

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18397

研究課題名(和文)p53によるアミノ酸代謝制御機構の解析

研究課題名(英文)Dissection of p53-mediated amino acid metabolism

研究代表者

宮本 崇史(Miyamoto, Takafumi)

東京大学・医科学研究所・特任助教

研究者番号：50740346

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で、我々はp53がアルギニノコハク酸合成酵素ASS1の発現制御を介して、アミノ酸の一つであるアルギニンの生合成経路を制御していることを見出しました。さらにp53によるASS1の発現制御は、がん遺伝子産物であるAktの活性レベルのコントロールに重要な役割を担っていることを明らかにしました。またがん細胞内のアルギニン生合成経路を制御することで、既存の抗がん剤の効果が増強される事が示されました。

本研究はp53による代謝制御メカニズムの一端を紐解いたもので、がん細胞内の栄養状態の理解や有効ながん治療法の開発に向けた重要な一歩であると考えられています。

研究成果の概要(英文)：Here, we show that Argininosuccinate synthase 1 (ASS1), a citrulline-aspartate ligase in de novo arginine synthesis pathway, was directly transactivated by p53 in response to genotoxic stress, resulting in the rearrangement of arginine metabolism. Analyses of ASS1-deficient cells generated using the CRISPR-Cas9 system revealed that ASS1 plays a pivotal role in limiting Akt phosphorylation. In addition, aberrant activation of Akt resulting from ASS1 loss disrupted Akt-mediated cell survival signaling activity under genotoxic stress. Building on these results, we demonstrated that p53 induced an intrinsic Akt repressor, ASS1, and the perturbation of ASS1 expression rendered cells susceptible to genotoxic stress. Our findings uncover a new function of p53 in the regulation of Akt signaling and how p53, ASS1, and Akt are interrelated to each other.

研究分野：分子生物学

キーワード：ASS1 p53 Akt アルギニン

1. 研究開始当初の背景

転写因子 p53 は最も有名ながん抑制遺伝子産物であり、多くの遺伝子の発現誘導を通して、様々な細胞機能を制御していることが知られている。近年特に p53 による代謝制御が、がんを抑制する上で中心的な役割を担っていることが明らかにされてきているが、p53 による代謝制御メカニズムの全容は未だ十分に理解されていない。

2. 研究の目的

本研究では p53 によって制御されている遺伝子を網羅的に同定し、p53 による代謝制御メカニズムの全容解明を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) p53 標的遺伝子の網羅的探索

HCT116 ヒト由来大腸がん細胞株の内、p53 を有する細胞株 (p53^{+/+}) と有さない細胞株 (p53^{-/-}) を、抗がん剤の一種で p53 を活性化させるアドリアマイシンで処理し、経時的 (アドリアマイシン処理から 0, 12, 24, 48 時間後) に細胞を回収した。その後、これら細胞内における messenger RNA (mRNA) とタンパク質の発現レベルをそれぞれトランスクリプトーム解析とプロテオーム解析を用いて解析し、p53 依存的に発現レベルが変化している mRNA およびタンパク質を探索した。

(2) p53 によるアルギニノコハク酸合成酵素 1 (ASS1) の活性変化に対する検討

ASS1 はシトルリンとアスパラギン酸からアルギニノコハク酸を合成する代謝酵素である。p53 による ASS1 の発現誘導がアルギニノコハク酸の合成を促進するかどうかを検討するため、アルギニノコハク酸を合成する過程で産生される代謝副産物の量を比色法によって検定した。

(3) マウスにおける ASS1 の発現誘導の解析

p53 を有する正常なマウス (p53^{+/+} マウス) と p53 を有さないマウス (p53^{-/-} マウス) に X 線 (10 Gy) を全身に照射し、24 時間後に様々な組織を摘出し、ASS1 の発現誘導がどういった組織で起こるかを RNA シークエンス解析によって検討した。

(4) p53-ASS1 経路によって制御されている細胞機能の検討

p53 が ASS1 を発現誘導し、細胞内の代謝を変化させることで、細胞内のシグナル伝達系がどのように変化するか、そしてその結果、どういった細胞機能が実行されるのかについて検討を行った。細胞内シグナル伝達系についてはウェスタンブロッティング法によってタンパク質の発現レベルやリン酸化レベルの検討を行った。細胞機能の解析については、フローサイトメトリーや細胞生存率ア

ッセイによってアポトーシスへの影響を検討した。

(5) Ass1 のステータスと X 線照射の検討

正常なマウスと Ass1 ヘテロノックアウトマウスに X 線を 10 Gy 照射し、その後の生存に違いがどうかどうかを検討した。

4. 研究成果

(1) 新規 p53 標的遺伝子として ASS1 を同定

HCT116 細胞を用いたトランスクリプトーム解析では 22,276 遺伝子を対象として解析を行い、アドリアマイシン処理後 12, 24, 48 時間後にそれぞれ p53 依存的に発現が増加するものとして 79, 295, 203 遺伝子を同定した。プロテオーム解析では 3,342 タンパク質を対象として解析を行い、アドリアマイシン処理後 12, 24, 48 時間後にそれぞれ p53 依存的に発現が増加するものとして 36, 82, 72 タンパク質を同定した。トランスクリプトーム解析とプロテオーム解析で共通して p53 依存的な発現誘導が認められたものは 7 遺伝子で、その内の 1 つが ASS1 であった。

p53 の結合部位は ASS1 遺伝子のイントロン 1 にあることをルシフェラーゼアッセイやクロマチン免疫沈降アッセイによって確認した。また p53 のノックダウンや過剰発現の実験を通して、ASS1 の発現誘導が p53 依存的であることを確認した。

(2) p53 は ASS1 の発現誘導を介してアルギニン代謝経路を制御している

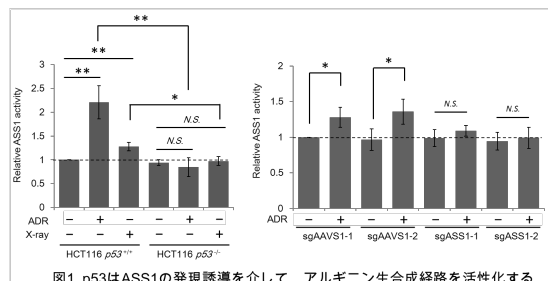


図1. p53はASS1の発現誘導を介して、アルギニン生合成経路を活性化する

ASS1 はアルギニン生合成経路における律速酵素であり、ASS1 によって合成されたアルギニノコハク酸はアルギニノコハク酸リアーゼによって速やかにアルギニンへと代謝される。そこで p53 による ASS1 の発現誘導がアルギニン生合成経路を活性化するかどうかを検討するために HCT116 p53^{+/+} 細胞と p53^{-/-} 細胞をアドリアマイシンで処理し、それぞれにおける ASS1 の活性を比色法によって測定した。その結果、アドリアマイシンで処理した HCT116 p53^{+/+} 細胞でのみ、アルギニン生合成経路の活性化が認められた (図 1 左側)。この HCT116 p53^{+/+} 細胞で観察された結果は p53 による ASS1 の発現誘導によるものなのかどうかを検討するために、CRISPR-Cas9 システムによるゲノム編集により、ASS1 欠損細胞 (sgASS1) を樹立し、同様な検討を行った。その結果、コントロールとなる正常細胞 (sgAAVS1) と比べて、

ASS1 欠損細胞ではアドリマイシン処理後のアルギニン生合成経路の活性化が認められなかった (図 1 右側)。以上の結果から、p53 は ASS1 の発現誘導を介してアルギニン生合成経路を活性化していることが明らかになった。

(3) X線照射はAss1の発現誘導を全身で引き起こす

X線照射によって全身で p53 を活性化した場合、どういった組織で Ass1 の発現が誘導されるかを p53^{+/+}マウスと p53^{-/-}マウスを用いて検討した。その結果、胸腺、骨、脾臓、卵巣、心臓、骨髄、小腸、食道、肺、大腸、舌、眼球において p53 依存的な発現上昇が認められた。一方、肝臓においては p53 依存的な発現抑制が観察された。いずれの組織においても p53 依存的な p21/Cdkn1a (p53 の最も有名な標的遺伝子) の発現誘導が認められている。

(4) ASS1 は内因性の Akt 抑制因子である

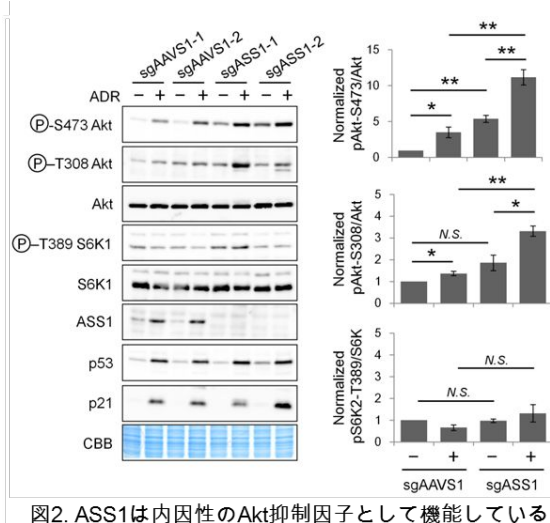


図2. ASS1は内因性のAkt抑制因子として機能している

p53 による ASS1 発現誘導の生理的意義を明らかにするために、細胞内シグナル伝達系でリン酸化が変動するシグナル因子の探索を行った。その結果、細胞をアドリマイシンで処理した場合、ASS1 欠損細胞では多くのシグナル因子が活性化していることが知られている。Akt のリン酸化レベル (特に 473 番目のセリン) が亢進していることがわかった。この Akt のリン酸化レベルの亢進は、通常培養条件下においても ASS1 欠損細胞で認められたことから、ASS1 は内因性の Akt 抑制因子であることが示唆された (図 2)。

ASS1 はアルギニン生合成経路における律速酵素であることから、ASS1 欠損細胞では、細胞内でアルギニンを生合成することができない。そこで、Akt のリン酸化レベルの亢進はアルギニンが欠乏することによるものではないかと考え、細胞をアルギニン欠乏培地で培養した。その結果、Akt のリン酸化レベルはアルギニン欠乏条件下で著しく亢進することがわかった。

さらにアドリマイシンで ASS1 欠損細胞を処理した場合、コントロール細胞と比べてアポトーシスが著しく亢進することがわかった。ASS1 欠損細胞に ASS1 を戻したり、培地にアルギニンを多く添加すると、こうしたアウトプットが抑制されることから、p53 による ASS1 の発現誘導はアドリマイシンに対する感受性を決定するうえで重要な役割を担っていることが示唆された。

Akt は様々な条件下で細胞を生存させるシグナルを出していることが知られているが、Akt のリン酸化レベルが大きく亢進し、活性レベルが高くなると、逆に細胞死を誘導することが報告されている。実際、ASS1 欠損細胞を Akt 阻害剤で処理すると、アドリマイシンによる細胞死が抑制されることがわかった。

以上の結果から、p53 は ASS1 の発現誘導を介して Akt の活性レベルに対して抑制的に働いていることが示唆された。p53 はこれまでに PTEN や PHLDA3 の発現誘導を介して Akt の活性レベルを抑制していることが報告されており、今回我々はこれら 2 つに加えて ASS1 も p53 による Akt の活性制御において重要な役割を担っていることを明らかにした。

(5) Ass1 は X線に対する感受性を決定する

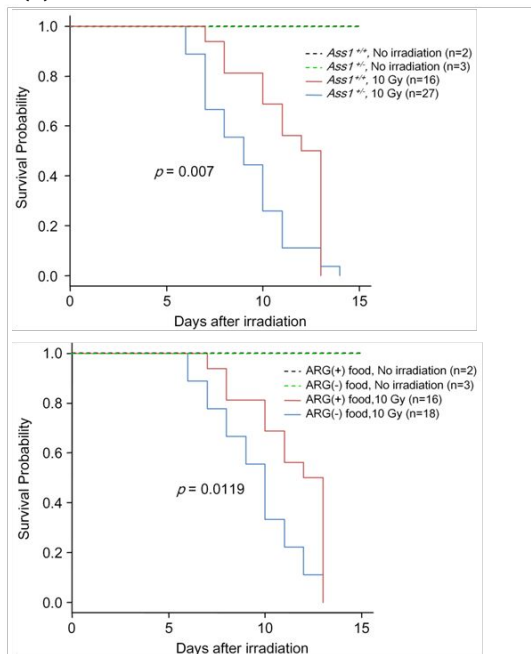


図3. Ass1とアルギニンはX線に対する感受性に影響する

最後に正常マウスと Ass1 ヘテロノックアウトマウスに X 線を照射し、その後の生存期間を比較検討したところ、Ass1 ヘテロノックアウトマウスの方が早く死ぬ傾向にあることがわかった (図 3 上)。さらにその原因の 1 つとして、小腸における消化管障害が考えられた。また、正常マウスであっても、食餌からアルギニンを抜いた場合、Ass1 ヘテロノックアウトマウス同様に早く死ぬことがわかった (図 3 下)。Ass1 ヘテロノックアウトマウス

ウスの食餌からアルギニンも抜いてもX線照射後の生存期間には影響を与えないことがわかった。以上の結果から、Ass1の遺伝的ステータスや食餌中のアルギニン量はX線の感受性を決定するうえで重要な要因であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

(1) Miyamoto T, Lo PHY, Saichi N, Ueda K, Hirata M, Tanikawa C, Matsuda K. "Argininosuccinate synthase 1 is an intrinsic Akt repressor transactivated by p53." *Sci Adv.* e1603204, 2017.

〔学会発表〕(計2件)

(1) Takafumi Miyamoto et al. 『Integrated OMICS analysis identifies ASS1 as a novel p53 target that modulates Akt signaling』、第39回日本分子生物学会年会、横浜、2016年12月

(2) Takafumi Miyamoto et al. 『Integrated OMICS analysis identifies ASS1 as a novel p53 target that modulates Akt signaling』、第75回日本癌学会学術総会、横浜、2016年10月

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://square.umin.ac.jp/matsudalab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮本 崇史 (MIYAMOTO, Takafumi)
東京大学・医科学研究所・特任助教

研究者番号：50740346

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし