



細胞の生き残り戦略: Aktのシグナルカスケード

A Strategy for Survival: The Akt Signaling Cascade

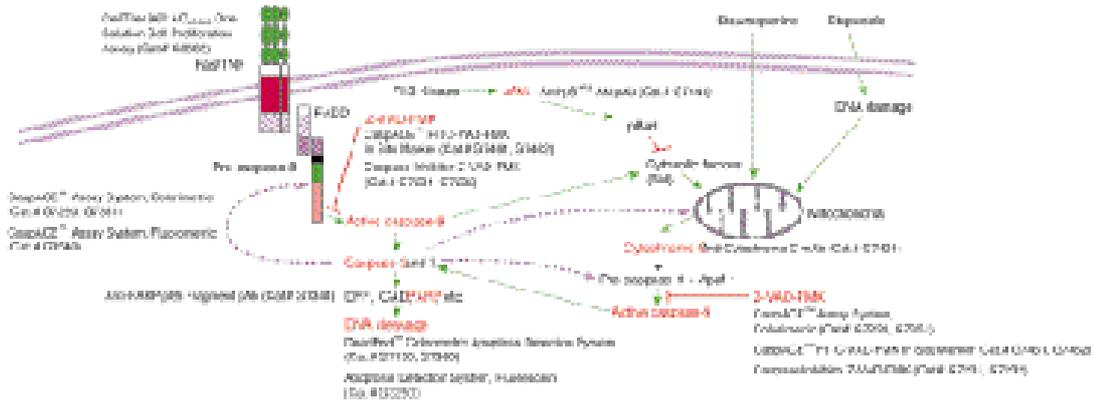


図1 アポトーシス/生存のモデル系

この図は抗アポトーシスに関する事象における Akt の役割を表している。関連したプロモガ製品を紹介している。これは Sun, X.M. et al. (1999) J. Biol. Chem. 274, 5053 に記載されている図に加筆した。

この10年間にアポトーシスの多様な経路の解明を目的とした研究に大きな進歩がありました。このように、細胞の生死の繊細なバランスを今後理解していくには、細胞が生き残るための経路を解明することが重要です。アポトーシスを抑制するためのイベントを制御する重要な酵素のひとつはプロテインキナーゼ Akt です。この酵素によって仲介されるシグナルカスケードを理解することで、細胞の生の維持と死に関する新たな知見が得られます。

はじめに

protein kinase B (PKB) または protein kinase related to protein kinase A and C (RAC-PK) とも呼ばれる Akt は多くの細胞種の生存を促進する重要な因子として現れます。Akt はアポトーシスを抑制するための事象を制御するシグナリングカスケードに関連したセリン・スレオニンキナーゼです。最近の実験結果では、Akt は変性疾患や癌の病原に重要な役割を担っていることが示唆され、細胞の研究の中心に位置するようになってきました。図1では生存の促進やアポトーシスの制御に関連した重要な事象を表しています。

Aktの基質

近年、多数の Akt の基質が報告されています。最初に同定されたのは Bcl-2 ファミリーのプレアポトーシスタンパク質である Bad です。リン酸化されていない Bad はアポトーシスを抑制する Bcl-2 分子に結合して、その機能を阻害します。その他の Akt の直接的な標的は哺乳類の転写因子であるフォークヘッドに関連した一群です。これらはリン酸化されると、細胞質に留まり、転写に関わることができなくなります。もうひとつの特徴的な Akt の基質はアポトーシスを引き起こすプロテアーゼ Caspase-9 です。Akt によってリン酸化された Caspase-9 はプロテアーゼ活性を直接阻害されるため、アポトーシスは抑制されます。

Akt は C 末端付近のセリン残基 S⁴⁷³ がリン酸化されることで活性化されます。この S⁴⁷³ のリン酸化は、Akt の調節やその活性の維持のために重要です。Akt の活性は外から基質を加えて測定することができませんが、Western 解析や活性化された Akt の局在を確認するには、Akt の第1リン酸化部位に対する特異的な抗体が非常に有効です。

Akt に特異的な新しい抗体

図2のパネルAは、プロモガの新しい Anti-pS⁴⁷³ Akt pAb (カタログ番号 G7441) を PDGF で刺激したマウス NIH3T3 の細胞溶解液に用いています。リン酸化された Akt との選択的かつ特異的な結合が示されました。一方、刺激を加えていないために、Akt がリン酸化されていない細胞の溶解液ではなにも検出されていません。対照試験として行われた図2のパネルBでは、pan-Akt pAb によって両方の細胞溶解液で total Akt の存在を示します。他メーカーのリン酸化特異的 Akt 抗体とは異なり、プロモガの Anti-pS⁴⁷³ Akt pAb は免疫染色にも使うことができます。図3のパネルAとパネルBは human Jurkat cell と rat neurosphere 初代培養細胞での免疫染色を表しています。このように、Anti-pS⁴⁷³ Akt pAb は Akt リン酸化ドメインに対して高い特異性を示しているだけでなく、種間での交差反応性にも優れていることがわかります。

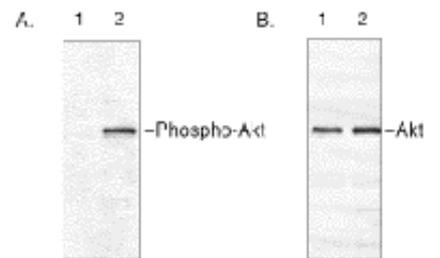


図2 Anti-pS⁴⁷³ Akt pAb を用いたウェスタンブロットによるリン酸化 Akt の検出
パネルA: NIH3T3 の細胞抽出液 (1 レーンあたり 10µg) をポリアクリルアミドゲル電気泳動で解析し、ニトロセルロースメンブランにブロットした。
レーン1: 無処理の細胞、レーン2: 50ng/ml の PDGF で20分間の前処理した細胞。
Anti-pS⁴⁷³ Akt pAb (カタログ番号 G7441) を2,500倍希釈で使用した。Donkey Anti-Rabbit IgG(H+L), HRP, Anti-ACTIVE[®] Qualified pAb (カタログ番号 V7951) を10,000倍希釈で使用し、化学発光で検出した。
パネルB: pan-Akt pAb (New England Biolabs) を用いて処理および無処理の NIH3T3 の細胞抽出液における total Akt を検出した。2次抗体と検出方法はパネルAと同じ方法を使った。

要約

プロモガでは生存の促進やアポトーシスを制御する個々の事象を研究するための一連の試薬を販売しています。プロモガの新しいリン酸化特異的抗体 "Anti-pS⁴⁷³ Akt pAb" を使うことで、細胞が生存するための経路における新しい知見が得られます。

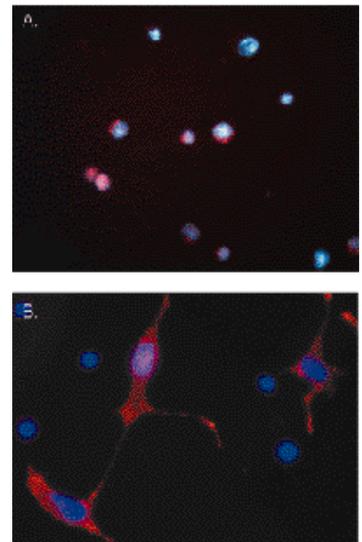


図3 リン酸化された Akt の免疫細胞染色
パネルA: Human Jurkat cell を回収、洗浄し、4% paraformaldehyde 処理を30分間行って poly-L-lysine コートしたスライドに固定した。染色の前に、0.2% Triton[®] X-100 で浸透処理し、5% donkey serum でブロッキングを行った。Anti-pS⁴⁷³ Akt pAb を50倍希釈で用いた。陽性反応を示す細胞を500倍希釈した2次抗体 Donkey Anti-Rabbit, Cy3[™]-conjugated で可視化した。核は DAPI で染色した。
パネルB: rat 胎児 (17日目) の脳細胞を回収し、20ng/ml の EGF と FGF を含む NB27 培地で培養し、EHS コートした Lab-Tek[®] II チャンバースライドにプレートした。固定した細胞はパネルAと同じ処理を行った。