

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07078

研究課題名（和文）核内転写制御因子PIAS1によるがん細胞の悪性化機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the role of PIAS1 in tumor progression

研究代表者

中川 宏治（NAKAGAWA, Koji）

北海道医療大学・薬学部・教授

研究者番号：80360949

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）：本研究では、転写制御因子PIAS1が低酸素誘導因子HIF-1依存的な遺伝子発現に及ぼす影響を解析した。その結果、PIAS1は、HIF-1の転写活性の増強を介して、HIF-1依存的な遺伝子の発現を正に制御することが判明した。また、PIAS1は、HIF-1と結合し、HIF-1のSUMO化修飾を促進することが分かった。さらに、PIAS1は、HIF-1とアセチル化酵素p300の結合を増強することが示された。以上の結果から、PIAS1は、SUMO E3リガーゼ活性依存的にHIF-1の転写コアクチベーターとして機能することが新たに明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果から、PIAS1によるHIF-1依存的な遺伝子発現の新規制御機構が明らかとなった。PIAS1は、前立腺がんや多発性骨髄腫などで発現の上昇が報告されており、また、HIF-1は、低酸素適応応答反応を誘導してがん細胞の悪性化に関与することから、PIAS1によるHIF-1依存的な遺伝子発現の増強は、がん細胞の悪性化を促進している可能性が考えられる。本研究から得られた基礎的な知見を基に、PIAS1のがん細胞の悪性化における役割を解明することができれば、この経路を標的とした新規の診断法や分子標的治療薬などの開発につながると期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined the effect of PIAS1 on the HIF-1-mediated gene expression and found that PIAS1 promoted the expression of HIF-1 target genes under hypoxic conditions by enhancing HIF-1 transcriptional activity. Additionally, mechanistic analysis revealed that PIAS1 physically associated with HIF-1 and promoted its SUMOylation. Furthermore, we found that PIAS1 enhanced binding of HIF-1 to the acetyltransferase p300. Taken together, these results indicate that PIAS1 functions as a SUMO E3 ligase and transcriptional coactivator of HIF-1.

研究分野：分子生物学

キーワード：PIAS1 HIF-1 低酸素応答 転写制御 SUMO化修飾 がん悪性化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

PIAS1 (protein inhibitor of activated STAT1)は、当初サイトカインシグナル伝達に関わる転写因子 STAT1 の DNA への結合を阻害するタンパク質として同定されたが、その後の解析から、STAT1 のみならず、p53、NF- κ B、Smad4 など様々の転写因子と結合し、その転写活性を正または負に調節することが明らかとなっている。PIAS1 は、多機能タンパク質であり、DNA 結合阻害や、転写共役因子のリクルート、SUMO (small ubiquitin-related modifier) 化修飾反応の促進などを介して、転写因子の活性を調節することが判明している (Shuai and Liu, *Nature Rev Immunol*, 2005)。SUMO は、ユビキチン様の翻訳後修飾分子であり、E1 活性化酵素、E2 結合酵素、E3 リガーゼからなる 3 種類の酵素系の連続した反応を介して基質タンパクの Lys 残基に共有結合する。PIAS1 は、SUMO 化修飾反応の E3 リガーゼとしての活性を有し、転写因子を含めた様々なタンパク質の SUMO 化修飾を促進することが知られている。また、臨床検体を用いた解析から、PIAS1 は、前立腺がんや多発性骨髄腫などにおいて発現の上昇が見られることから (Rabellino et al., *Cancer Res*, 2017) 発がん過程においても重要な役割を果たしていると考えられるが、その詳細は明らかになっていない。

固形がんを構成するがん細胞は、腫瘍組織の増大に伴い毛細血管から供給される酸素の濃度が低下し、低酸素状態に陥る。しかし、低酸素ストレスに暴露されたがん細胞では、遺伝子発現を変化させることで、低酸素への適応応答反応が誘導される。転写因子 HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1) は、細胞の低酸素適応応答の制御において中心的な役割を果たす転写因子であり、サブユニット (HIF-1 α) とサブユニット (HIF-1 β) から構成されるヘテロ二量体として機能する。HIF-1 α は、低酸素下 (<5% O₂) で安定化して蓄積し、核へ移行後 HIF-1 α と二量体を形成して、HRE (hypoxia response element) とよばれる DNA 配列に結合し、HIF-1 依存的な低酸素応答遺伝子の発現を上昇させる (Dengler, et al., *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2014)。その結果、解糖系の亢進、血管新生・血管拡張の促進、浸潤・転移の促進、細胞死抑制など低酸素適応応答反応が誘導される (Soni & Padwad, *Acta Oncol*, 2014)。このような低酸素適応反応の結果、がん細胞は悪性化し、抗がん剤耐性や放射線耐性などの治療抵抗性を示すようになり、がんの治療の難渋させる一因となっている。

本研究を申請した時点で、HIF-1 依存的な低酸素適応応答に PIAS1 が関与するか否かについては、一切報告がなく、不明であった。研究代表者が実施した予備的検討の結果より、PIAS1 は HIF-1 を介した転写に対し増強作用を有することが示唆されたことから、「PIAS1 は、HIF-1 を介した低酸素下での遺伝子発現を正に制御することで、がん細胞の悪性化を促進しているのではないか」と着想し、この仮説を検証するために、本研究を申請した。

2. 研究の目的

本研究では、PIAS1 による HIF-1 依存的な遺伝子発現調節機構を解明し、がん細胞の低酸素適応応答反応における PIAS1 の役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) PIAS1 が HIF-1 依存的な遺伝子発現に及ぼす影響の解析：ヒト胎児腎臓 293T 細胞もしくはヒト骨肉腫 U2OS 細胞に、PIAS1 に対する siRNA を導入し、低酸素 (1% O₂) で培養した後、RNA を抽出して定量的 RT-PCR 解析を行い、HIF-1 標的遺伝子の発現に対する PIAS1 ノックダウンの影響を解析した。

(2) PIAS1 が HIF-1 の転写活性に及ぼす影響の解析： 293T 細胞もしくは U2OS 細胞に、HIF-1 応答性の HRE レポーター遺伝子を、PIAS1 (野生型および SUMO E3 リガーゼ活性を欠損型 W372A 変異体) の発現ベクター、もしくは、PIAS1 に対する siRNA と共に導入し、低酸素 (1% O₂) で培養した後、ルシフェラーゼアッセイを行い、HIF-1 の転写活性に対する PIAS1 の影響を解析した。

(3) HIF-1 と PIAS1 の結合性の検討：

293T 細胞に、HA-tag を付加した HIF-1 P402/564A (安定型 HIF-1) を Myc-tag を付加した PIAS1 を過剰発現させた後、免疫沈降およびウェスタンブロット解析を行い、両者の結合性を検討した。

低酸素培養した U2OS 細胞を用いて免疫沈降およびウェスタンブロット解析を行い、細胞内在性の HIF-1 と PIAS1 の結合性を検討した。

3 種類の HIF-1 欠失変異体 (1-310 aa、311-603 aa および 604-826 aa) を PIAS1 と共に 293T 細胞に過剰発現させた後、免疫沈降およびウェスタンブロット解析を行い、HIF-1 の PIAS1 との結合領域を探索した。

(4) PIAS1 が HIF-1 の SUMO 化修飾に及ぼす影響の解析：

293T 細胞に、PIAS1 (野生型および W372A 変異体) の発現ベクター、もしくは、PIAS1 に対する siRNA を、HA-tag を付加した HIF-1 P402/564 および T7-tag を付加した SUMO-1 の発現ベクターと共に導入した後、免疫沈降およびウェスタンブロット解析を行い、HIF-1 の SUMO 化修飾に及ぼす PIAS1 過剰発現および PIAS1 ノックダウンの影響を解析した。

293T 細胞に、HA-tag を付加した野生型 HIF-1 もしくは HIF-1 K391/477R 変異体 (既知の SUMO 化修飾部位である Lys391 および Lys477 の変異体) を、T7-tag を付加した SUMO-1 および Myc-tag を付加した PIAS1 と共に過剰発現させ、免疫沈降およびウェスタンブロット解析を行い、HIF-1 の SUMO 化修飾部位を解析した。

293T 細胞に、HA-tag を付加した HIF-1 P402/564A を Myc-tag を付加した PIAS1 (野生型もしくは W372A 変異体) の発現ベクターと共に過剰発現させた後、免疫沈降およびウェスタンブロット解析を行い、HIF-1 と HIF-1 の既知の転写共役因子 (p300, PCAF, HDAC1, SIRT1 など) との結合性に対する PIAS1 の影響を解析した。

(5) ゲノム編集による PIAS1 欠損細胞の作製

ヒト胎児腎臓 293 細胞に、PIAS1 遺伝子に対する gRNA と Cas9 ヌクレアーゼの発現ベクターを導入し、その後、細胞をクローン化した。得られた細胞のクローンのセルライゼートを用いてウェスタンブロット解析を行った。

4. 研究成果

(1) PIAS1 が HIF-1 依存的遺伝子発現に及ぼす影響の解析： 293T 細胞および U2OS 細胞において、siRNA による PIAS1 のノックダウンは、低酸素への暴露により誘導される HIF-1 の標的遺伝子 (GLUT1, HK2, VEGFA, ALDOA, ADM など) の発現を有意に減少させた。この結果から、PIAS1 は HIF-1 依存的な遺伝子発現を正に制御することが判明した。

(2) PIAS1 が HIF-1 の転写活性に及ぼす影響の解析： 293T 細胞および U2OS 細胞において、PIAS1 は、その SUMO E3 リガーゼ活性依存的に、低酸素への暴露により誘導される HRE レポーター遺伝子の活性を有意に増加させた。また、siRNA による PIAS1 のノックダウンは、低酸素への暴露により誘導される HRE レポーター遺伝子の活性を有意に減少させた。これら

の結果から、PIAS1 は HIF-1 の転写活性に対し促進作用をもつことが分かった

(3) HIF-1 と PIAS1 の結合性の検討：

293T 細胞を用いた過剰発現系において、HIF-1 と PIAS1 の共沈が観察され、両者は結合することが分かった。

低酸素培養した U2OS 細胞において、細胞内在性の HIF-1 と PIAS1 の共沈が観察され、生理的条件下においても両者は結合することが示された。

293T 細胞を用いた過剰発現系において、HIF-1 欠失変異体のうち、1-310 aa および 311-603 aa において、PIAS1 との共沈が観察され、HIF-1 は、1-603 aa の領域を介して PIAS1 と結合することが分かった。

(4) PIAS1 が HIF-1 の SUMO 化修飾に及ぼす影響の解析：

293T 細胞を用いた過剰発現系において、PIAS1 は、その SUMO E3 リガーゼ活性依存的に HIF-1 の SUMO 化修飾を促進した。一方、293T 細胞における PIAS1 のノックダウンは、HIF-1 の SUMO 化修飾を減少させた。これらの結果から、PIAS1 は、HIF-1 に対する SUMO E3 リガーゼとして機能することが明らかになった。

293T 細胞を用いた過剰発現系において、HIF-1 K391/477R 変異体では、野生型 HIF-1 と比較して、SUMO 化修飾の部分的な減少が観察された。このことから、PIAS1 により誘導される HIF-1 の SUMO 化修飾は、既知の SUMO 化修飾部位である Lys391 および Lys477 に加え、未同定の Lys 残基においても起こることが示唆された。

293T 細胞を用いた過剰発現系において、PIAS1 は、その SUMO E3 リガーゼ活性依存的に HIF-1 とヒストンアセチル化酵素 p300 の結合性を増強した。

(5) ゲノム編集による PIAS1 欠損細胞の作製

ウェスタンブロット解析により、PIAS1 遺伝子を欠損した 293 細胞のクローンが得られたことが判明した。

以上の結果から、PIAS1 は、HIF-1 の SUMO 化修飾を介してその転写活性の増強し、HIF-1 標的遺伝子の発現を正に制御することが明らかとなった。従って、PIAS1 は SUMO E3 リガーゼ活性依存的に HIF-1 の転写コアクチベーターとして機能すると考えられる。これらの知見は、いずれも本研究の実施により新規に得られたものであり、独自の成果である。

しかしながら、PIAS1 による HIF-1 の転写活性増強の分子メカニズムについては未だ未解明の点も多い。特に、SUMO 化修飾が HIF-1 の転写活性は上昇させる機序の解明は今後の重要な課題である。過去の報告から、転写因子 Bcl11b では、SUMO 化修飾を受けると p300 との結合が促進されることが報告されており (Zhang et al., *J Biol Chem* 2012) SUMO 化修飾は状況により転写因子に p300 をリクルートする分子スイッチとして機能することが示唆されている。本研究においても、PIAS1 が SUMO E3 リガーゼ活性依存的に HIF-1 と p300 との結合を増強するという結果が得られており、PIAS1 による HIF-1 の SUMO 化修飾の促進が、p300 との結合を増強させている可能性が考えられる。PIAS1 による HIF-1 の転写活性増強の分子機構を更に明らかにするために、今後、HIF-1 の SUMO 化修飾が p300 との相互作用に及ぼす影響を解明することが重要である。

PIAS1 は、前立腺がんや多発性骨髄腫などにおいて発現が上昇していることが報告されており (Rabellino et al., *Cancer Res* 2017) また、HIF-1 は、低酸素適応応答反応を制御することで、がん細胞の悪性化を促進することが知られている (Soni and Padwad, *Acta Oncol*, 2014)。これらの事実と、PIAS1 が HIF-1 依存的な遺伝子発現の正の制御因子として機能すると

いう本研究の結果から、PIAS1 の発現上昇が見られるがん細胞では、低酸素適応応答反応の亢進により悪性度が上昇している可能性が考えられえる。この仮説を検証するために、今後、低酸素下でのがん細胞の悪性化における PIAS1 の役割を *in vivo* で解析することが特に重要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Kitagawa T, Kobayashi M, Ohta T, Terasaki M, Tsukamoto Y, Takai R, Ishizumi R, Uehara O, Nakagawa K, Akino K, Asaka M, Kuramitsu Y. | 4. 巻 35 |
| 2. 論文標題 Nine Cases of SARS-CoV-2-PCR-positive Samples Showed No Increase of Antibodies Against SARS-CoV-2 | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 In Vivo | 6. 最初と最後の頁 2947-2949 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/invivo.12587 | 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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 中川宏治、小林正伸 |
| 2. 発表標題 転写共役因子PIAS1はHIF-1依存的な遺伝子発現を増強する |
| 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 中川宏治、渡久地一真、武田宏司、小林正伸 |
| 2. 発表標題 転写コファクターPIAS1による低酸素応答性遺伝子の発現制御 |
| 3. 学会等名 第14回トランスporter研究会年会 |
| 4. 発表年 2019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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|