

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18432

研究課題名(和文)新規ワールブルグ効果制御物質の作用機序解明

研究課題名(英文)The mechanism of action of a novel small molecule that represses the Warburg effect

研究代表者

小林 大貴(Kobayashi, Hiroki)

国立研究開発法人理化学研究所・吉田化学遺伝学研究室・協力研究員

研究者番号：30528683

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ワールブルグ効果として知られるがん細胞の解糖系優位の代謝はがんの急速な増殖や悪性化に関与することが知られるが、その制御機構の全容は不明な点が多い。本研究ではがん細胞の代謝を制御する新規薬剤の作用機序を細胞内外の代謝解析・生化学・遺伝学的手法で解明した。その結果、がんの代謝を制御する新たな制御機構を見出すことができた。

研究成果の概要(英文)：The Warburg effect, a metabolic derangement in cancer cells resulting in increased glucose uptake and glycolysis, is considered as a malignant phenotype. However, the mechanism regulating the Warburg effect has remained elusive. We had identified a novel compound that inhibits the Warburg effect by phenotypic screening. In this study, we elucidated the mode of action of the compound by using metabolomic, biochemical and genetic approach. As a result, we identified the target molecule of the compound, and uncovered the mechanism regulating the balance between glycolysis and oxidative phosphorylation.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：ワールブルグ効果 代謝 ケミカルバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

ワールブルグ効果として知られるがん細胞の解糖系優位の代謝はがんの急速な増殖や悪性化に関わり、ゲノム変異やエピゲノム異常、環境応答によって引き起こされることがわかってきたが、その制御機構の全容は不明である。一方、研究代表者は以前の研究で新規の代謝制御物質 (CG56618) を取得している。CG56618 は呼吸を活性化させ、解糖系流束を低下させる。CG56618 の作用機序を解明することで「ワールブルグ効果がどのように制御されているか」に迫れると考えられた。

2. 研究の目的

(1) ワールブルグ効果制御物質 CG56618 が細胞内のどの分子に作用し代謝を制御するのかを解明する

(2) CG56618 の標的分子がどのようにワールブルグ効果を制御するのかを明らかにする

(3) CG56618 の標的分子のがん治療ターゲットとしての有効性を検証する

3. 研究の方法

細胞内代謝を解析するために細胞外フラックスアナライザーを用いて酸素消費速度 (OCR) および細胞外酸性化速度 (ECAR) を測定した。また細胞内代謝物を質量分析で測定 (メタボローム解析) した。細胞内シグナル伝達を調べるためにウェスタンブロットを用いた。遺伝学的解析には CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を用いた。

4. 研究成果

(1) CG56618 が細胞内代謝に与える影響

CG56618 の標的分子同定のための手掛かりを得るためにメタボローム解析を行った。その結果、CG56618 の添加により解糖系上流の代謝物 glucose 6-phosphate および fructose 6-phosphate (F6P) が増加した一方で fructose 1,6-bisphosphate (FBP) は減少した (図 1) ことから、CG56618 の添加により PFK1 (F6P をリン酸化し FBP を生成する酵素) が阻害される可能性が示唆された。

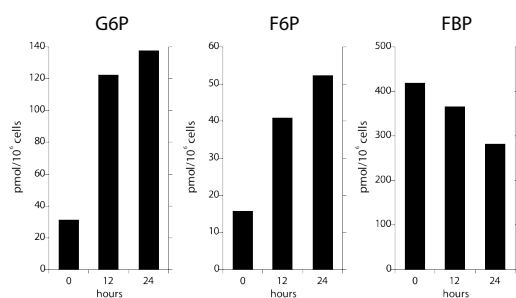


図 1. CG56618 が解糖系上流代謝物の量に与える変化 CG56618 を細胞に添加して 0、12、24 時間後に細胞内代謝物を抽出した。その後

抽出物を質量分析により定量した。データは CG56618 を添加して 0、12、24 時間後の G6P、F6P、FBP の量を示す。

(2) CG56618 が解糖系律速酵素 PFK1 に与える影響

PFK1 には PFKM、PFKP、PFKL の 3 つのアイソフォームが存在する。CG56618 が PFK1 の活性を阻害する可能性について検討するため、3 つのアイソフォームすべてをリコンビナントタンパク質として調製し、その酵素活性に与える影響を検討した。その結果、CG56618 はすべてのアイソフォームの酵素活性を阻害し (図 2)、その阻害様式は ATP 不競合、F6P 競合的であることを明らかにした。

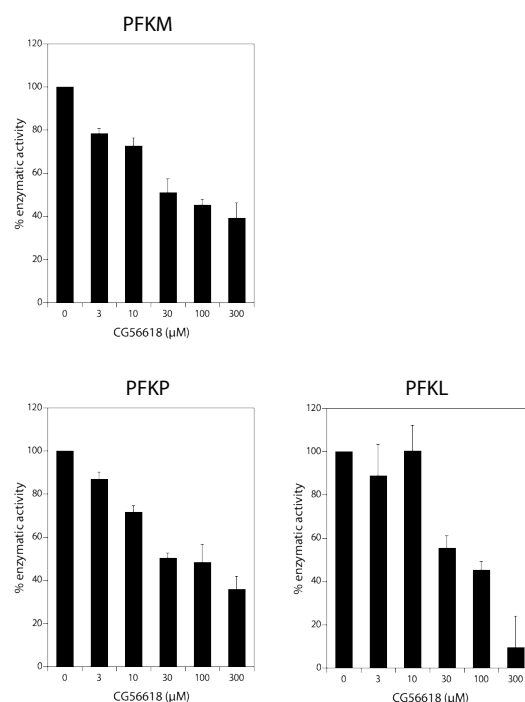


図 2. CG56618 が PFK1 酵素活性に与える影響 PFKM、PFKP、PFKL をそれぞれリコンビナントタンパク質として調製し、CG56618 存在下での PFK 活性を測定した。PFK 活性は ADP-Glo (Promega) により検出した。

つぎに CG56618 は細胞内でも PFK1 を阻害することで代謝を制御するのかを調べるために PFK1 ノックアウト細胞を作製した。その結果 PFKP および PFKL がノックアウトされ、PFKM は部分的に編集された細胞が得られた (図 3a)。これらの細胞は PFK1 野生型の細胞に CG56618 を添加したときと同じ様に酸化リン酸化の代謝に傾いていることがわかった (図 3b)。また PFK1 ノックアウト細胞は CG56618 を添加してもそれ以上代謝変化がおきないことから CG56618 は細胞レベルで PFK1 を介して代謝を制御することが明らかとな

った (図 4)。

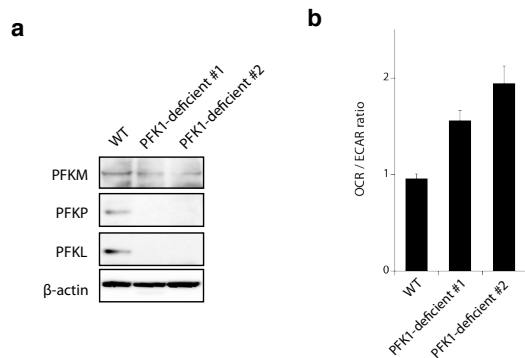


図 3. PFK1 ノックアウト細胞の代謝 (a)CRISPR/Cas9 によるゲノム編集で得られた PFK1 ノックアウト細胞の PFK1 タンパク質の発現量。(b)得られた PFK1 ノックアウト細胞の代謝を細胞外フラックスアナライザーで解析した。その結果、PFK1 ノックアウト細胞は野生型の細胞よりも高い OCR/ECAR 比を示し、呼吸優位の代謝を示すことが示された。

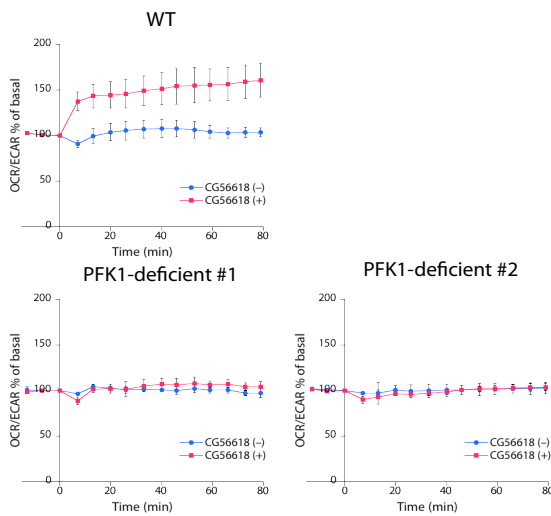


図 4. PFK1 ノックアウト細胞の CG56618 感受性 PFK1 野生型および得られた PFK1 ノックアウト細胞に対して CG56618 を添加したときの細胞内エネルギー代謝の変化を細胞外フラックスアナライザーで解析した。

(3) CG56618 の呼吸活性化メカニズム解析

CG56618 による酸素消費速度増加メカニズムを解析した。まずミトコンドリア呼吸を制御するグルタミンの取り込みや呼吸鎖複合体タンパク質発現量、脂肪酸分解経路に対して CG56618 が与える影響を検討した。その結果、CG56618 は脂肪酸分解を正に制御する AMPK を活性化することを見出した。さらに CG56618 による酸素消費速度増加は

AMPK 阻害剤および脂肪酸分解阻害剤によりキャンセルされる (図 5) ことから CG56618 は AMPK 活性化、脂肪酸分解を介してミトコンドリア呼吸を活性化することが明らかとなった。また PFK1 ノックアウト細胞では AMPK 活性化が亢進していたことから PFK1 活性が AMPK の活性を制御していることが明らかとなった。

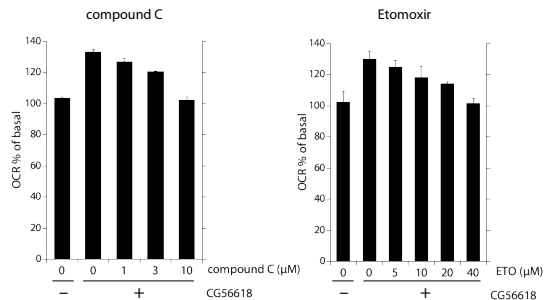


図 5. AMPK 阻害剤、脂肪酸分解阻害剤が CG56618 で誘導される呼吸活性化に与える影響 がん細胞に対して CG56618 と AMPK 阻害剤の compound C あるいは脂肪酸分解阻害剤の Etomoxir を添加し、OCR の変化を細胞外フラックスアナライザーで解析した。

以上の結果からがん細胞は PFK1 に依存して解糖系優位の状況をつくっており、PFK1 活性が AMPK 活性化/脂肪酸分解を介したミトコンドリア呼吸との切り替えに重要であることが明らかとなった。一方で CG56618 や PFK1 のノックアウトは顕著な抗がん作用を示さないことからそれ単独をがん治療のターゲットとすることはできないことが示唆された。

5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 小林 大貴、吉田 稔「がん代謝制御機構の化学遺伝学的解析」第 8 回 発酵学フォーラム、2017 年 11 月 11 日、山形県天童温泉滝の湯 (山形県・天童市)
- ② 小林 大貴、吉田 稔「新規ワールブルグ効果制御化合物の同定と作用機序解析」第 5 回 がん代謝研究会、2017 年 7 月 14 日、北海道大学 (北海道・札幌市)
- ③ 小林 大貴、吉田 稔「ワールブルグ効果を制御する化合物の同定と作用機序解析」ケミカルバイオロジー学会 第 12 回 年会、2017 年 6 月 9 日、北海道大学 (北海道・札幌市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 大貴 (KOBAYASHI, Hiroki)

国立研究開発法人理化学研究所・吉田化学
遺伝学研究室・協力研究員

研究者番号：30528683