PP2A) によって PIP₃ や Akt が脱リン酸化されることで終息する。

4-1-2 研究目的

本研究では、生細胞内で生じる EGF 刺激時の PDK1/Akt 結合の時間変化を NanoBiT システムを用いて解析し、Akt のリン酸化状態との関係を明らかにすることで、PDK1-Akt タンパク質相互作用メカニズムを解明することを目的とした。

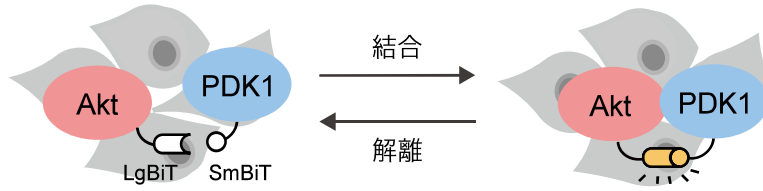
4-2 実験結果

4-2-1 LgBiT/SmBiT の最適な組み合わせの検討

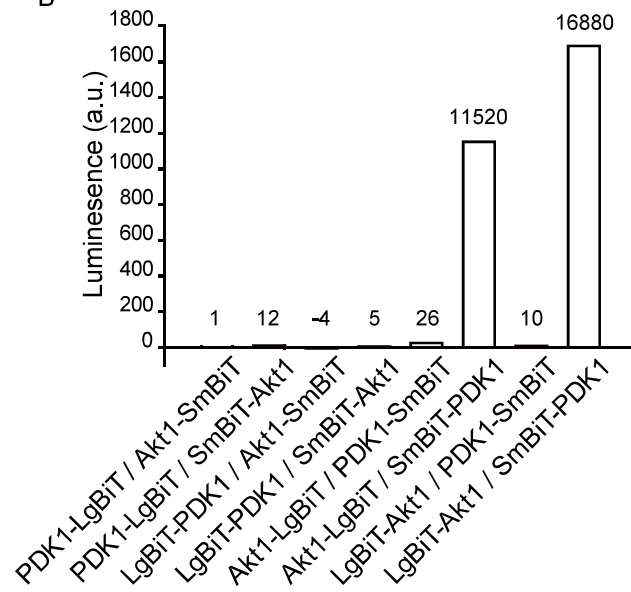
NanoLuc Binary Technology (NanoBiT) は、NanoLuc ルシフェラーゼを分割したタンパク質間相互作用解析システムであり、生細胞におけるタンパク質間相互作用の動態をリアルタイムに解析するために開発された (115)。このシステムでは、Large-BiT (LgBiT) サブユニットと Small-BiT (SmBiT) サブユニットの 2 つのタグを標的タンパク質に融合し、細胞内に発現させる。LgBiT と SmBiT の親和性は非常に低く、融合タンパク質が十分に密接に相互作用すると、機能的なルシフェラーゼが再構成され発光を生じる (図 18A)。LgBiT と SmBiT の相互作用は迅速で可逆的であるため、このシステムは標的タンパク質の結合・解離をリアルタイムに解析するのに有用である。

NanoBiT システムでは、LgBiT タグおよび SmBiT タグを、標的タンパク質の N 末端または C 末端に融合させるため、8 種類の組み合わせから立体的に適切な位置にある組み合わせを同定する必要がある。293T 細胞を用いて、各種プラスミドを一過性に発現させ、8 種類の組み合わせの発光強度を測定したところ、N 末端 LgBiT-Akt1 と N 末端 SmBiT-PDK1 の組み合わせで最も強い発光が観察された (図 18B)。興味深いことに、LgBiT は Akt1 の PH ドメイン側に、SmBiT は PDK1 の N 末端側、すなわち PH ドメインとは反対側に融合しており距離がある (図 18C)。SmBiT と PDK1 キナーゼドメイン間をつなぐ 21 残基のリンカー配列と 70 残基の非構造化領域の存在が、ルシフェラーゼの再構成を可能にしていると推定される (図 18D)。

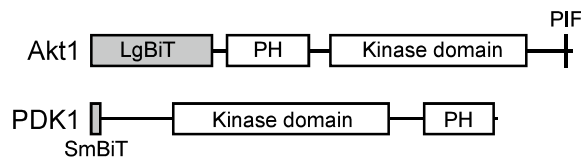
A



B



C



D

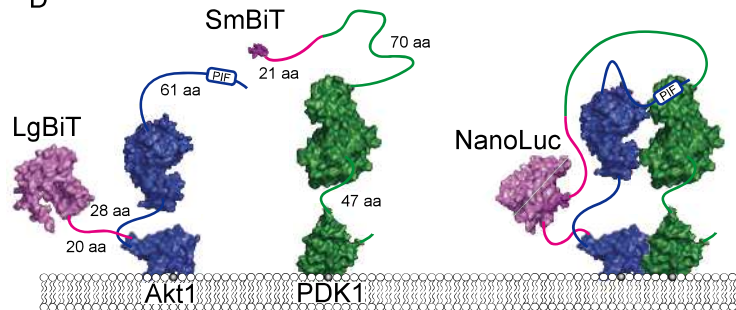


図 18 293T 細胞における LgBiT/SmBiT の最適な組み合わせの検討

(A) NanoLuc Binary Technology (NanoBiT) システムの原理。LgBiT 融合 Akt と SmBiT 融合 PDK1 が結合すると、ルシフェラーゼが再構成され発光する。

(B) 293T 細胞に LgBiT タグおよび SmBiT タグを N 末端または C 末端に付加した PDK1 および Akt1 を発現させ、24 時間後に発光強度を測定した。Duplicate で 1 回解析した平均値をグラフ化した。

(C) LgBiT-Akt1 および SmBiT-PDK1 の構造図。PH は PH ドメイン、PIF は疎水性 PDK1-interacting fragment モチーフを示す。

(D) LgBiT-Akt1 および SmBiT-PDK1 結合のモデル。Akt1 (PDB_ID: 4EKK および 1UNQ)、PDK1 (PDB_ID: 4RRV および 1W1D)、および NanoLuc (PDB_ID: 7SNS)。LgBiT と SmBiT の構造は AlphaFold2_Advanced (116)を用いて予測した。

4-2-2 MCF7 PDK1/Akt 細胞の EGF に対する反応性の検討

EGF 刺激による PDK1/Akt の結合変化をリアルタイムに測定するために、LgBiT-Akt1 および SmBiT-PDK1 を安定的に発現させたヒト乳がん細胞株 MCF7 (MCF7 PDK1/Akt 細胞) を樹立した。MCF7 細胞を EGF で処置したところ、Akt Thr308 リン酸化レベルの上昇が観察され、3–6 分の間をピークに、速やかに減少した (図 19A, B)。また、安定発現した LgBiT-Akt1 は、内因性 Akt と同じ動態でリン酸化することを確認した (図 19C)。そこで、MCF7 PDK1/Akt 細胞を EGF で刺激し、NanoBiT システムを用いて PDK1/Akt 結合の変化を 30 分間測定した。結合は EGF 刺激後速やかに増加し、約 3 分でピークに達した後、約 15 分で基底レベルまで徐々に減少した (図 20D)。PDK1 による Akt Thr308 リン酸化は、PDK1 と Akt の相互作用の後に起こること、western blotting ではタンパク質の抽出が完了するまでに若干のタイムラグがあることを考慮すると、NanoBiT システムによって観察された PDK1/Akt 結合がより早いピークを示したことは理にかなっている。これらの結果から、EGF 刺激後の PDK1/Akt 結合をリアルタイムに解析するための細胞株が樹立されたと考えられる。

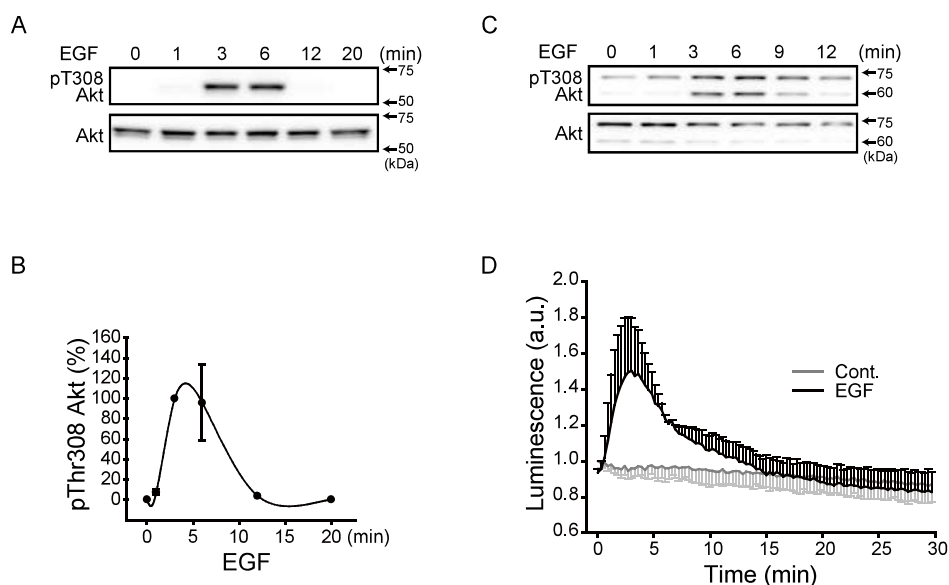


図 19 MCF7 PDK1/Akt 細胞の EGF に対する反応性の検討

(A, B) ヒト乳がん細胞株 MCF7 を無血清培地に交換して 4 時間後、EGF (50 ng/ml) で 1–20 分間刺激し、Akt の Thr308 リン酸化レベルとタンパク質発現量を western blotting により解析した。代表例 (A) と Akt のリン酸化レベルのピーク値を 100% として相対値で表した定量図 (B)。N=3。

(C) LgBiT-Akt1 および SmBiT-PDK1 を安定的に発現させた MCF7 細胞 (MCF7 PDK1/Akt 細胞) を無血清培地に交換して 4 時間後、EGF (50 ng/ml) で 1–12 分間刺激し、Akt の Thr308 リン酸化レベルとタンパク質発現量を western blotting により解析した。上部バンドが LgBiT-Akt、下部バンドが内因性 Akt を示す。N=3。

(D) MCF7 PDK1/Akt 細胞を EGF (50 ng/ml) で刺激し、EGF 刺激後の PDK1/Akt 結合を、NanoBiT システムを用いて 30 分間測定した。滅菌水処置 (Cont.) 直前の発光強度を 1.0 として相対値で表した。N=3。

4-2-3 EGFによる PDK1/Akt 結合に PIF 阻害が与える影響

PDK1 と Akt は、PDK1 のキナーゼドメインに存在する PIF ポケットと Akt1 の C 末端側に存在する PIF モチーフ間の相互作用によって安定化されたヘテロ二量体を形成する (117, 118)。PS48 は PDK1 の PIF ポケットに入る低分子化合物であり、飽和レベルで処置すると PDK1 と Akt の結合が阻害されることから (118)、PS48 を処置し作製した細胞の妥当性を検討した。MCF7 細胞を PS48 で前処置し、その後 EGF で刺激し、Akt Thr308 リン酸化レベルを western blotting により解析した。また、MCF7 PDK1/Akt 細胞において同様の処置を行い、PDK1/Akt 結合を、NanoBiT システムを用いて解析した。PS48 処置により Akt のリン酸化レベルに大きな変化は認められなかったが (図 20A, B)、NanoBiT システムにおいて、PS48 を高用量で処置すると、PDK1/Akt 結合の減少が認められた (図 20C-F)。本研究で用いた NanoBiT タグの組み合わせが、PDK1 の PIF ポケットと Akt の PIF モチーフの結合に影響を与えないことが示唆された。

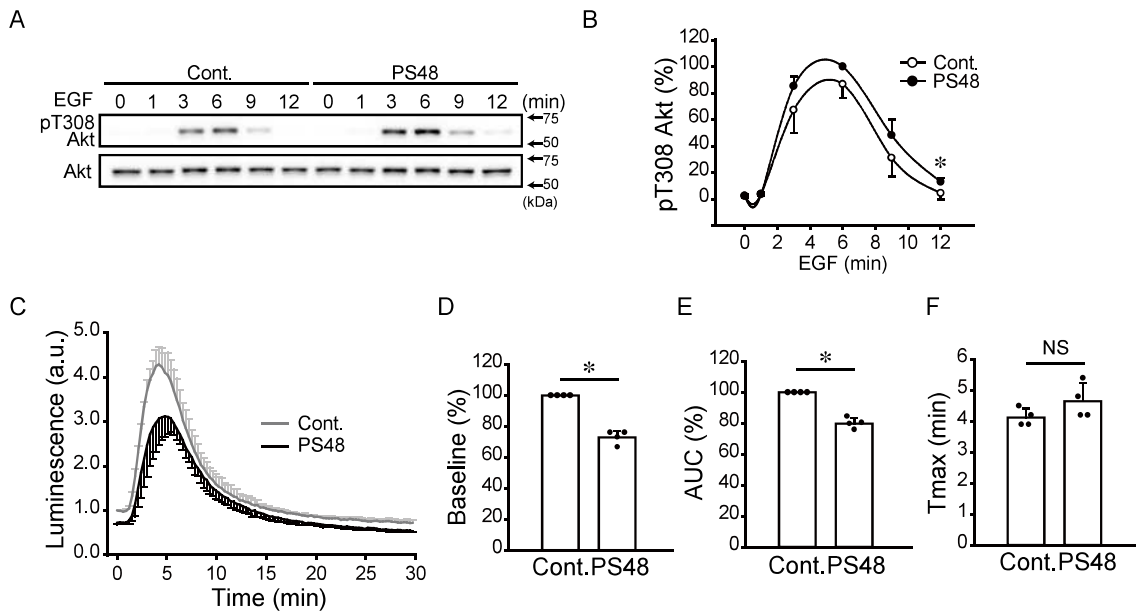


図 20 EGF による PDK1/Akt 結合に PIF 阻害が与える影響

(A, B) MCF7 細胞を無血清培地に交換し、PS48 (100 μ M) で 4 時間処置後、EGF (50 ng/ml) で 1–12 分間刺激し、Akt Thr308 リン酸化レベルとタンパク質発現量を western blotting により解析した。代表例 (A) と PS48 処置時の Akt のリン酸化レベルのピーク値を 100% として相対値で表した定量図 (B)。N=3。*: $P < 0.05$ (同時間の Cont. との比較)。

(C–F) MCF7 PDK1/Akt 細胞を無血清培地に交換し、PS48 (100 μ M) で 4 時間処置後、EGF (50 ng/ml) で刺激し、PDK1/Akt 結合を、NanoBiT システムを用いて 30 分間測定した (C)。発光強度は DMSO 処置 (Cont.) 0 秒時の発光強度を 1.0 として相対値で表した。EGF 刺激前の発光強度 (D)、EGF 刺激後の PDK1/Akt の結合量 (Area Under the Curve: AUC) (E)、EGF 刺激から発光強度の最高値に到達するまでの時間 (Tmax) (F) の定量図をそれぞれ示した。N=4。*: $P < 0.05$ 。NS: not significantly different。

4-2-4 EGF による PDK1/Akt 結合に Akt の細胞膜移行が与える影響

EGF 刺激で PI3K が活性化すると、細胞膜において PI(3,4,5)P₃ が合成される (図 17)。PI(3,4,5)P₃ の存在は PDK1 と Akt の細胞膜への局在に必須であることが報告されている (119)。そこで、PI(3,4,5)P₃ の合成抑制が、PDK1/Akt 結合に与える影響を検討した。MCF7 細胞を PI3K 阻害剤である LY294002 (LY) で前処置し、その後 EGF で刺激し、Akt Thr308 リン酸化レベルを western blotting により解析した。また、MCF7 PDK1/Akt 細胞において同様の処置を行い、PDK1/Akt 結合を、NanoBiT システムを用いて解析した。LY 処置により Akt のリン酸化は顕著に抑制され (図 21A, B)、PDK1/Akt 結合は静止細胞および EGF 刺激細胞の両方で減少した (図 21C-E)。リン酸化と同様に、LY 処置下での PDK1/Akt 結合は EGF によってわずかに上昇し、ピークまでの時間に差は認められなかった (図 21F)。

Akt は、PH ドメインを介して細胞膜上の PI(3,4,5)P₃ に結合する。PH ドメインの細胞膜結合が PDK1/Akt 結合に与える影響を検討した。PH ドメイン依存性のアロステリック Akt 阻害剤である AKT inhibitor VIII (AKTi) で処置した後に EGF で刺激し、Akt リン酸化レベルを western blotting、PDK1/Akt 結合を NanoBiT システムにより解析した。AKTi は、EGF 誘導性の Akt リン酸化と PDK1/Akt 結合をほぼ完全に阻害した (図 21G-K)。

以上の結果から、PH ドメインと PI(3,4,5)P₃ の結合を介した Akt の細胞膜移行が、EGF による PDK1/Akt 結合に必須である可能性が示された。

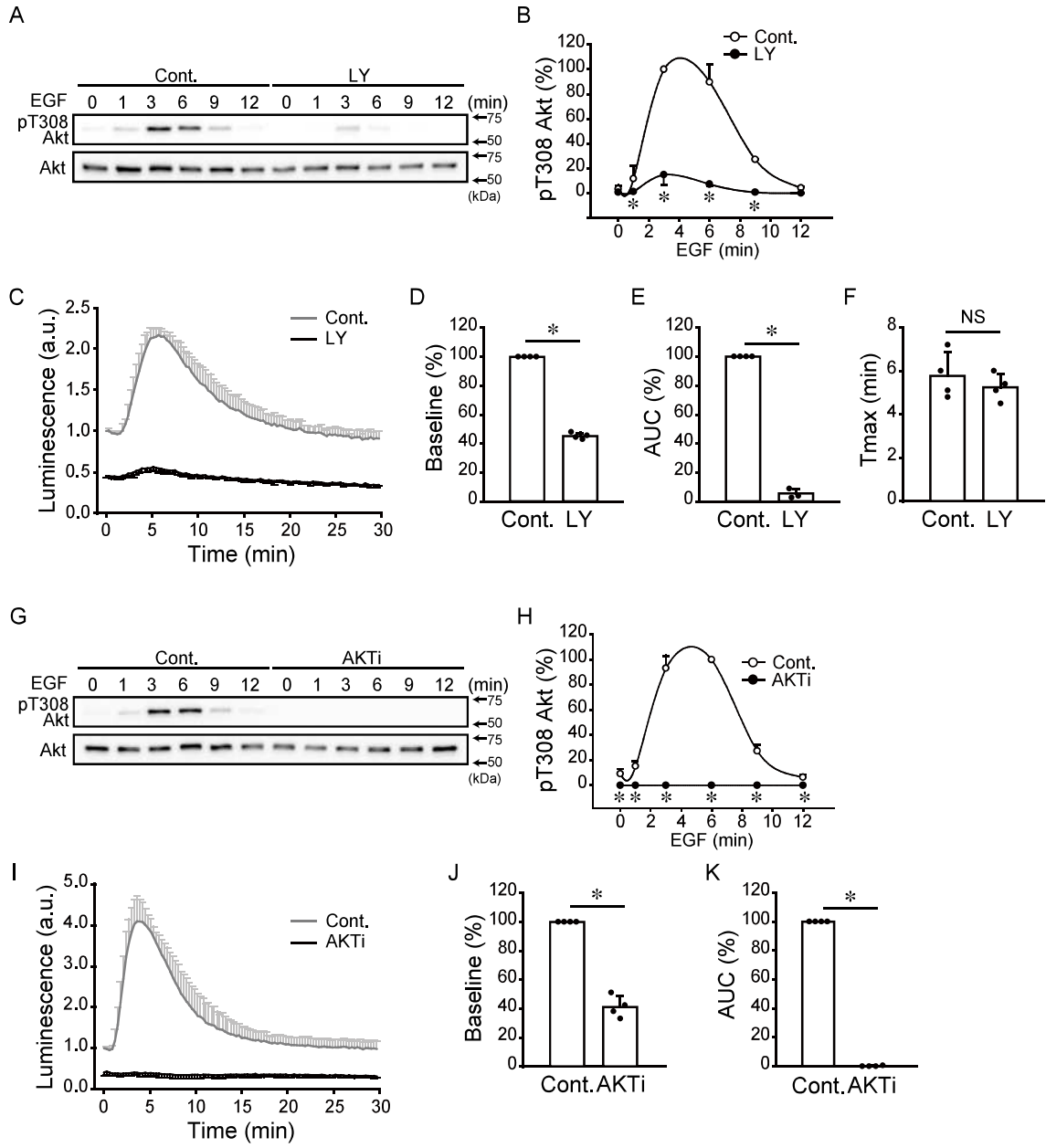


図 21 EGF による PDK1/Akt 結合に Akt の細胞膜移行が与える影響

(A, B, G, H) MCF7 細胞を無血清培地に交換し、LY294002 (LY: 10 μ M) で 2 時間 (A および B) または AKT inhibitor VIII (AKTi: 1 μ M) で 4 時間 (G および H) 処置後、EGF (50 ng/ml) で 1–12 分間刺激し、Akt の Thr308 リン酸化レベルとタンパク質発現量を western blotting により解析した。代表例 (A および G) と DMSO 処置 (Cont.) 時の Akt のリン酸化レベルのピーク値を 100% として相対値で表した定量図 (B および H)。N=3。*: $P < 0.05$ (同時間の Cont. との比較)。

(C–F, I–K) MCF7 PDK1/Akt 細胞を無血清培地に交換し、LY (10 μ M) で 2 時間 (A および B) または AKTi (1 μ M) で 4 時間 (G および H) 処置後、EGF (50 ng/ml) で刺激し、PDK1/Akt 結合を、NanoBiT システムを用いて 30 分間測定した (C および I)。発光強度は DMSO 処置 (Cont.) 0 秒時の発光強度を 1.0 として相対値で表した。EGF 刺激前の発光強度 (D および J)、EGF 刺激後の PDK1/Akt の結合量 (AUC) (E および K)、EGF 刺激から発光強度の最高値に到達するまでの時間 (Tmax) (F) の定量図をそれぞれ示した。N=4。*: $P < 0.05$ 。

NS: not significantly different.

4-2-5 EGF による PDK1/Akt 結合に PTEN 阻害が与える影響

PTEN は PI(3,4,5)P₃ の 3'位を脱リン酸化して PI(4,5)P₂ を形成する (図 22A)。PTEN を阻害すると、PI(3,4,5)P₃ の蓄積を通じて PDK1/Akt 結合が促進され、Akt のリン酸化が上昇することが予想された。MCF7 細胞を PTEN 阻害剤 bpV(HOpic) (bpV) で処置した後に EGF で刺激し、Akt Thr308 リン酸化レベルを western blotting により解析した。bpV 処置により静止状態の Akt リン酸化レベルは有意に上昇したが、EGF 誘導性の Akt リン酸化は阻害された (図 22A, B)。MCF7 PDK1/Akt 細胞において同様の処置を行い、PDK1/Akt 結合を NanoBiT システムにより解析したところ、bpV による PTEN 阻害は静止状態においても EGF 刺激下においても PDK1/Akt 結合に影響を与えなかった (図 22C-F)。

bpV による PTEN 阻害が PDK1/Akt 結合に影響を与えないという現象が EGF 刺激に特異的である可能性を検討するため、EGF と比較して PI3K/Akt シグナル伝達に対する選択性の高い insulin で細胞を刺激し PDK1/Akt 結合を解析した。Insulin は PDK1/Akt 結合を二峰性に増加させ、EGF 刺激と反応様式が異なることが明らかになった (図 22G, H)。bpV 処置により、insulin 誘導性の PDK1/Akt 結合は増加する傾向ではあったが、有意な差は認められなかった (図 22H)。これらの結果は、PTEN 阻害による PI(3,4,5)P₃ の蓄積が EGF や insulin によって誘導される PDK/Akt 結合において重要な役割を果たしていないことを示唆している。

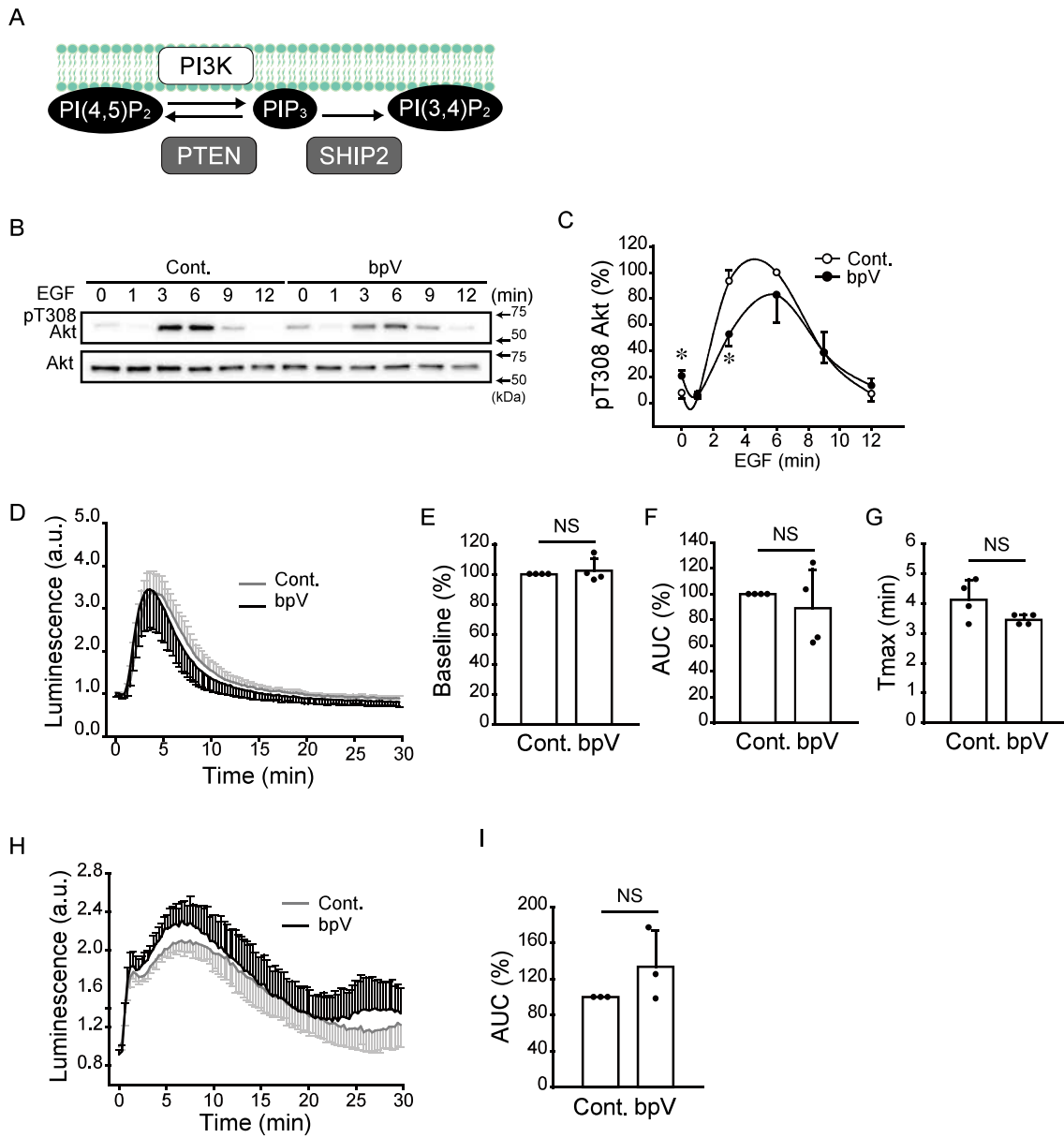


図 22 EGF による PDK1/Akt 結合に PTEN 阻害が与える影響

(A) PI(3,4,5)P₃ (PIP₃) は PTEN によって 3'位を脱リン酸化され PI(4,5)P₂ に、SHIP2 によって 5'位を脱リン酸化され PI(3,4)P₂ に変換される。

(B, C) MCF7 細胞を無血清培地に交換し bpV(HOpic) (bpV: 1 μM) で 4 時間処置後、EGF (50 ng/ml) で 1–12 分間刺激し、Akt Thr308 リン酸化レベルとタンパク質発現量を western blotting により解析した。代表例 (B) と DMSO 処置 (Cont.) 時の Akt のリン酸化レベルのピーク値を 100%として相対値で表した定量図 (C)。N=3。*: $P < 0.05$ (同時間の Cont.との比較)。

(D–I) MCF7 PDK1/Akt 細胞を無血清培地に交換し bpV (1 μM) で 4 時間処置後、EGF (50 ng/ml) (D–G) または insulin (200 nM) (H および I) で刺激し、PDK1/Akt 結合を、NanoBiT システムを用いて 30 分間測定した (D および H)。発光強度は DMSO 処置 (Cont.) 0 秒時の発光強度を 1.0 として相対値で表した。EGF 刺激前の発光強度 (E)、EGF (F) または insulin (I) 刺激後の PDK1/Akt の結合量 (AUC)、EGF 刺激から発光強度の最高値に到達するまでの時間 (Tmax) (G) の定量図をそれぞれ示した。N=4 (D–G)、N=3 (H および I)。*: $P < 0.05$ 。

NS: not significantly different.

4-2-6 EGF による PDK1/Akt 結合に SHIP2 阻害が与える影響

SHIP2 は PI(3,4,5)P₃ の 5'位を脱リン酸化し、PI(3,4)P₂ を合成する (図 22A)。MCF7 細胞の EGF 刺激時には、PTEN よりも SHIP2 の PI(3,4,5)P₃ の脱リン酸化への貢献が高い可能性が考えられることから、MCF7 細胞を SHIP2 阻害剤 AS1938909 (AS) で前処置し、その後 EGF で刺激し、Akt Thr308 リン酸化レベルを western blotting により解析した。AS 処置は、静止細胞と EGF 刺激細胞の両方で Akt リン酸化レベルを増加させた (図 23B, C)。MCF7 PDK1/Akt 細胞において同様の処置を行い、PDK1/Akt 結合を NanoBiT システムにより解析したところ、予想に反して PDK1/Akt 結合は有意に減少した (図 23D–G)。以上の結果から、SHIP2 阻害による PI(3,4,5)P₃ の蓄積は Akt のリン酸化レベルを増加させる一方で、PDK/Akt 結合能を低下させる可能性が示された。

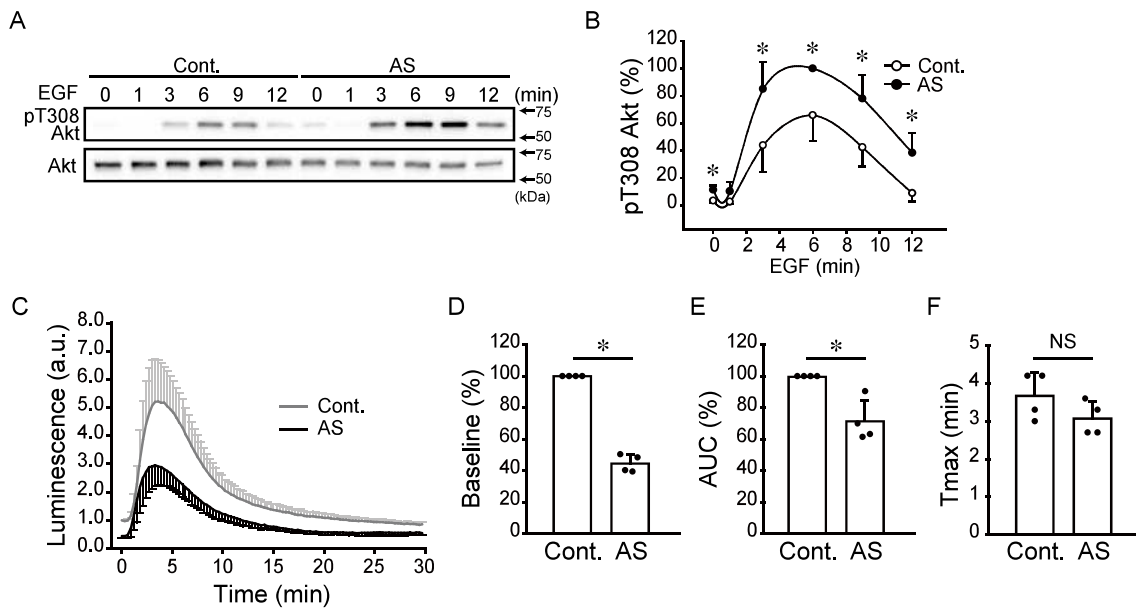


図 23 EGF による PDK1/Akt 結合に SHIP2 阻害が与える影響

(A, B) MCF7 細胞を無血清培地に交換し、AS1938909 (AS: 10 μ M) で 4 時間処置後、EGF (50 ng/ml) で 1–12 分間刺激し、Akt Thr308 リン酸化レベルとタンパク質発現量を western blotting により解析した。代表例 (A) と AS 処置時の Akt のリン酸化レベルのピーク値を 100% として相対値で表した定量図 (B)。N=3。*: $P < 0.05$ (同時間の Cont. との比較)。

(C–F) MCF7 PDK1/Akt 細胞を無血清培地に交換し、AS (10 μ M) で 4 時間処置後、EGF (50 ng/ml) で刺激し、PDK1/Akt 結合を、NanoBiT システムを用いて 30 分間測定した (C)。発光強度は DMSO 処置 (Cont.) 0 秒時の発光強度を 1.0 として相対値で表した。EGF 刺激前の発光強度 (D)、EGF 刺激後の PDK1/Akt の結合量 (AUC) (E)、EGF 刺激から発光強度の最高値に到達するまでの時間 (Tmax) (F) の定量図をそれぞれ示した。N=4。*: $P < 0.05$ 。NS: not significantly different.

4-2-7 EGF による PDK1/Akt 結合に Akt のリン酸化状態が与える影響

PI(3,4,5)P₃ ホスファターゼ阻害剤に対する反応性の検討から、Akt リン酸化の変化と PDK1/Akt 結合は必ずしも相関しないことが示唆された。ATP 競合型 Akt 阻害剤である afuresertib (AFU) は、Akt の脱リン酸化を防ぐことで Akt リン酸化レベルを上昇させる (120, 121)。Akt の過剰なリン酸化状態が EGF による PDK1/Akt 結合に与える影響を検討するために、MCF7 細胞を AFU で前処置した後に EGF で刺激し、Akt Thr308 リン酸化レベルを western blotting により解析した。以前の報告と一致して、AFU によって Akt リン酸化レベルの顕著な増加が観察された (図 24A, B)。AFU によって誘導された Akt のリン酸化レベルは、EGF 刺激時のピークよりも高く、EGF 刺激によってリン酸化レベルがさらに上昇することはなかった。MCF7 PDK1/Akt 細胞において同様の処置を行い、PDK1/Akt 結合を NanoBiT システムにより解析した。AFU 処置により、静止状態の PDK1/Akt 結合は著しく低下したが、EGF 誘導性の PDK1/Akt 結合には大きな影響を及ぼさなかった (図 24C-F)。この結果は、EGF による PDK1 と Akt の膜局在とそれに続く結合において、Akt のリン酸化状態は重要な役割を果たしていないことを示唆している。

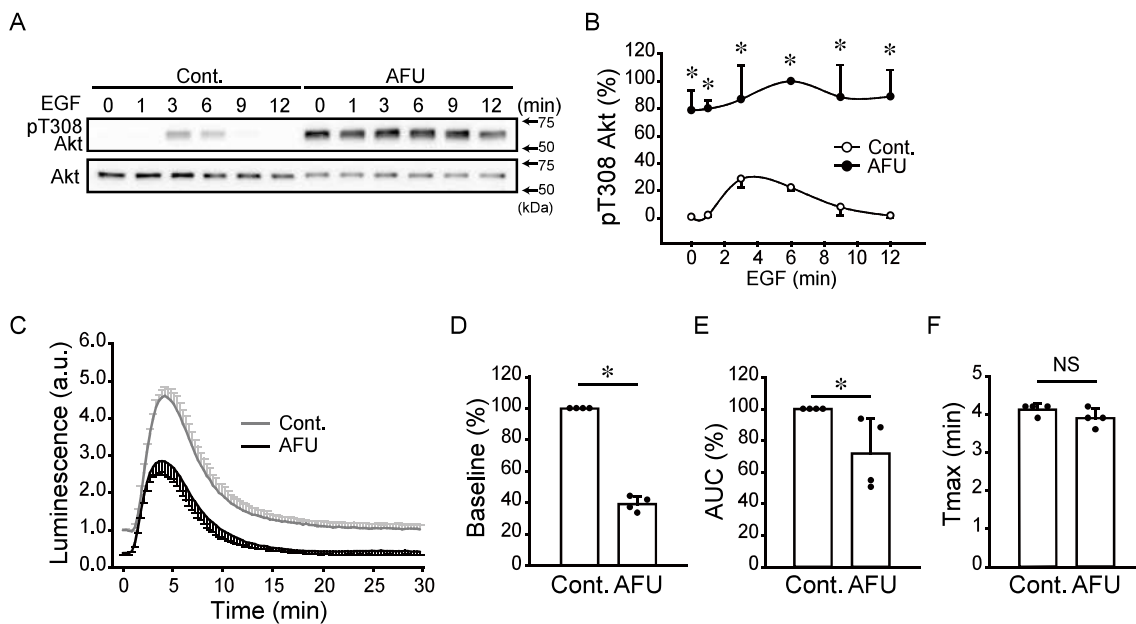


図 24 EGF による PDK1/Akt 結合に Akt のリン酸化状態が与える影響

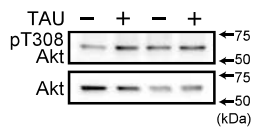
(A, B) MCF7 細胞を無血清培地に交換し、afuresertib (AFU: 1 μ M) で 4 時間処置後、EGF (50 ng/ml) で 1–12 分間刺激し、Akt Thr308 リン酸化レベルとタンパク質発現量を western blotting により解析した。代表例 (A) と AFU 処置時の Akt のリン酸化レベルのピーク値を 100% として相対値で表した定量図 (B)。N=3。*: $P < 0.05$ (同時間の Cont. との比較)。

(C–F) MCF7 PDK1/Akt 細胞を無血清培地に交換し、AFU (1 μ M) で 4 時間処置後、EGF (50 ng/ml) で刺激し、PDK1/Akt 結合を、NanoBiT システムを用いて 30 分間測定した (C)。発光強度は DMSO 処置 (Cont.) 0 秒時の発光強度を 1.0 として相対値で表した。EGF 刺激前の発光強度 (D)、EGF 刺激後の PDK1/Akt の結合量 (AUC) (E)、EGF 刺激から発光強度の最高値に到達するまでの時間 (Tmax) (F) の定量図をそれぞれ示した。N=4。*: $P < 0.05$ 。NS: not significantly different。

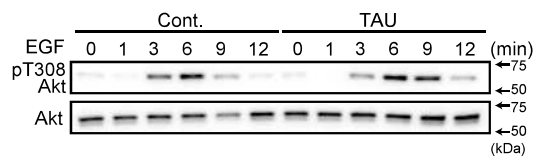
4-2-8 EGF による PDK1/Akt 結合に PP1 阻害が与える影響

Akt のリン酸化状態は EGF による PDK1/Akt 結合促進に影響を与えなかったことから、次に Akt の脱リン酸化を担うホスファターゼに対する阻害剤の効果を検討した。PP1 は Thr308 と Ser473 で Akt を脱リン酸化する (113, 122)。MCF7 細胞を PP1 阻害剤 tautomycin (TAU) で処置し、その後 EGF で刺激し、Akt Thr308 リン酸化レベルを western blotting により解析した。静止状態の MCF7 細胞において、TAU は Akt のリン酸化レベルを増加させたが、EGF 刺激時の増加に比べると無視できる程度であった (図 25A, B)。TAU 処置により EGF 誘導性の Akt リン酸化が持続したことから、PP1 が EGF 刺激後の Akt リン酸化の終息に関与していることが示唆された (図 25B, C)。MCF7 PDK1/Akt 細胞において同様の処置を行い、PDK1/Akt 結合を NanoBiT システムにより解析したところ、興味深いことに、EGF によって誘導された PDK1/Akt 結合は、TAU 処置によって早期に終結した (図 25D–G)。したがって、PP1 阻害によるリン酸化 Akt の増加は、PDK1/Akt 結合を上昇させないことが示された。

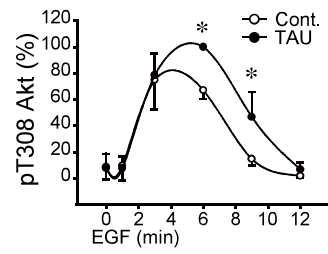
A



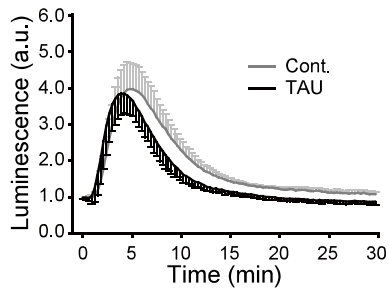
B



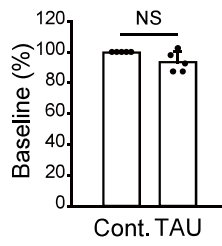
C



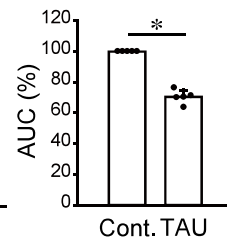
D



E



F



G

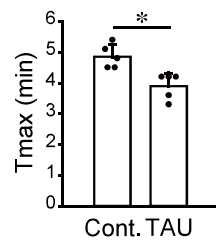


図 25 EGF による PDK1/Akt 結合に PP1 阻害が与える影響

(A–C) MCF7 細胞を無血清培地に交換し、tautomycin (TAU: 1 μ M) で 4 時間処置後、EGF (50 ng/ml) で 1–12 分間刺激し、Akt Thr308 リン酸化レベルとタンパク質発現量を western blotting により解析した。TAU 処置のみの代表例 (A)、EGF 処置時の代表例 (B) と TAU 処置時の Akt のリン酸化レベルのピーク値を 100%として相対値で表した定量図 (C)。N=3。*: $P<0.05$ (同時間の Cont.との比較)。

(D–G) MCF7 PDK1/Akt 細胞を無血清培地に交換し、TAU (1 μ M) で 4 時間処置後、EGF (50 ng/ml) で刺激し、PDK1/Akt 結合を、NanoBiT システムを用いて 30 分間測定した (D)。発光強度は DMSO 処置 (Cont.) 0 秒時の発光強度を 1.0 として相対値で表した。EGF 刺激前の発光強度 (E)、EGF 刺激後の PDK1/Akt の結合量 (AUC) (F)、EGF 刺激から発光強度の最高値に到達するまでの時間 (Tmax) (G) の定量図をそれぞれ示した。N=4。NS: not significantly different。

4-2-9 EGF による PDK1/Akt 結合に PP2A 阻害が与える影響

PP2A は、Akt Thr308 と Ser473 の両方を脱リン酸化する (123, 124)。MCF7 細胞を PP2A 阻害剤 okadaic acid (OA) で処置した後に EGF で刺激し、Akt Thr308 リン酸化レベルを western blotting により解析した。静止状態の MCF7 細胞では、OA は TAU よりも強く Akt のリン酸化を誘導したが、その程度は EGF 刺激による増加よりも低かった (図 26A–C)。MCF7 PDK1/Akt 細胞において同様の処置を行い、PDK1/Akt 結合を NanoBiT システムにより解析した。OA 処置は静止状態での PDK1/Akt 結合を顕著に増強した (図 26D–F)。EGF 刺激下では、OA が Akt のリン酸化を遅らせ、その持続時間をわずかに延長させる一方で (図 26B, C)、PP1 同様に PDK1/Akt の結合をより早く終結させた (図 26G)。以上の結果から、ホスファターゼ阻害による Akt リン酸化レベルの上昇と PDK1/Akt 結合は相関しない可能性が示された。

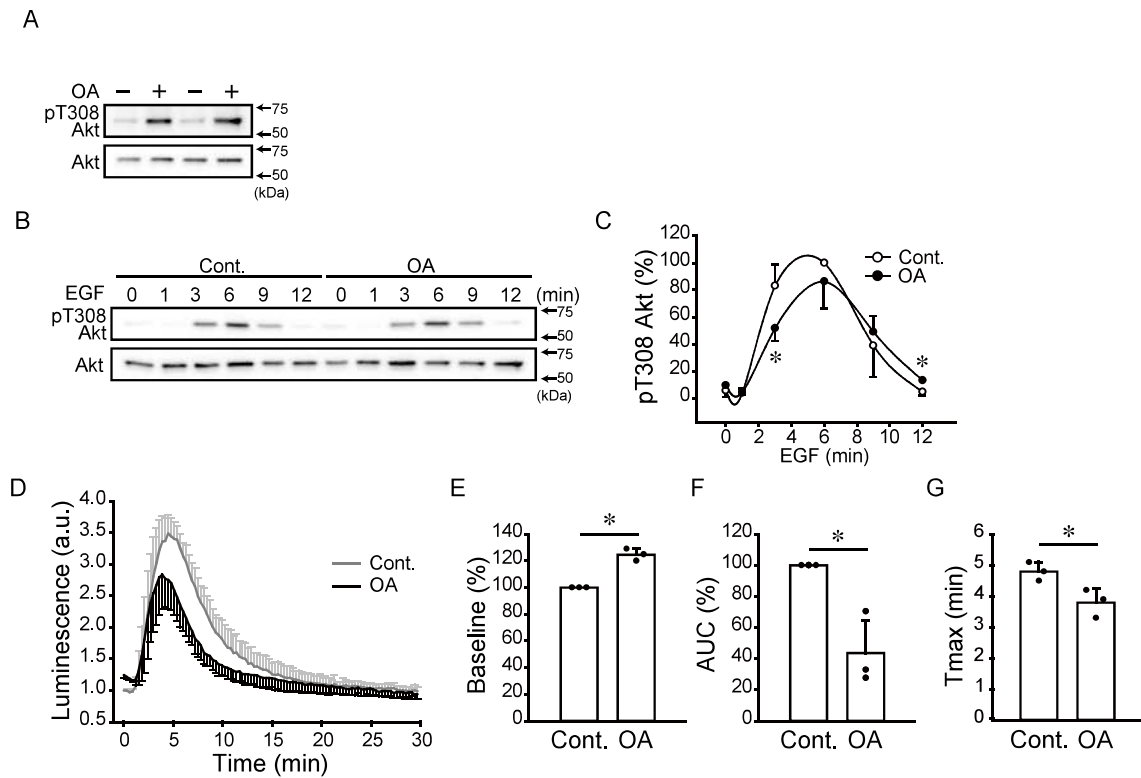


図 26 EGF による PDK1/Akt 結合に PP2A 阻害が与える影響

(A–C) MCF7 細胞を無血清培地に交換し、okadaic acid (OA: 100 nM) で 4 時間処置後、EGF (50 ng/ml) で 1–12 分間刺激し、Akt Thr308 リン酸化レベルとタンパク質発現量を western blotting により解析した。OA 処置のみの代表例 (A)、全体の代表例 (B)、DMSO 処置 (Cont.) 時の Akt のリン酸化レベルのピーク値を 100% として相対値で表した定量図 (C)。N=3。*: $P < 0.05$ (同時間の Cont. との比較)。

(D–G) MCF7 PDK1/Akt 細胞を無血清培地に交換し OA (100 nM) で 4 時間処置後、EGF (50 ng/ml) で刺激し、PDK1/Akt 結合を、NanoBiT システムを用いて 30 分間測定した (D)。発光強度は DMSO 処置 (Cont.) 0 秒時の発光強度を 1.0 として相対値で表した。EGF 刺激前の発光強度 (E)、EGF 刺激後の PDK1/Akt の結合量 (AUC) (F)、EGF 刺激から発光強度の最高値に到達するまでの時間 (Tmax) (G) の定量図をそれぞれ示した。N=3。

4-3 考察

PI3K/Akt シグナル伝達経路の活性亢進は、がんで最も頻繁に観察される変化のひとつであり、腫瘍の浸潤性、生存、増殖に関連している。数十年もの間、PI3K/Akt シグナルの制御機構を解明するために様々なアプローチが取られてきたが、細胞が刺激を受けた直後のシグナル動態は完全には理解されていない。本章では、NanoBiT システムを用いて PDK1/Akt 結合を生細胞内でモニターし、そのダイナミックな結合変化をリアルタイムで検出することに成功した。このシステムを用いて、EGF 刺激による PDK1 と Akt の結合は Akt のリン酸化状態ではなく、PI(3,4,5)P₃ の形成に強く依存していることを明らかにした。また、Akt のリン酸化および脱リン酸化は PDK1 との結合・解離によってのみ制御されているのではなく、様々な因子が複雑に関わり合っており今後さらなる研究が必要である。

4-3-1 NanoBiT システムにおいて付加したタグの構造的妥当性

Calleja らは、二光子蛍光寿命イメージング顕微鏡を用いた Förster resonance energy transfer (FRET) によって、PDK1 と Akt の相互作用を解析した(125)。彼らの FRET アッセイは、PDK1/Akt 結合が生じる局在を顕微鏡下で解析できるという利点がある一方で、成長因子での刺激から分析開始までに 2 分かかっており、その後の検出も 54 秒毎であるため、刺激直後の結合変化や連続した解析はできていない(125)。本研究では、ルミノメーターと NanoBiT システムを用いることにより、刺激前後の相互作用の変化を 18 秒毎の検出頻度でシームレスに解析することを可能にした。

Calleja らの FRET アッセイにおいて、PDK1 と Akt の N 末端にそれぞれ GFP と RFP がタグ付けされており、これらのタグの位置は本研究の NanoBiT システムにおいて発光強度の最高値を示した組み合わせと一致している。PDK1 と Akt は、PDK1 の PIF ポケットと Akt1 の PIF モチーフ間の相互作用によって安定化されたヘテロ二量体を形成する (117, 118)。タグの付加によって構造が変化する可能性を排除するために PIF 阻害剤を飽和レベルで処置したところ、NanoBiT システムにおいて PDK1/Akt 結合の減少が認められたことから、本研究で用いた NanoBiT タグの組み合わせが、PDK1 と Akt の結合に影響を与えないことが示唆された。他の組み合わせの発光強度が極端に低い理由は不明だが、PH ドメインと PI(3,4,5)P₃、または PIF モチーフと PIF ポケット間の結合を阻害しているのかもしれない。

4-3-2 刺激の違いによる結合動態の変化

本研究において、NanoBiT システムは EGF 刺激に加えて insulin 刺激による PDK1/Akt のダイナミックな結合変化を検出した。結合は EGF 刺激では一峰性に上昇し速やかに基底レベルまで低下したが、insulin 刺激では二峰性に反応し緩やかな低下を示した。解析の煩雑さを避けるため、本研究では主に EGF 刺激を用いたが、EGF 刺激と insulin 刺激の結合動態は明らかに異なっており、この違いを生み出す分子メカニズムを解析することは重要である。EGF 刺激に伴う epidermal growth factor receptor (EGFR) と PI3K/Akt シグナルを含む下流のシグナル伝達経路の活性化は、受容体の急速な内在化とダウンレギュレーションによって一過性を示すことが、いくつかの異なる細胞モデルにおいて示されている (126–130)。これを裏付けるように、bioluminescence resonance energy transfer

(BRET) システムを用いた、間接的に PI(3,4,5)P₃ の産生をモニタリングした研究では、EGF 刺激後に PI(3,4,5)P₃ 産生は 5–10 分でピークに達し、20 分以内に基底レベルにまで戻った (131)。一方、insulin 刺激では、プラトーに達した後も産生量は維持されており (131)、本研究の結合動態の変化に類似していた。したがって、刺激下における PDK1/Akt 結合変化は細胞膜における PI(3,4,5)P₃ の産生に依存している可能性が考えられる。

4-3-3 PDK1/Akt 不活性複合体の検出

静止細胞の細胞質では、PDK1 と Akt は不活性複合体として存在することが報告されている (125, 132)。Akt は、PH ドメインとキナーゼドメインの分子内相互作用によって不活性化された構造、いわゆる「PH-in」と呼ばれる自己抑制型構造で PDK1 と結合している。細胞質内不活性複合体の形成は脂質結合とは無関係であり、Akt の Thr308 と Ser473 のリン酸化を必要としない (125, 132)。NanoBiT システムの発光は LgBiT と SmBiT の構造的近接性に依存するため、本研究で用いたタグの組み合わせが不活性複合体の形成を検出するかは不明である。しかし、EGF 刺激後に発光の顕著な増加が観察されること、LY と AKTi による Akt の膜移行阻害によって発光が著しく減少することから、本システムが不活性複合体を検出したとしても、その影響は非常に小さいことが推測される。

PI3K 阻害剤と PH ドメイン依存性アロステリック Akt 阻害剤が静止状態においても結合を顕著に低下させたという事実は、無刺激下においてもかなりの量の PDK1/Akt 複合体が存在することを示唆している。それにもかかわらず、Akt リン酸化レベルは低く保たれている。PP1 阻害剤と PP2A 阻害剤の両方が静止状態での Akt リン酸化レベルを上昇させたことから、Akt はこれらのホスファター

ぜによって速やかに脱リン酸化されるのかもしれない。

4-3-4 PDK1/Akt 結合にホスファターゼが与える影響

PI(3,4,5)P₃ は、少なくとも2つの経路で脱リン酸化される。PI3-ホスファターゼである PTEN と PI5-ホスファターゼである SHIP2 は、それぞれ PI(4,5)P₂ と PI(3,4)P₂ を産生する (112)。PTEN 阻害剤 bpV と SHIP2 阻害剤 AS19 はどちらも PI(3,4,5)P₃ の蓄積を誘導することから、PDK1/Akt 結合を促進すると予想した。しかし、bpV は PDK1/Akt 結合に影響を与えず、AS19 はこれを抑制した。一方で、いずれの阻害剤も Akt リン酸化レベルを上昇させた。このことは、Akt のリン酸化が膜移行や膜における PDK1 との結合を阻害する負の調節機構として機能している可能性を示唆するが、OA は Akt のリン酸化レベルと PDK1/Akt 結合の両方を増加させたことから、これだけでは説明することができない。

EGF 刺激による Akt リン酸化は、TAU と OA 処置によって延長されたことから、PP1 と PP2A が Akt の脱リン酸化に関与していることが示唆された。しかし、TAU も OA も EGF 刺激後の Akt 脱リン酸化を完全には阻害しなかったことから他のホスファターゼの関与が示唆されるが、Akt Thr308 を基質とするホスファターゼに関する報告は限られている。PTEN は Akt Thr308 を脱リン酸化することが報告されているが (133)、本研究では PTEN 阻害剤は EGF 刺激後の Akt 脱リン酸化を阻害しなかった。

リン酸化とは対照的に、EGF 誘導性の PDK/Akt 結合は TAU および OA で処置により終息までの時間が短縮される。PDK1 はリン酸化状態に関係なく自己抑制型構造をとっており、PI(3,4,5)P₃ との結合のみがその抑制を解除でき、PDK1 が PI(3,4,5)P₃ と解離すると速やかに自己抑制型構造に戻る (134)。Akt/mTORC1

の下流標的である p70 S6K は、PDK1 の PH ドメインの中にある Ser549 をリン酸化し、PDK1 を PI(3,4,5)P₃ から解離させることで Akt との結合を阻害する (134)。したがって、PP1 や PP2A は PDK1 Ser549 を脱リン酸化することで、PDK1 を細胞膜上に留めている可能性が考えられるが、抗 pSer549 PDK1 抗体は市販されていないため、TAU や OA 処置がこのリン酸化部位に与える影響は解析できなかった。Akt のリン酸化は、Akt の立体構造をホスファターゼがアクセスできない状態に変化させることから (135)、リン酸化された Akt へのホスファターゼの結合は何らかの因子によって媒介されている可能性がある。EGF 刺激後の Akt 活性化を停止させる分子機構についてはさらなる研究が必要である。

4-3-5 EGF 刺激時の PDK1/Akt 結合と Akt のリン酸化状態

ATP 競合的 Akt 阻害剤 AFU は、活性型 Akt を標的として ATP を模倣し、ホスファターゼのリン酸化部位へのアクセスを阻害することで Akt 自身の過剰なリン酸化を誘導する (135)。AFU が誘導した高リン酸化状態の Akt においても、EGF 刺激により PDK1 と Akt の結合が促進された。したがって、PDK1/Akt 結合は Akt の Thr308 リン酸化状態には影響を受けず、PI(3,4,5)P₃ 合成に依存していると考えられる。この理由として考えられるのは、Akt kinase-interacting protein 1 (Aki1/Frued-1) や IQ motif containing GTPase activating protein 1 (IQGAP1) などの足場タンパク質の関与である (136)。PI3K 阻害剤 LY は、Aki1/Frued-1 と Akt の会合を抑制することから (137)、Akt と Aki1/Frued-1 の相互作用は PI(3,4,5)P₃ に依存している。また、EGF は IQGAP1 の Ser1443 リン酸化レベルを上昇させることで構造変化をもたらし、PI3K、PDK1、Akt を含む Akt 活性化に必要なすべての因子が IQGAP1 にリクルートされる。したがって、これらの足場タンパク

質の関与が、PDK1/Akt 結合と Akt リン酸化状態が相関しない理由の一つになる可能性がある。

第5章 総合考察

5-1 PP6 発現および機能の調節機構

第2章および3章において、PP6のタンパク質発現がRAおよびTGF- β の2つの細胞外刺激によって誘導され、その後の細胞内シグナル応答を促進することが示された。PP6は炎症性サイトカインであるTNF- α が誘導する細胞死を抑制するが、TNF- α 刺激はPP6の発現を誘導しないことから(138, 139)、本研究で観察された発現誘導は特異性を持った反応であると考えられる。細胞内では、PP2Aタンパク質の発現が厳密に制御されているのに対して(140)、PP6タンパク質の発現量は状況に応じて大きく変動する。ヒト結腸上皮細胞株Caco-2では、PP6タンパク質発現量は細胞密度の増加によって約18倍上昇する(47)。細胞密度依存的な増加は、ヒト色素性網膜上皮細胞ARPE-19でも観察される。また、PP6の発現増加は、インスリン抵抗性モデルマウスの脂肪組織(138)や炎症性腸疾患(141)、膠芽腫(38)や浸潤性膵管がん(142)、悪性中皮腫(143)などのがんでも観察されている。そのほかにも、電離放射線(IR)によるDNA損傷は、いくつかの細胞種でPP6の発現を増加させることが報告されている(144, 145)。反対に、PP6タンパク質発現量の低下も、いくつかの癌種で報告されている(79, 146)。このようにPP6の発現は、正常細胞やがん細胞、刺激など様々な状況に応じて容易に変化する。当研究室では以前、PP2Aタンパク質の分解は主にユビキチン/プロテアソーム系によって(48)、PP6タンパク質の分解は主に選択的オートファジーによって制御されていることを報告しており(42)、分解機構の違いが発現変動の差の原因になっている可能性がある。本研究においても、RAおよびTGF- β 刺激がオートファジー活性を低下させることが、PP6タンパク質の蓄積に寄与している可能性が示された。

本研究では、TGF- β 刺激がPP6 mRNA発現を上昇させることが明らかになっ

たが、PP6 の転写メカニズムはほとんど明らかになっておらず、転写因子の同定も進んでいない。2種の micro RNA (miRNA)、miR-31 および miR-373 が PP6 mRNA の発現量を制御することが明らかとなっており、がんや炎症性疾患において、これらの miRNA 発現が PP6 のタンパク質発現を低下させることが報告されている (143, 146, 147)。ヒト正常組織における PP6 の mRNA 発現とタンパク質量には相関が認められないことから (81)、PP6 タンパク質のレベルは転写、mRNA の翻訳やタンパク質の安定性など、様々な段階で調節されていると考えられる。

第2章および3章では、SAPS のうち PP6R1 のみ TGF- β 刺激によって発現が誘導された。第2章では PP6R2 を過剰発現させた場合のみ神経突起形成が促進されたが、全ての SAPS が SIN1 と結合することが認められ、脱リン酸化に関与する SAPS の同定には至らなかった。PP6 は、SAPS に加えて3種類の ankyrin repeat domain (Ankrd) サブユニット (Ankrd28、Ankrd44、Ankrd52) のうちの1つと結合することでヘテロ三量体を形成し、基質特異的な脱リン酸化を引き起こす。また、ヘテロ二量体としても機能し、PP6/PP6R2 二量体は Ankrd を介さずに γ -H2AX を脱リン酸化する (79)。最近、Rab40c が Ankrd28 のユビキチン化を促進して分解を誘導することで、PP6/PP6R1/Ankrd28 複合体の形成と活性を阻害することが報告された (148)。これらの報告から、単純に SAPS の違いだけで基質が選択されているのではなく、Ankrd の発現・結合や複合体の組み合わせによって制御されていることが推測される。今後は、SAPS および Ankrd のそれぞれのサブユニットの発現を単独で抑制することで、より詳細に PP6 複合体の複雑な機能の解明を進めることができると考える。

5-2 ホスファターゼを標的とした創薬戦略

ヒトの全遺伝子の約 20%が関与するともいわれる細胞内シグナル伝達は、複雑で巨大なネットワークを形成する。シグナル伝達系は想像以上にダイナミクスに富み、未だ明らかにされていない分子制御機構が隠されている。そのため、細胞外から刺激を受けた際には予想もつかない経路が働くこともあり、刺激下において反応をリアルタイムに検証することは、生体内の状態を知る上で重要である。第 2 章および 3 章ではそれぞれ神経分化因子および増殖因子刺激細胞外刺激下で観察し、第 4 章では生体内のシグナル変化をより詳細に観察するために生細胞で解析を行った。

一般的にタンパク質同士の結合面は広く浅いため、タンパク質間相互作用 (protein-protein interaction: PPI) を阻害する化合物の開発は難しいと考えられてきた。しかし、個々の PPI の分子機構の解明が進んだことで、ベンゾジアゼピンや ICG-001、IL-2、MDM2、BCL-2-BCL-XL、XAIP 阻害剤などいくつかの成功例が報告されつつあり (149)、PPI を制御する薬剤の開発に期待が集まっている。これらの薬の多くは、薬剤が結合したときにのみ形成される特異的なポケット (クリプトサイト) に結合する特徴を持っている。クリプトサイトは偶然発見されたものであり、探し当てて創薬につなげることは難しいが、この発見はタンパク質の構造的柔軟性こそが PPI 阻害薬開発において重要であると考えられる契機となった (150)。タンパク質のリン酸化反応は、PPI の主要な制御機構であり基質の微細な構造変化をも引き起こすため、キナーゼとホスファターゼの新たな基質の同定や反応メカニズムを解明することは PPI 創薬において必須であると考えられる。ホスファターゼはタンパク質の脱リン酸化を担い、多くのがんでその活性が抑制されているため、活性回復が治療標的として有用であると考

えられているが、基質選択性が低いことから長い間創薬標的として不適とされてきた。しかし、近年、PP2A の機能解析が進み、複合体の構成変化による機能差が明らかとなり、予想を超えた新たな生理機能と疾患との関わりが注目されている。成長因子などの外部からの刺激によって細胞内の PI3K/Akt シグナルが活性化し、その下流に存在する mTOR や p70 S6K の活性が持続されると、負のフィードバック機構によって Akt 活性が減弱する (151, 152)。最近、インスリンやグルコース刺激時に、PP2A B55 および B56 γ 3 複合体が mTOR や p70 S6K を脱リン酸化することで活性を低下させ、負のフィードバックを抑制することが明らかになった (153, 154)。この新たな PP2A の機能は、Akt の活性を上昇させることでシグナル伝達を促進すると考えられ、従来「がん抑制因子」として知られてきた PP2A が「がん促進因子」としての側面を持つことを示している。第 3 章において、PP2A 阻害剤処置により、予想に反して EGF 刺激による Akt のリン酸化が抑制された。したがって、EGF 刺激下において PP2A が負のフィードバックを抑制している可能性が考えられる。このような PP2A 阻害剤による負のフィードバックの増強はリン酸化だけでなく、PDK1/Akt 結合に影響を与えているのかもしれない。そのため、阻害剤だけでなく、様々な PP2A 複合体の発現抑制が Akt のリン酸化および PDK1/Akt 結合に与える影響を検討することで負のフィードバック機構の詳細な解明につながり、ホスファターゼの創薬開発において重要であると考えられる。

第 2 章および 3 章では PP6 が PI3K/Akt および TGF- β シグナルを正に制御することを初めて明らかにした。PP6 ノックアウトマウスの胚は E7.5 までに退化し、E8.5 で明らかな発生障害を示し、胎性致死となる (73)。PP6 が着床後のマウス胚形成に必須であることが示されており、PP6 ノックアウト MEF では、細胞増殖が顕著に抑制される (73)。この報告から、PP6 は発生段階のシグナル伝達におい

て正の働きを持つことが推測され、成長に応じて、また組織に応じてその役割が異なると考えることが妥当である。

本研究は、ホスファターゼの新たな生理機能を提示し、がんをはじめとした生活習慣病や神経変性疾患などとの関わりを持つ可能性を示した。これはホスファターゼを標的とした創薬開発の実現に貢献するものである。

第6章 実験材料および実験方法

6-1 細胞培養法

マウス神経芽腫細胞株 N2a、レンチウイルス産生用細胞株 Lenti-X HEK293T (Takara Bio)、マウス胎児線維芽細胞 MEF、ヒト乳がん細胞株 MCF7 は、1% antibiotic-antimycotic (AA、Thremo Scientific)、10% fetal bovine serum (FBS) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を培地として用い、37°C、5% CO₂に保ったインキュベーター (MCO-5AC、SANYO) 内で培養した。細胞の継代は培地を除去して HEPES buffered saline (HBS: 25 mM HEPES、150 mM NaCl、pH 7.4) で 1 回洗浄した後、trypsin/EDTA (0.5% trypsin、0.53mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) 含有) HBS) を加えてピペッティングすることにより細胞を剥がし行った。

マウス胚性幹細胞 (mESC) は、5% FBS、15% Serum Replacement、100 mM β -mercaptoethanol、2 mM L-グルタミン、1 mM nonessential amino acids (Wako)、15 ng/ml 白血病抑制因子 (Oriental Yeast) を添加した DMEM 中で、ゼラチンコートしたディッシュ (Sigma) 上で培養した。PA6 細胞は、文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクトを通じて理研 BRC から提供された。なお、培養に必要な器具は全て滅菌して用いた。

6-2 プラスミド DNA およびレンチウイルスベクターの作製

6-2-1 プラスミドの作製

pLVSIN nFLAG3 human PP6 は、ヒト肝臓 cDNA を鋳型に PCR で増幅した PP6 遺伝子を pLVSIN nFLAG3 の BamHI/EcoRI サイトに InFusion (Takara Bio) を用いて導入することで作製した。LgBiT タグまたは SmBiT タグを N 末端および C 末端に付加させた Akt1、PDK1 は鋳型として PCR で増幅し、InFusion を用いて

pBiT1.1-C[TK/LgBiT]、pBiT2.1-C[TK/SmBiT]、pBiT1.1-N[TK/LgBiT]、pBiT2.1-N[TK/SmBiT]に組み込んだ。

shRNA 発現プラスミドは、標的因子の配列に合わせ設計したプライマーをアニーリングした後に、pLVmC の ClaI/MluI サイトに T4 DNA ligase (Takara Bio) を用いてライゲーションすることで作製した。shRNA の標的配列は以下の通りである。

Non-target shRNA (shNT) : 5'-CAACAAGATGAGAGCACCA-3'

PP6 target shRNA (shPP6) : 5'-GACACAAACTACATATTTA-3'

6-2-2 プラスミドのトランスフォーメーションおよびミニプレップ

大腸菌 (XL10GOLD、Stratagene または HST08、Takara Bio) 10 μ l に 1 μ l のプラスミド溶液を加え、on ice で 30 分間静置した。ドライバス (Dry Bath Incubator、Major Science) で 42°C、45 秒間ヒートショックを加えた後、on ice で 2 分間静置し、100 μ l の LB Broth または super optimal broth with catabolite repression (SOC) Medium を加え、37°C で 30 分間振とう培養 (BioShaker BR-22FP、Taitec) した。その後、LB agar (ampicillin 100 μ g/ml 添加) プレートに播種し 37°C で一晩培養した。出芽したコロニーを単離し、5.0 ml の LB Broth (ampicillin 100 μ g/ml 添加) に加え 37°C、200 rpm で一晩振とう培養した。培養液をチューブに移し、室温にて 4,000 rpm で 10 分間遠心 (卓上小型遠心機 2420、KUBOTA) して、上清を除いた後、Plasmid Mini Kit I (Omega) を使用してプラスミドを抽出した。

6-2-3 プラスミドのトランスフェクション

12 穴プレートに細胞を 2.0×10^5 cell/well で播き一晩培養した。200 μ l の Opti-MEM にプラスミド 1.0 μ g および 2.5 μ l の Polyethylenimine "MAX" (PEI、

Polysciences) を混合した後 30 分間静置し、1.0 ml の培地 (10% FBS・1% AA 含有 DMEM) に加え 24 時間培養し使用した。上記は最小単位であり、使用する細胞培養プレートの表面積に応じて、適宜調整し使用した。

6-2-4 レンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入

6 穴プレートに HEK293T 細胞を 4.0×10^5 cell/well で播き一晚培養した。各種 レンチウイルスベクタープラスミド (1.0 μ g)、packaging plasmid (psPAX2: 0.77 μ g)、VSVG coat protein plasmid (pMD2.G: 0.43 μ g) と 2.5 μ l の PEI を 333 μ l の Opti-MEM に混合した後 30 分間静置した。その後、1.5 ml の培地 (10% FBS・1% AA 含有 DMEM) に加え、8 時間培養したのちに除去し、1.5 ml の培地に交換した。40 時間後、ウイルスを含む培地を 0.22 μ m のフィルター (Millipore) でろ過し、レンチウイルスベクターを得た。その後細胞を、ウイルスベクターを含む培地で 8 時間処置または振とうし、目的のタンパク質および shRNA を恒常的に発現する細胞を作出した。

6-3 Western blotting によるタンパク質発現量測定

6-3-1 タンパク質抽出

培地を除去した細胞を、on ice で冷却した HBS で洗浄し、triton X-100 含有 lysate buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、5 mM EDTA、5 mM EGTA、1 mM Na_3VO_4 、20 mM sodium pyrophosphate、1% Triton X-100、protease inhibitor cocktail (Roche) 1 tablet/50 ml) もしくは SDS 含有 lysate buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、5 mM EDTA、5 mM EGTA、1 mM Na_3VO_4 、20 mM sodium pyrophosphate、1% SDS、protease inhibitor cocktail 1 tablet/50 ml) を加えて細胞を可溶化した。得られた細胞溶解液を on ice で 5 分間静置した後に、4°C、15,000 rpm で 15 分間遠

心し、上清をタンパク質抽出液として使用した。

6-3-2 Western blotting

得られたサンプルのタンパク質濃度は DC protein assay kit (Bio-Rad) を用いて Lowry 法により測定した。タンパク質サンプル 10–40 µg を SDS ポリアクリルアミドゲル (8-15%) で泳動して分離した後に、転写装置 (Bio-Rad または ATTO) を用いて PVDF 膜 (Bio-Rad) もしくはニトロセルロース膜 (Wako) に転写した。PVDF 膜もしくはニトロセルロース膜を 0.5% もしくは 3% スキムミルク含有 TBS-T (25 mM Tris-HCl (pH 7.4)、150 mM NaCl、0.05% Tween 20) により室温で 30–60 分間ブロッキングした後に、一次抗体を 4°C で振とうしながら一晩反応させた。

洗浄後、二次抗体を室温で 1 時間反応させ、ECL Pro western blotting Detection Reagent (PerkinElmer) で発光させ、LAS3000mini (FUJIFILM) または Amersham ImageQuant 800 (Cytiva) または LuminoGraph II EM (ATTO) で観察した。イメージスキャナーで取り込んだバンドは、ImageJ (National Institutes of Health) を用いて測定し数値化した。ローディングコントロールには p97/VCP 抗体を用いた。

6-4 免疫沈降法および pull down assay

培養細胞の培地を除去した後に、on ice で冷却した HBS で 1 回洗浄し、triton-X 100 含有 IP 用 lysate buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、5 mM EDTA、5 mM EGTA、1 mM Na₃VO₄、20 mM sodium pyrophosphate、1% triton X-100、protease inhibitor cocktail 1 tablet/50 ml) もしくは CHAPS lysate buffer (40 mM HEPES (pH 7.4)、2 mM EDTA、10 mM disodium glycerophosphate、0.3%

CHAPS、10 mM sodium pyrophosphate、1 tablet/50 ml Roche Complete protease inhibitor) を加えて可溶化した。得られた細胞溶解液を on ice で5分間静置した後に 4°C、15,000 rpm で10分間遠心し、上清を採取してタンパク質サンプルとして使用した。Triton-X 100 含有 wash buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、5 mM EDTA、5 mM EGTA、1 mM Na₃VO₄、20 mM sodium pyrophosphate、1% triton X-100) もしくは CHAPS wash buffer (40 mM HEPES (pH 7.4)、150 mM NaCl、2 mM EDTA、10 mM disodium glycerophosphate、0.3% CHAPS、10 mM sodium pyrophosphate) を用いて洗浄したビーズ (FLAG M2 Affinity Gel、SIGMA もしくは Stag protein Agarose、Novagen) にサンプルを加え、4°C で2時間反応させた。ビーズを洗浄後、結合タンパク質を SDS sample buffer (50 mM Tris-HCl (pH 6.8)、0.4% SDS、6% β-mercaptoethanol、2% glycerol) もしくは FLAG peptide (SIGMA) で溶出し、western blotting により検出した。

6-5 免疫蛍光染色法

細胞を microscope cover glass (Fisherbrand) 上に播き、1日培養した。PBS (137 mM NaCl、2.7 mM KCl、1.76 mM KH₂PO₄、10 mM Na₂HPO₄) で洗浄後、4% paraformaldehyde (Wako) を用いて室温で20分間固定し、PBS で洗浄した。0.05% Triton-X 含有 PBS で、室温で1分間振とう (Wave-SI、TAITEC) することで脱膜化を行った後に、0.2%ゼラチン含有 PBS を用いて室温で20分間、もしくは3%スキムミルク含有 PBS を用いて室温で30分間振とうすることでブロッキングを行った。一次抗体を0.2%ゼラチン含有PBSもしくはPBSで希釈し、4°Cで一晩反応させた。PBSで洗浄後、遮光して二次抗体を60分間反応させた。標本は aqueous permanent mounting medium (Diagnostic BioSystems) を用いて micro slide glass (Matunami) に封入し、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM710、Carl

Zeiss) を用いて観察した。

6-6 In vitro kinase assay

キナーゼアッセイバッファー (50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、400 μ M ATP、10 mM MgCl₂、0.1 mM EDTA、0.005% Tween 20、2 mM DTT) に約 200 ng の His タグ SIN1/MAPKAP1 (CUSABIO) および 100 ng の His タグ活性 p70 S6 kinase (R&D : 活性 73 nmol/min/mg) または 70 ng の GST タグ活性 Akt1 (R&D : 活性 103 nmol/min/mg) を加えて、30°C、200 rpm で 1 時間反応させた。反応は SDS sample buffer を加えることで停止され、western blotting により検出した。

6-7 Real-time PCR 法

TRIzol Reagents (Invitrogen) を用いて細胞から全 RNA を抽出し、RNA 0.5 μ g を QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN) を用いて逆転写した。合成された cDNA を QuantiTect SYBR Green I Kit (QIAGEN) または THUNDERBIRD Next SYBR qPCR Kit (TOYOBO) および CFX96 Touch (Bio-Rad) を用いて PCR を行った。PCR 反応は、熱変性 (94°C、15 秒間)、アニーリング (60°C、30 秒間)、伸長 (72°C、30 秒間) を 45 サイクルまで行った。PP6c 発現量は GAPDH または TBP により規準化し、比較した相対値は comparative Ct ($2^{-(\Delta Ct-Cc)}$)method を用いて表した。使用したプライマーは、表 1 にまとめた。

表 1 Real-time PCR に使用したプライマー

プライマー		配列
PP6	forward	CGCCAGTAACAGTGTGGTGA
	reverse	GGCCACTTAGCCTTTAGTGCAAGA

GAPDH	forward	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC
	reverse	TGGTGAAGACGCCAGTGGA
TBP	forward	CATTCTCAAACCTCTGACCACTGCAC
	reverse	CAGCCAAGATTCACGGTAGATACAA

6-8 神経分化誘導法

6-8-1 N2a 細胞における神経突起解析

35 mm ディッシュに N2a 細胞を 2.0×10^5 個/well で播き、24 時間培養後、培地を 2% FBS、1% AA を含む DMEM に交換し、RA (20 nM) で処置した。24–72 時間培養し、神経突起の形成を、オールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-9000、KEYENCE) を用いて撮影した。1 つの細胞に複数の突起を形成する細胞においては、最も伸長している突起を軸索様突起として、撮影した範囲に存在する全ての細胞の軸索様突起の長さを計測した。またこの際、1 神経細胞あたりの神経突起形成数と神経突起形成細胞数を計数した。

6-8-2 マウス胚性幹細胞の神経分化誘導 (SDIA 法)

PA6 細胞を 10 cm ディッシュにプレーティングし、10%FBS 添加 MEMa で 5 日間培養した。細胞が馴染んだ後、FBS の混入を最小限にするため、細胞表面を 10 mL のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 3 回洗浄した。その後、mESC (1.7×10^3 個/cm²) を、10% FBS、0.1 mM nonessential amino acids、0.1 mM β -mercaptoethanol を添加した G-MEM (Wako) 中で、PA6 フィーダー細胞上で培養した。培養液は 4 日目に交換し、以後 2 日ごとに交換した。

6-9 Luciferase Reporter Assay

24 穴プレートに MEF を培地 390 μ L 中に約 5,000 個で播いた。24 時間後、ル

シフェラーゼ発現プラスミド、PEI 0.6 μ L、Opti-MEM 78 μ L を混合して培養液中に添加した。各種ルシフェラーゼ発現ベクターは、標的である NanoLuc ルシフェラーゼを 300 ng/well、内部標準であるホタルルシフェラーゼを 60 ng/well 加えて、総 DNA 量 360 ng/well とした。16 時間後、細胞を recombinant mouse TGF- β 1 (10 ng/ml) で処置し、8 時間後、標的および内部標準のルシフェラーゼを Nano-Glo Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて発光させ、蛍光強度を GloMax Explorer (Promega) により測定した。内部標準であるホタルルシフェラーゼの蛍光強度からトランスフェクション効率を算出し、標的である NanoLuc の蛍光強度を補正して転写活性を算出した。

6-10 Wound healing assay

MEF を 35mm ディッシュでコンフルエントに単層培養した。単層を 200 μ L のピペットチップで十字に切り取った。FBS フリー/DMEM で洗浄後、細胞を滅菌水または TGF- β (10 ng/ml) を含有した 0.5% FBS/DMEM で 8 時間インキュベートした。画像は 0 時間と 8 時間に撮影し、傷の大きさは ImageJ を用いて測定した。

6-11 NanoBiT 法

96 穴プレート (ViewPlate 96, Perkin Elmer) に N 末端 LgBiT-Akt および N 末端 SmBiT-PDK1 を安定に発現する MCF7 細胞を 5.0×10^4 個/well で播き、20–24 時間培養後、培地を DMSO または阻害剤を添加した 100 μ L FBS フリー培地に交換した。2–4 時間培養後、各ウェルに 25 μ L の NanoGlo Solution を添加し、37°C に設定した GloMax Explorer を用いて発光が定常状態になるまで 1 分毎に発光を測定した。1.3 μ g/mL の EGF または 5.2 μ M の insulin を各ウェルに 5 μ L ずつ添加し

(最終濃度はそれぞれ 50 ng/mL と 200 nM)、発光を 18 秒ごとに 30 分間測定した。ベースラインは EGF 刺激直前の値、AUC は刺激後 0 分から 30 分までのベースラインからの増加分を加算して算出、Tmax は発光強度が最も高くなった時点の値とした。

6-12 統計処理

実験成績は、平均±標準偏差で示した。有意差検定は 2 群間の比較では Student *t*-test を用い、危険率 (*P*) が 5%未満の場合を有意差ありとした。

6-12 使用抗体および薬物

使用した抗体を表 2、薬物を表 3 に示した。

表 2 使用抗体リスト

抗体	メーカー	型番
AC- α -Tublin	Cell Signaling	3971
Akt	Cell Signaling	2920
p-Akt Thr308	Cell Signaling	13038
p-Akt Ser473	Cell Signaling	4060
CREB	Cell Signaling	4820
p-CREB Ser133	Cell Signaling	9198
FLAG	SIGMA	F7425
HA	Aves	ET-HA 100
LC3	MBL	PM-036
mTOR	Cell Signaling	2983
p62	MBL	PM-045
p70 S6K	Santa Cruz	sc-5605
p-p70 S6K Thr371	Cell Signaling	9208
SIN1	Cell Signaling	12860
p-SIN1 Thr86	Cell Signaling	14716
PP2A	Millipore	07-324
PP4	Bethyl	A300-835A
PP6	Dr.David Brautigamより供与	
PP6R1	Dr.David Brautigamより供与	
PP6R2	Bethyl	970
PP6R3	Bethyl	972
S-tag	Novus	NBP2-13804
β 3-tubulin	Cell Signaling	5568
Smad2/3	Cell Signaling	8685
p-Smad3 Ser423/425	Cell Signaling	9520
p38 MAPK	Cell Signaling	9212
p-p38 MAPK Thr180/182	Cell Signaling	9216
ERK1/2	Cell Signaling	9107

p-ERK1/2	Cell Signaling	9101
VCP	Gene Tex	GTX113030

表 3 使用薬物リスト

抗体	購入/供給源
Retinoic acid	Wako
LY294002	BIOMOL
Akt inhibitor VIII	Cell Signaling
bpV (HOpic)	Wako
AS1938909	Echelon Biosciences
afuresertib	Cayman Chemical
tautomycin	Wako
okadaic acid	LC Laboratories
PS48	Santa Cruz

引用文献

1. Pawson, T., and Scott, J. D. (2005) Protein phosphorylation in signaling--50 years and counting. *Trends Biochem Sci.* **30**, 286–290
2. Ubersax, J. A., and Ferrell, J. E. (2007) Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **8**, 530–541
3. Olsen, J. V., Vermeulen, M., Santamaria, A., Kumar, C., Miller, M. L., Jensen, L. J., Gnad, F., Cox, J., Jensen, T. S., Nigg, E. A., Brunak, S., and Mann, M. (2010) Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. *Sci Signal.* **3**, ra3
4. Schönthal, A. H. (2001) Role of serine/threonine protein phosphatase 2A in cancer. *Cancer Lett.* **170**, 1–13
5. von Lindern, M., van Baal, S., Wiegant, J., Raap, A., Hagemeijer, A., and Grosveld, G. (1992) Can, a putative oncogene associated with myeloid leukemogenesis, may be activated by fusion of its 3' half to different genes: characterization of the set gene. *Mol Cell Biol.* **12**, 3346–3355
6. Olsen, J. V., Blagoev, B., Gnad, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., and Mann, M. (2006) Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell.* **127**, 635–648
7. Brautigan, D. L. (2013) Protein Ser/Thr phosphatases--the ugly ducklings of cell signalling. *FEBS J.* **280**, 324–345
8. Slupe, A. M., Merrill, R. A., and Strack, S. (2011) Determinants for Substrate Specificity of Protein Phosphatase 2A. *Enzyme Res.* **2011**, 398751
9. Zhang, Q., and Claret, F. X. (2012) Phosphatases: the new brakes for cancer development? *Enzyme Res.* **2012**, 659649

10. Cordeiro, M. H., Smith, R. J., and Saurin, A. T. (2018) A fine balancing act: A delicate kinase-phosphatase equilibrium that protects against chromosomal instability and cancer. *Int J Biochem Cell Biol.* **96**, 148–156
11. Westermarck, J., and Hahn, W. C. (2008) Multiple pathways regulated by the tumor suppressor PP2A in transformation. *Trends Mol Med.* **14**, 152–160
12. Ardito, F., Giuliani, M., Perrone, D., Troiano, G., and Lo Muzio, L. (2017) The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). *Int J Mol Med.* **40**, 271–280
13. Gillies, R. J., Verduzco, D., and Gatenby, R. A. (2012) Evolutionary dynamics of carcinogenesis and why targeted therapy does not work. *Nat Rev Cancer.* **12**, 487–493
14. Smith, M. P., and Wellbrock, C. (2016) Molecular Pathways: Maintaining MAPK Inhibitor Sensitivity by Targeting Nonmutational Tolerance. *Clin Cancer Res.* **22**, 5966–5970
15. Westermarck, J. (2018) Targeted therapies don't work for a reason; the neglected tumor suppressor phosphatase PP2A strikes back. *FEBS J.* **285**, 4139–4145
16. Klaeger, S., Heinzlmeir, S., Wilhelm, M., Polzer, H., Vick, B., Koenig, P.-A., Reinecke, M., Ruprecht, B., Petzoldt, S., Meng, C., Zecha, J., Reiter, K., Qiao, H., Helm, D., Koch, H., Schoof, M., Canevari, G., Casale, E., Depaolini, S. R., Feuchtinger, A., Wu, Z., Schmidt, T., Rueckert, L., Becker, W., Huenges, J., Garz, A.-K., Gohlke, B.-O., Zolg, D. P., Kayser, G., Vooder, T., Preissner, R., Hahne, H., Tönisson, N., Kramer, K., Götze, K., Bassermann, F., Schlegl, J., Ehrlich, H.-C., Aiche, S., Walch, A., Greif, P. A., Schneider, S., Felder, E. R., Ruland, J., Médard, G., Jeremias, I., Spiekermann, K., and Kuster, B. (2017) The target landscape of clinical kinase drugs.

Science. **358**, eaan4368

17. Shi, Y. (2009) Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell*. **139**, 468–484
18. Virshup, D. M., and Shenolikar, S. (2009) From promiscuity to precision: protein phosphatases get a makeover. *Mol Cell*. **33**, 537–545
19. Corcoran, J., and Maden, M. (1999) Nerve growth factor acts via retinoic acid synthesis to stimulate neurite outgrowth. *Nat Neurosci*. **2**, 307–308
20. Corcoran, J., Shroot, B., Pizzey, J., and Maden, M. (2000) The role of retinoic acid receptors in neurite outgrowth from different populations of embryonic mouse dorsal root ganglia. *J Cell Sci*. **113 (Pt 14)**, 2567–2574
21. Masiá, S., Alvarez, S., de Lera, A. R., and Baretino, D. (2007) Rapid, nongenomic actions of retinoic acid on phosphatidylinositol-3-kinase signaling pathway mediated by the retinoic acid receptor. *Mol Endocrinol*. **21**, 2391–2402
22. Ohashi, E., Kogai, T., Kagechika, H., and Brent, G. A. (2009) Activation of the PI3 kinase pathway by retinoic acid mediates sodium/iodide symporter induction and iodide transport in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res*. **69**, 3443–3450
23. Puttagunta, R., Schmandke, A., Floriddia, E., Gaub, P., Fomin, N., Ghyselinck, N. B., and Di Giovanni, S. (2011) RA-RAR- β counteracts myelin-dependent inhibition of neurite outgrowth via Lingo-1 repression. *J Cell Biol*. **193**, 1147–1156
24. Yudushkin, I. (2020) Control of Akt activity and substrate phosphorylation in cells. *IUBMB Life*. **72**, 1115–1125
25. Berchtold, D., and Walther, T. C. (2009) TORC2 plasma membrane localization is essential for cell viability and restricted to a distinct domain. *Mol Biol Cell*. **20**, 1565–1575

26. Liu, P., Gan, W., Inuzuka, H., Lazorchak, A. S., Gao, D., Arojo, O., Liu, D., Wan, L., Zhai, B., Yu, Y., Yuan, M., Kim, B. M., Shaik, S., Menon, S., Gygi, S. P., Lee, T. H., Asara, J. M., Manning, B. D., Blenis, J., Su, B., and Wei, W. (2013) Sin1 phosphorylation impairs mTORC2 complex integrity and inhibits downstream Akt signalling to suppress tumorigenesis. *Nat Cell Biol.* **15**, 1340–1350
27. Cañón, E., Cosgaya, J. M., Scsucova, S., and Aranda, A. (2004) Rapid effects of retinoic acid on CREB and ERK phosphorylation in neuronal cells. *Mol Biol Cell.* **15**, 5583–5592
28. Moore, D. L., and Goldberg, J. L. (2011) Multiple transcription factor families regulate axon growth and regeneration. *Dev Neurobiol.* **71**, 1186–1211
29. Chen, L., Feng, P., Peng, A., Qiu, X., Zhu, X., He, S., and Zhou, D. (2018) cAMP response element-binding protein and Yes-associated protein form a feedback loop that promotes neurite outgrowth. *J Cell Mol Med.* **22**, 374–381
30. Mayr, B., and Montminy, M. (2001) Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2**, 599–609
31. Li, X.-Y., Zhan, X.-R., Liu, X.-M., and Wang, X.-C. (2011) CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB in the differentiation of pancreatic ductal cells into islet β -cells mediated by hepatocyte growth factor. *Biochem Biophys Res Commun.* **404**, 711–716
32. Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., and Gong, C.-X. (2005) Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur J Neurosci.* **22**, 1942–1950
33. Liu, R., Zhou, X.-W., Tanila, H., Bjorkdahl, C., Wang, J.-Z., Guan, Z.-Z., Cao, Y., Gustafsson, J.-A., Winblad, B., and Pei, J.-J. (2008) Phosphorylated PP2A (tyrosine

307) is associated with Alzheimer neurofibrillary pathology. *J Cell Mol Med.* **12**, 241–257

34. Sontag, J.-M., Nunbhakdi-Craig, V., Mitterhuber, M., Ogris, E., and Sontag, E. (2010) Regulation of protein phosphatase 2A methylation by LCMT1 and PME-1 plays a critical role in differentiation of neuroblastoma cells. *J Neurochem.* **115**, 1455–1465

35. Ou, Y., and Rattner, J. B. (2004) The centrosome in higher organisms: structure, composition, and duplication. *Int Rev Cytol.* **238**, 119–182

36. Toyo-oka, K., Mori, D., Yano, Y., Shiota, M., Iwao, H., Goto, H., Inagaki, M., Hiraiwa, N., Muramatsu, M., Wynshaw-Boris, A., Yoshiki, A., and Hirotsune, S. (2008) Protein phosphatase 4 catalytic subunit regulates Cdk1 activity and microtubule organization via NDEL1 dephosphorylation. *J Cell Biol.* **180**, 1133–1147

37. Stefansson, B., and Brautigan, D. L. (2006) Protein phosphatase 6 subunit with conserved Sit4-associated protein domain targets IkappaBepsilon. *J Biol Chem.* **281**, 22624–22634

38. Shen, Y., Wang, Y., Sheng, K., Fei, X., Guo, Q., Lerner, J., Kong, X., Qiu, Y., and Mi, J. (2011) Serine/threonine protein phosphatase 6 modulates the radiation sensitivity of glioblastoma. *Cell Death Dis.* **2**, e241

39. LePage, K. T., Dickey, R. W., Gerwick, W. H., Jester, E. L., and Murray, T. F. (2005) On the use of neuro-2a neuroblastoma cells versus intact neurons in primary culture for neurotoxicity studies. *Crit Rev Neurobiol.* **17**, 27–50

40. Stefansson, B., Ohama, T., Daugherty, A. E., and Brautigan, D. L. (2008) Protein phosphatase 6 regulatory subunits composed of ankyrin repeat domains. *Biochemistry.* **47**, 1442–1451

41. Kawasaki, H., Mizuseki, K., Nishikawa, S., Kaneko, S., Kuwana, Y.,

- Nakanishi, S., Nishikawa, S. I., and Sasai, Y. (2000) Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron*. **28**, 31–40
42. Fujiwara, N., Shibutani, S., Sakai, Y., Watanabe, T., Kitabayashi, I., Oshima, H., Oshima, M., Hoshida, H., Akada, R., Usui, T., Ohama, T., and Sato, K. (2020) Autophagy regulates levels of tumor suppressor enzyme protein phosphatase 6. *Cancer Sci*. **111**, 4371–4380
43. Fukushima, N., Furuta, D., Hidaka, Y., Moriyama, R., and Tsujiuchi, T. (2009) Post-translational modifications of tubulin in the nervous system. *J Neurochem*. **109**, 683–693
44. Perdiz, D., Mackeh, R., Poüs, C., and Baillet, A. (2011) The ins and outs of tubulin acetylation: more than just a post-translational modification? *Cell Signal*. **23**, 763–771
45. Dehmelt, L., and Halpain, S. (2005) The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol*. **6**, 204
46. Wullschleger, S., Loewith, R., and Hall, M. N. (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*. **124**, 471–484
47. Ohama, T., Wang, L., Griner, E. M., and Brautigan, D. L. (2013) Protein Ser/Thr phosphatase-6 is required for maintenance of E-cadherin at adherens junctions. *BMC Cell Biol*. **14**, 42
48. Yabe, R., Miura, A., Usui, T., Mudrak, I., Ogris, E., Ohama, T., and Sato, K. (2015) Protein Phosphatase Methyl-Esterase PME-1 Protects Protein Phosphatase 2A from Ubiquitin/Proteasome Degradation. *PLoS One*. **10**, e0145226
49. Ohama, T. (2019) The multiple functions of protein phosphatase 6. *Biochim*

Biophys Acta Mol Cell Res. **1866**, 74–82

50. Nixon, R. A. (2013) The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat Med.* **19**, 983–997
51. Stavoe, A. K. H., and Holzbaur, E. L. F. (2019) Autophagy in Neurons. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **35**, 477–500
52. Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H., and Mizushima, N. (2006) Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature.* **441**, 885–889
53. Sarraf, S. A., Shah, H. V., Kanfer, G., Pickrell, A. M., Holtzclaw, L. A., Ward, M. E., and Youle, R. J. (2020) Loss of TAX1BP1-Directed Autophagy Results in Protein Aggregate Accumulation in the Brain. *Mol Cell.* **80**, 779-795.e10
54. Pyo, J.-O., Yoo, S.-M., Ahn, H.-H., Nah, J., Hong, S.-H., Kam, T.-I., Jung, S., and Jung, Y.-K. (2013) Overexpression of Atg5 in mice activates autophagy and extends lifespan. *Nat Commun.* **4**, 2300
55. Ban, B.-K., Jun, M.-H., Ryu, H.-H., Jang, D.-J., Ahmad, S. T., and Lee, J.-A. (2013) Autophagy negatively regulates early axon growth in cortical neurons. *Mol Cell Biol.* **33**, 3907–3919
56. Feng, X., Lu, J., He, Z., Wang, Y., Qi, F., Pi, R., and Zhang, G. (2018) Mycobacterium smegmatis Induces Neurite Outgrowth and Differentiation in an Autophagy-Independent Manner in PC12 and C17.2 Cells. *Front Cell Infect Microbiol.* **8**, 201
57. He, M., Ding, Y., Chu, C., Tang, J., Xiao, Q., and Luo, Z.-G. (2016) Autophagy induction stabilizes microtubules and promotes axon regeneration after

spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **113**, 11324–11329

58. Lüningschrör, P., Binotti, B., Dombert, B., Heimann, P., Perez-Lara, A., Slotta, C., Thau-Habermann, N., R von Collenberg, C., Karl, F., Damme, M., Horowitz, A., Maystadt, I., Füchtbauer, A., Füchtbauer, E.-M., Jablonka, S., Blum, R., Üçeyler, N., Petri, S., Kaltschmidt, B., Jahn, R., Kaltschmidt, C., and Sendtner, M. (2017) Plekhg5-regulated autophagy of synaptic vesicles reveals a pathogenic mechanism in motoneuron disease. *Nat Commun*. **8**, 678

59. Wojnacki, J., Nola, S., Bun, P., Cholley, B., Filippini, F., Pressé, M. T., Lipecka, J., Man Lam, S., N'guyen, J., Simon, A., Ouslimani, A., Shui, G., Fader, C. M., Colombo, M. I., Guerrera, I. C., and Galli, T. (2020) Role of VAMP7-Dependent Secretion of Reticulon 3 in Neurite Growth. *Cell Rep*. **33**, 108536

60. Yang, K., Yu, B., Cheng, C., Cheng, T., Yuan, B., Li, K., Xiao, J., Qiu, Z., and Zhou, Y. (2017) Mir505-3p regulates axonal development via inhibiting the autophagy pathway by targeting Atg12. *Autophagy*. **13**, 1679–1696

61. Plowey, E. D., Cherra, S. J., Liu, Y.-J., and Chu, C. T. (2008) Role of autophagy in G2019S-LRRK2-associated neurite shortening in differentiated SH-SY5Y cells. *J Neurochem*. **105**, 1048–1056

62. Zeng, M., and Zhou, J.-N. (2008) Roles of autophagy and mTOR signaling in neuronal differentiation of mouse neuroblastoma cells. *Cell Signal*. **20**, 659–665

63. Szwed, A., Kim, E., and Jacinto, E. (2021) Regulation and metabolic functions of mTORC1 and mTORC2. *Physiol Rev*. **101**, 1371–1426

64. Cloëtta, D., Thomanetz, V., Baranek, C., Lustenberger, R. M., Lin, S., Oliveri, F., Atanoski, S., and Rüegg, M. A. (2013) Inactivation of mTORC1 in the developing brain causes microcephaly and affects gliogenesis. *J Neurosci*. **33**, 7799–7810

65. Zhang, Y., Xu, S., Liang, K.-Y., Li, K., Zou, Z.-P., Yang, C.-L., Tan, K., Cao, X., Jiang, Y., Gao, T.-M., and Bai, X.-C. (2017) Neuronal mTORC1 Is Required for Maintaining the Nonreactive State of Astrocytes. *J Biol Chem.* **292**, 100–111
66. Yang, L., Miao, L., Liang, F., Huang, H., Teng, X., Li, S., Nuriddinov, J., Selzer, M. E., and Hu, Y. (2014) The mTORC1 effectors S6K1 and 4E-BP play different roles in CNS axon regeneration. *Nat Commun.* **5**, 5416
67. Hoxhaj, G., Caddy, E., Najafov, A., Houde, V. P., Johnson, C., Dissanayake, K., Toth, R., Campbell, D. G., Prescott, A. R., and MacKintosh, C. (2016) The E3 ubiquitin ligase ZNRF2 is a substrate of mTORC1 and regulates its activation by amino acids. *Elife.* **5**, e12278
68. Luo, Y., Xu, W., Li, G., and Cui, W. (2018) Weighing In on mTOR Complex 2 Signaling: The Expanding Role in Cell Metabolism. *Oxid Med Cell Longev.* **2018**, 7838647
69. Grabiner, B. C., Nardi, V., Birsoy, K., Possemato, R., Shen, K., Sinha, S., Jordan, A., Beck, A. H., and Sabatini, D. M. (2014) A diverse array of cancer-associated MTOR mutations are hyperactivating and can predict rapamycin sensitivity. *Cancer Discov.* **4**, 554–563
70. Massagué, J. (2012) TGF β signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **13**, 616–630
71. Heldin, C.-H., and Moustakas, A. (2016) Signaling Receptors for TGF- β Family Members. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **8**, a022053
72. Zhang, Y. E. (2009) Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res.* **19**, 128–139
73. Ogoh, H., Tanuma, N., Matsui, Y., Hayakawa, N., Inagaki, A., Sumiyoshi, M.,

Momoi, Y., Kishimoto, A., Suzuki, M., Sasaki, N., Ohuchi, T., Nomura, M., Teruya, Y., Yasuda, K., Watanabe, T., and Shima, H. (2016) The protein phosphatase 6 catalytic subunit (Ppp6c) is indispensable for proper post-implantation embryogenesis. *Mech Dev.* **139**, 1–9

74. Assmann, P. F., and Summerfield, Q. (1989) Modeling the perception of concurrent vowels: vowels with the same fundamental frequency. *J Acoust Soc Am.* **85**, 327–338

75. Douglas, P., Ye, R., Trinkle-Mulcahy, L., Neal, J. A., De Wever, V., Morrice, N. A., Meek, K., and Lees-Miller, S. P. (2014) Polo-like kinase 1 (PLK1) and protein phosphatase 6 (PP6) regulate DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs) phosphorylation in mitosis. *Biosci Rep.* **34**, e00113

76. Zeng, K., Bastos, R. N., Barr, F. A., and Gruneberg, U. (2010) Protein phosphatase 6 regulates mitotic spindle formation by controlling the T-loop phosphorylation state of Aurora A bound to its activator TPX2. *J Cell Biol.* **191**, 1315–1332

77. Douglas, P., Zhong, J., Ye, R., Moorhead, G. B. G., Xu, X., and Lees-Miller, S. P. (2010) Protein phosphatase 6 interacts with the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit and dephosphorylates gamma-H2AX. *Mol Cell Biol.* **30**, 1368–1381

78. Dziegielewski, J., Bońkowska, M. A., Ponięcka, E. A., Heo, J., Du, K., Crittenden, R. B., Bender, T. P., Brautigan, D. L., and Larner, J. M. (2020) Deletion of the SAPS1 subunit of protein phosphatase 6 in mice increases radiosensitivity and impairs the cellular DNA damage response. *DNA Repair (Amst).* **85**, 102737

79. Zhong, J., Liao, J., Liu, X., Wang, P., Liu, J., Hou, W., Zhu, B., Yao, L., Wang, J., Li, J., Stark, J. M., Xie, Y., and Xu, X. (2011) Protein phosphatase PP6 is required

for homology-directed repair of DNA double-strand breaks. *Cell Cycle*. **10**, 1411–1419

80. Kajino, T., Ren, H., Iemura, S.-I., Natsume, T., Stefansson, B., Brautigan, D. L., Matsumoto, K., and Ninomiya-Tsuji, J. (2006) Protein phosphatase 6 down-regulates TAK1 kinase activation in the IL-1 signaling pathway. *J Biol Chem*. **281**, 39891–39896

81. Ziembik, M. A., Bender, T. P., Larner, J. M., and Brautigan, D. L. (2017) Functions of protein phosphatase-6 in NF- κ B signaling and in lymphocytes. *Biochem Soc Trans*. **45**, 693–701

82. Derynck, R., and Zhang, Y. E. (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*. **425**, 577–584

83. Heikkinen, P. T., Nummela, M., Leivonen, S.-K., Westermarck, J., Hill, C. S., Kähäri, V.-M., and Jaakkola, P. M. (2010) Hypoxia-activated Smad3-specific dephosphorylation by PP2A. *J Biol Chem*. **285**, 3740–3749

84. Fujiwara, N., Shibutani, S., Ohama, T., and Sato, K. (2021) Protein phosphatase 6 dissociates the Beclin 1/Vps34 complex and inhibits autophagy. *Biochem Biophys Res Commun*. **552**, 191–195

85. Chou, P.-Y., Lin, S.-R., Lee, M.-H., Schultz, L., Sze, C.-I., and Chang, N.-S. (2019) A p53/TIAF1/WWOX triad exerts cancer suppression but may cause brain protein aggregation due to p53/WWOX functional antagonism. *Cell Commun Signal*. **17**, 76

86. Thakur, N., Hamidi, A., Song, J., Itoh, S., Bergh, A., Heldin, C.-H., and Landström, M. (2020) Smad7 Enhances TGF- β -Induced Transcription of c-Jun and HDAC6 Promoting Invasion of Prostate Cancer Cells. *iScience*. **23**, 101470

87. Xu, Y., Yang, S., Huang, J., Ruan, S., Zheng, Z., and Lin, J. (2012) Tgf- β 1

induces autophagy and promotes apoptosis in renal tubular epithelial cells. *Int J Mol Med.* **29**, 781–790

88. Kim, S. I., Na, H.-J., Ding, Y., Wang, Z., Lee, S. J., and Choi, M. E. (2012) Autophagy promotes intracellular degradation of type I collagen induced by transforming growth factor (TGF)- β 1. *J Biol Chem.* **287**, 11677–11688

89. Ghavami, S., Cunnington, R. H., Gupta, S., Yeganeh, B., Filomeno, K. L., Freed, D. H., Chen, S., Klonisch, T., Halayko, A. J., Ambrose, E., Singal, R., and Dixon, I. M. C. (2015) Autophagy is a regulator of TGF- β 1-induced fibrogenesis in primary human atrial myofibroblasts. *Cell Death Dis.* **6**, e1696

90. Ghavami, S., Cunnington, R. H., Gupta, S., Yeganeh, B., Filomeno, K. L., Freed, D. H., Chen, S., Klonisch, T., Halayko, A. J., Ambrose, E., Singal, R., and Dixon, I. M. C. (2015) Autophagy is a regulator of TGF- β 1-induced fibrogenesis in primary human atrial myofibroblasts. *Cell Death Dis.* **6**, e1696

91. Wang, Z., Sun, Y., Lou, F., Bai, J., Zhou, H., Cai, X., Sun, L., Yin, Q., Tang, S., Wu, Y., Fan, L., Xu, Z., Wang, H., Hu, X., and Wang, H. (2022) Targeting the transcription factor HES1 by L-menthol restores protein phosphatase 6 in keratinocytes in models of psoriasis. *Nat Commun.* **13**, 7815

92. Kennard, S., Liu, H., and Lilly, B. (2008) Transforming growth factor-beta (TGF- 1) down-regulates Notch3 in fibroblasts to promote smooth muscle gene expression. *J Biol Chem.* **283**, 1324–1333

93. Liang, J., Zhou, Y., Zhang, N., Wang, D., Cheng, X., Li, K., Huang, R., Lu, Y., Wang, H., Han, D., Wu, W., Han, M., Miao, S., Wang, L., Zhao, H., and Song, W. (2021) The phosphorylation of the Smad2/3 linker region by nemo-like kinase regulates TGF- β signaling. *J Biol Chem.* **296**, 100512

94. Luo, K., and Lodish, H. F. (1997) Positive and negative regulation of type II TGF-beta receptor signal transduction by autophosphorylation on multiple serine residues. *EMBO J.* **16**, 1970–1981
95. Zhong, J., Liao, J., Liu, X., Wang, P., Liu, J., Hou, W., Zhu, B., Yao, L., Wang, J., Li, J., Stark, J. M., Xie, Y., and Xu, X. (2011) Protein phosphatase PP6 is required for homology-directed repair of DNA double-strand breaks. *Cell Cycle.* **10**, 1411–1419
96. Zou, Y., Zheng, Q., Jiang, B., Liu, Y., Xu, Y., Ma, L., Hu, Z., Wu, M., and Song, H. (2022) Deficiency of PPP6C protects TNF-induced necroptosis through activation of TAK1. *Cell Death Dis.* **13**, 618
97. Kim, S. I., Kwak, J. H., Wang, L., and Choi, M. E. (2008) Protein phosphatase 2A is a negative regulator of transforming growth factor-beta1-induced TAK1 activation in mesangial cells. *J Biol Chem.* **283**, 10753–10763
98. Hayashi, K., Momoi, Y., Tanuma, N., Kishimoto, A., Ogoh, H., Kato, H., Suzuki, M., Sakamoto, Y., Inoue, Y., Nomura, M., Kiyonari, H., Sakayori, M., Fukamachi, K., Kakugawa, Y., Yamashita, Y., Ito, S., Sato, I., Suzuki, A., Nishio, M., Suganuma, M., Watanabe, T., and Shima, H. (2015) Abrogation of protein phosphatase 6 promotes skin carcinogenesis induced by DMBA. *Oncogene.* **34**, 4647–4655
99. Kato, H., Kurosawa, K., Inoue, Y., Tanuma, N., Momoi, Y., Hayashi, K., Ogoh, H., Nomura, M., Sakayori, M., Kakugawa, Y., Yamashita, Y., Miura, K., Maemondo, M., Katakura, R., Ito, S., Sato, M., Sato, I., Chiba, N., Watanabe, T., and Shima, H. (2015) Loss of protein phosphatase 6 in mouse keratinocytes increases susceptibility to ultraviolet-B-induced carcinogenesis. *Cancer Lett.* **365**, 223–228
100. Kishimoto, K., Kanazawa, K., Nomura, M., Tanaka, T., Shigemoto-Kuroda, T., Fukui, K., Miura, K., Kurosawa, K., Kawai, M., Kato, H., Terasaki, K., Sakamoto, Y.,

Yamashita, Y., Sato, I., Tanuma, N., Tamai, K., Kitabayashi, I., Matsuura, K., Watanabe, T., Yasuda, J., Tsuji, H., and Shima, H. (2021) Ppp6c deficiency accelerates K-rasG12D -induced tongue carcinogenesis. *Cancer Med.* **10**, 4451–4464

101. Fukui, K., Nomura, M., Kishimoto, K., Tanuma, N., Kurosawa, K., Kanazawa, K., Kato, H., Sato, T., Miura, S., Miura, K., Sato, I., Tsuji, H., Yamashita, Y., Tamai, K., Watanabe, T., Yasuda, J., Tanaka, T., Satoh, K., Furukawa, T., Jingu, K., and Shima, H. (2022) PP6 deficiency in mice with KRAS mutation and Trp53 loss promotes early death by PDAC with cachexia-like features. *Cancer Sci.* **113**, 1613–1624

102. Manning, B. D., and Toker, A. (2017) AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell.* **169**, 381–405

103. Fruman, D. A., Chiu, H., Hopkins, B. D., Bagrodia, S., Cantley, L. C., and Abraham, R. T. (2017) The PI3K Pathway in Human Disease. *Cell.* **170**, 605–635

104. Gonzalez, E., and McGraw, T. E. (2009) The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle.* **8**, 2502–2508

105. Santi, S. A., and Lee, H. (2010) The Akt isoforms are present at distinct subcellular locations. *Am J Physiol Cell Physiol.* **298**, C580-591

106. Kupriyanova, T. A., and Kandrор, K. V. (1999) Akt-2 binds to Glut4-containing vesicles and phosphorylates their component proteins in response to insulin. *J Biol Chem.* **274**, 1458–1464

107. Tschopp, O., Yang, Z.-Z., Brodbeck, D., Dummler, B. A., Hemmings-Mieszczak, M., Watanabe, T., Michaelis, T., Frahm, J., and Hemmings, B. A. (2005) Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development.* **132**, 2943–2954

108. Vanhaesebroeck, B., and Alessi, D. R. (2000) The PI3K-PDK1 connection:

more than just a road to PKB. *Biochem J.* **346 Pt 3**, 561–576

109. Lučić, I., Rathinaswamy, M. K., Truebestein, L., Hamelin, D. J., Burke, J. E., and Leonard, T. A. (2018) Conformational sampling of membranes by Akt controls its activation and inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **115**, E3940–E3949

110. Truebestein, L., Hornegger, H., Anrather, D., Hartl, M., Fleming, K. D., Stariha, J. T. B., Pardon, E., Steyaert, J., Burke, J. E., and Leonard, T. A. (2021) Structure of autoinhibited Akt1 reveals mechanism of PIP3-mediated activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **118**, e2101496118

111. Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., and Sabatini, D. M. (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science.* **307**, 1098–1101

112. Ramos, A. R., Ghosh, S., and Erneux, C. (2019) The impact of phosphoinositide 5-phosphatases on phosphoinositides in cell function and human disease. *J Lipid Res.* **60**, 276–286

113. Xiao, L., Gong, L.-L., Yuan, D., Deng, M., Zeng, X.-M., Chen, L.-L., Zhang, L., Yan, Q., Liu, J.-P., Hu, X.-H., Sun, S.-M., Liu, J., Ma, H.-L., Zheng, C.-B., Fu, H., Chen, P.-C., Zhao, J.-Q., Xie, S.-S., Zou, L.-J., Xiao, Y.-M., Liu, W.-B., Zhang, J., Liu, Y., and Li, D. W.-C. (2010) Protein phosphatase-1 regulates Akt1 signal transduction pathway to control gene expression, cell survival and differentiation. *Cell Death Differ.* **17**, 1448–1462

114. Millward, T. A., Zolnierowicz, S., and Hemmings, B. A. (1999) Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. *Trends Biochem Sci.* **24**, 186–191

115. Dixon, A. S., Schwinn, M. K., Hall, M. P., Zimmerman, K., Otto, P., Lubben, T. H., Butler, B. L., Binkowski, B. F., Machleidt, T., Kirkland, T. A., Wood, M. G.,

Eggers, C. T., Encell, L. P., and Wood, K. V. (2016) NanoLuc Complementation Reporter Optimized for Accurate Measurement of Protein Interactions in Cells. *ACS Chem Biol.* **11**, 400–408

116. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., Silver, D., Vinyals, O., Senior, A. W., Kavukcuoglu, K., Kohli, P., and Hassabis, D. (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature.* **596**, 583–589

117. Biondi, R. M., Cheung, P. C., Casamayor, A., Deak, M., Currie, R. A., and Alessi, D. R. (2000) Identification of a pocket in the PDK1 kinase domain that interacts with PIF and the C-terminal residues of PKA. *EMBO J.* **19**, 979–988

118. Gordon, M. T., Ziemba, B. P., and Falke, J. J. (2021) Single-molecule studies reveal regulatory interactions between master kinases PDK1, AKT1, and PKC. *Biophys J.* **120**, 5657–5673

119. Alessi, D. R., James, S. R., Downes, C. P., Holmes, A. B., Gaffney, P. R., Reese, C. B., and Cohen, P. (1997) Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol.* **7**, 261–269

120. Dumble, M., Crouthamel, M.-C., Zhang, S.-Y., Schaber, M., Levy, D., Robell, K., Liu, Q., Figueroa, D. J., Minthorn, E. A., Seefeld, M. A., Rouse, M. B., Rabindran, S. K., Heerding, D. A., and Kumar, R. (2014) Discovery of novel AKT inhibitors with enhanced anti-tumor effects in combination with the MEK inhibitor. *PLoS One.* **9**,

e100880

121. Kinoshita, S., Ri, M., Kanamori, T., Aoki, S., Yoshida, T., Narita, T., Totani, H., Ito, A., Kusumoto, S., Ishida, T., Komatsu, H., and Iida, S. (2018) Potent antitumor effect of combination therapy with sub-optimal doses of Akt inhibitors and pomalidomide plus dexamethasone in multiple myeloma. *Oncol Lett.* **15**, 9450–9456

122. Thayyullathil, F., Chathoth, S., Shahin, A., Kizhakkayil, J., Hago, A., Patel, M., and Galadari, S. (2011) Protein phosphatase 1-dependent dephosphorylation of Akt is the prime signaling event in sphingosine-induced apoptosis in Jurkat cells. *J Cell Biochem.* **112**, 1138–1153

123. Kuo, Y.-C., Huang, K.-Y., Yang, C.-H., Yang, Y.-S., Lee, W.-Y., and Chiang, C.-W. (2008) Regulation of phosphorylation of Thr-308 of Akt, cell proliferation, and survival by the B55alpha regulatory subunit targeting of the protein phosphatase 2A holoenzyme to Akt. *J Biol Chem.* **283**, 1882–1892

124. Kim, K., Baek, A., Hwang, J.-E., Choi, Y. A., Jeong, J., Lee, M.-S., Cho, D. H., Lim, J.-S., Kim, K. I., and Yang, Y. (2009) Adiponectin-activated AMPK stimulates dephosphorylation of AKT through protein phosphatase 2A activation. *Cancer Res.* **69**, 4018–4026

125. Calleja, V., Alcor, D., Laguerre, M., Park, J., Vojnovic, B., Hemmings, B. A., Downward, J., Parker, P. J., and Larijani, B. (2007) Intramolecular and intermolecular interactions of protein kinase B define its activation in vivo. *PLoS Biol.* **5**, e95

126. Zhang, Y., and Akhtar, R. A. (1996) Effect of epidermal growth factor on phosphatidylinositol 3-kinase activity in rabbit corneal epithelial cells. *Exp Eye Res.* **63**, 265–275

127. Pinkas-Kramarski, R., Soussan, L., Waterman, H., Levkowitz, G., Alroy, I.,

- Klapper, L., Lavi, S., Seger, R., Ratzkin, B. J., Sela, M., and Yarden, Y. (1996) Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. *EMBO J.* **15**, 2452–2467
128. Kholodenko, B. N., Demin, O. V., Moehren, G., and Hoek, J. B. (1999) Quantification of short term signaling by the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem.* **274**, 30169–30181
129. Kiyatkin, A., Aksamitiene, E., Markevich, N. I., Borisov, N. M., Hoek, J. B., and Kholodenko, B. N. (2006) Scaffolding protein Grb2-associated binder 1 sustains epidermal growth factor-induced mitogenic and survival signaling by multiple positive feedback loops. *J Biol Chem.* **281**, 19925–19938
130. Toyoshima, Y., Kakuda, H., Fujita, K. A., Uda, S., and Kuroda, S. (2012) Sensitivity control through attenuation of signal transfer efficiency by negative regulation of cellular signalling. *Nat Commun.* **3**, 743
131. Kuo, M.-S., Auriiau, J., Pierre-Eugène, C., and Issad, T. (2014) Development of a human breast-cancer derived cell line stably expressing a bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based phosphatidyl inositol-3 phosphate (PIP3) biosensor. *PLoS One.* **9**, e92737
132. Calleja, V., Laguerre, M., Parker, P. J., and Larijani, B. (2009) Role of a novel PH-kinase domain interface in PKB/Akt regulation: structural mechanism for allosteric inhibition. *PLoS Biol.* **7**, e17
133. Phadngam, S., Castiglioni, A., Ferraresi, A., Morani, F., Follo, C., and Isidoro, C. (2016) PTEN dephosphorylates AKT to prevent the expression of GLUT1 on plasmamembrane and to limit glucose consumption in cancer cells. *Oncotarget.* **7**, 84999–85020

134. Jiang, Q., Zhang, X., Dai, X., Han, S., Wu, X., Wang, L., Wei, W., Zhang, N., Xie, W., and Guo, J. (2022) S6K1-mediated phosphorylation of PDK1 impairs AKT kinase activity and oncogenic functions. *Nat Commun.* **13**, 1548
135. Lin, K., Lin, J., Wu, W.-I., Ballard, J., Lee, B. B., Gloor, S. L., Vigers, G. P. A., Morales, T. H., Friedman, L. S., Skelton, N., and Brandhuber, B. J. (2012) An ATP-site on-off switch that restricts phosphatase accessibility of Akt. *Sci Signal.* **5**, ra37
136. Bao, F., Hao, P., An, S., Yang, Y., Liu, Y., Hao, Q., Ejaz, M., Guo, X.-X., and Xu, T.-R. (2021) Akt scaffold proteins: the key to controlling specificity of Akt signaling. *Am J Physiol Cell Physiol.* **321**, C429–C442
137. Nakamura, A., Naito, M., Tsuruo, T., and Fujita, N. (2008) Freud-1/Aki1, a novel PDK1-interacting protein, functions as a scaffold to activate the PDK1/Akt pathway in epidermal growth factor signaling. *Mol Cell Biol.* **28**, 5996–6009
138. Flowers, J. B., Oler, A. T., Nadler, S. T., Choi, Y., Schueler, K. L., Yandell, B. S., Kendzierski, C. M., and Attie, A. D. (2007) Abdominal obesity in BTBR male mice is associated with peripheral but not hepatic insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **292**, E936-945
139. Garnett, C. T., Palena, C., Chakraborty, M., Tsang, K.-Y., Schlom, J., and Hodge, J. W. (2004) Sublethal irradiation of human tumor cells modulates phenotype resulting in enhanced killing by cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res.* **64**, 7985–7994
140. Baharians, Z., and Schönthal, A. H. (1998) Autoregulation of protein phosphatase type 2A expression. *J Biol Chem.* **273**, 19019–19024
141. Hagiwara, K., Yamaguchi, A., Tsuchiya, N., Kitamura, S., Iwadare, J., Sahara, R., Yamamoto, K., and Tokunaga, K. (2001) Identification of genes upregulated in the inflamed colonic lesions of Crohn's disease. *Biochem Biophys Res Commun.* **283**, 130–

142. Jury, R. P., Thibodeau, B. J., Fortier, L. E., Geddes, T. J., Ahmed, S., Pruetz, B. L., Farinola, M. A., and Wilson, G. D. (2012) Gene expression changes associated with the progression of intraductal papillary mucinous neoplasms. *Pancreas*. **41**, 611–618
143. Ivanov, S. V., Goparaju, C. M. V., Lopez, P., Zavadil, J., Toren-Haritan, G., Rosenwald, S., Hoshen, M., Chajut, A., Cohen, D., and Pass, H. I. (2010) Pro-tumorigenic effects of miR-31 loss in mesothelioma. *J Biol Chem*. **285**, 22809–22817
144. Garnett, C. T., Palena, C., Chakraborty, M., Tsang, K.-Y., Schlom, J., and Hodge, J. W. (2004) Sublethal irradiation of human tumor cells modulates phenotype resulting in enhanced killing by cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res*. **64**, 7985–7994
145. Mori, M., Benotmane, M. A., Vanhove, D., van Hummelen, P., Hooghe-Peters, E. L., and Desaintes, C. (2004) Effect of ionizing radiation on gene expression in CD4⁺ T lymphocytes and in Jurkat cells: unraveling novel pathways in radiation response. *Cell Mol Life Sci*. **61**, 1955–1964
146. Wu, N., Liu, X., Xu, X., Fan, X., Liu, M., Li, X., Zhong, Q., and Tang, H. (2011) MicroRNA-373, a new regulator of protein phosphatase 6, functions as an oncogene in hepatocellular carcinoma. *FEBS J*. **278**, 2044–2054
147. Yan, S., Xu, Z., Lou, F., Zhang, L., Ke, F., Bai, J., Liu, Z., Liu, J., Wang, H., Zhu, H., Sun, Y., Cai, W., Gao, Y., Su, B., Li, Q., Yang, X., Yu, J., Lai, Y., Yu, X.-Z., Zheng, Y., Shen, N., Chin, Y. E., and Wang, H. (2015) NF- κ B-induced microRNA-31 promotes epidermal hyperplasia by repressing protein phosphatase 6 in psoriasis. *Nat Commun*. **6**, 7652
148. Han, K.-J., Mikalayeva, V., Gerber, S. A., Kettenbach, A. N., Skeberdis, V. A.,

and Prekeris, R. (2022) Rab40c regulates focal adhesions and PP6 activity by controlling ANKRD28 ubiquitylation. *Life Sci Alliance*. **5**, e202101346

149. Cukuroglu, E., Engin, H. B., Gursoy, A., and Keskin, O. (2014) Hot spots in protein-protein interfaces: towards drug discovery. *Prog Biophys Mol Biol*. **116**, 165–173

150. Mizukoshi, Y., Takeuchi, K., Tokunaga, Y., Matsuo, H., Imai, M., Fujisaki, M., Kamoshida, H., Takizawa, T., Hanzawa, H., and Shimada, I. (2020) Targeting the cryptic sites: NMR-based strategy to improve protein druggability by controlling the conformational equilibrium. *Sci Adv*. **6**, eabd0480

151. Boura-Halfon, S., and Zick, Y. (2009) Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. **296**, E581-591

152. Julien, L.-A., Carriere, A., Moreau, J., and Roux, P. P. (2010) mTORC1-activated S6K1 phosphorylates Rictor on threonine 1135 and regulates mTORC2 signaling. *Mol Cell Biol*. **30**, 908–921

153. Hsiao, K.-C., Ruan, S.-Y., Chen, S.-M., Lai, T.-Y., Chan, R.-H., Zhang, Y.-M., Chu, C.-A., Cheng, H.-C., Tsai, H.-W., Tu, Y.-F., Law, B. K., Chang, T.-T., Chow, N.-H., and Chiang, C.-W. (2023) The B56 γ 3-containing protein phosphatase 2A attenuates p70S6K-mediated negative feedback loop to enhance AKT-facilitated epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer. *Cell Commun Signal*. **21**, 172

154. Sanz-Castillo, B., Hurtado, B., Vara-Ciruelos, D., El Bakkali, A., Hermida, D., Salvador-Barbero, B., Martínez-Alonso, D., González-Martínez, J., Santiveri, C., Campos-Olivas, R., Ximénez-Embún, P., Muñoz, J., Álvarez-Fernández, M., and Malumbres, M. (2023) The MASTL/PP2A cell cycle kinase-phosphatase module restrains PI3K-Akt activity in an mTORC1-dependent manner. *EMBO J*. **42**, e110833

謝辞

本研究および論文の作成を進めるにあたり、懇切なご指導および御助言を頂いた山口大学獣医薬理学研究室 佐藤晃一教授、大浜剛准教授、獣医公衆衛生学研究室 度会雅久教授、獣医臨床病理学研究室 水野拓也教授、鹿児島大学獣医薬理学研究室 宮本篤教授、宇野泰広准教授、獣医生理学研究室 白石光也准教授、岡山理科大学獣医学部創薬学講座 藤原信行講師、山口大学大学院医学系研究科薬理学講座 辻竣也助教に心より厚く感謝の意を表します。

岡山理科大学獣医学部毒性学講座 早川晃司准教授にはES細胞を提供していただきました。奈良女子大学自然科学系生物科学科 渡邊 利雄教授には CreERT-PP6^{flox/flox} MEF 細胞を提供していただき、多くの助言をいただきました。Virginia University の Dr. David Brautigan には PP6c 抗体を提供していただきました。心より厚く感謝の意を表します。

本論文を作成するにあたり懇切なご指導および御助言を頂いた山口大学獣医薬理学教室の皆様、また私を暖かく見守ってくれた夫・幸柳尚規、父・北村敏克、母・北村千恵、妹・山崎理央、弟・北村麟太郎に心より感謝の意を表します。

最後に、本研究で犠牲になった多くの動物たちに深く感謝するとともに、その霊が鎮められるよう心よりお祈り致します。