

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：34606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08658

研究課題名(和文)Txnipリボヌクレオプロテイン複合体による代謝制御・癌抑制

研究課題名(英文)Metabolic regulation and cancer suppression by Thioredoxin interacting protein (Txnip) ribonucleoprotein complex

研究代表者

増谷 弘 (Masutani, Hiroshi)

天理医療大学・医療学部・教授

研究者番号：50252523

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Txnipは、糖尿病の病態や癌抑制に重要な役割を果たす。本研究では、Txnipがグルコース依存的にRNAを含む核内高分子複合体を構成することを明らかにし、Txnipと相互作用する候補タンパク質を同定した。さらにTxnipの発現がRNAの発現パターンを変化させることを明らかにした。これらにより、Txnipが多くの結合因子と相互作用することによってその機能を発揮する分子機構を明らかにした。この成果は、糖代謝制御や癌抑制法の開発に寄与する。一方、Txnipの発現を制御する低分子化合物が、神経保護作用があり、アルツハイマー病の病因となるTauのリン酸化を抑制することを示し、その分子機構解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Txnipは、糖尿病の病態や癌抑制に重要な役割を果たす。本研究は、Txnipが多くの結合因子と相互作用することによってその機能を発揮する分子機構を明らかにした。この成果は、糖代謝制御や癌抑制法の開発に寄与する。また、その役割が明らかでないlong non coding RNAの役割や制御機構を明らかにできる学術的意義を有する。一方、Txnipの発現を制御する低分子化合物は、神経保護作用があり、アルツハイマー病の病因となるTauのリン酸化を抑制することを示した。これらの化合物を用いた研究は、アルツハイマー病の治療薬の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Thioredoxin interacting protein (Txnip) plays an important role in diabetes, and tumor suppression. By tandem affinity purification and proteomic analyses, we identified Txnip binding proteins such as HSP90/70 and Prp31. We showed that Txnip forms glucose-dependent high molecular weight complexes in the nucleus, containing RNAs. RNA-seq analysis revealed that Txnip expressing cells had a different pattern of RNA expression compared to control cells. These results indicate that Txnip performs its function by binding to multiple partners and forming high molecular complexes that could modulate other signaling processes. Complete elucidation of the molecular mechanisms of Txnip will help to develop new treatments and strategies for cancer and diabetes. We also identified small molecules which can regulate the expression of Txnip. We showed that these compounds have neuroprotective activities and suppress the phosphorylation of Tau, an important cause of Alzheimer's disease.

研究分野：病態生化学

キーワード：Txnip 糖尿病 癌 RNA 低分子化合物 アルツハイマー病 高分子複合体 long non coding RNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

thioredoxin interacting protein (Txnip)/ TBP-2(*JBC*, 1999)は、核に時としてドット状に局在し、糖代謝・転写制御に重要な役割を果たす (*Endocrinology* 2009; *Nature Communications*, 2010; *PLoS One*, 2012; 2011-2012 年度新学術領域「食欲脂肪蓄積制御」(公募)代表)。Txnip が細胞への糖の取り込みを制御することが国際的にも注目されているが、その分子機構は明らかではない。

Txnip は様々な癌組織で発現が低下しており、膀胱癌において Txnip の変異が 7%見られることが報告されており (*Nature*, 2014)、実際の癌抑制遺伝子であるが、その分子機構は明らかではない。研究代表者は、glucose 依存的に Txnip は分子量約 1000-1200kDa の複合体を形成すること、またこの複合体は long non coding RNA を含んでいることを示唆する予備的知見を得ていた。近年、long non coding RNA が核内で様々な複合体を形成していることが報告されているが、それらの生理的意義や制御機構は殆どわかっていない。

一方、2013-2015 年度基盤 C、2015 年度 Astep 研究の成果として、Txnip の glucose による発現を制御する低分子化合物のスクリーニングの結果、糖取り込みを増強させ、動物実験で血糖を低下させる複数の低分子化合物を得ており、これらは CDK5/CaMKK2/AMPK 経路に働くことを明らかにしていた。CDK5/CaMKK2/AMPK 経路は代謝、癌に関与するのみならずアルツハイマー病の原因となっており神経変性障害を起こす Tau の過剰なリン酸化にも重要な役割を果たす。しかしながら、CDK5 の上流のシグナル伝達機構は明確ではない。

2. 研究の目的

Txnip を含む glucose 依存的に構成される核内リボヌクレオプロテイン(RNP)高分子複合体の蛋白質をプロテオミクスにより、また、RNA を RNA シークエンシングで同定する。これらの構成成分の制御分子機構を解析することにより、long non coding RNA の新たな生理的意義を明らかにすると同時に、Txnip による細胞への糖代謝制御や癌抑制の分子機構を明らかにし、新たな代謝制御・癌治療薬開発への基盤とする。

CDK5/CaMKK2/AMPK 経路に働く低分子化合物を利用して、新たな代謝制御・癌・神経変性疾患治療薬開発への基盤とする。

3. 研究の方法

1) Txnip を含む高分子リボヌクレオプロテイン(RNP)複合体を構成する蛋白質の解明

作成済みの 293 Tet on Flag-HA-Txnip-V5-His stable transfectant あるいはコントロール細胞をプロテアゾーム阻害剤と 20mM glucose で刺激した核難溶画分を 1% Triton X-100 で抽出し、Flag 抗体、HA 抗体でタンデム免疫沈降したものを SDS-PAGE、銀染色、マスマスペクトロメトリーにより同定する。

2) Txnip を含む高分子 RNP 複合体を構成する RNA の解明

上記核抽出液難溶 1% Triton X-100 抽出画分を、DNase 処理し、100kDa フィルターで高分子量画分をとり、そこから RNA を抽出し、RNA シークエンサー解析を行う。

3) ケミカルバイオロジーによる CDK5 上流のシグナル伝達機構の解析

糖による Txnip 発現誘導を抑制する低分子化合物について、神経保護作用や Tau のリン酸化への影響を検討する。さらに低分子化合物を NHS-FG ビーズ (磁気ナノビーズ) と共有結合させ、C2C12 細胞の cytosol をサイズで分画後、affinity 精製し、プロテオミクス解析により、化合物のターゲットを同定する。

4. 研究成果

(1)

研究代表者は、Du145 前立腺細胞株において Txnip が glucose 依存的に 1000 から 1300kDa の核内高分子複合体を構成し、その複合体が RNA を含むことを明らかにした(Hirata et al. Bulletin of Tenri Health Care University, in press)。Txnip の分子機構を調べるために Txnip と相互作用するタンパク質を解析し、タンデムアフィニティー精製とプロテミクス分析によって複数の候補タンパク質 HSP90/70 や Prp31 を同定した。また、RNase 処理によりこの高分子複合体は減少し、Txnip が高次リボタンパク質複合体を形成することを明らかにしている。これらの結果により、Txnip が多くの結合パートナーと相互作用し、一過性の高次リボ蛋白質複合体を形成することによってその機能を発揮し、シグナル伝達調節因子の分解を調節するモデルを提示することができた(Hirata et al. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2019, 677, 108159)。

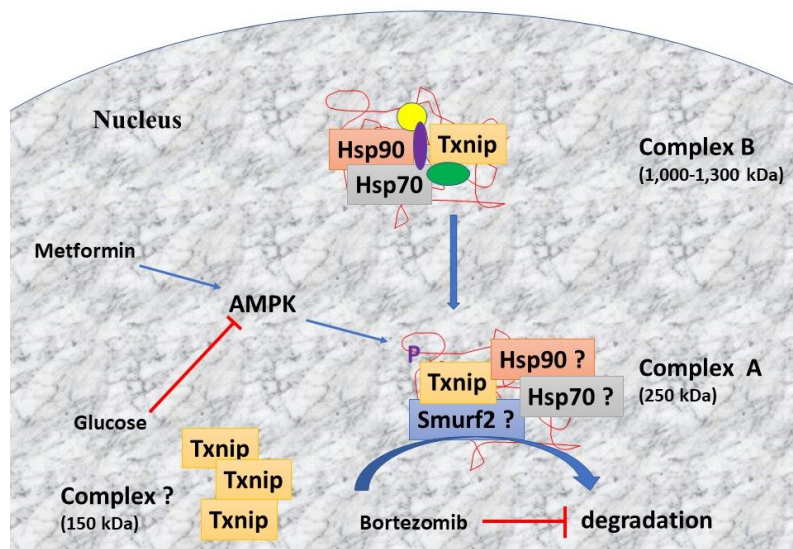


図 1. Txnip 高分子量複合体の単純化したモデル

(Hirata et al. Bulletin of Tenri Health Care University, in press)

Txnip: thioredoxin interacting protein, AMPK: AMP-dependent kinase, HSP: heat shock protein, Smurf2:

SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2

(2) RNA シークエンスにより Txnip の発現が mRNA や non coding RNA の発現パターンを変化させることを明らかにした (Data in Brief, 2020, 28, 104893)。

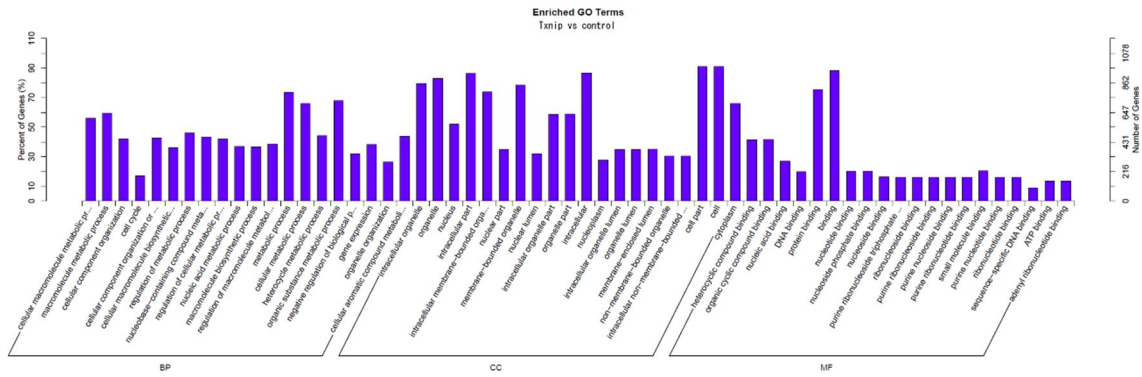


図2. Txnip過剰発現細胞とコントロール細胞でのmRNAターゲット遺伝子の遺伝子オントロジー解析

ジー解析

Txnip過剰発現細胞あるいはコントロール細胞の高分子複合体からのRNAを解析した。横軸は遺伝子の生物学的プロセスの項目、縦軸はその項目に関係するターゲット遺伝子の数を示す。(BP: biological process ; 生物学的プロセス, MF: molecular function ; 分子機構).

(3) Txnip を含む高次リボ蛋白質複合体が高濃度のグルコースなどの代謝状態により制御されていることを示した (Hirata et al. Bulletin of Tenri Health Care University, in press)

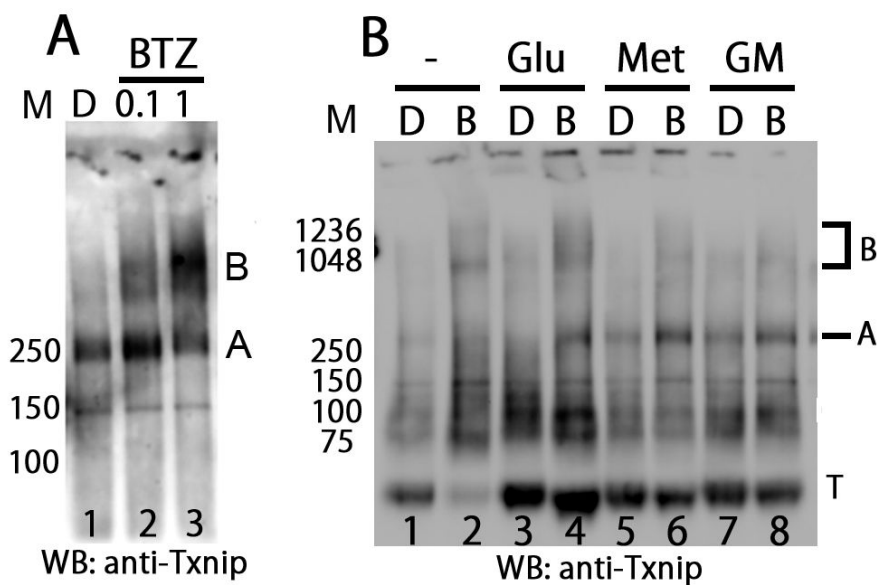


図3. Txnip 複合体の Blue Native Polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE)解析 A. DMSO あるいは0.1 あるいは1 μM のボルテゾミブ で一夜処理した DU145 細胞の BN-PAGE 解析 B. pEF-

F-HA-Txnip-V5-His および pcDNA3-Myc-Txnip を過剰発現させた DU145 細胞を, 0.1 % DMSO、20 mM グルコース、1 μ M ボルテゾミブ、2 mM メトホルミン単独あるいは組み合わせで一晩処理し、BN-PAGE 解析を行い、そのゲルをメンブレンに転写して、抗 Txnip 抗体で解析した。M: 分子量マーカー, D: DMSO; Glu: glucose ; グルコース; B, BTZ: bortezomib; ボルテゾミブ Met: metformin; メトホルミン T: Txnip 過剰発現蛋白質、GM: グルコースおよびメトホルミン。2 回の独立した実験の代表的なイメージを示す。

(4)Txnip の発現を制御する CDK5/ CaMKK2/ AMPK 経路に働く glucose 取り込みを促進する低分子化合物を得ている。この低分子化合物のいくつかについて、グリオブラストーマ細胞株 SHSY5Y 細胞において神経保護作用があることを明らかにしている。これらの化合物が Tau のリン酸化を抑制することを示した。さらに、これらの化合物を用いたケミカルバイオロジーにより、化合物に特異的に反応するターゲット蛋白質の候補を得て、その分子機構の解析を行っている。

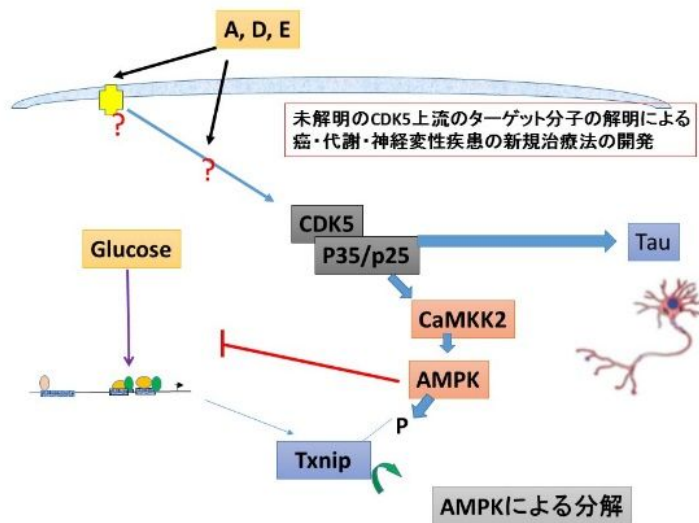


図4 .Txnip の発現を制御する CDK5/ CaMKK2/ AMPK 経路に働く低分子化合物によるアルツハイマー病治療薬の開発

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 増谷 弘、Hirata CL	4. 巻 6
2. 論文標題 癌・病態におけるThioredoxin, Txnip, ARRDC3研究の最近の展開	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 天理医療大学紀要	6. 最初と最後の頁 14-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Yodoi J, Matsuo Y, Tian H, Masutani H, Inamoto T	4. 巻 9
2. 論文標題 Anti-Inflammatory Thioredoxin Family Proteins for Medicare, Healthcare and Aging Care	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 1081~1081
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu9101081	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 Hirata CL, Ito S, Masutani H	4. 巻 677
2. 論文標題 Thioredoxin interacting protein (Txnip) forms redox sensitive high molecular weight nucleoprotein complexes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Arch Biochem Biophys	6. 最初と最後の頁 108159
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.abb.2019.108159	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 Hirata CL, Ito S, Masutani H	4. 巻 28
2. 論文標題 Dataset on the formation of Thioredoxin interacting protein (Txnip) containing redox sensitive high molecular weight nucleoprotein complexes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Data Brief	6. 最初と最後の頁 104893
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dib.2019.104893	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 Maeda M, Tanabe-Shibuya J, Miyazato P, Masutani H, Yasunaga JI, Usami K, Shimizu A, Matsuoka M	4. 巻 11
2. 論文標題 IL-2/IL-2 Receptor Pathway Plays a Crucial Role in the Growth and Malignant Transformation of HTLV-1-Infected T Cells to Develop Adult T-Cell Leukemia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Microbiol	6. 最初と最後の頁 356
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2020.00356	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 Hirata CL, Nishioka K, Ashida S, Mizutani Y, Masutani H	4. 巻 8
2. 論文標題 Metabolic regulation of Thioredoxin interacting protein (Txnip)-containing high molecular protein complexes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bulletin of Tenri Health Care University	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Soyama T, Masutani H, Hirata CL, Iwai-Kanai E, Inamoto T	4. 巻 in press
2. 論文標題 Thioredoxin as a novel sensitive marker of biological stress response in smoking	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Clin Biochem Nutr	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcbrn.19-108	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 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 増谷 弘, クリスチアネ ルミ ヒラタ, 大石真也, 藤井信孝
2. 発表標題 Thioredoxin interacting protein (Txnip)を応用した糖尿病・認知症治療薬の開発
3. 学会等名 第71回日本酸化ストレス学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Cristiane Lumi Hirata, Kanari Nishioka, Sae Ashida, Yoichi Mizutani, Shinji Ito, Iwai-Kanai Eri, Takashi Inamoto, Hiroshi Masutani
2. 発表標題 Thioredoxin interacting protein (Txnip) High order complex formation in cancer cells
3. 学会等名 第27回日本Cell Death 学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 増谷 弘
2. 発表標題 アルファアレスチンによる白血病予後・代謝・細胞外小胞制御
3. 学会等名 第110回近畿血液学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 増谷 弘
2. 発表標題 レドックスシグナル研究からアルファアレスチンを応用した癌・糖尿病・認知症研究へ
3. 学会等名 Kyoto 60 Medical meeting（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Cristiane Lumi Hirata, Kanari Nishioka, Sae Ashida, Yoichi Mizutani, Shinji Ito, Hiroshi Masutani
2. 発表標題 Thioredoxin interacting protein (Txnip) High order complex formation in cancer cells
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
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
--	---------------------------	-----------------------	----