

【トピックス】

ストレス老化シグナルによる解糖系酵素 PGAM のユビキチン化制御

三河 拓己、稲垣 暢也、近藤 祥司

京都大学大学院・医学研究科・糖尿病・内分泌・栄養内科学

キーワード：Glycolysis, phosphoglycerate mutase, Mdm2, Ubiquitination

1. はじめに

正常な組織と比較して、癌に特有な代謝特性の一つに「解糖系代謝亢進」が知られている（ワールブルグ（Warburg）効果と呼ぶ、1930年提唱）。ワールブルグ効果は、癌臨床診断検査（FDG-PET など）の理論的根拠として、既に広く応用されている。一方、癌におけるワールブルグ効果の病理的意義については、以下のように幾つか提唱されている。すなわち、癌の生存戦略として、①低酸素環境適応、②抗酸化力獲得、③バイオマス合成、④ストレス老化耐性獲得、などの利点が考えられる。また、それぞれの可能性を説明しうる分子メカニズムとして、①転写因子 HIF-1 (hypoxia-inducible transcription factor 1) の活性化とその標的遺伝子である多くの解糖系酵素の発現上昇<sup>[1]</sup>、②抗酸化力獲得 [2] およびペントースリン酸経路 (PPP) 活性化 [3]、などの報告が見られる (図1)。

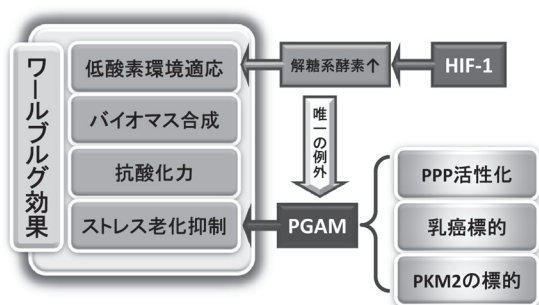


図1 PGAM はストレスによりユビキチン化を介した分解を受ける

癌細胞では解糖系が亢進している（ワールブルグ効果）。PGAM は癌細胞の増殖に重要な役割を果たすと予想されたが、多くの解糖系酵素の転写を活性化する転写因子 HIF-1 は、PGAM をターゲットとしない。

我々のグループでは、以前にマウス正常繊維芽細胞 (MEF 細胞) を用いて、細胞老化抑制 cDNA スクリーニングを行い、解糖系酵素の一つであるホスホグリセリン酸ムターゼ PGAM を同定している<sup>[2]</sup>。その後、PGAM は、他のグループからも、①乳癌抗癌剤の標的となる事<sup>[4]</sup>、②癌特異的解糖系酵素 PKM2 の標的となること<sup>[5]</sup>、③ PPP を直接活性化する事<sup>[3]</sup>、などの報告が相次ぎ、癌代謝における重要性が指摘されている。

しかしながら、PGAM の制御機構は長く謎のままであった。その理由の一つは、PGAM は HIF-1 の転写制御を受けない唯一の例外であるという意外な事実であった。そこで、我々は PGAM 制御機構の詳細な分子メカニズムの検討を行い、老化ストレス時に PGAM が癌関連遺伝子 Mdm2 によりユビキチン化を受け、分解されることを今回発見した<sup>[6]</sup>。

2. ストレス老化シグナルによる PGAM のユビキチン化

ストレス老化シグナル（酸化ストレス、DNA 傷害、発癌ストレスなど）により、通常細胞は、テロメア非依存的に細胞老化する（「ストレス老化」と呼ぶ）。老化細胞では、解糖系代謝が低下することを我々は以前報告している<sup>[2]</sup>。まず、我々は独自に抗 PGAM 抗体を作成し、ストレス老化誘導による PGAM タンパク質の挙動を検討した。MEF 細胞に対して、DNA 傷害（低濃度 Etoposide 暴露）や発癌ストレス（低分子 GTP 結合タンパク質 Ras の発癌変異 Ras-G12V 発現）により、ストレス老化を誘導した場合、PGAM タンパク質の顕著な減少、PGAM 酵素活性低下、それに伴い解糖系代謝低下が観察された。この際の PGAM 減少は、ユビキチン-プロテアソーム系によるタンパク分解が原因であることが証明された (PGAM mRNA プロファイルの検討、プロテアソーム阻害剤 MG132 による検討、ポリユビキチン化修飾 PGAM の検出などより)。

3. Pak1 キナーゼによる PGAM のリン酸化修飾がユビキチン化の引き金となる

多くのユビキチン化反応は、前段階としてユビキチン化以外のタンパク修飾（リン酸化等）の影響を受けることがよく知られている。PGAM のユビキチン化機構解明のため、まず、我々は PGAM をリン酸化するキ

連絡先：〒 606-8507  
 京都府京都市左京区聖護院川原町 54  
 TEL：075-751-3465  
 FAX：075-771-4260  
 E-mail：hkondoh@kuhp.kyoto-u.ac.jp

ナーゼに注目した。Pak1 キナーゼ (p21 (cdc42/Rac1)-activated kinase) は細胞運動性や細胞骨格など多くの細胞現象に機能する遺伝子であり、アポトーシスや癌化にも関与することが知られている<sup>[7]</sup>。既に Pak1 キナーゼが PGAM のセリン 118 残基をリン酸化することが知られていた<sup>[8]</sup>。Shalom-Barak らの報告では、PGAM リン酸化により、その酵素活性は低下するもののタンパク質レベルは変化しないとされていたが、彼らは癌細胞株 HEK293T 細胞を用いていた点是我々とは異なる。そこで我々は、初代 MEF 細胞において、Pak1 キナーゼの PGAM ユビキチン化への影響を検討した。Pak1 を過剰発現した MEF 細胞では、PGAM ユビキチン化によるタンパク質分解が亢進し、早期老化が引き起こされた。一方、Pak1 の発現をノックダウンしたり PGAM のセリン 118 残基をシステインに置換したりすると、PGAM のユビキチン化が減少することが観察された。

さらに、ストレス老化シグナルの活性化により、Pak1 タンパク質レベルが上昇し、PGAM のセリン 118 残基をリン酸化することが、抗セリン 118 リン酸化抗体や試験管内リン酸化反応で観察された。これらの結果より、ストレス細胞老化において、Pak1 によるリン酸化修飾が PGAM 分解を促進することが判明した。

#### 4. ユビキチンリガーゼ Mdm2 による PGAM のユビキチン化修飾

次に、PGAM のユビキチン化修飾を行うユビキチンリガーゼの探索を行った。ユビキチン化修飾はユビキチン活性化酵素 E1, ユビキチン結合酵素 E2, ユビキチンリガーゼ E3 による多段階のステップを経て行われる。E1, E2 とは異なり、基質特性を決定する E3 は種類が多く、数百種類存在するといわれており、PGAM ユビキチン化に対する特異的ユビキチンリガーゼ同定が喫緊の課題であった。以前、我々は PGAM 酵素活性が p53 依存的であることを報告していた<sup>[9]</sup>。これを手掛かりに、まず、様々な細胞株において PGAM タンパク質の挙動を検討したところ、正常細胞 (WI38, TIG-3, IMR90) では DNA 傷害などにより PGAM タンパク質減少が観察された一方で、癌細胞株 (HEK293T, Sw620, HT-29, HeLa) では PGAM はより安定であった。p53 ノックアウト MEF でも同様の知見を得た。以上の結果より、PGAM 蛋白分解は p53 依存的であることが示唆された。p53 は癌抑制遺伝子であり、転写因子としても知られる。我々は、p53 の下流因子の一つであり、p53 そのもののユビキチン化も担う RING 型ユビキチンリガーゼ Mdm2 が、PGAM の分解を促進することを見出した。さらに、Mdm2 がストレス存在下において PGAM と強く結合し、その結合は Pak1 によるリン酸化が促進していることを見出した。最終的に試験管内ユビキチン化反応系を構築し、Mdm2 が試験管内で PGAM を基質としてユビキチン化できることを見出した。

以上より、PGAM のユビキチン化酵素 E3 が Mdm2 であることが確実にされた。これは癌関連遺伝子 Mdm2 による代謝酵素制御の最初の報告となった。

#### 5. PGAM をユビキチン化出来ない Mdm2 変異の発現は癌化を促進させる

従来、以下のような幾つかの理由により、Mdm2 は癌遺伝子と考えられてきた。①癌抑制遺伝子 p53 をユビキチン化分解する点、②ある種の癌における遺伝子増幅・発現上昇、③ある条件ではヒト初代繊維芽細胞を形質転換する<sup>[9]</sup>、などの報告による。しかし一方で、Mdm2 はある環境下では癌抑制遺伝子としても働きうる可能性が知られている<sup>[10]</sup>。Mdm2 による細胞周期停止<sup>[11]</sup>や、アポトーシス促進 (今回の我々の論文) が報告されているからだ<sup>[6]</sup>。このような一見矛盾する Mdm2 の 2 面性は、従来謎のままだった。我々は、細胞の状況や環境条件により、Mdm2 の基質選択性の違いが生まれ、引いては細胞の運命に大きく影響するのではないかと考え、その証明を試みた。

我々は、癌のサンプルより検出された遺伝子変異の網羅的データベース上で報告のあった 3 つの新規 Mdm2 変異について、基質選択性の違いを検討した。興味深いことに、p53 不活性化に関して、これら 3 つの変異と野生型はほぼ同様の活性を示す一方で、PGAM ユビキチン化活性は Mdm2 の RING ドメイン内変異 (M459I) においてのみ、顕著な低下を認めた。さらに野生型 Mdm2 と異なり、この M459I 変異においてのみ、Ras-G12V と PGAM との共発現により、ヌードマウス皮下腫瘍形成能を獲得した (図 2)。以上をまとめると、Mdm2 がその二つの基質 (p53 と PGAM) に対して、ストレス老化シグナル活性化時に、正反対のユビキチン化活性を示すことが判明した。つまり、p53 を安定化する一方、PGAM を不安定化することにより老化を誘導する。しかしある条件 (Mdm2-M459I 変異) では、このシグナル伝達 (Ras-G12V) は逆に作用し、p53 を不

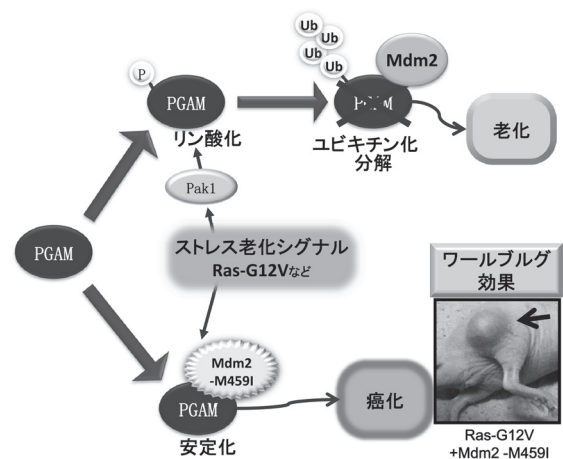


図2 Mdm2 による PGAM のユビキチン化機構の破綻により細胞が癌化する

ストレス老化シグナル下、Mdm2 による p53 と PGAM のユビキチン化の違いのモデル図。詳細は本文参照。写真は Ras-G12V と Mdm2-M459I を発現させた PGAM2-Tg MEF 細胞をヌードマウスの皮下へ打ち込み、腫瘍形成を観察したもの。

活性化し PGAM を安定化することにより発癌に寄与する。すなわちワールブルグ効果となる (図 2)。

## 6. おわりに

今回、我々は PGAM 分子制御機構の詳細な検討を行い、(1) ストレス老化により PGAM がユビキチン化を受け、(2) Pak1 キナーゼによるリン酸化がそのユビキチン化を促進し、(3) Mdm2 が PGAM のユビキチン化酵素であり、(4) PGAM をユビキチン化できない Mdm2 変異が癌化に寄与することを報告した。これより、細胞老化とワールブルグ効果の分子接点として、p53/Mdm2 経路による PGAM のユビキチン化が重要であることが判明した (図 2)。

## 参考文献

- 1 Iyer, N. V., Leung, S. W. & Semenza, G. L. The human hypoxia-inducible factor 1alpha gene: HIF1A structure and evolutionary conservation. *Genomics* 52, 159-165, 1998.
- 2 Kondoh, H. *et al.* Glycolytic enzymes can modulate cellular life span. *Cancer research* 65, 177-185, 2005.
- 3 Hitosugi, T. *et al.* Phosphoglycerate mutase 1 coordinates glycolysis and biosynthesis to promote tumor growth. *Cancer Cell* 22, 585-600, 2012.
- 4 Evans, M. J., Saghatelian, A., Sorensen, E. J. & Cravatt, B. F. Target discovery in small-molecule cell-based screens by in situ proteome reactivity profiling. *Nat Biotechnol* 23, 1303-1307, 2005.
- 5 Vander Heiden, M. G. *et al.* Evidence for an alternative glycolytic pathway in rapidly proliferating cells. *Science* 329, 1492-1499, 2010.
- 6 Mikawa, T. *et al.* Senescence-inducing stress promotes proteolysis of phosphoglycerate mutase via ubiquitin ligase Mdm2. *The Journal of cell biology* 204, 729-745, 2014.
- 7 Molli, P. R., Li, D. Q., Murray, B. W., Rayala, S. K. & Kumar, R. PAK signaling in oncogenesis. *Oncogene* 28, 2545-2555, 2009.
- 8 Shalom-Barak, T. & Knaus, U. G. A p21-activated kinase-controlled metabolic switch up-regulates phagocyte NADPH oxidase. *The Journal of biological chemistry* 277, 40659-40665, 2002.
- 9 Seger, Y. R. *et al.* Transformation of normal human cells in the absence of telomerase activation. *Cancer Cell* 2, 401-413, 2002.
- 10 Manfredi, J. J. The Mdm2-p53 relationship evolves: Mdm2 swings both ways as an oncogene and a tumor suppressor. *Genes Dev* 24, 1580-1589, 2010.
- 11 Brown, D. R., Thomas, C. A. & Deb, S. P. The human oncoprotein MDM2 arrests the cell cycle: elimination of its cell-cycle-inhibitory function induces tumorigenesis. *The EMBO journal* 17, 2513-2525, 1998.