

癌抑制遺伝子 p53 の細胞内代謝とエネルギー調節機構

千葉大学大学院 医学研究院 細胞治療内科学

鈴木 佐和子

1. はじめに

ヒトの癌の約50%に変異が認められる癌抑制遺伝子産物p53は、「ゲノムの守護神:the guardian of the genome」として生体を癌から防ぐという機能以外にも、多種多様な生体ストレスから細胞を守ることから、「細胞の番人:cellular gatekeeper」などとも称されている。最近では癌抑制機能だけでなく、肥満、糖尿病、老化、虚血、心不全といった生活習慣病や老化関連疾患においても、その分子病態にp53が関与していることが明らかとなってきている。しかしながら、p53本来の機能である癌抑制作用のメカニズム研究に比べれば、動脈硬化や肥満・糖尿病などの生活習慣病病態におけるメカニズム解析は立ち遅れており、p53がどのようなメカニズムを介して関与するのか依然明らかとなっていない。そこで、「動脈硬化分子病態における転写因子p53エネルギー代謝調節機構の解明」を目指して、p53の新たな細胞内代謝制御機構とエネルギー代謝調節機構を明らかにし、生活習慣病分子病態のブレークスルーを目指す。

2. 方法

1) 高速シーケンサーを用いた p53-ChIP-seq と RNA-seq を組み合わせたゲノムワイド解析による細胞内代謝関連制御分子の探索と代謝環境応答時の発現解析：高速シーケンサーによる p53ChIP シーケンスとトランスクリプトーム解析にて細胞内代謝に関与する新規 p53 下流遺伝子の探索を行った。

2) CE-TOFMS によるメタボローム解析を用いた転写因子 p53 とその下流の代謝酵素分子群による細胞内メタボライトの解析：癌細胞では解糖系が亢進し、TCA サイクルの抑制と嫌氣的経路から主にエネルギーを得るといったエネルギー代謝の変化が生じており、ワールブルグ効果として広く知られている。p53 はこれらの酵素反応系を調節することが明らかにされつつある。そこでメタボローム解析を駆使して、細胞内代謝動態を網羅的に捉えることで、癌と正常細胞における p53 経路の違いを解析する。さらに、1) で同定された分子と特異的にノックダウンしたり、過剰発現するシステムと組み合わせて、Cell Metabolism に及ぼす機能と代謝環境応答時の役割について解析した。

3) マウス動脈硬化/肥満動物モデルを用いた p53 活性化と新規細胞内代謝関連分子の発現解析による有用性/実証的解析：高脂肪食負荷による肥満マウスモデルや STAM マウスの NASH 肝臓を用いて、脂肪組織・肝臓における p53 と代謝関連下流遺伝子の発現解析を行なった。

3. 結果

RNA sequenceやマイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析とChIP sequenceを組み合わせたゲノムワイド解析によって、ヒト17086遺伝子中、207遺伝子に有意な発現誘導が認められ、細胞内代謝に関与する新規p53下流遺伝子として、グルタミン代謝に関与するphosphate activated glutaminase (GLS2)、ピリミジン代謝に関与するsulfatase、dihydropyrimidinase-like 4(DPYSL4)、老化関連遺伝子であるSURF2など、未報告の興味深い新規p53下流遺伝子が多数同定された。その中でGlytaminolysisの中心的役割を担っている、グルタミンをグルタミン酸に変換する細胞内代謝酵素であるGLS2に着目した。種々の生化学的・分子生物学的解析をした結果、GLS2は主にミトコンドリアに局在する分子で、p53がmRNAとタンパクの両レベルでその転写誘導を引き起こし、細胞内グルタミン代謝を制御した。そして、レンチウイルスによるshRNAのノックダウンシステムや強制発現系を樹立し、GLS2は正常細胞および癌細胞において DNA傷害時・酸化的ストレス時にp53依

存性に著明に誘導され、癌抑制作用を有するのみならず、抗酸化作用や好氣的回路を介してエネルギー産生を促進することが明らかとした。更にメタボローム解析と組み合わせることにより、GLS2はグルタミン酸の供給とグルタチオンの産生制御を介して抗酸化作用を発揮し、また α ケトグルタル酸を介してTCAサイクルへ器質を供給することで好氣的回路を正に調整しているといった機序が明らかとなった。病態生理解析では、マウス肥満モデルの肝臓や脂肪、更にはヒトおよびマウスのNASH肝臓においてGLS2の発現が有意に増加していた。

4. 考察 まとめ

AMPKによるp53シグナルの活性化や、グルコーストランスポーターの発現制御、解糖系に関する酵素群の転写調節等、細胞内エネルギーバランスに関わるp53の役割が次々と明らかにされつつあるが、その実体は十分に解明されていない¹⁾。一方でアポトーシス・細胞周期停止・老化機能を出来なくしたp53 mutantをノックインしても癌抑制機能が保たれることが報告され、その機序としてp53の細胞内代謝特に抗酸化作用を介して癌抑制効果が注目を集めている²⁾。

GLS2遺伝子は2000年にクローニングされ、グルタミンをグルタミン酸に加水分解する酵素であり、グルタミン酸はグルタチオン産生や α ケトグルタル酸を介してTCAサイクルに利用されることが報告されていた。しかしながら、肝癌・乳癌・大腸癌・白血病・2型糖尿病などでGLS2の過剰発現が報告された以外には、p53との関連やGLS2の生理的役割については全くわかっていなかった。我々は、GLS2は、主にミトコンドリアに局在し、DNA傷害や活性酸素などの酸化ストレスに応答してp53依存的にその発現が著明に誘導されるp53下流遺伝子であることをはじめて明らかとした。そして本研究により、GLS2は抗酸化作用や好氣的エネルギー産生を介してミトコンドリア機能制御に重要な役割を果たしており、その機序としてグルタミン代謝を介したグルタチオンや α ケトグルタル酸産生が重要であることが明らかとなった³⁾。

生体内では活性酸素生成系と消費系のバランスが崩れ酸化に傾いたときに酸化ストレスが生じ、癌や老化、動脈硬化、糖尿病、神経変性疾患など様々な病態に関与している。最近、p53ノックアウトマウスの脾臓や胸腺などで活性酸素が増加し、更にp53ノックアウトマウスに抗酸化剤を摂取させると癌発生率が低下することが示され、p53の抗酸化作用が注目されている⁴⁾。GLS2のヒトおよびマウスの臓器発現を検討すると、共に肝臓、脳、脾臓に高発現しており何らかの代謝性疾患との関連が示唆された。そこで、酸化ストレスがその病態に深く関わることで知られる肥満マウスやNASHマウスを用いて、GLS2の発現解析を行った。その結果、肥満マウスにおける肝臓や脂肪、更にはNASHの肝臓においてGLS2の発現が有意に増加していた。これらの結果はGLS2が増加することで酸化ストレスの増加に対して拮抗的に作用している可能性を示唆している。

5. 発表論文、参考文献

1. Maddocks OD, Vousden KH. Metabolic regulation by p53. *J Mol Med (Berl)*. 2011 Mar;89(3):237-45. doi: 10.1007/s00109-011-0735-5. Epub 2011 Feb 23.
2. Li T, Kon N, Jiang L, Tan M, Ludwig T, Zhao Y, Baer R, Gu W. Tumor suppression in the absence of p53-mediated cell-cycle arrest, apoptosis, and senescence. *Cell*. 2012 Jun 8;149(6):1269-83. doi: 10.1016/j.cell.2012.04.026.
3. Suzuki S, Tanaka T, Poyurovsky MV, Nagano H, Mayama T, Ohkubo S, Lokshin M, Hosokawa H, Nakayama T, Suzuki Y, Sugano S, Sato E, Nagao T, Yokote K, Tatsuno I, Prives C. Phosphate-activated glutaminase (GLS2), a p53-inducible regulator of glutamine metabolism and reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Apr 20;107(16):7461-6.
4. Sablina AA, Budanov AV, Ilyinskaya GV, Agapova LS, Kravchenko JE, Chumakov PM. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat Med*. 2005 Dec;11(12):1306-13. Epub 2005 Nov 13.