

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07387

研究課題名(和文) COP1を中心とする発がん・エネルギー代謝ネットワークのリプログラミング

研究課題名(英文) Reprogramming of metabolic networks in COP1-mediated oncogenesis

研究代表者

加藤 規子 (Kato, Noriko)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・博士研究員

研究者番号：10252785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：E3ユビキチンリガーゼCOP1は、発がん・エネルギー代謝経路に関わる因子群を分解標的とする。がん細胞が如何にして増殖に必須の特異的エネルギー代謝機構を獲得するのかを、COP1を中心とする発がん・エネルギー代謝ネットワークの研究から明らかにすることを目的とした。

研究成果として、COP1-Trib1複合体は、骨髄系前駆細胞分化促進因子C/EBP α ばかりでなくACCを含む代謝酵素群をも分解標的とし、急性骨髄性白血病(AML)発症の原因となることを見いだした。分解制御を受けにくい代謝酵素変異体を作製しマウスモデルに導入すると白血病発症は抑制されたことから、がん治療への応用が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、がんと代謝の研究は新たな治療戦略の開発の必要性の面から活発に行われている。COP1は発がん・代謝の両経路に関わり、分解標的となる代謝酵素群を安定化するとがん化は抑制される。このことは、COP1研究は発がん・代謝の相互作用の研究モデルとして優れており、発がん過程における代謝ネットワークのリプログラミング機構のより深い理解をもたらし、新規がん治療薬の開発に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：An E3 ubiquitin ligase COP1 targets several factors that are involved in tumorigenesis and metabolism for degradation. We aimed how cancer-initiating cells acquire a specific energy metabolic system essential for their proliferation in the process of cellular transformation by investigating the COP1's activities linking both tumorigenesis and metabolism.

Several important results were obtained in this study. The Trib1-COP1 ligase complex targets a group of the metabolic enzymes including ACC as well as C/EBP α , a transcription factor regulating myeloid differentiation, for degradation during myeloid leukemogenesis. The stable expression of an ACC mutant, which was resistant to degradation, suppressed Trib1-COP1-induced growth-promoting activity in a primary bone marrow culture and delayed the onset of acute myeloid leukemia (AML) in mouse models. The up-regulated expression of these enzymatic factors has potential as a strategy for cancer therapy.

研究分野：生物学

キーワード：細胞増殖分化 発がん エネルギー代謝

1. 研究開始当初の背景

(1) COP1 (constitutive photomorphogenic 1) は、高等植物から哺乳類に至るまで非常に良く保存された E3 ユビキチンリガーゼであり、植物では、光シグナルにより誘導される光形態形成を遂行する転写因子群 (HY5, HYH, HFR1, LAF1) を負に制御する。哺乳類では、COP1 の分解標的因子として c-Jun, ETV1, ETV4, ETV5, p53, C/EBP α , ACC, TORC2, FOXO1 などが報告されている。これら標的因子群の機能分類から、哺乳類 COP1 は発がん関連経路およびエネルギー代謝経路 (脂質代謝・糖新生) において重要な役割を担うことが示唆されるが、これらを包括的に説明できる制御機構は分っていない。

(2) 我々は、これまでの研究課題の成果から以下のことを見いだした。1) COP1-Trib1 複合体による骨髄系造血細胞分化に必須の転写因子 C/EBP α の分解促進が分化阻害を惹起し、白血病発症の原因となる (引用文献 2)。2) 白血病関連因子 MLF1 は COP1 を結合阻害し、C/EBP α および MLF1-COP1-p53 がん抑制経路の安定化に寄与する (引用文献 1、3)。3) COP1 結合アミノ酸配列 (COP1 結合配列) を持つ蛋白質群の網羅的検索、プロテオーム解析、メタボローム解析を組み合わせて、COP1 が関与する発がん・エネルギー代謝経路群のネットワークを網羅的に検索した。この作業から、新規機能的 COP1 複合体 (COP1-アダプター因子-基質あるいは COP1-基質-共役因子) 群を同定した (図 1 参照)。

分解標的基質	機能	発がん・代謝関連機能	COP1 結合配列	アダプター因子共役因子
c-JUN	転写因子	Oncogene	+	DET1
ETV1,4,5	転写因子	Oncogene	+	DET1
p53	転写因子	Tumor suppressor Metabolism	-	Factor A (前課題にて同定)
C/EBP α	転写因子	Tumor suppressor Lipid metabolism	-	Trib1 (Trib2)
ACC	脂肪酸合成酵素	Lipid metabolism	-	Trib3
TORC2	転写共役因子	Glucose homeostasis	+	?
FOXO1	転写因子	Glucose homeostasis	-	?
Factor X,Y,Z (前課題にて同定)	代謝酵素	Energy metabolism	+	Factors

図 1. COP1 の分解標的因子群とその機能的特徴

2. 研究の目的

(1) 本研究では、前研究課題の研究成果 (上記 1. 研究開始当初の背景 (2) 図 1) で得られた COP1 関連ネットワークの候補因子群を主に解析した。発がん過程で、がん細胞が如何にして増殖に必須の特異的エネルギー代謝機構を獲得するのかを、COP1 を中心とする発がん・エネルギー代謝ネットワークの研究から明らかにすることを目的とした。

(2) COP1 経路は急性骨髄性白血病の原因となる Trib1 あるいは NPM-MLF1 融合遺伝子産物により活性化される。上記候補因子群を中心に、マウス骨髄移植実験の手法を用いて、発がん過程における代謝機構の変化を白血病発症マウスモデルを用いて検証した。

3. 研究の方法

(1) COP1 の下流に位置する p53、C/EBP α および代謝酵素群 (ACC・Factor X, Y, Z 等) 三経路について分化能を有する骨髄細胞培養系および急性骨髄性白血病 (AML) 発症マウスモデルを用いて経時的に検討した。

(2) 前研究課題により新規同定した COP1 複合体 (COP1-Factor A-p53) および COP1 標的分解基質群複合体 (COP1-アダプター因子-基質あるいは COP1-基質-共役因子、基質として ACC および代謝系酵素 Factor X,Y,Z) の変化を、同様に細胞培養系・マウスモデルを用いて解析した。

(3) 白血病関連因子 MLF1 は COP1 と直接結合し、COP1-Trib1 複合体形成を阻害することにより、リガーゼ活性を不活性化する。MLF1 は COP1-新規標的分解基質群複合体においても抑制的に機能するのかを検討した。

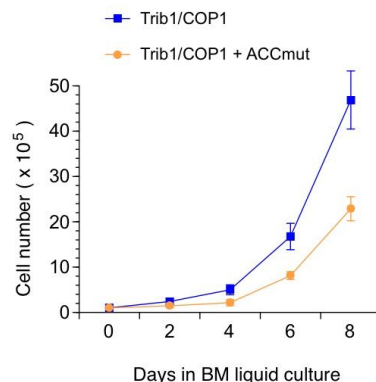
4. 研究成果

(1) E3 ユビキチンリガーゼ COP1-Trib1 複合体による急性骨髄性白血病発症機構に、COP1 新規標的分解因子、特に代謝関連因子が関与する可能性を検定した。その結果、COP1-Trib1 複合体は、骨髄系前駆細胞分化促進因子 C/EBP α ばかりでなく ACC を含む代謝酵素群 (図 1 参照) をも分解標的とすることを見いだした。主な標的代謝因子群の遺伝子クローニングを行い発現

ベクターを構築した。

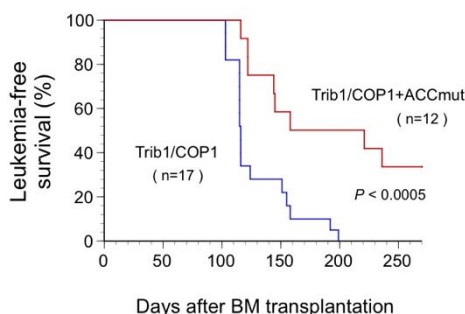
(2) 上記発現ベクターにより各種細胞培養系を用いた基本的な解析を行い、直接結合、蛋白質分解能、ユビキチン化能を確認し、特異的結合部位を特定した。

さらに、分解制御を受けにくい代謝酵素変異体を作製し解析したところ、新規同定した代謝因子群の多くは COP1-Trib1 複合体により誘導される細胞増殖に対して抑制的に働くことを見出した。代表例として脂肪酸合成酵素 ACC 変異体による解析例を右図に示す。



(3) これら代謝酵素群及びその変異体が白血病発症過程に与える影響を骨髄移植マウスモデルを用いて検証した。細胞培養系実験とほぼ一致して、COP1-Trib1 複合体により誘導される AML 発症が、変異体共発現マウスモデルでは有意に遅延ないしは未発症となることを見出した。

代表例として ACC 変異体マウスモデルにおける AML 発症生存曲線を右図に示す。このことから、COP1-Trib1 複合体による C/EBP α の分解促進ばかりでなく、関連代謝酵素の分解促進が発がんの一因となることがわかった。



(4) これら代謝酵素群及びその変異体が白血病発症過程の早期に与える影響を骨髄移植マウスモデルおよび細胞培養系を用いて、さらに詳細に解析した。骨髄移植後 10~12 週の比較的早期段階の移植マウスの骨髄を採取し、二次移植を行ったところ、コントロールマウスは前例 30 日以内に AML で死亡したのに対し、変異体共発現マウス骨髄の二次移植マウスでは 75%以上が 150 日経過しても AML 発症を認めなかった。このことは、COP1 の分解標的代謝因子の安定化を測ることが、発がんの抑制に寄与することを示している。

(5) MLF1 は多くは細胞質に局在し、核内局在シグナル (NLS)・核外移行シグナル (NES) をもつシャトル蛋白質である (引用文献 4)。核内において COP1 と直接結合し、COP1-Trib1 複合体形成によるユビキチンリガーゼ活性を阻害し、C/EBP α の安定化を促す。実際に、骨髄移植マウスモデルでは、MLF1 導入発現は COP1-Trib1 複合体による AML 発症を抑制する。ところが、COP1 の新規標的代謝酵素群の多くは、MLF1 による結合阻害を受けなかった。理由としては、これら代謝因子の多くが細胞質で機能するため、あるいは MLF1 は組織特異的・分化段階特異的発現を認めるためと考える。

(6) 以上の研究成果から、発がん過程において生じる代謝機構異常のリバランスを試みることは、治療戦略として有用であると考えられる。COP1 を中心とする発がん・エネルギー代謝ネットワークの研究をさらに発展させることにより、新たながん治療戦略の開発に繋がりたい。

< 引用文献 >

1. Nakamae I, Kato JY, Yokoyama T, Ito H, Yoneda-Kato N. Myeloid leukemia factor 1 stabilizes tumor suppressor C/EBP α to prevent Trib1-driven acute myeloid leukemia. *Blood Adv.* 1: 1682-1693, 2017.
2. Yoshida A, Kato JY, Nakamae I, and Yoneda-Kato N. COP1 targets C/EBP α for degradation and induces acute myeloid leukemia via Trib1. *Blood.* 122: 1750-1760, 2013.
3. Yoneda-Kato N, Tomoda K, Umehara M, Arata Y, Kato JY. Myeloid leukemia factor 1 regulates p53 by suppressing COP1 via COP9 signalosome subunit 3. *EMBO J.* 24: 1739-1749, 2005.
4. Yoneda-Kato N and Kato JY. Shuttling imbalance of MLF1 results in p53 instability and increases susceptibility to oncogenic transformation. *Mol Cell Biol.* 28: 422-434, 2008.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Nakamae I, Kato JY, Yokoyama T, Ito H, Yoneda-Kato N	4. 巻 1
2. 論文標題 Myeloid leukemia factor 1 stabilizes tumor suppressor C/EBPalpha to prevent Trib1-driven acute myeloid leukemia.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Blood Adv.	6. 最初と最後の頁 1682-1693
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/bloodadvances.2017007054	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Larasati YA, Yoneda-Kato N, Nakamae I, Yokoyama T, Meiyanto E, Kato JY.	4. 巻 8
2. 論文標題 Curcumin targets multiple enzymes involved in the ROS metabolic pathway to suppress tumor cell growth.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 2039
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-20179-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Maiyanto E, Putri H, Arum Larasati Y, Yudi Utomo R, Istighfari Jenie R, Ikawati M, Lestari B, Yoneda-Kto N, Nakamae I, Kawaichi M, Kato JY	4. 巻 9
2. 論文標題 Anti-proliferative and anti-metastatic potential of curcumin analog, pentagamavunon-1 (PGV-1), toward highly metastatic breast cancer cells in correlation with ROS generation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Adv. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 445-452
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15171/apb.2019.053.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Lestari B, Nakamae I, Yoneda-Kto N, Morimoto T, Kanaya S, Yokoyama T, Shionyu M, Shirai T, Maiyanto E, Kato JY.	4. 巻 9
2. 論文標題 Pentagamavunon-1 (PGV-1) inhibits ROS metabolic enzymes and suppresses tumor cell growth by inducing M phase (prometaphase) arrest and cell senescence.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 14867
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-51244-3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakamae I, Morimoto T, Shima H, Shionyu M, Fujiki H, Yoneda-Kato N, Yokoyama T, Kanaya S, Kakiuchi K, Shirai T, Maiyanto E, Kato JY.	4. 巻 24
2. 論文標題 Curcumin derivatives verify the essentiality of ROS upregulation in tumor suppression.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecules.	6. 最初と最後の頁 4067
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules24224067.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Ito H, Nakamae I, Kato JY, Yoneda-Kato N.
2. 発表標題 ACC1 degradation via COP1-Trib1 complex induces metabolic reprogramming leading to myeloid leukemogenesis
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kato JY, Nakamae I, Yokoyama T, Yoneda-Kato N, Meiyanto E.
2. 発表標題 A novel curcumin analog inhibits tumorigenesis through pro metaphase arrest and anti oxidative interference.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakamae I, Yoneda-Kato N, Yokoyama T, Meiyanto E, Kato JY.
2. 発表標題 Suppression of tumor cell growth by targeting ROS metabolic enzymes.
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, New York, USA (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ito H, Nakamae I, Yokoyama T, Kato JY, Yoneda-Kato N.
2. 発表標題 COP1-Trib1 targets ACC1 for degradation and protects leukemic cells from metabolic stress in acute myeloid leukemia.
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoneda-Kato N, Ito H, Nakamae I, Yokoyama T, Kato JY.
2. 発表標題 Tribbles-COP1 ligase complex in acute myeloid leukemia
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤秀矩、中前伊公子、横山隆志、加藤順也、加藤規子
2. 発表標題 急性骨髄性白血病の発症過程におけるCOP1-Trib1複合体リガーゼを介したACC1蛋白質分解に伴う代謝機能異常に関する解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Noriko Yoneda-Kato
2. 発表標題 Myeloid leukemia factor 1 stabilizes tumor suppressor C/EBPalpha to prevent Trib1-driven acute myeloid leukemia.
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting（国際学会）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	加藤 順也 (Kato Jun-ya) (00273839)	奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・教授 (14603)	
研究分担者	横山 隆志 (Yokohama Takashi) (00535833)	奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教 (14603)	