

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06546

研究課題名（和文）ユビキチン様タンパク質MNSF の糖代謝制御によるがん細胞増殖調節機構の解明

研究課題名（英文）Regulation of cancer cell growth by regulation of glucose metabolism by ubiquitin-like protein MNSF

研究代表者

中村 守彦（Morihiro, Nakamura）

島根大学・学術研究院医学・看護学系・教授

研究者番号：20155865

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）：MNSF はユビキチン様ファミリーのユビキチン発現メンバーであり、様々な生物学的機能に関与している。RAW264.7細胞において、MNSF siRNAは酸素消費速度と活性酸素産生を増加させたが、ATPレベルは減少させた。ミトコンドリアATP合成酵素の阻害剤であるオリゴマイシンを添加したときのATP減少率は、MNSF をノックダウンした細胞で有意に大きかった。さらに、HIF-1 タンパク質およびmRNAの発現レベルは、MNSF siRNAによって低下した。グルコース代謝に対するMNSF の影響をマウス腹膜マクロファージで調べたが、乳酸産生、グルコース消費、活性酸素産生に変化はなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ユビキチン様タンパク質MNSF の役割として、世界で初めて糖代謝制御機能について詳細に明らかにした。この研究成果は、本研究領域へ与えるインパクトは極めて大きい。これまでアポトーシス制御など多様な機能について明確にしてきたが、今回の研究成果により、MNSF は生命の根幹に関与する機能を有すると推察される。

研究成果の概要（英文）：Monoclonal non-specific suppressor factor (MNSF) is a ubiquitously expressed member of the ubiquitin-like family that has been involved in various biological functions. Previous studies have demonstrated that MNSF regulates glycolysis and enhances cell proliferation in the macrophage-like cell line RAW264.7. In this study, we showed that MNSF regulates HIF-1-mediated metabolic reprogramming. In RAW264.7 cells, MNSF siRNA increased oxygen consumption rate and ROS production, but decreased ATP levels. The rate of ATP reduction upon addition of oligomycin, an inhibitor of mitochondrial ATP synthase, was significantly greater in cells with MNSF knockdown. In addition, the expression levels of HIF-1 protein and mRNA were decreased by MNSF siRNA. The effect of MNSF on glucose metabolism was examined in murine peritoneal macrophages, but there were no changes in lactate production, glucose consumption, or ROS production.

研究分野：生物化学

キーワード：ユビキチン HIF 糖代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者・中村は 1995 年に、サイトカインの 1 つとして、Monoclonal Nonspecific Suppressor Factor  $\beta$  (MNSF $\beta$ ) を発見し、細胞増殖や細胞分化の調節機能について明らかにしてきた。

最近、SUMO などユビキチン様タンパク質が解糖系を制御することが報告されている。本研究の目的は、ユビキチン様タンパク質 MNSF $\beta$  の糖代謝制御による、がん細胞増殖調節機序の解明である。ユビキチン化に準じた MNSF $\beta$  化による、新しいタンパク質翻訳後修飾機構と他のユビキチン様タンパク質 (SUMO etc.) およびユビキチン・システムとの共通点と相違点を明確にし、同研究分野の発展に寄与する。

2. 研究の目的

予備実験で、MNSF $\beta$  siRNA が細胞膜 GLUT1 (glucose transporter 1) 発現を強く抑制することを確認した。MNSF $\beta$  化される標的タンパク質と、この MNSF $\beta$  化で制御を受ける重要な解糖系酵素として PFKFB3 を同定した。ユビキチン化と異なり、MNSF $\beta$  化はタンパク質分解を伴わない。MNSF $\beta$  による GLUT1 発現調節を介した糖代謝調節機序を明らかにし、抗がん創薬につなげる。

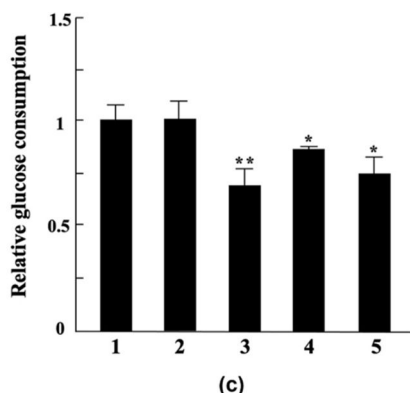
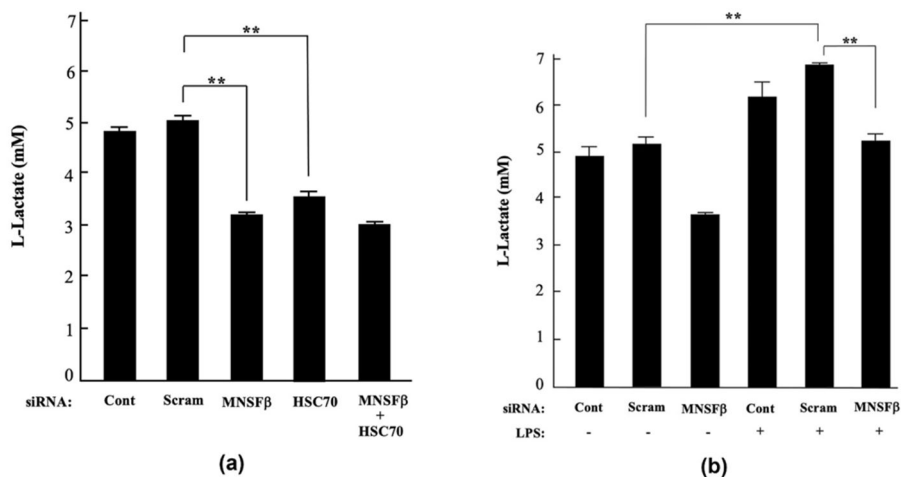
3. 研究の方法

- ① MNSF $\beta$  が解糖系の制御に直接関与することを実証する目的で、以下の実験を遂行する。
- ② 糖代謝に關する GLUT1 の過剰発現が、種々のがん細胞のアポトーシスにおいて重要な働きをすることが多く報告されている。そこで、MNSF $\beta$  の糖代謝制御について、GLUT1 に焦点を当てる。
- ③ 予備実験により、MNSF $\beta$  が HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1)  $\alpha$  発現を制御する結果を得ている。HIF-1 $\alpha$  は糖代謝を制御する中心的な分子であり、アポトーシス調節にも深く関与する。HIF-1 $\alpha$  は GLUT1 の遺伝子発現を調節するので、HIF-1 $\alpha$  の転写因子活性を調べる。
- ④ MNSF $\beta$  の解糖系制御機構を生化学・分子化学的手法により明らかにする。

4. 研究成果

**MNSF $\beta$  siRNA は Raw264.7 細胞における乳酸放出とグルコース取り込みを阻害する**

MNSF $\beta$  siRNA で処理すると、乳酸の分泌が強く阻害された (図 1a)。同様に、HSC70 siRNA を導入した Raw264.7 細胞でも乳酸の放出が抑制された。MNSF $\beta$  と HSC70 のダブルノックダウンは、単独の siRNA 処理と有意差はなかった。これらの結果は、HSC70 が MNSF $\beta$  の活性を安定化させる重要なシャペロンであるという仮説を支持するものである。次に、MNSF $\beta$  siRNA 処理が、LPS 刺激 Raw264.7 細胞による乳酸放出に影響するかどうかを調べた。乳酸放出は Raw264.7



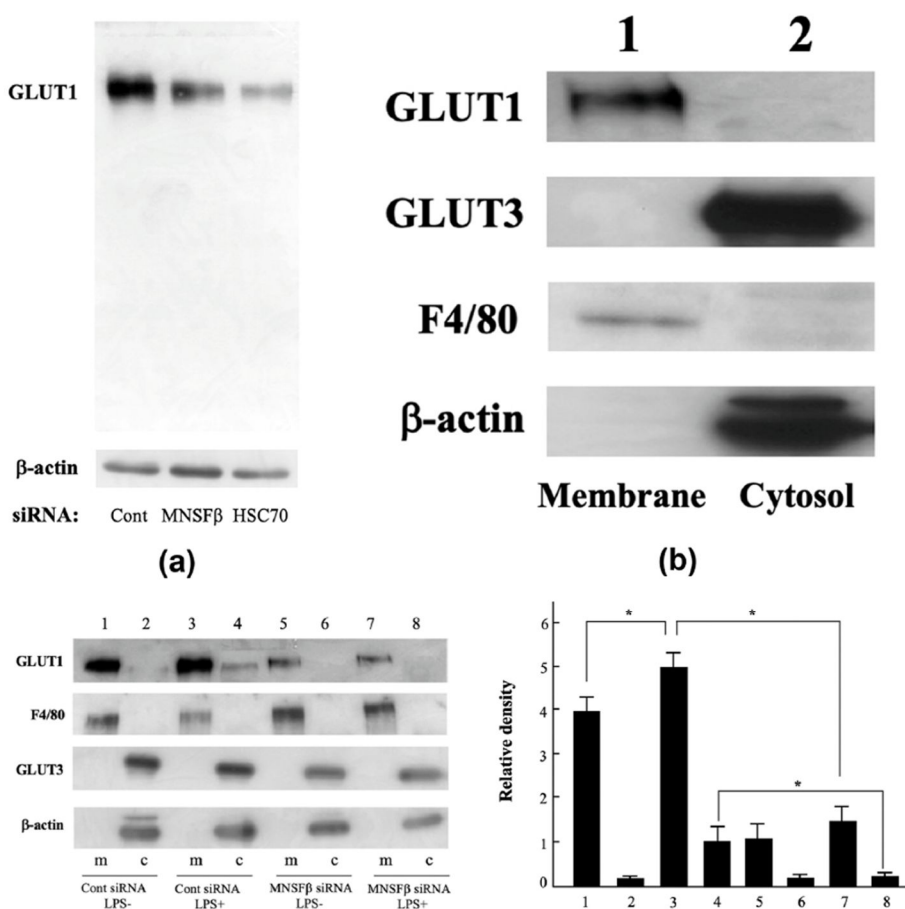
**図 1** (a)MNSFβ siRNA で処理した細胞の培養液中の乳酸量を、材料と方法のセクションに記載したように、乳酸アッセイキットを用いて測定した。HSC70 siRNA で処理した細胞から放出された乳酸の量も測定した。**\*\*p < 0.01** 対スクランブル siRNA で処理した細胞 (b) LPS 刺激細胞における乳酸放出の増加に対する MNSFβ siRNA の効果を測定した。**\*\*p < 0.01** 対スクランブル siRNA で処理した細胞 (LPS あり、なし) (c) Raw264.7 細胞によるグルコースの取り込みを、材料と方法のセクションに記載されているように、グルコースアッセイキット-WST を用いて試験した。レーン 1、コントロール (siRNA なし); レーン 2、スクランブル siRNA; レーン 3、MNSFβ siRNA; レーン 4、HSC70 siRNA; レーン 5、MNSFβ siRNA + HSC70 siRNA。スクランブル siRNA で処理した細胞に対して **\*p < 0.05**; スクランブル siRNA で処理した細胞に対して **\*\*p < 0.01**。

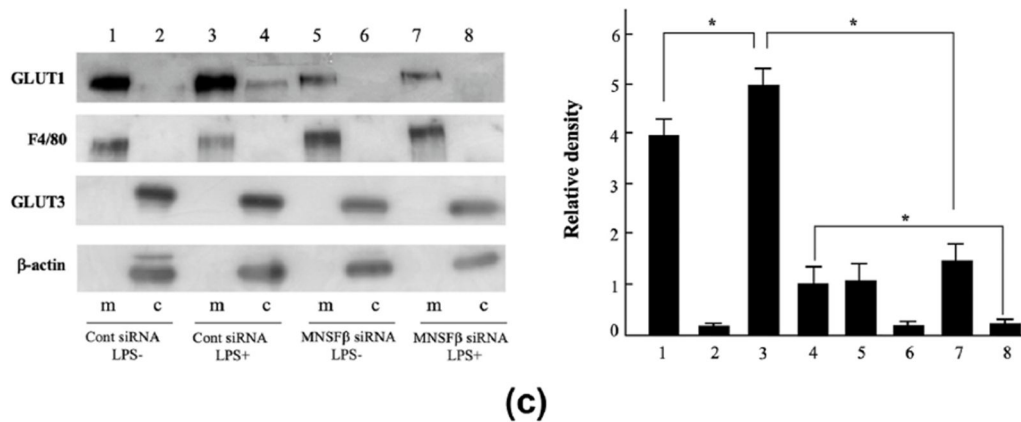
細胞の LPS 刺激によって増加し (図 1b)、この乳酸の増加は MNSFβ siRNA 処理によって有意に阻害された (図 1b)。乳酸の放出とグルコースの取り込みは、解糖に深く関与している。MNSFβ siRNA がグルコース取り込みに影響するかどうかを調べるため、比色 WST 反応に基づくグルコースアッセイ系を用いた。その結果、非刺激 Raw264.7 細胞において、MNSFβ siRNA 処理はグルコース取り込みに対して有意な阻害効果を示した (図 1c、レーン 3)。MNSFβ siRNA と同様に、HSC70 siRNA もグルコース取り込みを有意に阻害した (図 1c、レーン 4)。

### GLUT1 は MNSFβ の制御活性に関与する重要な因子である

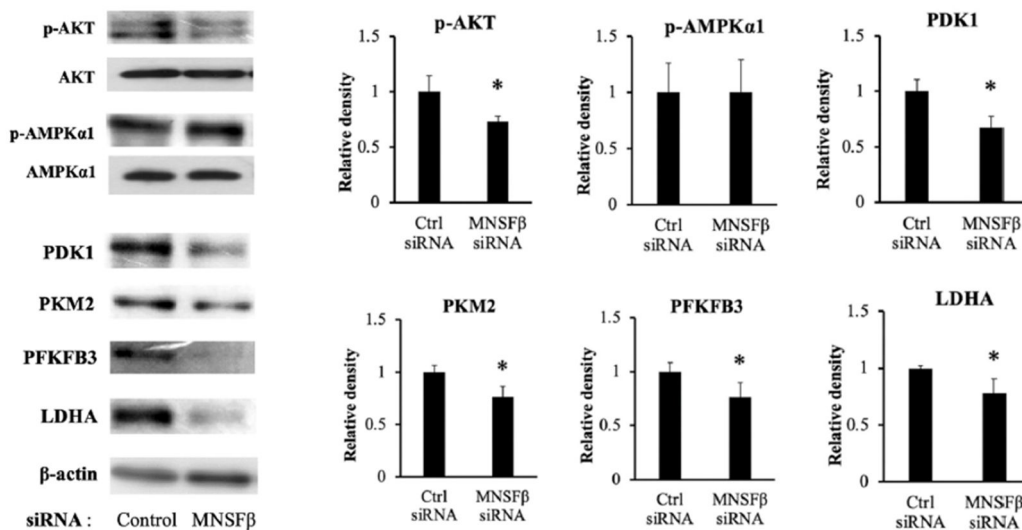
図 2a に示すように、全細胞で GLUT1 の強い発現が観察され、MNSFβ と HSC70 の両方 siRNA は GLUT1 の発現を強力に阻害した。次に、細胞を膜画分と細胞質画分に分画し、それぞれの GLUT1 と GLUT3 の発現をウェスタンブロット分析で解析した。膜マーカーには F4/80 を用いた。図 2b から明らかなように、GLUT1 は膜に強く発現していたが、このトランスポーターは細胞質では検出されなかったことから、細胞は正しく分画されたことがわかる。対照的に、GLUT3 は細胞質に強く発現していたが、未刺激の Raw264.7 細胞では細胞膜に移動していなかった。まとめると、GLUT1 はマクロファージにおけるグルコース代謝を仲介し、MNSFβ は GLUT1 の細胞膜発現を制御している。また、非刺激細胞の細胞質には GLUT1 が観察されなかったことから、MNSFβ は GLUT1 の細胞膜へのトランスロケーションには関与していない可能性がある。LPS で刺激した Raw264.7 細胞では GLUT1 の発現が増加したことが以前に報告されている。そして、MNSFβ siRNA が LPS (1μg/ml) 刺激細胞における GLUT1 の増加に影響を与えるか検討した。

図 2c (レーン 4) に示すように、GLUT1 の細胞膜発現は増加し、細胞質での発現はわずかに検出可能であった。MNSFβ siRNA 処理により、LPS 刺激細胞における両者の発現上昇が抑制された。LPS 刺激細胞では、GLUT3 の細胞膜発現は観察されなかった (図 2c、レーン 3)。MNSFβ siRNA で処理した Raw264.7 細胞では、GLUT3 の発現が僅かに減少した (図 2、レーン 6 と 8)。





(c)



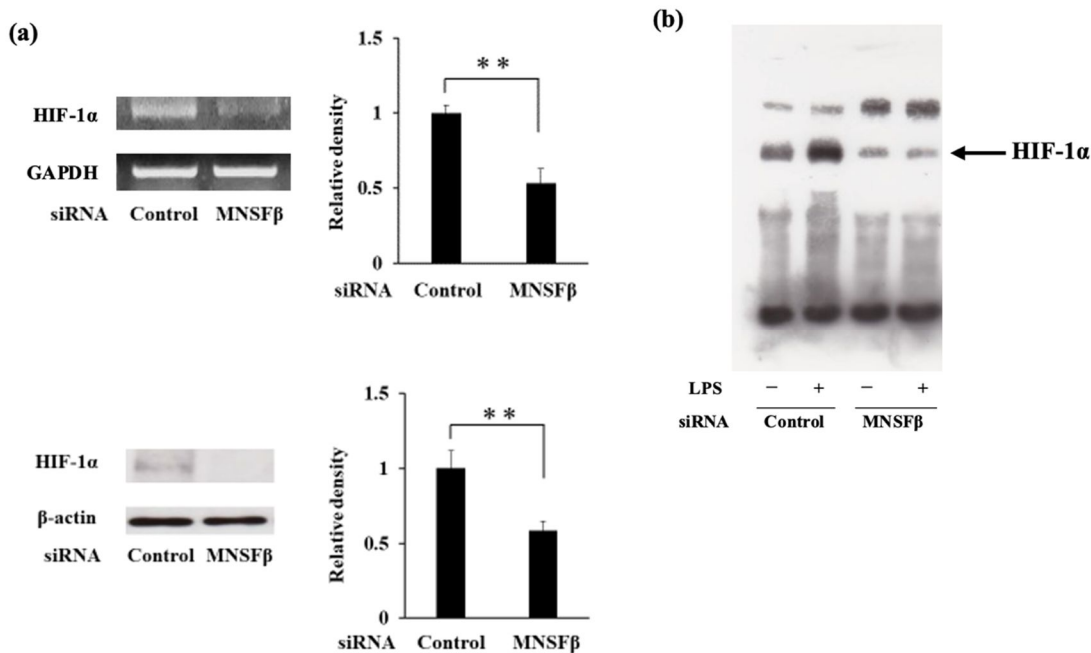
(d)

図 2(A) MNSFβ siRNA または HSC70 siRNA で処理した非刺激 Raw264.7 細胞における GLUT1 発現を、抗 GLUT1 抗体を用いたウェスタンブロット分析により測定した。(B) 細胞を膜と細胞質に分画し、各分画について抗 GLUT1 抗体と抗 GLUT3 抗体を用いてウェスタンブロットアッセイを行った。膜マーカーとして F4/80 を用いた。(C) LPS 刺激細胞において、GLUT1 および GLUT3 発現に対する MNSFβ siRNA の効果を評価した。値は 3 連サンプルの平均値±標準偏差で表した。\*p-AKT, リン酸化 AKT; p-AMPKα1, リン酸化 AMPKα1。値は 3 連サンプルの平均値±標準偏差で表した。MNSFβ siRNA で処理しなかった細胞に対して、\*p < 0.05。

さらに、MNSFβ によって制御されるグルコース代謝の主要分子を同定した。図 1D に示すように、MNSFβ siRNA で処理した Raw264.7 細胞では、ピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ 1 (PDK1) ピルビン酸キナーゼアイソザイム M2 (PKM2) 6-ホスホフルクト-2-キナーゼ/フルクトース-2,6-ビスホスファターゼ 3 (PFKFB3) 乳酸デヒドロゲナーゼ A (LDHA) の発現が有意に阻害された。AKT のリン酸化 (活性化) も阻害されたが、AMP 活性化プロテインキナーゼ α1 (AMPKα1) は阻害されなかった。したがって、MNSFβ は解糖に関するいくつかの重要な分子を制御している。

#### MNSFβ は Raw264.7 細胞において HIF-1α の mRNA およびタンパク質発現を制御する

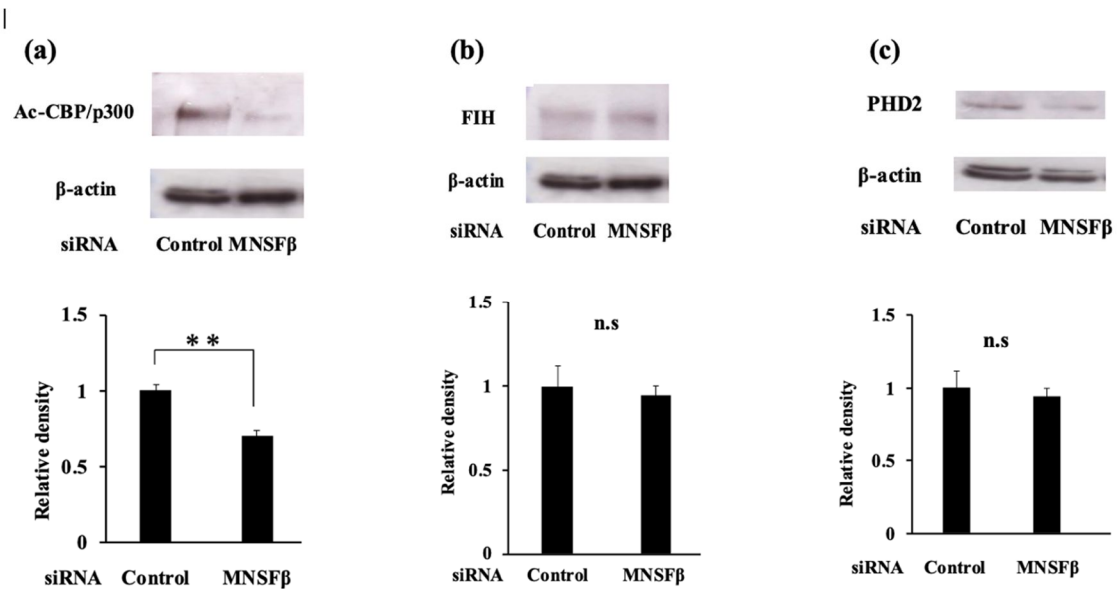
HIF-1α が MNSFβ による解糖制御を媒介するかどうかを調べるため、HIF-1α の mRNA およびタンパク質の発現を解析した。MNSFβ siRNA の 48 時間トランスフェクション後、HIF-1α mRNA およびタンパク質発現は有意に減少した (図 3a)。さらに、EMSA により HIF-1α の DNA 結合性を評価した。MNSFβ siRNA は DNA-HIF-1α 相互作用を阻害した (図 3b)。これらの結果は、MNSFβ ノックダウンによる HIF-1α 転写活性の低下が、解糖の抑制に関与している可能性を強く示唆している。



**図 3** (a) Raw264.7 cells were transfected with siRNAs for 48 h and MNSFβ mRNA (upper) and protein (lower) expression were analyzed by RT-PCR and western blotting, respectively. (b) the DNA binding activity of HIF-1 was evaluated by EMSA. Cells were stimulated with 1 μg/ml LPS for 24 h after 48 h transfection and nuclear extracts were prepared. The data are presented as the means ±SD from three independent experiments. \*\* $P < 0.01$ .

### MNSFβ siRNA は Raw264.7 細胞のアセチル-CBP/p300 の発現を低下させる

HIF-1α の安定性と転写活性は、ユビキチン化、水酸化、アセチル化などの翻訳後修飾によって制御されている。そこで、MNSFβ が HIF-1α の安定化と複合体形成に関与する因子に影響を及ぼすかどうかを調べた。48 時間トランスフェクション後、MNSFβ siRNA はアセチル-CBP/p300 の発現を減少させたが (図 4a)、FIH および PHD2 の発現は変化しなかった (図 4b、4c)。これらの結果は、MNSFβ siRNA による HIF-1α 転写活性の低下は、HIF-1α だけでなく、アセチル-CBP/p300 の発現低下によっても影響され、HIF-1α 標的遺伝子の発現低下を通じて解糖を抑制することを示している。



**図 4** After 48 h of transfection, acetyl-p300/CBP (a), FIH (b) and PHD2 (c) expression were analyzed by western blotting. The data are presented as the means ±SD from three independent experiments. \*\* $P < 0.01$ .

### 結語

MNSFβ は RAW264.7 細胞において、GLUT1 を介しての糖代謝を制御していることを明らかにした。そして、HIF-1α がその制御に深く関与していることを確認した。マウス腹腔マクロファージにおいても同様の結果を得ており、今後も、ユビキチン様タンパク質の糖代謝制御に焦点を当てた研究を遂行する。

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 1件）

1. 著者名 Morihiro Nakamura, Yuki Fukuma, Kaori Notsu, Megumi Kono	4. 巻 49
2. 論文標題 Quercetin and HSC70 coregulate the anti-inflammatory action of the ubiquitin-like protein MNSF	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Biology Reports	6. 最初と最後の頁 1213-1222
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11033-021-06949-y	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 Morihiro Nakamura, Kyoko Yamasaki, Megumi Kono	4. 巻 33
2. 論文標題 Ubiquitin-like protein MNSF regulates glycolysis and promotes cell proliferation with HSC70 assistance	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemistry and biophysics reports	6. 最初と最後の頁 101414
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2022.101414	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3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高野恵、中村守彦
2. 発表標題 ユビキチン様タンパク質MNSF がもたらす糖代謝制御機構
3. 学会等名 第95回 日本生化学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高野恵、中村守彦
2. 発表標題 ユビキチン様タンパク質MNSF による糖代謝制御の分子機構の解明
3. 学会等名 第94回 日本生化学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高野恵、中村守彦
2. 発表標題 ユビキチン様タンパク質MNSF の糖代謝制御による細胞増殖調節機構の解明
3. 学会等名 第93回 日本生化学会
4. 発表年 2021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