

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08618

研究課題名(和文) NRF1糖鎖修飾を介したプロテアソーム活性調節機構の解析

研究課題名(英文) Molecular mechanism of regulation of PSM activity by NRF1 O-GlcNAc modification

研究代表者

関根 弘樹 (Sekine, Hiroki)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：50506285

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ユビキチン・プロテアソーム系に増殖を依存するがんが存在する。これらのがんに対してはプロテアソーム阻害剤が有効な分子標的薬として期待され、すでに一部のがん種では臨床応用されている。ところがプロテアソームサブユニット(PSM)遺伝子群は、阻害剤により転写レベルで発現上昇するため耐性が問題になる。転写因子NRF1はこの発現上昇に寄与するので、NRF1抑制は広範な高プロテアソーム活性がんへのプロテアソーム阻害剤使用の可能性を広げると期待される。そこでNRF1の詳細な活性化分子機構解析から、NRF1のO-GlcNAc化修飾が核内安定化、PSM遺伝子群の活性化に必須の役割を果たしていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究でO-GlcNAc化ががんにおいて、プロテアソーム活性維持に関わることを明らかとした。一方で細胞内のタンパク質の恒常性維持(プロテオスタシス)は、正常な細胞機能にとっても極めて重要であり、その破綻が神経変性疾患、老化現象など多くの疾患の分子基盤となることが明らかにされている。またO-GlcNAc化は細胞の栄養状態によって制御されており、神経機能維持、日周性維持など多くの生命現象に関与する。本研究で明らかとしたO-GlcNAc化-プロテアソーム活性という軸は、これら幅広い生命現象に関わる可能性があり、がんだけでなく他の分野への波及効果は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Cancer cells often heavily depend on the ubiquitin-proteasome system (UPS) for their growth and survival. Irrespective of their strong dependence on the proteasome activity, cancer cells, except for multiple myeloma, are mostly resistant to proteasome inhibitors. A major cause of this resistance is the proteasome bounce-back response mediated by NRF1, a transcription factor that coordinately activates proteasome subunit genes. To identify new targets for efficient suppression of UPS, we explored the possible existence of nuclear proteins that cooperate with NRF1 and identified O-linked N-acetylglucosamine transferase (OGT) and host cell factor C1 (HCF-1). O-GlcNAcylation catalyzed by OGT was essential for NRF1 stabilization and consequent upregulation of proteasome subunit genes. OGT inhibition was effective at sensitizing cancer cells to a proteasome inhibitor both in culture cells and a xenograft mouse model.

研究分野：分子生物学

キーワード：転写因子 プロテアソーム タンパク質恒常性 翻訳後修飾

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プロテアソームによるタンパク質分解機構の破綻は、がんや神経変性疾患などの病態に関わることが知られている。プロテアソーム機能が損なわれると、そのサブユニット群の遺伝子の発現量を増大させるプロテアソーム-バウンス-バック反応(以下、PBB 反応とする)と呼ばれるフィードバック機構が働く。近年、転写因子 NF-E2-related factor 1 (NRF1) がプロテアソーム・サブユニット遺伝子群を統括的に活性化し、PBB 反応の鍵因子であることが明らかとなった (Steffen et al, *Mol Cell* 2010; Radhakrishnan et al., *Mol Cell* 2010)。NRF1 は CNC 転写因子ファミリーの 1 つで、sMAF 因子とヘテロ 2 量体を形成して DNA に結合し転写を活性化する。通常 NRF1 は、ユビキチン E3 リガーゼである HRD1 や beta-TrCP によりユビキチン化されてプロテアソームで分解されている (Tsuchiya et al, *Mol Cell Biol* 2011)。細胞のプロテアソーム活性が低下すると、NRF1 はプロテアソームで分解されている他の因子に先駆けていち早く安定化して、プロテアソーム-サブユニット遺伝子群の発現を誘導し、細胞のプロテアソーム活性を維持する。実際、神経特異的な NRF1 ノックアウトマウスにおいて、ユビキチン化タンパク質の異常な蓄積が観察され、それにより神経変性疾患様の表現型を示すことが報告されている (Lee et al, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; Kobayashi et al, *Genes Cells* 2011)。このように、NRF1 は PBB 反応を担い、プロテオスタシスをプロテアソーム活性の側面から支えている。生体内シグナルや外界からの刺激によるプロテアソーム活性制御機構の解明は、プロテオスタシス破綻により発症する病態の理解に重要と考えられる。しかし、プロテアソーム活性制御において PBB 反応を介して重要な貢献を果たしている NRF1 が、どのような機能調節をうけているのかについては不明な点が多く残されていた。

2. 研究の目的

タンパク質の恒常性維持(プロテオスタシス)は正常な細胞機能にとって極めて重要であり、その破綻が多くの疾患の分子基盤となっていることが明らかにされている。NRF1 は、プロテオスタシス維持機構の一つであるプロテアソームの活性維持において中心的役割を果たしている。NRF1 は通常時、小胞体上に存在し、HRD1-p97 でユビキチンプロテアソーム系を介して分解されている。ところがプロテアソームの阻害を受けると、安定化し特異的なプロテアーゼにより切断されたのち、核内に移行して、標的遺伝子群を活性化する。小胞体上の制御機構は最近明らかとされつつあるが、核内での制御機構については不明な点が多い。そこで NRF1 の核内での活性化の詳細な分子機構を明らかとするために、核内 NRF1 結合因子群を同定し、その機能解析を通してプロテアソーム・サブユニット遺伝子群の新規活性化機構を明らかとすることを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

NRF1 にタグを施した安定発現細胞株を作製し、核内複合体を取得、LS-MS/MS によって構成因子を同定した。これら同定したタンパク質群のうち、機能的に重要な結合因子を明らかとするために、ノックダウン後、NRF1 転写活性化に対する影響をプロテアソーム・サブユニット遺伝子群の転写活性を指標に評価した。機能的な結合因子の決定後は、リコンビナントタンパク質を用いて NRF1 との結合様式を明らかとした。さらにその結合因子の生物学的特性から、NRF1 機能修飾への関与の形式を予測し、特定の生命現象とプロテアソーム活性との関わりを明らかとすることとした。上記のような実験は主にがん細胞由来の培養細胞を用いて行い、最終的には in vivo での機能を検証するために、xenograft モデルを用いて今回同定した結合因子との関係性を明らかとした。

4. 研究成果

(1)NRF1 新規結合因子の同定 NRF1 の新規結合因子を明らかとするために核内複合体を取得した結果、タンパク質に単糖付加する O-GlcNAc 化翻訳後修飾酵素である O-Linked N-Acetylglucosamine (GlcNAc) Transferase / Host cell factor 1 (OGT/HCF-1)複合体が同定された。これらの NRF1 活性化に対する影響を調べるために、両因子のノックダウンによる機能抑制を行ったところ、両者とも NRF1 の転写活性化すなわちプロテアソーム・サブユニット遺伝子群のプロテアソーム阻害剤による活性化が減弱化した。また両因子の機能抑制は、NRF1 の十分なタンパク質蓄積を妨げることがわかった。よって OGT/HCF-1 複合体による NRF1 活性化の詳細な分子機構を探ることとした。

(2)O-GlcNAc 化修飾による NRF1 タンパク質安定化分子機構 OGT は基質として UDP-GlcNAc を必要とする。UDP-GlcNAc はグルコース・グルタミンを生成源としてヘキサミン生合成経路を介して生成されることから、細胞外のグルコース・グルタミン濃度によって細胞内 O-GlcNAc 量は変動することが知られている。そこで細胞内 O-GlcNAc 量変化で NRF1 タンパク質量が調節されるかを調べるために、細胞を高グルコース処理した時の NRF1 タンパク質量を調べることとした。高グルコース処理により細胞内 O-GlcNAc 化タンパク質は増加し、それに伴って NRF1 タンパク質量も増加した。NRF1 自身が OGT の標的、すなわち O-GlcNAc 化修飾を受けるタンパク質であるかを、NRF1 免疫沈降後に O-GlcNAc 化タンパク質認識抗体で調べたところ、NRF1 が直接 O-GlcNAc 化されていることがわかった。O-GlcNAc 化修飾はタンパク質のセリン/スレオニン残基に施される翻訳後修飾であるため、一般的にリン酸化との拮抗

作用が知られている。NRF1 は小胞体上での分解制御に加えて、細胞質 / 核内においてリン酸化依存的に beta-TrCP と結合することで分解制御を受けることが知られている。それゆえ NRF1 の O-GlcNAc 化は、NRF1 のリン酸化部位に施されて、beta-TrCP との結合が阻害されることによるものであると仮定した。結果予想通り、細胞内 O-GlcNAc 化修飾を増大させると NRF1 と beta-TrCP との結合が減弱化し、さらに beta-TrCP との結合に必須である NRF1 のセリン残基に変異を施したところ、細胞内の O-GlcNAc 化量に応じた NRF1 蓄積が起こらなくなったので、beta-TrCP との結合に必須なセリン残基での O-GlcNAc 化修飾が OGT/HCF1 複合体による NRF1 安定化の分子機構であることが明らかとなった。

(3) がん検体における OGT とプロテアソーム・サブユニット遺伝子群との発現相関 O-GlcNAc

化修飾の基質である UDP-GlcNAc の生成に必須のグルコースやグルタミンは、がんにおいて取り込みが増大していることが知られている。実際、O-GlcNAc 化タンパク質は多くの固形がんにおいて増大していることが報告されている。そこで OGT の発現量とプロテアソーム・サブユニット遺伝子群の発現量が相関しているのではないかと考え、The Cancer Genome Atlas (TCGA) データベースを用いて乳がん、大腸がん患者のプロテアソーム解析結果を解析した。結果 OGT とプロ

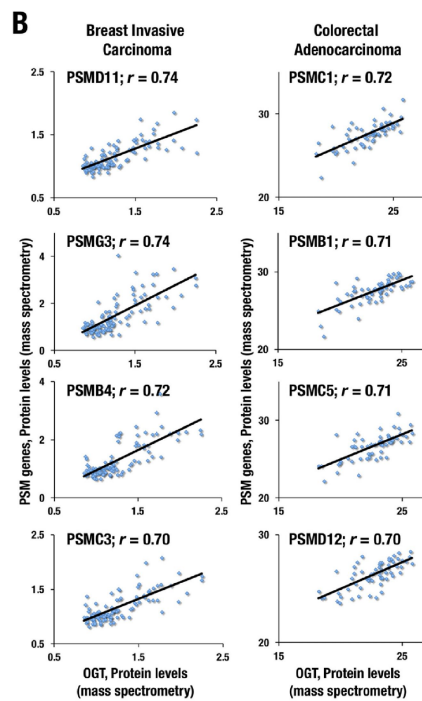
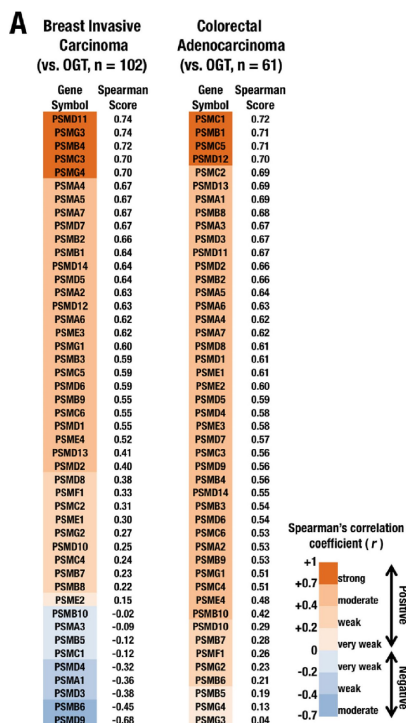


図 1 がん検体における OGT とプロテアソーム・サブユニット遺伝子群とのタンパク質発現量の相関

テアソーム・サブユニット遺伝子群は非常に高い相関性を持っていることが明らかとなった(図 1)。

(4) OGT/HCF1 複合体阻害によるプロテアソーム阻害剤の抗がん作用の増大 一部のがん種では、プロテアソーム活性が上昇しており、その活性に増殖を依存するがんが存在する。これらのがんに対しては、プロテアソーム阻害剤が、有効な分子標的薬として期待され、実際、多発性骨髄腫など一部のがん種では、すでに臨床応用がなされている。ところが、プロテアソーム・サブユニット遺伝子群の、NRF1 による阻害剤でのフィードバック的な転写発現上昇は、阻害剤に対する耐性を持たせることに繋がり、特に固形がんでは使用されてこなかった。そこで今回明らかとした OGT/HCF1 複合体の機能抑制によりプロテアソーム阻害剤のがん抑制効果を高められるのではないかと考えた。OGT/HCF1 のノックダウンにより機能抑制を行うと、培養細胞レベルでプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブに対する感受性が高まった。さらに固形がんのモデルでも同様のことが観察されるかを調べるために、免疫不全マウス(ヌードマウス)の皮下に、OGT 誘導的ノックダウン細胞とコントロール細胞を移植し、異所性に固形がんを発生させ、腫瘍部分に直接プロテアソーム阻害剤を投与したところ、

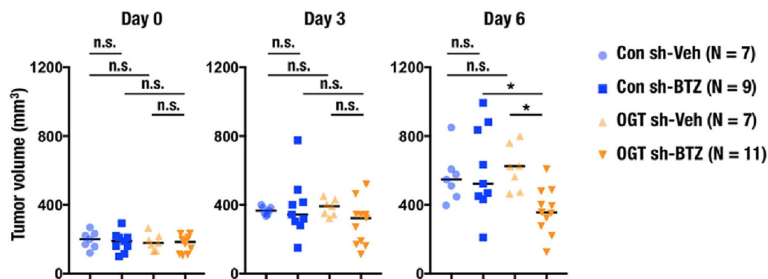


図 2 OGT 抑制によりプロテアソーム阻害剤(ボルテゾミブ; BTZ)の抗がん作用を高められる

有意差を持って OGT ノックダウン細胞がプロテアソーム阻害剤投与によって、増殖抑制されることがわかった(図 2)。以上の結果から高プロテアソームを有する難治性の固形がんに対しても、OGT を抑制することで、プロテアソーム阻害剤が使用できる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sekine H, Okazaki K, Kato K, Alam MM, Shima H, Katsuoka F, Tsujita T, Suzuki N, Kobayashi A, Igarashi K, Yamamoto M, Motohashi H.	4. 巻 38
2. 論文標題 O-GlcNAcylation Signal Mediates Proteasome Inhibitor Resistance in Cancer Cells by Stabilizing NRF1.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 e00252-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MCB.00252-18.	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 Dodo M, Kitamura H, Shima H, Saigusa D, Wati SM, Ota N, Katsuoka F, Chiba H, Okae H, Arima T, Igarashi K, Koseki T, Sekine H, Motohashi H.	4. 巻 65
2. 論文標題 Lactate dehydrogenase C is required for the protein expression of a sperm-specific isoform of lactate dehydrogenase A.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Biochem.	6. 最初と最後の頁 323-334
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvy108.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 1.Alam MM, Okazaki K, Nguyen LTT, Ota N, Kitamura H, Murakami S, Shima H, Igarashi K, Sekine H, Motohashi H.	4. 巻 292(18)
2. 論文標題 Glucocorticoid receptor signaling represses the antioxidant reponse by inhibiting histone acetylation mediated by the transcriptional activator NRF2.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Biol Chem	6. 最初と最後の頁 7519-7530
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.M116.773960.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 3.Nezu M, Souma T, Yu L, Sekine H, Takahashi N, Wei AZ, Ito S, Fukamizu A, Zsengeller ZK, Nakamura T, Hozawa A, Karumanchi SA, Suzuki N, Yamamoto M.	4. 巻 10(479)
2. 論文標題 Nrf2 inactivation enhances placental angiogenesis in a preeclampsia mouse model and improves maternal and fetal outcomes.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Signal.	6. 最初と最後の頁 pii: eaam5711
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/scisignal.aam5711.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sekine H , Yamamoto M , Motohashi H	4. 巻 19
2. 論文標題 Tumors sweeten macrophages with acids.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature immunology	6. 最初と最後の頁 1281-1283
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41590-018-0258-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato K , Hirano I , Sekine H , Miyauchi K , Nakai T , Kato K , Ito S , Yamamoto M , Suzuki N	4. 巻 9
2. 論文標題 An immortalized cell line derived from renal erythropoietin-producing (REP) cells demonstrates their potential to transform into myofibroblasts.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 11254
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-47766-5	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 -

[学会発表] 計5件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 関根弘樹
2. 発表標題 O-結合型糖鎖修飾によるがん細胞のプロテアソーム阻害剤の分子機構
3. 学会等名 第6回がん代謝研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroki Sekine.
2. 発表標題 O-GlcNAcylation signal confers resistance to proteasome inhibitors on cancer cells by increasing NRF1 stability.
3. 学会等名 The 77th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 関根弘樹
2. 発表標題 翻訳後修飾を介したプロテアソームサブユニット遺伝子発現制御機構
3. 学会等名 第33回がん・エピゲノム研究会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hiroki Sekine.
2. 発表標題 O-GlcNAcylation signal confers resistance to proteasome inhibitors on cancer cells by increasing NRF1 stability.
3. 学会等名 未来型医療拠点キックオフ 第二回カロリンスカ研究所・東北大学合同会議（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hiroki Sekine, Keito Okazaki, Md. Morshedul Alam, Hozumi Motohashi.
2. 発表標題 O-GlcNAcylation signal confers resistance to proteasome inhibitors on cancer cells by increasing NRF1 stability.
3. 学会等名 第12回研究所ネットワーク国際シンポジウム（国際学会）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 関根 弘樹 , 本橋 ほづみ	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医歯薬出版(株)	5. 総ページ数 7
3. 書名 【メタボローム解析UPDATE】基礎 がん細胞の代謝とCNC転写因子NRF1、NRF2	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----