

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06206

研究課題名(和文) p53とAMPKが織りなす多階層的ながん抑制システムの統合解析

研究課題名(英文) Integrated analysis of the multi-layered tumor suppressor system woven by p53 and AMPK

研究代表者

宮本 崇史 (Takafumi, Miyamoto)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：50740346

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：近年、転写因子p53による代謝制御が、がんを抑制する上で重要な役割を担っていることが明らかにされている。このp53による代謝制御を介したがん抑制メカニズムでは、がん治療上の標的分子の1つであるAMPKの時空間的な活性制御を適切にコントロールする必要がある。しかし、p53-AMPK axisによるがん抑制メカニズムは十分に解明されていない。

本研究ではp53-AMPK axisによるがん抑制メカニズムを解明するには至らなかったが、p53と栄養代謝の関連性、AMPKの時空間的な活性ダイナミクスの可視化の改良など、今後の研究展開に必要な基盤技術の開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転写因子p53やリン酸化酵素AMPKの機能を理解することは、より効果的ながんの治療法や予防法を開発していく上で、極めて有用である。

本研究ではp53-AMPK axisによるがん抑制メカニズムを解明するには至らなかったが、p53と栄養代謝の関連性、AMPKの時空間的な活性ダイナミクスの可視化の改良など、今後の研究展開に必要な基盤技術の開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：Recently, metabolic regulation by the transcription factor p53 has been shown to play an important role in suppressing cancer. This p53-mediated metabolic regulation requires appropriate control of the spatiotemporal activity of AMPK, which is one of the target molecules for cancer therapy. However, the mechanism of cancer suppression by the p53-AMPK axis has not been fully elucidated.

Although this study did not elucidate the mechanism of cancer suppression by the p53-AMPK axis, we succeeded in developing fundamental technologies necessary for future research development, such as the relationship between p53 and nutrient metabolism and improved visualization of the spatiotemporal activity dynamics of AMPK.

研究分野：がん生物学

キーワード：p53 AMPK

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がん細胞において最も高頻度に変異が見られる転写因子 p53 は、様々な細胞機能の制御を通してがん抑制的に機能していることが知られている(Biegging et al. Nat Rev Cancer. 2014; 研究業績論文 1-5, 12, 14-17)。近年その中でも特に p53 による代謝調節が、がんの抑制に対して中心的な役割を担っていることが明らかにされている(Li et al. Cell. 2012; Vousden and Ryan. Nat Rev Cancer. 2009)。これまでに 20 以上の代謝関連遺伝子が p53 によって直接制御されていることが報告されているが、これら遺伝子の発現誘導は条件依存的であり、必ずしも常に全てが誘導されているわけではない(Fischer et al. Nucleic Acids Res. 2016)。従って p53 による代謝制御では、ほぼすべての条件で誘導される代謝関連遺伝子(core metabolism-related genes (MRGs))と条件特異的に誘導される代謝関連遺伝子(peripheral MRGs)の組み合わせによって多彩な栄養環境を創り出すことになる。こうした細胞内外の栄養環境の変化は栄養情報として処理され、細胞内シグナル伝達系を通じて適切な細胞機能が実行される。この p53 を起点とした栄養情報の変化から適切な細胞機能が実行されるまでの情報処理プロセスを統括している分子が 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) である(Vousden and Ryan. Nat Rev Cancer. 2009)。

AMPK はヘテロ三量体からなるセリン・スレオニンリン酸化酵素で、細胞内の栄養環境の変化を感知し、50 以上の基質のリン酸化を介して様々な細胞機能を制御していることが知られている(Hardie et al. Nat Rev Mol Cell Biol. 2012)。こうした多機能性を有する AMPK は、時空間的にその活性パターンを変化させることで、状況に応じて適切な細胞機能を選択・実行していることが代表者によって明らかにされている。興味深いことに、p53 は栄養環境を含む様々な環境情報の変化に対して、AMPK と密な情報連携を行うことでがん抑制的に機能することが知られている(Vousden and Ryan. Nat Rev Cancer. 2009)。従って、p53 による代謝関連遺伝子の発現制御ネットワークと AMPK による時空間的なシグナル伝達系を「細胞内の代謝情報の変化」というキーワードでつなぐ多階層的な機能解析は、p53 と AMPK によって行われるがん抑制メカニズムの動作原理を理解するうえで重要であると考えられる(Weidong et al. Oncotarget. 2015; Zadra et al. Mol Cancer Res. 2015)。しかしその詳細な解析は行われていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は上述の学術的問いを紐解くことで、p53 による代謝制御が創り出す情報の意味を解読し、その先にあるがん抑制メカニズムを実行するうえで中核をなす情報の流れを多階層横断的に理解することである。

### 3. 研究の方法

#### **(1) 様々なストレス情報に対する代謝関連遺伝子の協奏的な発現制御を明らかにする**

代表者は抗がん剤である Adriamycin で処理した HCT116 ヒト大腸癌由来細胞株と MCF10A ヒト乳腺上皮細胞株を対象とした transcriptome analysis を行い、p53 依存的に発現が変化する代謝関連遺伝子の探索を行なった。その結果と Fischer らのメタ解析(Nucleic Acids Res. 2016)を合わせて検討した結果、全ての条件で誘導される core MRGs は ISCU と TIGAR、GLS2 であり、それ以外は条件依存的な peripheral MRGs であることがわかった。本研究計画では、さらに詳細な検討を行うため、Adriamycin 以外に p53 を活性化させることが知られている Nutrin-3a (Shangary and Wang. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2009)や X 線、グルコースやアミノ酸飢餓(Jones et al. Mol Cell. 2005; Maddocks et al. Nature. 2013)などで様々な組織由来の細胞株を処理する。その後、それぞれにおいてどういった p53 標的代謝関連遺伝子の発現が協奏的に行われているのかを quantitative PCR によって検討し、代謝関連遺伝子内での core MRGs と peripheral MRGs を明らかにする。使用する細胞株は野生型の p53 を持つ細胞株とそれを CRISPR-Cas9 system によって knockout したもの、およびゲノム編集によって p53 変異体に置換された細胞株を用いる。すでに p53 knockout cell lines の樹立は進めている。p53 変異体としては gain-of-function が知られている R175H や R248W など(Muller and Vousden. Cancer Cell. 2014)に加え、p53 依存的なアポトーシス誘導ができない K117R 変異体と代謝制御能しか有していない 3KR (K117R+K161R+K162R)変異体(Li et al. Cell. 2012)を含めて解析する。

#### **(2) p53 標的遺伝子の誘導のみを阻害すること可能にした細胞株の樹立**

多くの代謝関連遺伝子は細胞内の栄養環境の恒常性を維持するうえで必須であるため、CRISPR-Cas9 system で Knockout 細胞株を樹立した場合、それだけで細胞内のシグナル伝達系に影響がでてしまうことを代表者は報告している。また定型外翻訳の問題(Makino et al. Sci Rep. 2016)も考慮する必要がある。そこで本研究計画では、p53 による発現誘導のみを阻害するため、各代謝関連遺伝子の発現誘導に必要な p53 結合配列を CRISPR-Cas9 system を用いたゲノム編集技術に

よって改変もしくは除去した細胞株( $\Delta p53BS^{MRG}$ 細胞株)を樹立し、3(1)同様な検討を行う。既に予備実験として p53 の標的遺伝子である MDM2 の p53 結合配列を除去した細胞株を樹立し、ベアスラインでの発現レベルには影響を与えずに、p53 の活性化に伴う発現誘導のみを阻害できることを確認している。

> 本研究を進めるため、CRISPR-Cas9 による最適なゲノム編集技術の確立を行った。その結果、複数の gRNA を使った p53BS の切除ではなく、ゲノム配列の置換によって p53BS を改編する方が良いという結論に至った。現在、Koch らの方法 (Nat Protocol. 2018) に従って、ゲノム配列の改編を進めている。

### **(3) p53 による代謝制御を起点とする AMPK の時空間的なシグナルダイナミクスの解析**

代表者は時空間特異的に AMPK の活性をリアルタイムでモニタリングできる Förster resonance energy transfer-based AMPK biosensors (ABKARs)を開発し、時空間的な AMPK の活性パターンが AMPK によって実行される細胞機能を決定するうえで重要であることを報告している。本研究計画では p53 による代謝制御の結果創り出される栄養環境が AMPK の活性レベルを時空間的にどのように変化させるのかを ABKARs を用いて網羅的に検討する。細胞株は p53 の野生型、欠損型、変異型に加え、上述の各代謝関連遺伝子に対応した  $\Delta p53BS^{MRG}$  細胞株を使用することで、様々な条件下における AMPK の時空間的な活性パターンについて包括的な理解を試みる。

### **(4) p53 によるがん抑制メカニズムを実行するために必須となる代謝関連遺伝子の同定**

p53 による AMPK を介したがん抑制メカニズムでは、アウトプットとして細胞周期停止を誘導するタイプ(Jones et al. Mol Cell. 2005)とアポトーシスを誘導するタイプ(Okoshi et al. J Biol Chem. 2008)が知られている。本研究計画では、どの AMPK の時空間的な活性パターンが細胞周期停止もしくはアポトーシスの誘導につながるのかを明らかにし、そのパターンを創り出すために必要な p53 標的代謝関連遺伝子の最小構成要素の同定を試みる。p53 標的代謝関連遺伝子の最小構成遺伝子は  $\Delta p53BS^{MRG}$  細胞株を用いて決定する。また細胞周期停止やアポトーシス誘導に必要な AMPK の時空間的な活性パターンは、代表者が開発したタンパク質の活性レベルを時空間的に操作できる手法を用いて特定する。

### **(5) p53 によるがん抑制メカニズムで創り出される栄養環境の検討**

上述 3(1)から 3(4)の研究を通して、p53 によるがん抑制メカニズムを実行するために必要な代謝関連遺伝子の最小構成要素と AMPK の時空間的な活性パターンを決定した後、そうした条件時の細胞内栄養環境をメタボローム解析によって検討することで、こういった栄養素もしくは栄養素の組み合わせが重要なのかを明らかにする。代表者はすでに HCT116 細胞を Adriamycin で処理した場合のメタボローム解析を行い、p53 依存的に変動する代謝物質の検討を進めている。

## 4. 研究成果

### **(1) 様々なストレス情報に対する代謝関連遺伝子の協奏的な発現制御を明らかにする**

HCT116 細胞での実験を行う前の予備検討として、ラット肝臓癌由来細胞株 H-II-4-E 細胞を様々な栄養欠乏条件下(アミノ酸飢餓、グルコース飢餓、脂質飢餓)で培養し、その影響を検討するためにトランスクリプトーム、プロテオーム、メタボロームの解析を行った。本研究結果がまだ未発表であるため詳細を公表することは差し控えるが、様々な栄養欠乏条件特異的に変動する複数のオミクス情報を特定した。現在、その中から p53 と AMPK とリンクする情報の抽出を行っており、HCT116 細胞での検討を含めた包括的な理解に向けた準備を進めている。

### **(2) p53 標的遺伝子の誘導のみを阻害すること可能にした細胞株の樹立**

本研究を進めるため、CRISPR-Cas9 による最適なゲノム編集技術の確立を行った。その結果、複数の gRNA を使った p53BS の切除ではなく、ゲノム配列の置換によって p53BS を改編する方が良いという結論に至った。現在、Koch らの方法 (Nat Protocol. 2018) に従って、ゲノム配列の改編を進めている。

### **(3) p53 による代謝制御を起点とする AMPK の時空間的なシグナルダイナミクスの解析**

本研究期間において osABKARs による時空間的な AMPK の活性ダイナミクスを可視化する技術の改良を行った。その結果、論文投稿時(2015年)よりも遥かに高い解像度で AMPK の時空間的な活性ダイナミクスを可視化することに成功している。現在、本手法について論文の投稿を準備している。

### **(4) p53 によるがん抑制メカニズムを実行するために必須となる代謝関連遺伝子の同定**

### **(5) p53 によるがん抑制メカニズムで創り出される栄養環境の検討**

今回我々は p53-AMPK axis におけるがん抑制的な作用が、細胞内構造のリモデリングと連携しているという仮説を見出した。例えば多くのがん細胞ではミトコンドリアの断片化が観察されるが、AMPK もまた、ミトコンドリアの断片化に関与していることが報告されている。この多くのがん細胞で観察される「ミトコンドリアの断片化」は持続的な表現型であるのに対し、AMPK による「ミトコンドリアの断片化」は短期的な表現型である。つまり、「ミトコンドリアの断片化」と一言 でいっても、それがどれぐらいの期間続いた断片化なのかによって意味合いが異なるのではないかと考えた。しかしこうしたアイデアを検討するためには、任意のタイミングかつ秒から分のオーダーでミトコンドリアの形態を変化させる技術が必要だが、そうした技術が開発されていなかった。

## 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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miyamoto Takafumi, Matsuzaka Takashi, Shimano Hitoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Rho associated, coiled coil containing protein kinase 1 as a new player in the regulation of hepatic lipogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 1165 ~ 1167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13051	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 Matsuzaka T, Kuba M, Koyasu S, Yamamoto Y, Motomura K, Arulmozhiraja S, Ohno H, Sharma R, Shimura T, Okajima Y, Han SI, Aita Y, Mizunoe Y, Osaki Y, Iwasaki H, Yatoh S, Suzuki H, Sone H, Takeuchi Y, Yahagi N, Miyamoto T, Sekiya M, Nakagawa Y, Ema M, Takahashi S, Tokiwa H, Shimano H.	4. 巻 -
2. 論文標題 Hepatocyte ELOVL Fatty Acid Elongase 6 Determines Ceramide Acyl Chain Length and Hepatic Insulin Sensitivity in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep.30953	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 Ma Yang, Sekiya Motohiro, Kainoh Kenta, Matsuda Takaaki, Iwasaki Hitoshi, Osaki Yoshinori, Sugano Yoko, Suzuki Hiroaki, Takeuchi Yoshinori, Miyamoto Takafumi, Yahagi Naoya, Nakagawa Yoshimi, Matsuzaka Takashi, Shimano Hitoshi	4. 巻 523
2. 論文標題 Transcriptional co-repressor CtBP2 orchestrates epithelial-mesenchymal transition through a novel transcriptional holocomplex with OCT1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 354 ~ 360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.12.070	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 Miyamoto Takafumi, Matsuzaka Takashi, Shimano Hitoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 ROCK 1 as a new player in the regulation of hepatic lipogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13051	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 Sharma Rahu, Takafumi Miyamoto, et al.	4. 巻 9
2. 論文標題 Octacosanol and policosanol prevent high-fat diet-induced obesity and metabolic disorders by activating brown adipose tissue and improving liver metabolism	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-41631-1	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 Murayama Yuki, Takafumi Miyamoto, et al.	4. 巻 593
2. 論文標題 Glucocorticoid receptor suppresses gene expression of Rev-erb (Nr1d1) through interaction with the CLOCK complex	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 423 ~ 432
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.13328	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 Miyamoto Takafumi, Rho Elmer, Kim Allen, Inoue Takanari	4. 巻 -
2. 論文標題 Cellular Application of Genetically Encoded Sensors and Impeders of AMPK	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 255 ~ 272
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-7598-3_17	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

〔学会発表〕 計5件(うち招待講演 5件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 宮本崇史
2. 発表標題 細胞機能を自在に制御する技術の開発
3. 学会等名 日本分子生物学会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takafumi Miyamoto
2. 発表標題 Argininosuccinate synthase 1 is an intrinsic Akt repressor transactivated by p53
3. 学会等名 Gordon Research Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takafumi Miyamoto
2. 発表標題 生物情報へのハッキングによる細胞操作技術の開発
3. 学会等名 形態解析ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takafumi Miyamoto
2. 発表標題 Hacking a living cell
3. 学会等名 第10回 光塾 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takafumi Miyamoto
2. 発表標題 オルガネラの形態制御法iCOMの開発
3. 学会等名 第27回日本バイオイメーjing学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 オルガネラの形態操作方法、オルガネラ形態変化用キット、オルガネラ形態操作のための細胞構成物質を使用した論理回路、およびアクチュエータータンパク質	発明者 宮本崇史、松坂賢、 島野仁	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、1.特願2019-211266	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------