

令和 5 年 4 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07609

研究課題名(和文) 蛋白質O-GlcNAc化による増殖シグナルの制御と癌における破綻の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism of cancer growth signaling by protein O-GlcNAcylation

研究代表者

久保田 裕二 (Kubota, Yuji)

東京大学・医科学研究所・講師

研究者番号：70614973

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)：蛋白質のO-GlcNAc化修飾は、グルコースの代謝産物GlcNAcを特定のSer/Thr残基に1分子付加する反応である。本研究により、解析対象の新規O-GlcNAc化分子の修飾部位が判明し、また本修飾が細胞増殖を司るMAPK経路の活性化に寄与することが分かった。さらに、細胞内グルコース濃度の上昇に応じて本分子のO-GlcNAc修飾が増加すると、MAPK経路の制御分子との相互作用性が変化し、増殖シグナルが惹起されることを見出した。さらに、癌細胞ではグルコースの取り込み・代謝亢進と一致して本分子のO-GlcNAc化も増加しており、MAPKシグナルの異常活性化と増殖能を促進していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌細胞ではグルコース取り込みと代謝促進により(Warburg効果)、様々な癌悪性形質が惹起されている。グルコース代謝産物であるUDP-GlcNAcも同様に癌で増進しており、蛋白質O-GlcNAc化のドナーとして本修飾反応を促進するが、発癌への寄与は不明な点が多い。本研究の結果、Warburg効果によるグルコース代謝増進を癌増殖シグナルへと変換する、新たな仕組みを発見した。こうした「O-GlcNAc異常」と「細胞増殖制御」を分子レベルでリンクした知見は、様々な生理プロセスのみならず、癌をはじめとする重篤な疾患発症(糖尿病、神経変性疾患)の機序解明や治療法開発に重要な考察を与えると期待される。

研究成果の概要(英文)：Protein O-GlcNAcylation is a reaction that a single GlcNAc molecule (a glucose metabolite) is conjugated to a protein. In this study, I identified the modification site of a novel O-GlcNAcylated protein and found that this modification contributes to the activation of the MAPK pathway, which regulates cell proliferation. Furthermore, I found that an increase in the O-GlcNAc modification of this molecule alters its interaction with a regulatory molecules of the MAPK pathway and thereby enhances a proliferative signal. Furthermore, in cancer cells, in coincidence with increased glucose uptake and metabolism, O-GlcNAcylation of this molecule is also enhanced, thus promoting the abnormal activation of MAPK signaling and proliferative potential.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：O-GlcNAc MAPK がん

1. 研究開始当初の背景

蛋白質 O-GlcNAc 化は翻訳後修飾の一種であり、糖転移酵素 OGT(O-GlcNAc transferase)がグルコースの代謝産物である UDP-GlcNAc をドナーとして、標的分子の Ser/Thr 残基に一分子の N-アセチルグルコサミンを付加する反応である (図 1 A)。本修飾は細胞外蛋白質に生じる長鎖グリコシル化とは異なり、様々な細胞内 (細胞質、核) 蛋白質を標的とし、生命機能を制御する転写因子 (c-MYC、p53) や細胞骨格関連分子 (Tau)、ヒストンなど 1000 種を超える分子が基質として同定されている。O-GlcNAc 化は OGT と脱糖鎖酵素 OGA (O-GlcNAcase) によるダイナミックな修飾反応であり、O-GlcNAc 化された分子は細胞内局在や安定性、結合分子との親和性などが大きく変化する。また、本修飾は蛋白質の Ser/Thr 残基に生じることからリン酸化と拮抗した修飾動態を示し、これによって様々なシグナル伝達経路の制御にも影響を及ぼす。さらに、細胞内グルコースの増加や糖代謝の異常亢進は O-GlcNAc 化のバランスを破綻させ、癌や糖尿病、神経変性疾患などの難治性疾患の発症や悪性化に関与することから、その重要性が病理学的観点からも認識されつつある。

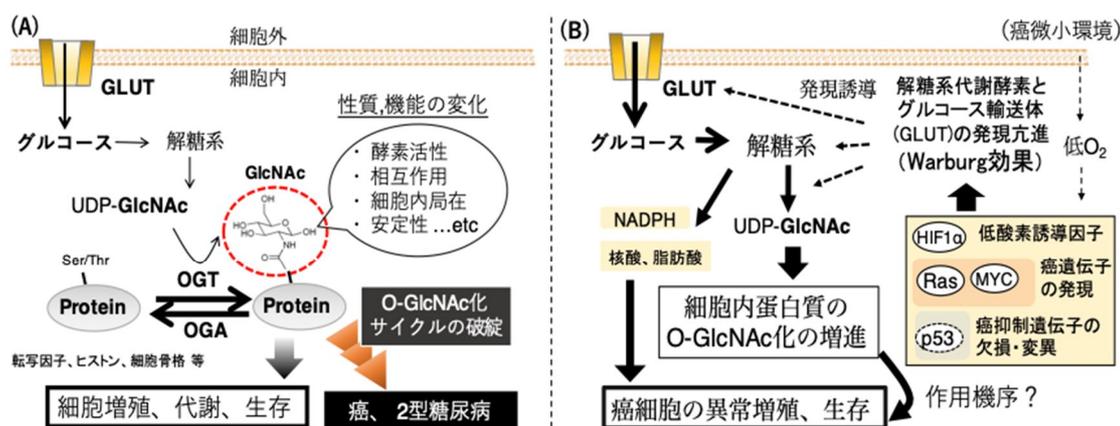


図1 (A) 蛋白質O-GlcNAc化反応。様々な機能分子が本修飾による制御を受けており、生体の恒常性維持を担う。(B) 癌細胞におけるO-GlcNAc化の異常亢進。癌遺伝子や癌微小環境などの作用により好気性解糖(Warburg効果)が進行すると、UDP-GlcNAcの増進に伴いO-GlcNAc化蛋白質が増加し、増殖制御機構の破綻が誘導される。

癌細胞では一般的に、Warburg 効果と呼ばれるグルコース代謝の異常亢進が生じており、無制限な増殖・生存能を惹起している。O-GlcNAc 化のドナーである UDP-GlcNAc は細胞内グルコース量や代謝促進に伴い増加することから、近年、Warburg 効果が細胞内タンパク質の O-GlcNAc 化をも促進し、増殖や生存など基本的生命機能の脱制御を経て、癌の増悪を導く可能性が提唱されている。しかし、こうした O-GlcNAc 化の制御破綻と癌の増悪をリンクする実行分子は現在まで不明であり、その詳細な分子メカニズムについて新たな知見が求められていた (図 1 B)。

2. 研究の目的

本研究では蛋白質 O-GlcNAc 化の制御破綻による疾患誘導・悪性化の分子プロセス、特に、癌細胞における O-GlcNAc 化の異常亢進が増殖能を促進するメカニズムを分子・細胞・個体レベルで検証し、本シグナル制御機構を標的とした新たな治療法を提案するための分子基盤解明を目的とする。

3. 研究の方法

申請者はこれまでに、細胞内タンパク質の過剰な O-GlcNAc 化が、細胞増殖を司る MAPK 経路を増強することを見出した。また、独自に開発した O-GlcNAc 化解析技術 (WGA-SDS-PAGE、分子選択的 O-GlcNAc 化亢進法など) を活用することで、その標的となる制御因子が O-GlcNAc 化修飾を受けることを見出した。そこで、本分子が O-GlcNAc 修飾を受けることで分子の機能や性状にどのような変化がもたらされるか検証するため、本分子の O-GlcNAc 修飾型を大量に取得し、質量分析により O-GlcNAc サイトを決定すると共に、分子機能に与える影響を各種生化学アッセイにて観察する。また本分子の O-GlcNAc 化部位のアラニン置換体 (O-GlcNAc 化不能型) を作出して、in vitro 及び in vivo における本修飾の機能的意義を検証する。また、本分子の O-GlcNAc 化が癌の発生や進展に影響するか検討する。本目的のため、本分子の野生型または上述の O-GlcNAc 化不能型を安定発現させた癌細胞株を作出し、二次元および三次元 (ヌードマウス皮下移植) における増殖能、腫瘍形成能を検証する。次に、Warburg の原因となる活性型 HIF1 や K-Ras を正常細胞株に安定発現させることで、本分子の O-GlcNAc 化が亢進することを確認すると共に、実際に MAPK シグナルの増加および増殖能の亢進が認められるか検証する。

4. 研究成果

まず、ヒト正常組織由来の細胞株 (HEK293) から解析対象のタンパク質分子を免疫沈降にて精製し、内在性レベルで O-GlcNAc 化が生じていることを確認した。また、同細胞株を高グルコース濃度の環境にて培養することで、本分子の O-GlcNAc 化が増強されることも見出した。次に、O-GlcNAc 化修飾部位を同定するため、HEK293 細胞に本分子と OGT を共発現したのち、免疫沈降法にて本分子を精製した。次に、近年我々が開発した WGA アフィニティー電気泳動法を用いて、精製した分子を O-GlcNAc 修飾型と非修飾型に分離し、修飾型のバンドのみを切り出して LC-MS/MS 法により解析した。その結果、分子内の特定の Ser 及び Thr 残基群が O-GlcNAc 化を受けていることを見出した。そこで、これらの残基をアラニンに置換した変異体を作成し、細胞内に発現させたところ、O-GlcNAc 化効率が大幅に減弱することが確認された。また、同変異体を安定発現するヒト細胞株を樹立し、in vitro での解析を進めた結果、本分子の O-GlcNAc 化修飾が MAPK 経路のシグナル強度を増強し、細胞増殖を促進する機能を有していることを明らかにした。

タンパク質の O-GlcNAc 化とリン酸化は Ser/Thr 残基を標的とすることから、本分子の O-GlcNAc 化が当該修飾部位近辺に存在する既知のリン酸化に影響するか、各リン酸化部位の特異的抗体を用いて検討した。その結果、本分子の O-GlcNAc 化はこれらのリン酸化修飾には影響しないことが確認された。さらに、本分子の O-GlcNAc 化型を上述の方法にて大腸菌または HEK293 細胞より精製し、これを実験材料として本分子の相互作用分子 (MAPK 経路を負に抑制) に与える影響を解析した。その結果、本分子が O-GlcNAc 化されることで、その相互作用分子の機能が阻害され、結果として MAPK

経路の活性が増大することが示された。

さらに、本分子の野生型または O-GlcNAc 化不能型変異体を HeLa 細胞に安定発現させたところ、O-GlcNAc 化不能型では足場依存性/非依存性増殖能、およびヌードマウス皮下移植における腫瘍形成能が有意に抑制されたことから、本分子の O-GlcNAc 化修飾が癌の悪性形質を促進することが示された。また、活性型 HIF1 及び K-Ras を HEK293 細胞株に安定発現させ Warburg 効果を模倣した環境においては、本分子の O-GlcNAc 化が亢進しており、これと一致して MAPK シグナルの増加も認められた。以上の結果から、細胞内グルコース濃度の上昇に応じて本分子が O-GlcNAc 修飾を受けること、またその結果、制御分子との相互作用性が変化し、MAPK シグナルの活性化が惹起されることが明らかとなった。さらに、癌細胞ではグルコースの取り込み・代謝共に亢進しているが、これと一致して本分子の O-GlcNAc 化も癌細胞で増加しており、その結果、MAPK シグナルの異常活性化と増殖能が亢進していることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Watanabe M, Arii J, Takeshima K, Fukui A, Shimojima M, Kozuka-Hata H, Oyama M, Minamitani T, Yasui T, Kubota Y, Takekawa M, Kosugi I, Maruzuru Y, Koyanagi N, Kato A, Mori Y, Kawaguchi Y.	4. 巻 95
2. 論文標題 Prohibitin-1 Contributes to Cell-to-Cell Transmission of Herpes Simplex Virus 1 via the MAPK/ERK Signaling Pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of virology	6. 最初と最後の頁 e01413-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.01413-20	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 Kubota Yuji, Fujioka Yuko, Patil Ashwini, Takagi Yusuke, Matsubara Daisuke, Iijima Masatomi, Momose Isao, Naka Ryosuke, Nakai Kenta, Noda Nobuo N., Takekawa Mutsuhiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Qualitative differences in disease-associated MEK mutants reveal molecular signatures and aberrant signaling-crosstalk in cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	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/s41467-022-31690-w	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 Ohe Seina, Kubota Yuji, Yamaguchi Kiyoshi, Takagi Yusuke, Nashimoto Junichiro, Kozuka-Hata Hiroko, Oyama Masaaki, Furukawa Yoichi, Takekawa Mutsuhiro	4. 巻 13
2. 論文標題 ERK-mediated NELF-A phosphorylation promotes transcription elongation of immediate-early genes by releasing promoter-proximal pausing of RNA polymerase II	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	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/s41467-022-35230-4	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 久保田 裕二、塩崎ゆかり、武川 睦寛
2. 発表標題 DNA損傷ストレスにより活性化するシグナル伝達経路と細胞運命決定機構の解析
3. 学会等名 第15回日本臨床ストレス応答学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuji Kubota, Yuko Fujioka, Nobuo N. Noda, and Mutsuhiro Takekawa
2. 発表標題 Elucidation of the activation and drug-resistance mechanisms of diseases-associated MEK1 mutants
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuji Kubota, Mutsuhiro Takekawa
2. 発表標題 A novel suppression mechanism of ERK signaling by caspase-mediated protein cleavage
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 久保田裕二、武川睦寛
2. 発表標題 カスパーゼ依存的な蛋白質切断を介したERKシグナルの新規活性制御機構
3. 学会等名 第71回日本電気泳動学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 久保田裕二、武川睦寛
2. 発表標題 癌および先天性RASopathyで認められるMEKミスセンス変異体の異常活性化機構と疾患発症メカニズムの解明
3. 学会等名 CREST「多細胞」領域会議 若手Flash Talk発表
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuji Kubota, Yuko Fujioka, Ashwini Patil, Yusuke Takagi, Daisuke Matsubara, Masatomi Iijima, Isao Momose, Ryosuke Naka, Kenta Nakai, Nobuo N. Noda, Mutsuhiro Takekawa
2. 発表標題 Elucidation of molecular mechanisms of ERK hyper-activation and drug-resistance in cancers with MEK1 mutations
3. 学会等名 第81回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 久保田 裕二, 中 亮介, 武川 睦寛
2. 発表標題 出芽酵母を利用した機能的スクリーニング法による恒常活性化型ヒトJNK1変異体の単離
3. 学会等名 第16回 日本臨床ストレス応答学会大会
4. 発表年 2022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
---------	---------