

AKTシグナルによる細胞初期化促進の分子機構

関田 洋一, 木村 透

1. はじめに

PI3K/AKTシグナル経路は、成長因子やホルモンといった細胞外からの刺激によって活性化して、細胞の増殖、生存、成長、代謝を促進する。これらの作用に加えて、細胞の脱分化や初期化を促進するという興味深い側面も持っている。始原生殖細胞 (primordial germ cell: PGC) は、精子や卵の元となる生殖細胞だが、特定の条件下では脱分化をして、*in vivo*においてはさまざまな組織を含む精巣性テラトーマを形成し、*in vitro*においては多能性を持った胚性生殖細胞 (embryonic germ cell: EG細胞) へと誘導される。また、最終分化した体細胞は、特定の転写因子 (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc: c-Mycは必須ではない) を強制発現させることによってiPS細胞へと初期化される。本稿では、始原生殖細胞の脱分化やiPS細胞の誘導におけるPI3K/AKTシグナル経路の役割を概説する。

2. 背景

細胞が成長因子やサイトカインなどのシグナルを受け取ると、受容体型チロシンキナーゼやGタンパク質共役型受容体を介して、ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ (PI3K) が活性化する¹⁾。PI3Kは細胞膜のリン脂質であるホスファチジルイノシトール4,5-二リン酸 (PIP2) をリン酸化して、ホスファチジルイノシトール3,4,5-三リン酸 (PIP3) に変換する。AKTは、PHドメインを介してPIP3を認識し、細胞膜に集積する。ここで、AKTはPDK1やmTORC2によってリン酸化され、活性化状態になる。活性化AKTは、セリン・トレオニンキナーゼとしてさまざまなタンパク質をリン酸化し、活性を制御する。そして、その下流で、細胞の生存、増殖、代謝、成長などが促進さ

れる。これらの効果に加えて、細胞の脱分化や初期化を促進することもわかってきた (図1)。

PGCの脱分化におけるPI3K/AKTシグナルの役割については、PGC特異的phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (*Pten*) 欠損マウスとAKTの条件的活性化マウスを使って調べられた²⁾。がん抑制に働くことが知られているPTENは、PIP3をPIP2に変換することで、PI3K/AKTシグナルを負に制御している。PGC特異的*Pten*欠損マウスでは、PGCの脱分化が誘導されて、出生後に精巣性テラトーマを高頻度で発症するようになる³⁾。また、*Pten*欠損PGCからは、EG細胞の誘導効率が大幅に上昇する。このことから、PTENは雄の生殖細胞の確立に必須であることが示され、さらにPI3Kの異常な活性化がPGCの脱分化を促進することが示唆された。

さらにAKTを条件的に活性化するマウスによって、PGCにおける活性化AKTの役割が調べられた⁴⁾。このマウスは、ミリスチル化したAKTと改変エストロゲン受容体の融合タンパク質 (AKT-Mer) をトランスジーンとして発現する⁵⁾。AKT-Merは、Merのリガンドであるヒドロキシタモキシフェン (4OHT) の添加により活性化する。このマウスのPGCからEG細胞を誘導する際に、4OHTを投与すると、非投与群に比べて誘導効率が大幅に改善する。さらに、通常のEG細胞誘導法ではSCF, LIF, bFGFの3種類の成長因子が必要となるが、AKT活性化時にはbFGFが必須ではなくなる。このことから、PI3K/AKTシグナル経路がPGCの脱分化で中心的な役割を担っていることがわかる。

iPS細胞の誘導時にも、AKTを活性化すると、初期化効率が改善する。このときAKTは、転写因子のFOXO1をリン酸化して核外に移行させ、解糖系を亢進することで、初期化促進に関わっている⁶⁾。また、iPS細胞の誘導時には、細胞の増殖速度が速い細胞が優先的に初期化されるが、AKTは細胞増殖やアポトーシスを抑制するTPR53や細胞周期チェックポイントに関わるcyclin D, CDKI, p21Cip1, p27Kip1などをリン酸化することで、細胞増殖を促進し、細胞の初期化効率を向上させていると考えられる^{7,8)}。さらに、iPS細胞誘導時には、さまざまなエピジェネティック修飾が変動する。クロマチンリモデリング複合体のNuRDの構成因子、MBD3を阻害するとiPS細胞の誘導効率が劇的に改善する⁹⁾。活性化AKTは、PGCの初期化過程でMbd3の発現を低下させる。このように、AKTは代謝経路やアポ

北里大学理学部生物科学科幹細胞学講座 (〒252-0373 神奈川県相模原市南区北里1-15-1)

Mechanism of promotion of cell reprogramming by AKT signal
Yoichi Sekita and Tohru Kimura (Laboratory of Stem Cell Biology, Department of Biosciences, Kitasato University School of Science, 1-15-1 Kitasato, Minami-ku, Sagamihara-shi, Kanagawa 252-0373, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2023.950066

© 2023 公益社団法人日本生化学会

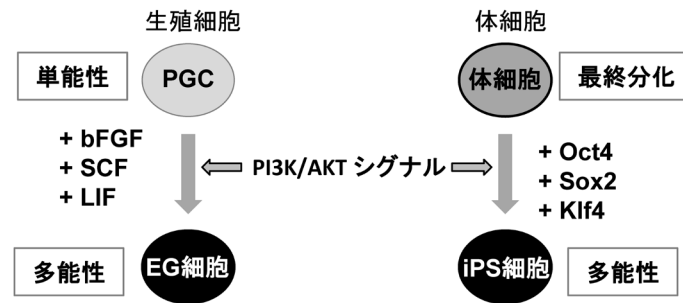


図1 PI3K/AKTシグナル経路による細胞の脱分化，初期化の促進
始原生殖細胞（PGC）からEG細胞を誘導する際や，体細胞からiPS細胞を誘導する際にPI3K/AKTを活性化すると，それぞれ脱分化効率と初期化効率が上昇する。

トースス，細胞増殖，エピジェネティック修飾の制御に関与しながら，細胞の初期化を促進していると考えられる。

3. AKT活性化による代謝リモデリングとエピジェネティックリプログラミングの促進

最近，我々は，AKT活性化による細胞初期化促進の分子メカニズムを調べるため，iPS細胞誘導時にAKTを活性化し，プロテオーム解析，メタボローム解析，トランスクリプトーム解析などを実施した¹⁰⁾。マウス胎仔線維芽細胞（MEF）に初期化因子（Oct4, Sox2, Klf4：OSK）と同時にAKT-Merをレトロウイルスベクターで導入し，導入3日後の継代時に二つに分けて，片方には4OHTを添加してAKT活性化群（OSKA+4OHT），別の片方には溶媒のみを加えてAKT非活性化群（OSKA-4OHT）のコントロールとして両者を比較した（図2A）。MEFには，初期化されるとGFPを発現するもの（Oct4-EGFP MEF：OE-MEF）を用いて，GFP陽性コロニー数によって初期化効率を定量した。遺伝子導入7日後と10日後で，AKT活性化によって初期化効率が大幅に上昇することを確認した。

プロテオーム解析によって，AKT活性化群では発現上昇しているタンパク質の多くが，解糖系，ペントースリン酸経路，脂肪酸代謝，アミノ酸合成といった代謝に関するものであることがわかった。メタボローム解析によっても，解糖系やペントースリン酸経路の代謝産物の産生が亢進していることが確認された。ペントースリン酸経路の代謝物はヌクレオチド合成経路へと入るが，実際に核酸の産生量が上昇していた。また，TCAサイクルの中間代謝産物で，脂肪酸やアミノ酸合成へとつながるクエン酸なども増加していた。これらの結果は，脂肪酸代謝やアミノ酸合成に関わる酵素タンパク質の発現が上昇していたことと合わせて，DNAや細胞膜，アミノ酸といった細胞増殖に必要となる物質の同化経路が促進されていると考えられた。実際に我々はAKT活性化により，細胞増殖が促進していることを確認した。

産生量が上昇していた代謝物の中でも，我々はTCAサイクルの中間代謝産物である α ケトグルタル酸（ α KG）に注目した（図2B）。iPS細胞の誘導過程では，エピジェネティックリプログラミングによって，ゲノム全体のDNAメチル化がいったん消去され，多能性細胞特有のDNAメチル化が再確立される。 α KGはDNA脱メチル化経路の中心的役割を担うTET酵素の補因子として働き，エピジェネティックリプログラミングに重要であると考えられた。DNA脱メチル化過程の最初のステップでは，TETがメチル化シトシン（5mC）を酸化してヒドロキシメチル化シトシン（5hmC）へと変換する。トランスクリプトーム解析で，AKT活性化によりTETの発現量が上昇していることがわかっており，タンパク質量も上昇していることをウェスタンブロットティングにより確認した（図2C）。TETの発現上昇と α KGの産生上昇によるエピジェネティックリプログラミングへの影響を調べるため，ドットプロット法により5hmC量を測定したところ，AKT活性化細胞において，ゲノム中の5hmC量が約4倍に上昇していることが確認された（図2D）。

トランスクリプトーム解析によって，多能性関連遺伝子であるNanog, Zfp42, pri-miR290-295の発現が上昇していたことから，これらのプロモーターとエンハンサー領域のDNAメチル化レベルをバイサルファイトシーケンス法によって調べた。これらの遺伝子は，強力に遺伝子発現を促進するスーパーエンハンサーと呼ばれる制御領域を近傍に持つ。AKT活性化細胞では，スーパーエンハンサーにおいて有意なDNAの低メチル化が誘導されていた。一方，プロモーター領域などでのDNAメチル化レベルは，AKT非活性化コントロールと同レベルであった。

4. α KGの産生亢進とTETの発現上昇の相乗効果によるTET超活性化が細胞初期化を促進する

AKT活性化により， α KGの産生亢進とTETの発現上昇によって，ゲノム全体の5hmC量が上昇していた。このこ

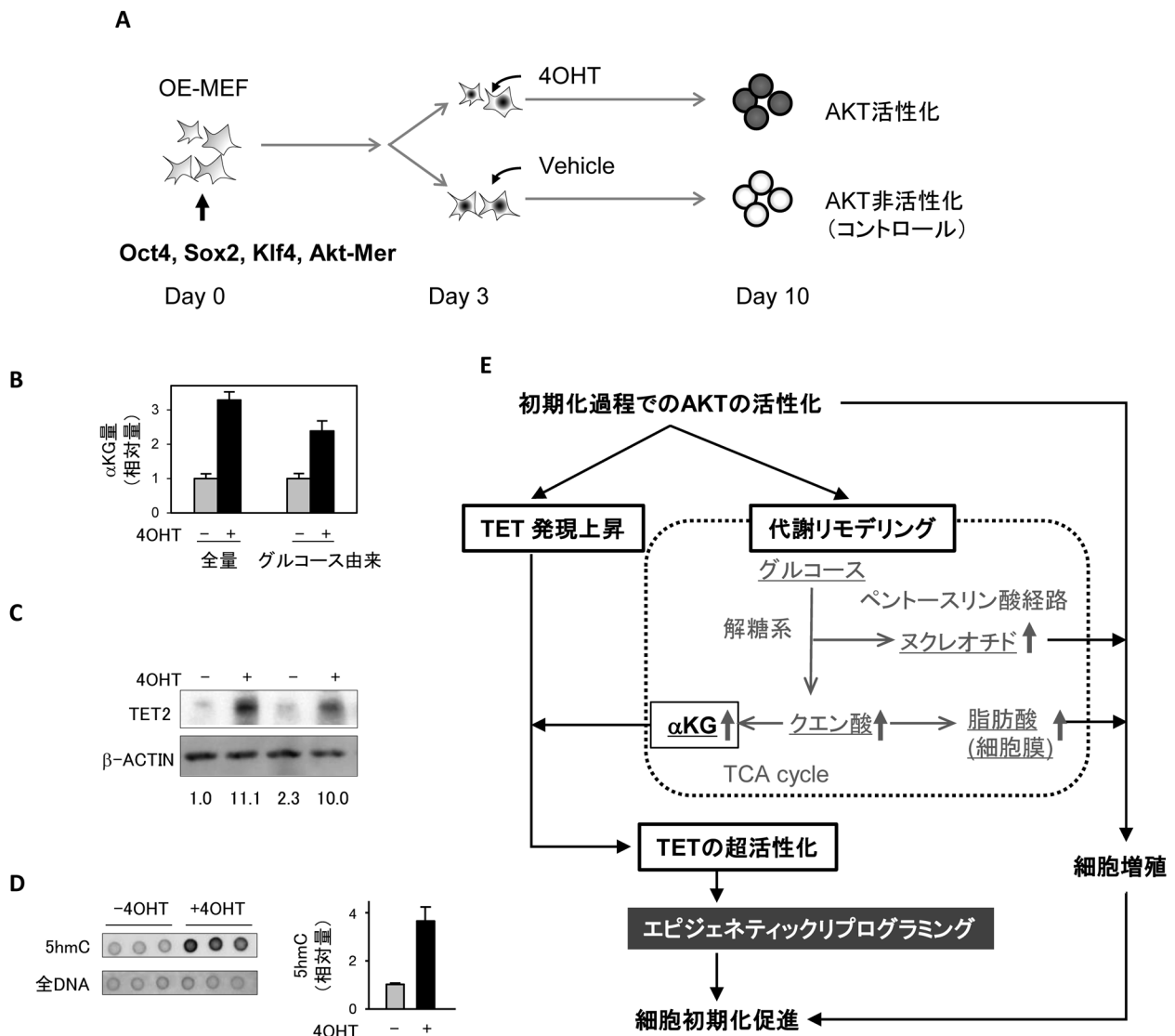


図2 iPS細胞誘導時の活性化AKTによる細胞初期化促進の分子機構

(A) iPS細胞誘導時にMerのリガンドである4OHTを投与することによってAKTを活性化する実験系を構築した。(B) 活性化AKT (4OHT+) により、 α KGの産生量が上昇する。(C) 活性化AKT (4OHT+) によりTET2の発現量がタンパク質レベルで上昇する。(D) 活性化AKT (4OHT+) により、ゲノム全体の5hmC量が上昇する。(E) iPS細胞誘導過程で、活性化AKTはTETの発現上昇と代謝リモデリングを介した α KGの産生上昇を誘導する。これらの相乗効果によってTETの酵素活性が超活性化し、エピジェネティックリプログラミングが促進し、細胞初期化効率率が上昇する。代謝リモデリングによっては、ヌクレオチド合成や脂肪酸合成も亢進し、細胞増殖に必要な分子の供給が増加する。文献10の一部を改変。

と細胞初期化の関係を調べるため、まずAKTを活性化させた状態でTETを抑制する実験を行った(図3A)。この実験では、イソクエン酸から α KGを産生するイソクエン酸脱水素酵素1 (IDH1)の変異体で、 α KGを2-ヒドロキシグルタル酸(2HG)に変換するIDH1-R132Hを、初期化中の細胞に導入した。2HGは、 α KGとは逆にTETの活性を阻害する。IDH1-R132Hによって、活性化AKTによる α KGの産生上昇が抑えられ、その代わりに2HGが顕著に増加、そして5hmC量の上昇は抑制された。このとき、細胞の初

期化はほとんど起こらなかった。

次に、細胞内 α KG産生量を低下させることが知られているアミノトランスフェラーゼ阻害剤(aminoxyacetic acid: AOA)を、初期化中の細胞に投与した(図3B)。AOAの投与量に応じて活性化AKTによる α KGの産生量と5hmC量が抑制され、1 mMの投与では5hmC量は、AKT非活性化細胞と同レベルであった。このとき、細胞の初期化は有意に抑制された。AOAによる細胞初期化の抑制は、細胞膜透過性の α KG誘導體(dimethyl- α KG: DM- α KG)

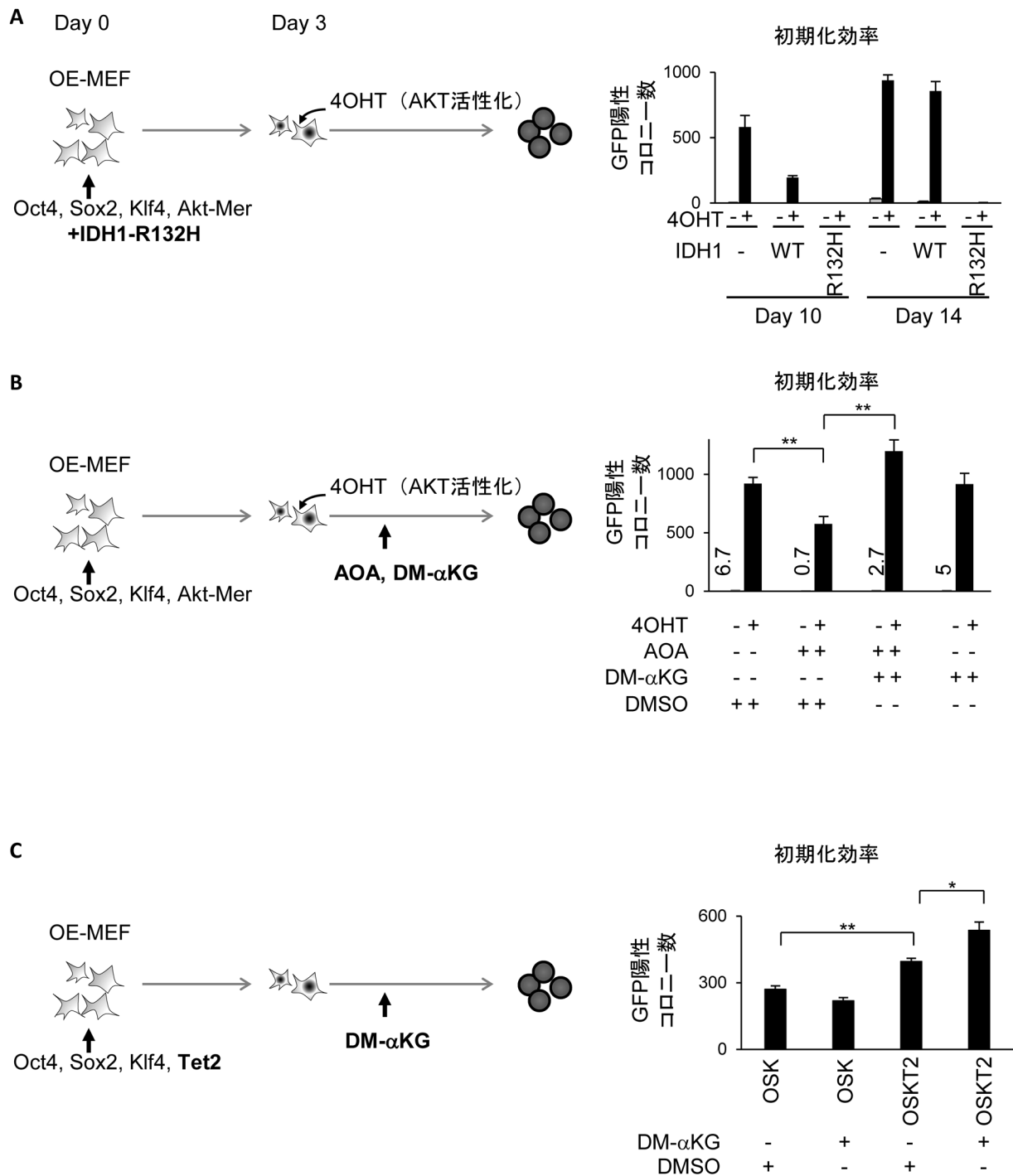


図3 iPS細胞誘導時のTETと α KGによる初期化促進

(A) IDH1-R132Hが産生する2HGによってTETを阻害すると、活性化AKTによる細胞初期化の促進作用は阻害される。(B) AOAによって α KG産生を抑制すると、活性化AKTによる細胞初期化の促進は抑制される。AOAと同時にDM- α KGを投与すると、細胞初期化の促進作用が回復する。(C) AKTを活性化しなくても、TETの過剰発現によって細胞初期化が促進され、DM- α KG投与によってその効果はさらに強まる。文献10の一部を改変。

の投与により回復した。

最後に、AKTを活性化せずに、TETの過剰発現とDM- α KG投与による細胞初期化への影響を調べた(図3C)。以前より、初期化中の細胞でTETを過剰発現させると、初

期化効率が上昇することは知られていた^{11,12)}。OSKに加えてTet2を過剰発現(OSKT2)した場合には、報告どおり初期化効率は向上した。一方、OSK導入細胞にDM- α KGを投与しても、細胞の初期化効りに影響はなかった。

しかし、OSKT2細胞にDM- α KGを投与すると、非投与細胞に比べて初期化効率が有意に上昇した。

以上のことから、細胞の初期化過程でAKTを活性化した細胞では、 α KGの産生亢進とTETの発現上昇の相乗効果によるTETの超活性化が、エピジェネティックリプログラミングを促進し、細胞初期化効率が上昇していることが明らかとなった(図2E)。我々の解析では、活性化AKTによって、グルコース由来の α KGが細胞質で増加していることもわかった(図2C)。細胞質におけるグルコース由来の α KGは二つの経路で産生される。一つは、リンゴ酸-アスパラギン酸シャトルによって、TCAサイクルの中間産物として産生された α KGがミトコンドリアから細胞質へ運び出される経路。もう一つは、TCAサイクルの代謝産物として生成したクエン酸が、ミトコンドリアから細胞質にくみ出され、IDH1などの働きによって α KGに変換される経路である。いずれの経路の場合にも、ミトコンドリアの働きが重要になる。細胞初期化の最初期段階では、OXPHOS burstと呼ばれるミトコンドリアにおける酸化リン酸化が一過的に増大する現象がみられるように、ミトコンドリアの活性が重要だと考えられている¹³⁾。我々の結果は、ミトコンドリアの活性化が、 α KGの産生亢進でも重要であることを示している。

AKTとTETの関係については、次のようなことが知られている。*Tet1*と*Tet2*遺伝子のスーパーエンハンサーにはOCT4結合サイトが存在する¹⁴⁾。AKTは、OCT4を直接リン酸化することで活性化する¹⁵⁾。これらのことから、活性化AKTは、初期化因子として導入されたOCT4の活性化を介して、TETの発現上昇を誘導している可能性が考えられる。今後は、AKTシグナル経路がどのように α KGの産生を亢進させるのか、また、TETの発現を上昇させるのか、これらの詳細な分子メカニズムの解明が望まれる。

5. おわりに

PI3/AKTシグナル経路は、細胞の生存、増殖、代謝、成長を促進するので、生理的に重要な役割を担っている。同時に、異常な活性化によってがん化を引き起こすなど、病態生理とも密接に関わっている。ここで概説したような活性化AKTによる代謝経路のリモデリングを伴ったエピジェネティックリプログラミングの促進が、病態とどのように関わっているのかを解明することが重要になるだろう。

文 献

- Manning, B.D. & Toker, A. (2017) AKT/PKB signaling: Navigating the network. *Cell*, **169**, 381–405.
- Sekita, Y., Nakamura, T., & Kimura, T. (2016) Reprogramming of germ cells into pluripotency. *World J. Stem Cells*, **8**, 251–259.
- Kimura, T., Suzuki, A., Fujita, Y., Yomogida, K., Lomeli, H., Asada, N., Ikeuchi, M., Nagy, A., Mak, T.W., & Nakano, T. (2003) Conditional loss of PTEN leads to testicular teratoma and enhances embryonic germ cell production. *Development*, **130**, 1691–1700.
- Kimura, T., Tomooka, M., Yamano, N., Murayama, K., Matoba, S., Umehara, H., Kanai, Y., & Nakano, T. (2008) AKT signaling promotes derivation of embryonic germ cells from primordial germ cells. *Development*, **135**, 869–879.
- Watanabe, S., Umehara, H., Murayama, K., Okabe, M., Kimura, T., & Nakano, T. (2006) Activation of Akt signaling is sufficient to maintain pluripotency in mouse and primate embryonic stem cells. *Oncogene*, **25**, 2697–2707.
- Yu, Y., Liang, D., Tian, Q., Chen, X., Jiang, B., Chou, B., Hu, P., Cheng, L., Gao, P., Li, J., et al. (2014) Stimulation of somatic cell reprogramming by ERas-Akt-FoxO1 signaling axis. *Stem Cells*, **32**, 349–363.
- Krizhanovsky, V. & Lowe, S.W. (2009) Stem cells: The promises and perils of p53. *Nature*, **460**, 1085–1086.
- Hanna, J., Saha, K., Pando, B., van Zon, J., Lengner, C.J., Creighton, M.P., van Oudenaarden, A., & Jaenisch, R. (2009) Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature*, **462**, 595–601.
- Rais, Y., Zviran, A., Geula, S., Gafni, O., Chomsky, E., Viukov, S., Mansour, A.A., Caspi, I., Krupalnik, V., Zerbib, M., et al. (2013) Deterministic direct reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Nature*, **502**, 65–70.
- Sekita, Y., Sugiura, Y., Matsumoto, A., Kawasaki, Y., Akasaka, K., Konno, R., Shimizu, M., Ito, T., Sugiyama, E., Yamazaki, T., et al. (2021) AKT signaling is associated with epigenetic reprogramming via the upregulation of TET and its cofactor, alpha-ketoglutarate during iPSC generation. *Stem Cell Res. Ther.*, **12**, 510.
- Gao, Y., Chen, J., Li, K., Wu, T., Huang, B., Liu, W., Kou, X., Zhang, Y., Huang, H., Jiang, Y., et al. (2013) Replacement of Oct4 by Tet1 during iPSC induction reveals an important role of DNA methylation and hydroxymethylation in reprogramming. *Cell Stem Cell*, **12**, 453–469.
- Di Stefano, B., Sardina, J.L., van Oevelen, C., Collombet, S., Kallin, E.M., Vicent, G.P., Lu, J., Thieffry, D., Beato, M., & Graf, T. (2014) C/EBP α poises B cells for rapid reprogramming into induced pluripotent stem cells. *Nature*, **506**, 235–239.
- Kida, Y.S., Kawamura, T., Wei, Z., Sogo, T., Jacinto, S., Shigeno, A., Kushige, H., Yoshihara, E., Liddle, C., Ecker, J.R., et al. (2015) ERRs mediate a metabolic switch required for somatic cell reprogramming to pluripotency. *Cell Stem Cell*, **16**, 547–555.
- Sohni, A., Bartocetti, M., Khoueiry, R., Spans, L., Vande Velde, J., De Troyer, L., Pulakanti, K., Claessens, F., Rao, S., & Koh, K.P. (2015) Dynamic switching of active promoter and enhancer domains regulates Tet1 and Tet2 expression during cell state transitions between pluripotency and differentiation. *Mol. Cell. Biol.*, **35**, 1026–1042.
- Malak, P.N., Dannemann, B., Hirth, A., Rothfuss, O.C., & Schulze-Osthoff, K. (2015) Novel AKT phosphorylation sites identified in the pluripotency factors OCT4, SOX2 and KLF4. *Cell Cycle*, **14**, 3748–3754.

著者寸描**●関田 洋一**（せきた よういち）

北里大学理学部生物科学科幹細胞学講座 准教授. 博士（理学）.

■**略歴** 2001年東京工業大学生命理工学部卒業. 03年同大学院修士課程修了. 06年同大学院博士課程修了. 東京医科歯科大学, ケンブリッジ大学, 大阪大学を経て, 14年より現職.

■**研究テーマと抱負** エピゲノム編集技術を使って, エピジェネティクスが本当に重要なのかを知りたい.

■**趣味** 農作業, 釣り.