

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440100

研究課題名(和文)細胞がん化過程におけるCOP1によるエネルギー代謝機構のリプログラミング

研究課題名(英文) Reprogramming of metabolic systems via COP1 in the process of cellular transformation and cancer progression

研究代表者

加藤 規子 (Kato, Noriko)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：10252785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：E3ユビキチンリガーゼCOP1は、発がん・エネルギー代謝経路に関わる。細胞がん化過程で、がん細胞が如何にして増殖に必須の特異的エネルギー代謝機構を獲得するのかを、COP1の発がん・エネルギー代謝両経路を繋ぐ研究から解明することを目的とした。

成果として、COP1の新規複合体・標的分解基質群を同定し、COP1が関与する発がん・エネルギー代謝ネットワーク予想図を作成した。さらに、骨髄性白血病関連因子MLF1は、COP1と直接結合しCOP1-Trib1複合体活性を阻害して、C/EBP $\beta$ の安定化を促しAML発症を抑制することを見いだした。MLF1活性の誘導・安定化はがん治療での応用が見込める。

研究成果の概要(英文)：COP1 is an E3 ubiquitin ligase that is involved in tumorigenesis and metabolism. We aimed how cancer-initiating cells acquire a specific energy metabolic system essential for their proliferation in the process of cellular transformation by investigating the COP1's activities linking both tumorigenesis and metabolism.

In this study, we newly identified COP1's ligase-complexes and substrates for degradation, and depicted a presumable network map associated with COP1 activities. We are analyzing these factors using various cell culture systems and mouse models. In addition, we found that acute myeloid leukemia-associated MLF1 is an inhibitory factor of the ligase activity of the COP1-Trib1 complex. MLF1 directly interacts with COP1 and interferes with the formation of the COP1-Trib1 complex, thereby stabilizing C/EBP $\beta$  protein and suppressing AML development in mice. Induction and stabilization of MLF1 expression have a potential as a novel strategy for cancer therapy.

研究分野：生物学

キーワード：細胞がん化 エネルギー代謝

1. 研究開始当初の背景

(1) COP1 は、高等植物から哺乳類に至るまで非常に良く保存された E3 ユビキチンリガーゼであり、植物では、光シグナルにより誘導される光形態形成を遂行する転写因子群 (HY5, HYH, HFR1, LAF1) を負に制御する。哺乳類では、COP1 の分解標的因子として c-Jun, p53, ETV1, ETV4, ETV5, C/EBP $\alpha$ , ACC, TORC2(CRTC2), FOXO1 などが報告されている。これら標的因子群を機能分類すると、哺乳類 COP1 は発がん関連経路およびエネルギー代謝両経路 (脂質代謝・糖新生) において重要な役割を担う可能性が高い (図 1 参照)。

分解標的基質	機能	発がん・代謝関連機能	COP1 結合配列
c-JUN	転写因子	Oncogene	+
ETV1,4,5	転写因子	Oncogene	+
p53	転写因子	Tumor suppressor Metabolism	-
C/EBP $\alpha$	転写因子	Tumor suppressor Lipid metabolism	-
ACC	脂肪酸合成酵素	Lipid metabolism	-
TORC2	転写共役因子	Glucose homeostasis	+
FOXO1	転写因子	Glucose homeostasis	-

図 1. COP1 の分解標的因子群とその機能的特徴

(2) 我々は、急性骨髄性白血病 (AML) 関連因子 MLF1 と細胞がん化の関係を研究する過程で、MLF1-COP1-p53 がん抑制経路が存在することを見だし報告した。COP1 の標的分解因子の一つ C/EBP $\alpha$  は、その遺伝子点突然変異による不活性化および機能低下がヒト AML の原因となることが知られている。また、正常機構では、C/EBP $\alpha$  は造血細胞ばかりでなく脂肪細胞の分化を促進する。分化段階特異的にアダプター因子 Trib1 を介して COP1 による分解制御を受ける。これらの知見は、白血病発症マウスモデルを用いて COP1 関連発がん・エネルギー代謝経路の解析が可能であることを示している。

2. 研究の目的

(1) E3 ユビキチンリガーゼ COP1 の研究から、1) 白血病関連 MLF1-COP1-p53 がん抑制経路の破綻が細胞増殖を促すこと、2) COP1-Trib1 複合体による C/EBP $\alpha$  の分解促進が分化阻害を惹起し白血病発症の原因となること、3) COP1 の標的分解因子群は、機能的に例外無く、発がん関連およびエネルギー代謝経路のどちらかあるいは両方に分類されることを見いだした。

(2) 本研究では、細胞がん化の過程で、がん細胞が如何にして増殖に必須の特異的エネルギー代謝機構を獲得するのかを、これまでに得られた成果を基に、COP1 の発がん・エネルギー代謝両経路を繋ぐ研究から明ら

かにすることを目的とした。

(3) さらに、COP1 の上流に位置する MLF1 が、他の COP1 の標的分解因子群においても抑制的に機能するのかを検定した。

3. 研究の方法

(1) COP1 結合アミノ酸配列 (COP1 結合配列) を持つ蛋白質群の網羅的検索、プロテオーム解析、メタボローム解析を組み合わせ、COP1 が関与する発がん・エネルギー代謝経路群のネットワークを網羅的に検索した。この作業から、新規機能的 COP1 複合体 (COP1-アダプター因子-基質あるいは COP1-基質-共役因子) 群の同定を試みた。各種培養系を用いて相互作用の確認を行い、機能解析を進めている。

(2) MLF1 は、COP1 上流に位置し抑制的に働く。また、COP1-Trib1 複合体による C/EBP $\alpha$  の分解促進が分化阻害を惹起し、白血病発症の原因となる。これらの事実を踏まえ、MLF1 が C/EBP $\alpha$  の安定化に寄与するかを、COP1-Trib1 複合体導入発現により AML を発症する骨髄移植マウスモデルを用いて検証した。さらに、MLF1 欠損マウスを作製し、MLF1 欠損の影響を検討した。マウスモデルにより得られた結果は、ヒトがんゲノム解析データベースを用いて、ヒト AML においても同様の結果が得られるかを検証した。

(3) 新たに同定した機能的 COP1 複合体経路の役割について、細胞培養系および骨髄移植マウスモデルを用いて解析を開始した。

4. 研究成果

(1) 蛋白質アミノ酸結合配列検索システム・プロテオーム解析・メタボローム解析を組み合わせ解析し、COP1 の新規複合体・標的分解基質群を同定した。これにより既知・新規関連因子群を俯瞰し、COP1 が関与する発がん・エネルギー代謝ネットワーク予想図を作成した。現在、これら因子群について、細胞培養系・マウスモデルを用いて解析中である。

(2) COP1 結合配列を有する Tribbles (Trib1, Trib2, Trib3) はアダプター因子であり、COP1 はアダプター因子の使い分けにより標的因子を変えると予測された。上記研究方法 (1) により、新規 COP1-アダプター因子-分解基質複合体群を同定した。また、COP1 結合配列を有し、直接的に分解標的基質となる c-Jun・ETV family は DET1 共役因子の存在下で分解促進される。同様に、上記研究方法 (1) により新規 COP1-基質-共役因子複合体群を同定した。

(3) MLF1 は COP1 と直接的に結合することを見いだした。MLF1 は、COP1 との直

接結合により、COP1-Trib1 複合体形成によるユビキチンリガーゼ活性を阻害し、C/EBP $\alpha$ の安定化を促すことを明らかにした。また、MLF1 のマウス骨髄への過剰発現は、Trib1 導入により誘導される *in vitro* 造血細胞増殖能の促進・コロニー形成能の促進を抑制した。

(4) MLF1 導入発現は COP1-Trib1 複合体による AML 発症を抑制することを骨髄移植マウスモデルを用いて明らかにした。Real-time PCR による定量化 Trib1/MLF1 発現比で検定すると、Trib1 発現比率が高いほど AML 発症率が高く、MLF1 発現比率が高いほど AML 発症率が低かった。また、MLF1 欠損マウス骨髄への COP1-Trib1 複合体導入は、より未分化段階の AML 発症を惹起した。このことは、MLF1 欠損による C/EBP $\alpha$ の早期不安定化を意味する。マウスモデルの実験結果から、MLF1 活性の誘導・安定化はがん治療での有効性が見込める。

(5) 骨髄移植マウスモデルにより得られた Trib1/MLF1 発現比の結果がヒト AML でも該当するかを検証した。米国がんゲノム解析データベース NCBI Gene Expression Omnibus (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) からデータを取得し、9 例の健常者ドナー、285 例の AML、284 例の ALL 骨髄サンプルの 3 群間で比較検討したところ、AML 群で有意に高い Trib1/MLF1 発現比が認められた。ヒト臨床材料においても、マウスモデル結果を支持する結果が得られた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

Ueda A, Yoneda-Kato N, Yamanaka Y, Nakamae I, Kato JY. Cytoplasmic retention of CDC6 induces premature senescence in immortalized cells and suppression tumor formation in mice. *J.Hematol.Oncol.Res.* 2016. 査読有  
DOI:10.14302/issn.2372-6601.jhor-16-1125,2016.

Kukita Y, Okami J, Yoneda-Kato N, Nakamae I, Kawabata T, Higashiyama M, Kato JY, Komada K, Kato K. Homozygous inactivation of CHEK2 is linked to a familial case of multiple primary lung cancer with accompanying cancers in other origins. *Cold Spring Harb.Mol.Case Stud.* 2: a001032, 2016. 査読有

加藤順也、加藤規子 シグナロソームとシグナル伝達 分子消化器病 11:183-187, 2014, 査読なし

吉田晃洋、加藤規子 Introduce My Article. *Jpn. J. Clin. Hematol.* 55:259,

2014, 査読なし

[学会発表](計 8 件)

Kato N, Inhibitory mechanism of the Trib1-COP1 complex ligase activity targeting tumor suppressor C/EBP $\alpha$ . The 75th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, October 7, 2016, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan.

Kato JY, Targeting CDK2-CSN5 small complex is a novel strategy for cancer therapy. The 75th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, October 8, 2016, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan.

Kato JY, Molecular targets for tumor suppression by RNA interference and other method. 2nd International Symposium of Chemistry and Biology of RNA Interference (ISCBRI), September 30, 2016, Iizuka, Fukuoka, Japan.

Kato N, Regulatory mechanism of the Trib1-COP1 complex activity leading to myeloid leukemogenesis. The 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, October 8, 2015, Nagoya Congress Center, Nagoya, Japan.

Kato JY, Cytoplasmic retention of CDC6 induces premature senescence in immortalized cells and suppresses tumor formation in mice. The 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, October 10, 2015, Nagoya Congress Center, Nagoya, Japan.

Yoneda-Kato N, The Trib1-COP1 complex activity leading to myeloid leukemogenesis is suppressed by Myeloid leukemia factor 1. 1st Tribbles Meeting: Tribbles pseudokinases at the crossroads of metabolism, cancer, immunity and development, April 22, 2015, The Aquincum Hotel, Budapest, Hungary.

Kato JY, CSN5 specifically interacts with CDK2 to control senescence. ZOMES VIII, November 19, 2014, Xiamen, China.

Yoneda-Kato N, p53-associated ubiquitin ligase COP1 targets C/EBP $\alpha$  and induces acute myeloid leukemia via Trib1. 16th International p53 workshop, June 18, 2014, Waterfront Congress Center, Stockholm, Sweden.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページアドレス

<http://bsw3.naist.jp/kato/>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

加藤 規子 (KATO Noriko)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ  
エンス研究科・助教

研究者番号：10252785

### (2)研究分担者

加藤 順也 (KATO Jun-ya)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ  
エンス研究科・教授

研究者番号：00273839