

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K05731

研究課題名(和文) 葉酸代謝に関与するアルデヒド脱水素酵素のがん抑制機能の全容解明を目指して

研究課題名(英文) Toward a Complete Elucidation of the Cancer Suppressive Function of Aldehyde Dehydrogenase Involved in Folic Acid Metabolism

研究代表者

佐々木 雅人 (Sasaki, Masato)

東北医科薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：30396527

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)：ALDH1L1安定発現HuH-7細胞のメタボローム解析の結果、Serが減少しGlyが増加すること、プリンヌクレオチド合成中間体のZMPが増加することを見出した。ALDH1L1発現によるZMPの増加はAMPK活性には影響を及ぼさなかったが、ZMPによるミトコンドリア膜電位の低下に耐性を示した。データベース解析では、ALDH1L1発現が酸化リン酸化や脂肪酸代謝の遺伝子群の発現に差を生じ、ALDH1L1発現の低い肝臓がん細胞株群はZMPやコルジセピンに感受性があることを示した。またALDH1L1発現が、ピリミジンヌクレオチド合成やサルベージ経路に影響しないことを見出した。これらを2報の論文とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん抑制遺伝子として推定されているALDH1L1遺伝子の肝臓がんにおける役割の一端を明らかとしたことで、肝臓がんにおける葉酸代謝の重要性をあらためて示すことができた。肝臓がんではALDH1L1発現が低下していることが多いが、ALDH1L1の役割が明らかとなったことで、新たな治療標的の策定が可能になると予想される。また、既存の核酸アナログに対する感受性試験の結果から、ALDH1L1発現の高低にかかわらず、これらの治療薬に有効であることが示された。以上の発見が、今後の肝臓がん治療の選択肢の幅を広げることにつながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Using ALDH1L1 stably expressing HuH-7 cells, metabolomic analysis revealed a decrease in Ser and an increase in Gly and an increase in ZMP, de novo purine nucleotide synthesis intermediate ZMP. Although ZMP is an activator of endogenous AMPK, ZMP derived from ALDH1L1 expression had no effect on AMPK activity. On the other hand, ZMP causes a decrease in mitochondrial membrane potential, but ALDH1L1 expression was resistant to a decrease in mitochondrial membrane potential. Database analysis showed that high and low expression of ALDH1L1 differentially expressed genes involved in oxidative phosphorylation and fatty acid metabolism, and that a group of liver cancer cell lines with low ALDH1L1 expression were sensitive to ZMP and cordycepin. We also found that ALDH1L1 expression did not affect de novo pyrimidine nucleotide synthesis or the salvage pathway. These were submitted as two papers and accepted.

研究分野：分子生物学

キーワード：がん代謝 de novo ヌクレオチド合成 翻訳後修飾 ユビキチン

1. 研究開始当初の背景

テトラヒドロ葉酸 (THF)、及び、THF 誘導体はチミジル酸やプリン合成のみならず、ビタミン B₁₂ と共同的に *S*-アデノシルメチオニン(AdoMet)の合成に関与し、AdoMet は細胞内メチル化反応のメチル基ドナーとして寄与するため、DNA やヒストンタンパク質などのメチル化 (エピジェネティック制御) にも重要な役割を果たす。THF 代謝を仲介する酵素群の一つである細胞質局在型のアルデヒド脱水素酵素 1 ファミリーメンバー-1 (ALDH1L1)とミトコンドリア局在型の ALDH1L2 は、10-ホルミル THF (10-fTHF)と NADP⁺から、THF と NADPH を産生する。細胞内 NADPH の約 40%が、これらの THF 代謝系により産生されることが知られている。NADPH は、酸化型のグルタチオンやアスコルビン酸、チオレドキシニンなどの抗酸化分子種の還元利用され、それらのリサイクリングに重要な役割を果たす。NADPH は、ALDH1L1 および ALDH1L2 の他に、ペントースリン酸経路やイソクエン酸脱水素酵素 (IDH1/2)、リンゴ酸脱水素酵素 (ME1/3)により産生され、総合的に活性酸素種(ROS)レベルの制御に寄与する。従って、NADPH 産生反応系の障害は、細胞内の ROS 維持機構に影響をおよぼすと考えられる。

研究開始当初、研究代表者は、多くの腫瘍組織で *ALDH1L1* 発現が減弱していること、複数のヒトがん細胞株においても *ALDH1L1* および *ALDH1L2* の発現が減少していること、さらに、乳がん患者の無再発生存期間、腎臓がん患者の生存率が、*ALDH1L1* 高発現患者で優位に延長することを見出していた。これらの事実から、*ALDH1L1* および *ALDH1L2* が、がん抑制遺伝子として機能することを予想し、*ALDH1L1* および *ALDH1L2* の野生型 (WT)、又は、活性中心のミスセンス変異により酵素活性を欠いたドミナントネガティブ変異体 (MT)の安定発現株を作製し、これらの解析を進めてきていた。*ALDH1L1* および *ALDH1L2* の発現レベルが異なる 2 種類の肝がん細胞株 (HepG2, HuH-7) を選択し解析を行なった所、非ストレス環境下では細胞内 NADP⁺/NADPH 比には大きな影響を及ぼさないことや、メタボローム解析により、THF 代謝に関わる L-Ser や Gly などの特定の代謝物の変化を見出していた。

研究を進める中で、*ALDH1L1* および *ALDH1L2* の WT タンパク質がユビキチン化 (Ub 化)と推定される高分子量体を形成することを発見していた。この事実は、*ALDH1L1* および *ALDH1L2* の Ub 化によるタンパク質の安定性制御機構も存在することを示している。興味深いことに、MT *ALDH1L1* および *ALDH1L2* は、その変異が Ub 化を受ける Lys 残基の変異ではないにもかかわらず、Ub 化レベルが WT よりも顕著に低下している。すなわち、酵素活性と Ub 化との間には何らかの相関があることを示唆しているが、その機序は不明であった。

2. 研究の目的

ALDH1L1 および *ALDH1L2* の活性とタンパク質安定性との相関性を、細胞・組織・個体における THF 代謝との相関性を、さらには、それらの発がん・腫瘍進展性への関与を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

- ・ *ALDH1L1* および *ALDH1L2* 安定発現肝がん細胞株を用いた生化学的・細胞生物学的解析。主として、*ALDH1L1* 安定発現 HuH-7 細胞株を用いて、NADP⁺/NADPH、ROS 定量、AdoMet 定量などを行った。加えて、代謝拮抗薬等への感受性を比較検討するために、セルフラックスアナライザーによる細胞の代謝変化をモニターした。
- ・ *ALDH1L1* および *ALDH1L2* タンパク質の分子レベルの解析では、HEK293 細胞に一過性に *ALDH1L1*、*ALDH1L2* およびユビキチン遺伝子の発現ベクターを導入し、免疫沈降法、ウェスタンブロットにより、Ub 化について検討した。加えて、どの Lys 残基を介して Ub 鎖が形成されているのかを特定する目的で、Lys 変異体のユビキチン遺伝子を作製し、同様に解析を行なった。
- ・ 遺伝子欠損マウスの作製・解析による個体レベルでの解析を目的に、*Aldh1l1* および *Aldh1l2* 遺伝子のエキソン配列内の 2 カ所に CRISPR/Cas9 システムで認識させるためのガイド RNA の設計を行い、欠失変異の有無を確認した。

4. 研究成果

研究開始当初、*Aldh1l1* および *Aldh1l2* 遺伝子欠損マウスの報告はなかったが、本申請が採択された直前・直後に *Aldh1l1* および *Aldh1l2* 遺伝子欠損マウスの報告がなされたため、本研究計

画は見直しを余儀なくされた。

ALDH1L1 安定発現 HuH-7 細胞株を用いた生化学的・細胞生物学的解析では、メタボロミクスの解析結果から、ALDH1L1 発現細胞において Ser が減少し Gly が増加すること、並びに *de novo* プリンヌクレオチド合成中間体の 5-アミノイミダゾール-4-カルボキサミドリボヌクレオチド (ZMP/AICAR)が増加することに着目した。Ser の減少と Gly の増加は、ALDH1L1 が細胞質で THF 代謝系が亢進していることを表し、さらに 10-fTHF が ALDH1L1 により消費される結果、10-fTHF からホルミル基を受容して ZMP から 5-ホルムアミノイミダゾール-4-カルボキサミドリボヌクレオチドが産生する反応が障害され、ALDH1L1 発現細胞では ZMP が蓄積することが示唆された。ZMP は内在性の AMP 依存性プロテインキナーゼ(AMPK)の活性化因子であることが知られていることから、ALDH1L1 発現細胞における AMPK の活性化を調べたが、興味深いことに、AMPK の活性には変化が見られなかった。一方、セルフラックスアナライザーを用いた解析では、ALDH1L1 の発現はミトコンドリア活性に影響を及ぼし、ZMP によるミトコンドリア膜電位の低下に耐性を示すことを見出した。加えて、データベースサーチにより、ALDH1L1 発現の高低が酸化的リン酸化や脂肪酸代謝に関与する遺伝子発現に差があること、ならびに ALDH1L1 発現の低い肝臓がん細胞株群では ZMP と ZMP 類似化合物の Cordycepin に対して感受性があることを見出し、以上をまとめて Scientific reports に投稿・受理された。研究を推進する中で、がん細胞におけるヌクレオチド要求性に着目した。ALDH1L1 発現細胞では ZMP の蓄積が表す通り、*de novo* プリンヌクレオチド合成が抑制されていると予想され、ヌクレオチドの供給はサルベージ経路に依存していると考えられた。そこで、プリンヌクレオチドアナログを用いた感受性試験を実施したところ、ALDH1L1 発現には影響が見られなかった。ZMP は *de novo* ピリミジンヌクレオチド合成に対しても抑制的に働くことを示唆する論文があることから、ジヒドロオロト酸デヒドロゲナーゼ阻害剤およびピリミジンヌクレオチドアナログを用いた感受性試験も行ったが、ALDH1L1 発現は両者に影響されなかった。これらの結果は、ALDH1L1 の発現の高低にかかわらず、ヌクレオチド製剤が肝臓がんの治療に用いることが可能であることを示唆しており、以上を Fundamental Toxicological Sciences に投稿・受理された。

ALDH1L1 および ALDH1L2 タンパク質の分子レベルの解析では、特定の試薬処理時にのみ ALDH1L1 および ALDH1L2 タンパク質の Ub 化が亢進することを見出している。現在、その機序についての解析と、Ub 鎖の連結様式の解析を行なっている。また、ALDH1L2 については Ub 化の E3 リガーゼは未同定であり、RNA 干渉を用いた E3 リガーゼの同定について検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sasaki Masato, Yamamoto Kazuo, Ueda Takeshi, Irokawa Hayato, Takeda Kouki, Sekine Ryoya, Itoh Fumie, Tanaka Yutaka, Kuge Shusuke, Shibata Nobuyuki	4. 巻 13
2. 論文標題 One-carbon metabolizing enzyme ALDH1L1 influences mitochondrial metabolism through 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide accumulation and serine depletion, contributing to tumor suppression	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13486
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-38142-5	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 -

1. 著者名 Sasaki Masato, Itoh Fumie, Shibata Nobuyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Effects of expression of the 10-formyltetrahydrofolate metabolizing enzyme ALDH1L1 on pyrimidine nucleotide synthesis and the salvage pathway	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Fundamental Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 241 ~ 247
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2131/fts.10.241	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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐々木雅人、山本一男、上田健、色川隼人、武田洸樹、関根僚也、伊藤文恵、田中大、久下周佐、柴田信之
2. 発表標題 10-ホルミルテトラヒドロ葉酸代謝酵素の発現はミトコンドリア活性と5-アミノイミダゾール-4-カルボキサミドリボヌクレオシド感受性に影響を及ぼす / Expression of a 10-formyltetrahydrofolate-metabolizing enzyme affects mitochondrial respiration and 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside sensitivity.
3. 学会等名 第50回 日本毒性学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐々木雅人、山本一男、上田健、色川隼人、関根僚也、武田洸樹、田中大、伊藤文恵、久下周佐、柴田信之
2. 発表標題 肝がん細胞におけるプリンヌクレオチドアナログ感受性と10-ホルミルテトラヒドロ葉酸代謝酵素発現レベルとの相関 / Relationship between purine nucleotide analogue sensitivity and 10-formyltetrahydrofolate metabolizing enzyme expression in hepatocellular carcinoma cells.
3. 学会等名 フォーラム2023 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐々木雅人、山本一男、伊藤文恵、田中大、柴田信之
2. 発表標題 アルデヒドデヒドロゲナーゼ1ファミリーメンバーL1発現HuH-7細胞におけるテトラヒドロ葉酸代謝とペントースリン酸経路の関連解析
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 佐々木雅人、山本一男、上田健、武田洸樹、色川隼人、伊藤文恵、田中大、久下周佐、柴田信之
2. 発表標題 がん細胞における葉酸代謝酵素発現がde novoプリン合成中間体AICAR量の変化とエネルギー代謝に及ぼす影響
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 柳澤紗良、佐々木雅人、伊藤文恵、田中大、小松祥子、藤村務、柴田信之
2. 発表標題 葉酸代謝酵素ALDH1L1、および、ALDH1L2のストレスに応答した翻訳後修飾変化の解析
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金澤和康、佐々木雅人、佐藤絵理香、佐川舜乙、武山亜美、伊藤文恵、田中大、柴田信之
2. 発表標題 葉酸代謝酵素ALDH1L1/2のコピキチン修飾による活性調節機構
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 武山亜美, 橘 賢一, 伊藤文恵, 田中 大, 佐々木雅人, 柴田信之
2. 発表標題 葉酸代謝関連酵素の SUMO 化修飾
3. 学会等名 第59回日本薬学会東北支部大会
4. 発表年 2020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	山本 一男 (Yamamoto Kazuo) (70255123)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・准教授 (17301)	

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
---------	---------