

令和 6 年 9 月 14 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03165

研究課題名（和文）GTPの駆動する増殖ストレス緩和システムの分子基盤の解明

研究課題名（英文）Exploring the molecular mechanism of GTP-driven stress response system

研究代表者

佐々木 敦朗（Sasaki, Atsuo）

慶應義塾大学・政策・メディア研究科（藤沢）・特任教授

研究者番号：80620385

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：細胞の増殖に必要なエネルギーを感知するたんぱく質「PI5P4K」に焦点を当てて研究を行った。このたんぱく質がどのように細胞内の信号を制御しているのかを解明するため、生化学的な分析とデータ解析を行い、ストレス下で細胞がどのように成長するのか新しい仕組みを発見した。さらに、これらの成果は、細胞が遭遇する様々なストレス状況にどう対応しているのか、そのメカニズムを明らかにする手がかりを提供するものとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ストレス条件下において、細胞の成長やエネルギー管理に重要な役割を果たすたんぱく質「PI5P4K」の働きを理解することに貢献した。これにより、がん細胞の成長を制御する新たな治療方法の開発につながる可能性もたらされた。細胞のエネルギー感知機能についての知見は、がん治療だけでなく、一般的な病気の理解にも応用できるため、広範な社会的意義が期待される。

研究成果の概要（英文）：The research focused on PI5P4K, a protein that senses the energy needed for cell growth. To elucidate how this protein regulates intracellular signals, biochemical analysis and data analysis were conducted to discover a new mechanism for how cells grow under stress. Furthermore, these results provide clues to how cells respond to the various stress conditions they encounter.

研究分野：細胞エネルギー代謝

キーワード：エネルギー代謝 シグナル伝達 イノシトールリン脂質 PI5P4K GTP

1. 研究開始当初の背景

細胞は、mTOR や PI3K の活性化により、タンパクや脂質合成が高めることで増殖する。癌など爆発的に増殖する細胞では、「太れ、増やせ、捨てるな」の強い増殖シグナルを受ける代償として、変異タンパク質や代謝のオーバーロードが起きている。しかしながら、どのように細胞が増殖作用を ON にしながら、恒常性を維持しているのか謎が多い。

PI5P4K β はイノシトール脂質キナーゼの分野において、黎明期に同定された初期メンバーであるが、いまをもって最も謎に包まれたキナーゼである。これは、PI5P4K β の制御するセカンドメッセンジャー、PI5P への結合因子の同定が遅れていることが、大きな原因となっている。現在、癌やシグナル伝達の分野では横綱級の重要分子として知られる class I PI3K は、その下流のセカンドメッセンジャー、PI(3,4,5)P₃ (PIP3) が、AKT と結合することが分かり、爆発的に研究が進んだ。現在、PI3K 経路標的とした様々な疾患治療戦略が可能となっているのは、PI(3,4,5)P₃-AKT の経路が明らかとなり、薬効マーカーとしても使用できることが大きい。

我々は、GTP エネルギー代謝の研究を行うなかで、GTP 合成経路の鍵酵素 IMPDH が悪性癌細胞で発現が増加し、GTP 濃度を高め増殖作用を促進していることを報告した (Kofuji et al., *Nat. Cell Biol.* 2019)。また p53 変異がんの腫瘍形成に重要な因子として、イノシトールリン脂質キナーゼの一種 PI5P4K β を同定した (Emerling et al., *Cell*, 2013)。さらに 2016 年、PI5P4K β が細胞内で GTP 濃度を感知し細胞内シグナルへと変換し代謝バランスをとる GTP センサーであることを発見した (Sumita et al., *Mol. Cell*, 2016)。

2. 研究目的

PI5P4K β の GTP センサー機能を失わせた変異体 (F205L 変異: FL 変異体) を発現する細胞は、栄養リッチな条件での増殖は正常である。一方、栄養飢餓や活性酸素ストレスのかかる条件での増殖能は著しく妨げられた。我々が構築したデータから、PI5P4K β は GTP 依存に細胞のストレス耐性について重要な制御を行い、さらに様々なストレスから細胞を守る p53 と関連し生体の恒常性維持に重要な作用をしていることを掴んだ。しかしながら、PI3K と異なり、PI5P4K のシグナル伝達経路はブラックボックスとなっている。ここに PI5P4K の制御するセカンドメッセンジャーである PI5P に結合し細胞における作用を発揮するエフェクター分子を同定することで、研究が大きく進展することが期待できる。

これらのことから、本研究は、PI5P4K β を起点とした増殖細胞における GTP 依存的な恒常性維持機構の解明を長期目標とし、PI5P4K β による蛋白・RNA・代謝制御を多層的解析により同定することを研究期間における目的とした。

3. 研究方法

本研究では、PI5P4K β の機能を理解するために包括的な実験手法を採用した。PI5P4K β のセカンドメッセンジャーである PI5P のエフェクターとの結合特性を解明するため、

高感度質量分析を用いたプロテオミクスアプローチを実施した。次世代シーケンシングを用いてトランスクリプトームの変化を追跡し、タンパク質表現の変動を質量分析により定量化した。これにより、PI5P4K β が活性化または抑制された際の細胞内の広範な生物学的変化を詳細に調査し、さらに、これらの変化が細胞の生存や増殖にどのように影響を及ぼすかを評価した。このアプローチにより、PI5P4K β の生物学的な役割を全体的な視点から捉えることができた。

4. 研究成果

(1) PI5P 結合タンパク質の同定

これまでイノシトール脂質結合タンパク質探索のプロテーム解析を行った例はない。一つに界面活性剤を用いることで、膜成分が大きく変化し、結合が弱くなる技術的な難しさがある。我々は、独自のサンプル調整方法でこの問題を解決した。さらに、複数の脂質成分を含む架橋型リポソームシステムと組み合わせ、イノシトール脂質プルダウンアッセイの構築に成功した(図1)。PI3P への結合が知られる SNX4 を調べたところ、PI3P への強い結合を確認している。そこで全種類のイノシトール脂質(図1)を用いプルダウンされたタンパク質の質量解析により同定を行った。こうしたプロテオームアッセイでは、偽陽性がでることも多く、それは今後の機能解析の障壁となる。そこで、スクリーニングの精度を高めるため、同じ実験を別の日に行い、どちらのプロテオーム解析においても検出される分子をふるいにかけた。その結果、再現性をもって PI5P 結合性の分子群が同定に成功した。これらの PI5P エフェクター候補分子は、細胞のストレス応答に関与しているものがあつた。

これらの候補分子とそれに付随するパスウェイを選択していくため、以下のようにトランスクリプトーム解析を行った。

(2) PI5P4K β による遺伝子発現リプログラミングの分子基盤の解析

独自に樹立した WT と FL 細胞のトランスクリプトーム解析を行った。解析には近年開発された CAGE 法 (cap analysis gene expression) と MARA 解析 (motif activity response analysis) を組み合わせることで、転写因子ネットワークの経時的な活性変動の動態解析も含め行った。これらのアイソジェニック細胞株において、非常に興味深い差異が見られた。それは PI5P 結合候補分子にも関与が考えられる遺伝子群も幾つかあつた。しかしながら、アイソジェニックな細胞株においては、GTP 感知機能を欠失した PI5P4K β における変化を代償するための遺伝子発現が起こっていることも考えられた。そこで、開発した PI5P4K β 阻害剤により WT と FL の差異を生み出している遺伝子発現プロファイルを制御しているかの検証を行った。こうして得られた転写因子ネットワークおよび、PI5P4K β の阻害による遺伝子発現リプログラムの全容から、とくに顕著に変化し、かつ同定された PI5P 結合候補因子も帰属する細胞機能について着目して解析を進めた。

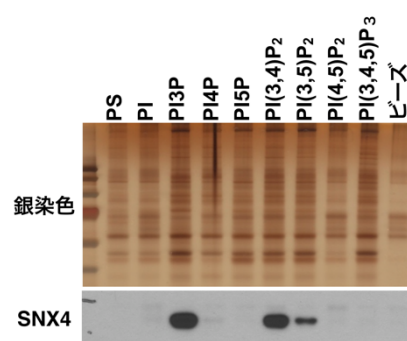


図1 新規イノシトール脂質結合タンパク質抽出法：銀染色像とPI3P結合タンパクSNX4のウェスタン解析

(3) PI5P4K β による新規細胞機能制御の同定

PI5P4K β が作用する候補の細胞機能について、PI5P4K β 阻害剤を用いて解析を行った。現在論文化を進めているため詳細な記載はできない状況であるが、PI5P4K β 阻害により細胞はある種のストレスへの耐性が著しく低下した。そのストレス耐性の低下には、PI5P エフェクター候補分子が関与していることも捉えた。阻害剤添加により、エフェクター分子自身に早期に変化が起きていることから、ストレス応答の低下に直接関与していることが考えられた。この発見をもとに、個体レベルにおいても PI5P4K β がある局面で重要な役割を果たすことが考えられ、現在マウス個体を用いた解析を進めている。

このように本研究では、多層的オミックス解析と生化学、細胞生物学そして、独自に開発した PI5P4K β 阻害剤を組み合わせることで、PI5P4K β の新規の細胞機能制御機構を捉えることに成功した。この発見により PI5P4K の研究が今後大きく進展すること、新たな生命制御の理解につながり、病理解明や、疾患治療開発への応用への道が開かれていくことが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 8件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Kopra Kari, Mahran Randa, Yli-Hollo Titta, Tabata Sho, Vuorinen Emmiliisa, Fujii Yuki, Vuorinen Iida, Ogawa-Iio Aki, Hirayama Akiyoshi, Soga Tomoyoshi, Sasaki Atsuo T., H?rm? Harri	4. 巻 415
2. 論文標題 Homogeneous luminescent quantitation of cellular guanosine and adenosine triphosphates (GTP and ATP) using QT-LucGTP&ATP assay	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Analytical and Bioanalytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 6689 ~ 6700
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00216-023-04944-9	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 該当する

1. 著者名 Ikeda Yoshiki, Davis Mindy I., Sumita Kazutaka, Zheng Yuxiang, Kofuji Satoshi, Sasaki Mika, Hirota Yoshihisa, Pragani Rajan, Shen Min, Boxer Matthew B., Takeuchi Koh, Senda Toshiya, Simeonov Anton, Sasaki Atsuo T.	4. 巻 679
2. 論文標題 Multimodal action of KRP203 on phosphoinositide kinases in vitro and in cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 116 ~ 121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.08.050	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 該当する

1. 著者名 Takeuchi Koh, Senda Miki, Ikeda Yoshiki, Okuwaki Koji, Fukuzawa Kaori, Nakagawa So, Sasaki Mika, Sasaki Atsuo T., Senda Toshiya	4. 巻 290
2. 論文標題 Functional molecular evolution of a <sc>GTP</sc> sensing kinase: <sc>PI5P4K </sc>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 4419 ~ 4428
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.16763	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 該当する

1. 著者名 Osaka Natsuki, Hirota Yoshihisa, Ito Doshun, Ikeda Yoshiki, Kamata Ryo, Fujii Yuki, Chirasani Venkat R., Campbell Sharon L., Takeuchi Koh, Senda Toshiya, Sasaki Atsuo T.	4. 巻 8
2. 論文標題 Divergent Mechanisms Activating RAS and Small GTPases Through Post-translational Modification	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Biosciences	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmolb.2021.707439	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 該当する

1. 著者名 Ikeda Yoshiki, Hirayama Akiyoshi, Kofuji Satoshi, Hirota Yoshihisa, Kamata Ryo, Osaka Natsuki, Fujii Yuki, Sasaki Mika, Ikeda Satsuki, Smith Eric P, Bachoo Robert, Soga Tomoyoshi, Sasaki Atsuo T	4. 巻 170
2. 論文標題 SI-MOIRAI: a new method to identify and quantify the metabolic fate of nucleotides	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 699 ~ 711
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvab077	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 該当する

1. 著者名 Dasgupta Biplab, Hirota Yoshihisa, Fujii Yuki, Osaka Natsuki, Ito Doshun, Plas David R., Sasaki Atsuo T.	4. 巻 1
2. 論文標題 Targeting Energy Metabolism to Overcome Therapeutic Resistance of Glioblastoma and Tumor-associated Edema	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gliomas_Exon Publications	6. 最初と最後の頁 121 ~ 138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.36255/exonpublications.gliomas.2021.chapter7	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

1. 著者名 Garrett Matthew, Fujii Yuki, Osaka Natsuki, Ito Doshun, Hirota Yoshihisa, Sasaki Atsuo T.	4. 巻 1
2. 論文標題 Emerging Roles of Wild-type and Mutant IDH1 in Growth, Metabolism and Therapeutics of Glioma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gliomas_Exon Publications	6. 最初と最後の頁 61 ~ 78
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.36255/exonpublications.gliomas.2021.chapter4	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 該当する

1. 著者名 Takeuchi Koh, Ikeda Yoshiki, Senda Miki, Harada Ayaka, Okuwaki Koji, Fukuzawa Kaori, Nakagawa So, Yu Hong Yang, Nagase Lisa, Imai Misaki, Sasaki Mika, Lo Yu-Hua, Ito Doshun, Osaka Natsuki, Fujii Yuki, Sasaki Atsuo T., Senda Toshiya	4. 巻 30
2. 論文標題 The GTP responsiveness of PI5P4K evolved from a compromised trade-off between activity and specificity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Structure	6. 最初と最後の頁 886 ~ 899.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.str.2022.04.004	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 該当する

[学会発表] 計16件(うち招待講演 8件/うち国際学会 11件)

1. 発表者名 Yoshiki Ikeda, Risa Kawaguchi, Yoshihisa Hirota, Shun Kageyama, Akiyoshi Hirayama, Kazutaka Sumita, Mikako Warren, Yuki Fujii, Mika Sasaki, Kensuke Tateishi, Manabu Natsumeda, Tomoyoshi Soga, Takahisa Nakamura, Diego Perez-Tilve, Koh Takeuchi, Toshiya Senda, Atsuo T. Sasaki.
2. 発表標題 GTP-sensor PI5P4K counteracts anabolic stresses by lysosomal acidification.(Poster).
3. 学会等名 KEYSTONE SYMPOSIA on Molecular and Cellular Biology Tumor Metabolism (B3) (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Aki OGAWA-IIO, Kari Kopra, Harri H, Satoshi Ogasawara, Ryo Kamata, Atsuo T Sasaki.
2. 発表標題 Fueling the Way-The Role of Localized GTP Synthesis in Renal Cell Carcinoma Metastasis.(Poster) .
3. 学会等名 KEYSTONE SYMPOSIA on Molecular and Cellular Biology Tumor Metabolism (B3) (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Aki Ogawa-Iio, Ryo Kamata, Hirofumi Yoshino, Kara Wolfe, Satoshi Kofuji, Harri H, Kari Kopra, Titta Yli-Hollo, Osamu Ogawa, Eijiro Nakamura, Takeshi Kobayashi, Satoshi Ogasawara, Takeshi Murata, Koh Takeuchi, Toshiya Senda, Tomoyoshi Soga, Akiyoshi Hirayama, Laura M Machesky, Atsuo T Sasaki.
2. 発表標題 Workshop 2: Metabolic Targets and Vulnerabilities. Fueling the Way-The Role of Localized GTP Synthesis in Renal Cell Carcinoma Metastasis.(Presentation).
3. 学会等名 KEYSTONE SYMPOSIA on Molecular and Cellular Biology Tumor Metabolism (B3) (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 飯尾 亜樹、Kari Kopra、Harri H、小笠原 諭、鎌田 諒、佐々木 敦朗.
2. 発表標題 G-SHINE プローブによる細胞内GTP 局在可視化法とその応用(口頭発表).
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐々木敦朗
2. 発表標題 時空間マルチスケール分析が照らすGTPエネルギー代謝の未踏領域（口頭発表）
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大田祐誠, 佐々木敦朗
2. 発表標題 プロドラッグ・ミコフェノール酸モフェチルは非肝臓細胞でも活性化されるのか？（口頭発表）
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuki Fujii, Aki Iio (Ogawa), Shun Kageyama, Sho Tabata, Kazutaka Sumita, Mika Sasaki, Ko Takeuchi, Toshiya Senda, Atsuo T. Sasaki.
2. 発表標題 Targeting the GTP sensing kinase PI5P4K to sensitize oxidative and nutrient stresses to suppress the metastatic potential of invasive cancer cells.
3. 学会等名 CANCER METASTASIS RESEARCH SYMPOSIUM. (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Atsuo T Sasaki.
2. 発表標題 At the Front of Cancer Metastasis -A Dynamic Role of Energy Metabolism(Presentations).
3. 学会等名 CANCER METASTASIS RESEARCH SYMPOSIUM. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Atsuo T Sasaki.
2. 発表標題 Fueling the way-The Role of Localized GTP Synthesis in Cancer Metastasis(Presentations).
3. 学会等名 CANCER METASTASIS RESEARCH SYMPOSIUM. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuki Fujii, Aki Ogawa-Iio, Shun Kageyama, Sho Tabata, Kazutaka Sumita, Mika Sasaki, Ko Takeuchi, Toshiya Senda, Atsuo Sasaki.
2. 発表標題 Targeting the GTP sensing kinase PI5P4K to sensitize oxidative and nutrient stresses to suppress the metastatic potential of invasive cancer cells. (Posters).
3. 学会等名 CANCER METASTASIS RESEARCH SYMPOSIUM. (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Aki Ogawa-Iio, Satoshi Kofuji, Kari Kopra, Harri H, Satoshi Ogasawara, Atsuo Sasaki.
2. 発表標題 Inosine monophosphate dehydrogenase drives "leadership" in collective cell migration of glioblastoma.(Posters)
3. 学会等名 CANCER METASTASIS RESEARCH SYMPOSIUM. (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐々木 敦朗
2. 発表標題 GTP Energy Metabolism and Brain Tumors
3. 学会等名 Northwestern University, Basic Research Seminar Series (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木 敦朗
2. 発表標題 生命のしなやかさと進化の鍵;GTPレジリエンス研究が拓く未来
3. 学会等名 日本分子生物学会年会;GTPワークショップ(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木 敦朗
2. 発表標題 GTP Energy Metabolism and Cancers
3. 学会等名 WFBCCC-Grand Round Seminar_Wake Forest School of Medicine(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐々木 敦朗
2. 発表標題 GTPエネルギーによる新たな遺伝子発現と代謝調節メカニズム
3. 学会等名 第2回鶴岡カンファレンス2020(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐々木 敦朗
2. 発表標題 GTP代謝研究の夜明け前
3. 学会等名 第43回分子生物学会年会 ワークショップ「細胞のエネルギー制御の進化と多様化」(招待講演)(国際学会)
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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