

がん幹細胞性を調節するヘキソサミン合成経路の 数理モデル

白岡航平*
板野直樹**

要旨

がん幹細胞は、抗がん剤や放射線治療に極めて高い耐性を示し、治療後も残存してがん細胞を生み続けて再発を引き起こす。従って、がん幹細胞性を制御している機構を解明し、その対策を講じることが、がんの根治的治療に重要である。我々はこれまでに、糖鎖の発現とがん幹細胞性との関連について研究を展開し、ヒアルロン酸糖鎖の過剰産生が、糖代謝中心プログラムのヘキソサミン合成経路(HBP)の代謝流束(フラックス)を加速して、がん幹細胞性の促進に働くことを明らかにしてきた。

HBPは、糖供与体UDP-N-アセチルグルコサミン(UDP-GlcNAc)の供給を通じて、タンパク質の糖鎖修飾を制御し、細胞内のシグナル伝達や転写調節、エピジェネティクスなど細胞機能の広範な調節に働く。しかしながら、このHBP代謝流速の加速が、がん幹細胞性の制御に働く詳細な機構については、依然として明らかではない。また、UDP-GlcNAcの細胞内動態をリアルタイムに計測する手法が開発されていないため、UDP-GlcNAcの細胞内動態が細胞シグナルの調節に働く機構は、十分に理解されていない。今回我々は、HBP代謝振動による細胞内UDP-GlcNAc濃度の周期的な変化が、下流シグナルの発信とがん幹細胞性の制御に働くという仮説を立て、数理モデルによる検証を行った。

キーワード：乳がん、がん幹細胞、ヒアルロン酸、ヘキソサミン合成経路、数理モデル、シミュレーション

1. はじめに

ヘキソサミン合成経路(HBP)は解糖系の副経路であり、ウリジン二リン酸-N-アセチルグルコサミン(UDP-GlcNAc)の生合成経路である(図1)。グルコーストランスポーターによって細胞内に取り込まれたグルコース(Glc)は、段階的にグルコース-6-リン酸(Glc-6P)、そしてフルクトース-6-リン酸(Fru-6P)へと代謝される。引き続き、Fru-6Pは、HBP開始反応を触媒するL-グ

* 京都産業大学総合生命科学部

** 京都産業大学生命科学部

ルタミン：D-フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼ (GFAT) によりグルコサミン-6-リン酸 (GlcN-6P) に変換される。この逆反応は、グルコサミン-6-リン酸イソメラーゼ (GNPDA) により触媒される。GlcN-6P は、順次グルコサミン-リン酸-N-アセチルトランスフェラーゼ 1 (GNPNAT1) により N-アセチルグルコサミン-6-リン酸 (GlcNAc-6P) に、ホスホグルコムターゼ 3 (PGM3) により N-アセチルグルコサミン-1-リン酸 (GlcNAc-1P) に、そして、最終的に UDP-N-アセチルヘキシサミンフォスフォリラーゼ 1 (UAP1) により UDP-GlcNAc へと代謝される。さらに、HBP 最終産物の UDP-GlcNAc は、HBP の律速酵素であり、アロステリック酵素である GFAT をフィードバック阻害することが知られている [1]。

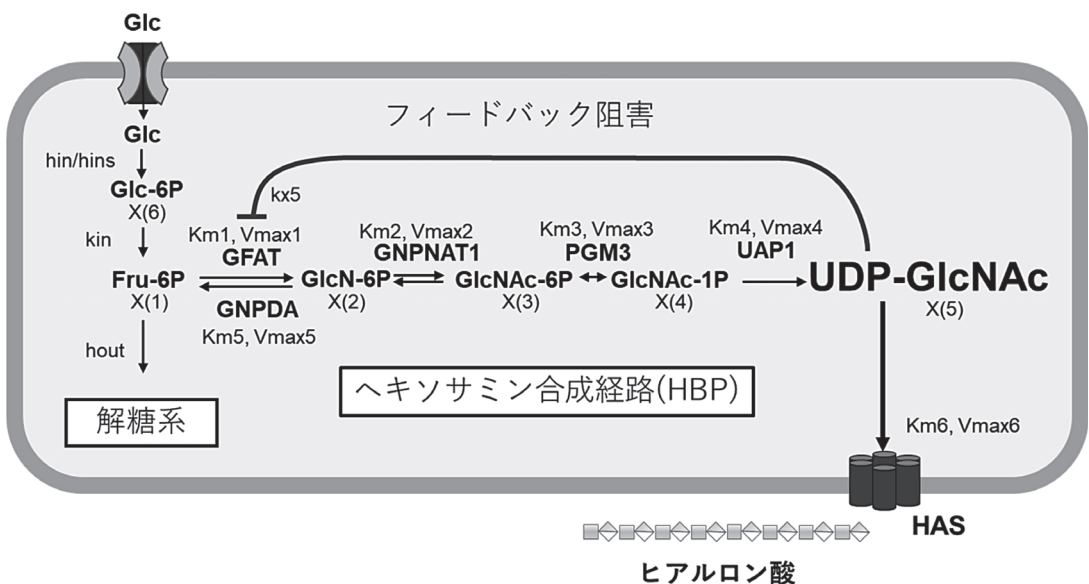


図1 細胞内グルコース代謝およびHBP代謝経路の模式図

UDP-GlcNAc は、ヒアルロン酸などの複合糖質の合成に利用されるほか、タンパク質の糖鎖修飾反応の基質として、細胞内のシグナル伝達や転写調節、エピジェネティクスなど細胞機能の広範な調節に働く重要な糖ヌクレオチドである [2]。我々はこれまでに、ヒアルロン酸を過剰に産生する乳がん細胞において、HBP の代謝流速 (フラックス) が加速し、がん幹細胞性の促進に働くことを明らかにしてきた [3]。しかし、HBP 代謝流速の加速が、がん幹細胞性の制御に働く詳細な機構については、依然として明らかでない。本研究では、解糖系などにみられる自律的な振動に着想を得て、HBP 代謝流束の変化を下流シグナルへと変換する機構として、新たに“ヘキシサミン代謝の自律振動モデル”を提唱する。このモデルの検証には、UDP-GlcNAc の細胞内動態をリアルタイム追跡して、代謝流束の加速による濃度振動とシグナル発信との関連を解明する必要がある。しかし、そのリアルタイム追跡技術はいまだ確立されていない。そこで本研究では、HBP 代謝反応の数理モデルを構築し、

UDP-GlcNAc の細胞内動態をシミュレーションすることにより、上記仮説の検証を試みた。

2. HBP 数理モデルの構築

HBP の代謝反応は、GFAT, GNPDA, GNPAT1, PGM3, そして UAP1 の代謝酵素が担っている。そこで、HBP における各代謝の反応速度式をもとに、以下に示す数理モデルを構築した。各代謝の中間産物を図 1 に示すように $x(1) \sim x(6)$, 各代謝酵素のミカエリス定数を $Km1 \sim 6$, そして、最大反応速度を $Vmax1 \sim 6$ として表した。反応速度式には、文献上で報告されているヒト代謝酵素の Km を用いて (表 1), ミカエリス・メンテン式を適用した [2-8]。ただし、複数のサブユニットから構成される酵素では、酵素反応速度と基質濃度の関係が、ミカエリス・メンテン式に従わず、シグモイド (S 字) 型となる場合がある。このとき、多量体を構成するサブユニットに最初の基質が結合すると、酵素の構造が変化して、次の基質分子が素早く結合するといった協同的反応が起こる。このことをアロステリック効果といい、多量体を形成する酵素では、代謝反応においてアロステリック効果を考慮する必要がある。そこで、HBP 代謝酵素のうちアロステリック酵素である GFAT については、アロステリック効果の影響を考慮し、GFAT のサブユニット数 (基質の結合数) を n としてヒルの式を適用した。さらに、GFAT の酵素活性は、HBP 最終産物の UDP-GlcNAc によりフィードバック阻害を受ける。そこで、フィードバック阻害を考慮して数理モデルを拡張した。ここで、 $Kx5$ は、HBP 最終産物の UDP-GlcNAc が GFAT にフィードバック阻害する阻害定数 Ki を示す。数理モデルにおける hin (一定入力) と $hins$ (sin 波による入力) は、Glc からグルコース -6 リン酸 (Glc-6P) へ代謝される反応の速度定数、 kin は、Glc-6P がフルクトース -6 リン酸 (Fru-6P) へ代謝される反応の速度定数、そして、 $hout$ は Fru-6P 以降の解糖系の速度定数を示す。

HBP 代謝反応の数理モデル

(Glc-6P の代謝速度)

$$dx[6]/dt=hins*\sin[t]+hin-kin*x[6][t]$$

(Fru-6P の代謝速度)

$$dx[1]/dt=kin*x[6][t]-(Vmax1/(1+(x[5][t]/kx5)^n))*((x[1][t]/km1)^n/(1+(x[1][t]/km1)^n)) + (Vmax5*x[2][t])/(km5+x[2][t])$$

(GlcN6P の代謝速度)

$$dx[2]/dt=(Vmax1/(1+(x[5][t]/kx5)^n))*((x[1][t]/km1)^n/(1+(x[1][t]/km1)^n)) - (Vmax2*x[2][t])/(km2+x[2][t]) - (Vmax5*x[2][t])/(km5+x[2][t])$$

(GlcNAc-6P の代謝速度)

$$dx[3]/dt=(Vmax2*x[2][t])/(km2+x[2][t]) - (Vmax3*x[3][t])/(km3+x[3][t])$$

(GlcNAc-1P の代謝速度)

$$dx[4]/dt=(Vmax3*x[3][t])/(km3+x[3][t]) - (Vmax4*x[4][t])/(km4+x[4][t])$$

(UDP-GlcNAc の代謝速度) $dx[5]/dt = (V_{max4} * x[4][t]) / (k_{m4} + x[4][t]) - (V_{max6} * x[5][t]) / (k_{m6} + x[5][t])$

表1 ヒト HBP 代謝酵素のミカエリス定数

	MW (kDa)	K _m (μM)	Source	Reference
GFAT	78.8 (316)	7-980 (for Fru-6P)	human recombinant	4, 5
GPNPAT1	20.7	97 (for GlcN-6P)	human recombinant	6
PGM3	59.9	30 (for GlcNAc-6P)	human recombinant	7, 8
UAP1	58.8	200-310 (for GlcNAc-1P)	human recombinant	7, 8
GNPDA	28.6	270 (for GlcN-6P)	human recombinant	9

阻害定数

	MW (kDa)	K _i (μM)	Source	Reference
GFAT	78.8 (316)	4 (for UDP-GlcNAc)	human recombinant	5

*K_m は括弧内で示す基質に対する各酵素のミカエリス定数を表す。

3. HBP 代謝振動のシミュレーション

数式処理システムの Mathematica (バージョン 12.0, Wolfram Co., Champaign, IL) を用い、各酵素の代謝回転数 k_{cat} に基づいて推定した V_{max} を基準に数値を変化させ、HBP 代謝中間産物の動態変化のシミュレーションを行った。GFAT はその活性化状態に応じて 2 量体あるいは 4 量体として存在することが知られている。そこでまず、GFAT が 4 量体を形成する場合を想定してシミュレーションを行った。Fru-6P への代謝の流れが一定であるとした場合、図 2 に示す各パラメータ値で代謝中間産物 $x(2) \sim x(5)$ の濃度が振動することが明らかとなった。 V_{max6} の値を変化させてシミュレーションを実施した結果、18 から 78 の範囲で振動が生じた (図 2)。さらに、GFAT の UDP-GlcNAc による阻害定数 K_{x5} を変化させて、シミュレーションを行った。その結果、阻害定数が 2 から 20 の範囲で振動が生じ、 K_{x5} を一定範囲で変化させると、振動の振幅と周波数が大きく影響を受けることが明らかとなった (図 3)。同条件で、Fru-6P への代謝の流れを sin 波で入力した場合には、何れの条件においても $x(2) \sim x(5)$ の濃度の振動は減衰した (図 4B)。

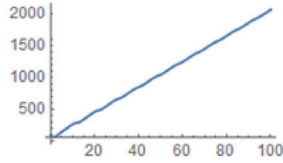
A

Vmax1m...200
 Vmax2m...100
 Vmax3m...50
 Vmax4m...200
 Vmax5m...10
 Vmax6m...18

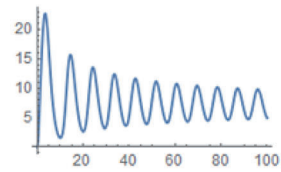
Km1m...100
 Km2m...97
 Km3m...30
 Km4m...300
 Km5m...270
 Km6m...30

Kx5m...4

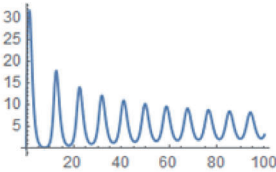
kinm...10
 hinsm...0
 hinm...5
 houtm...2



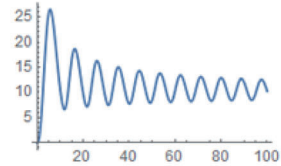
x(1)



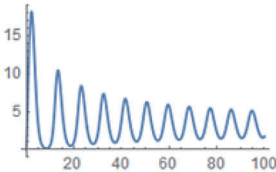
x(4)



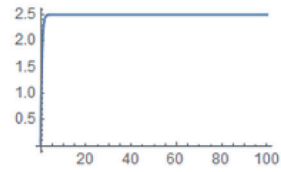
x(2)



x(5)



x(3)



x(6)

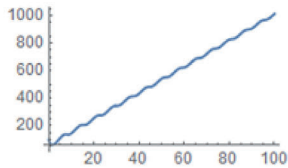
B

Vmax1m...200
 Vmax2m...100
 Vmax3m...50
 Vmax4m...200
 Vmax5m...10
 Vmax6m...78

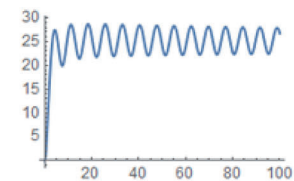
Km1m...100
 Km2m...97
 Km3m...30
 Km4m...300
 Km5m...270
 Km6m...30

Kx5m...4

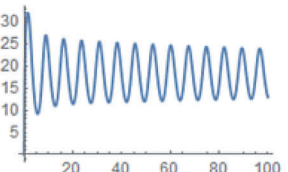
kinm...10
 hinsm...0
 hinm...5
 houtm...2



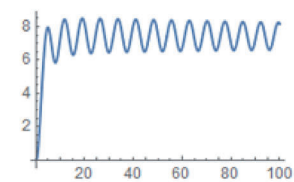
x(1)



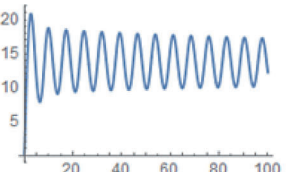
x(4)



x(2)



x(5)



x(3)



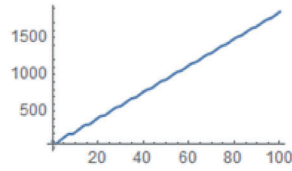
x(6)

図2 GFAT (4量体) を想定したシミュレーション: Vmaxの検討

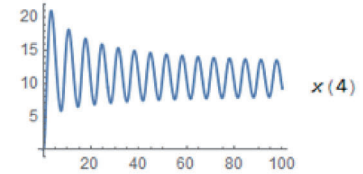
- A. Vmax6 を 18 に設定した振動モデル
 - B. Vmax6 を 78 に設定した振動モデル
- X (1) ~ X (6) は代謝産物の濃度を示す。

A

Vmax1m...200
 Vmax2m...100
 Vmax3m...50
 Vmax4m...200
 Vmax5m...10
 Vmax6m...50

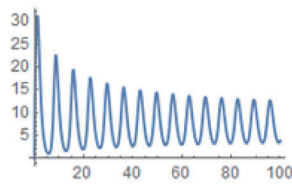


x(1)

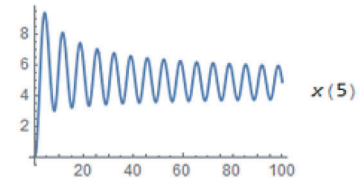


x(4)

Km1m...100
 Km2m...97
 Km3m...30
 Km4m...300
 Km5m...270
 Km6m...30



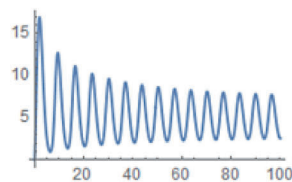
x(2)



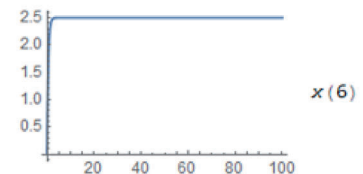
x(5)

Kx5m...2

kinm...10
 hinsm...0
 hinm...5
 houtm...2



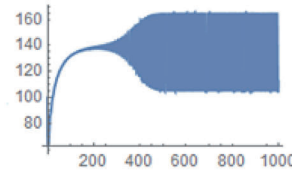
x(3)



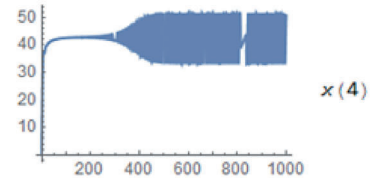
x(6)

B

Vmax1m...200
 Vmax2m...100
 Vmax3m...50
 Vmax4m...200
 Vmax5m...10
 Vmax6m...50

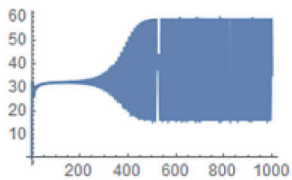


x(1)

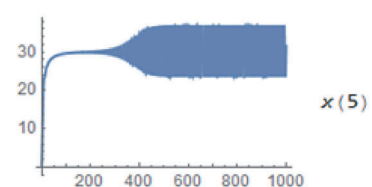


x(4)

Km1m...100
 Km2m...97
 Km3m...30
 Km4m...300
 Km5m...270
 Km6m...30



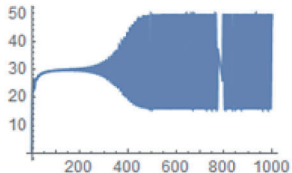
x(2)



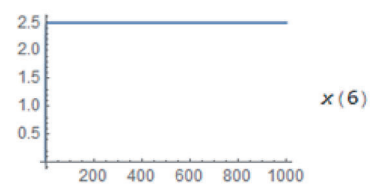
x(5)

Kx5m...20

kinm...10
 hinsm...0
 hinm...5
 houtm...2



x(3)



x(6)

図3 GFAT (4量体) を想定したシミュレーション: 阻害定数の検討

A: 阻害定数を2に設定した振動モデル

B: 阻害定数を20に設定した振動モデル

X(1) ~ X(6) は代謝産物の濃度を示す。

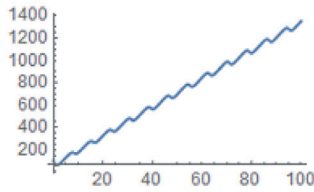
A

Vmax1m...200
 Vmax2m...100
 Vmax3m...50
 Vmax4m...200
 Vmax5m...10
 Vmax6m...50

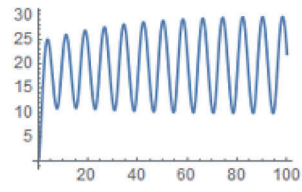
Km1m...100
 Km2m...97
 Km3m...30
 Km4m...300
 Km5m...270
 Km6m...30

Kx5m...4

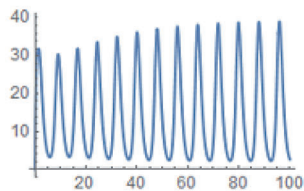
kinm...10
 hinsm...0
 hinm...5
 houtm...2



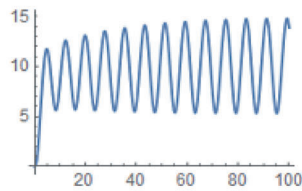
x(1),



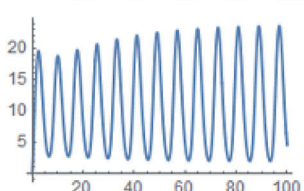
x(4),



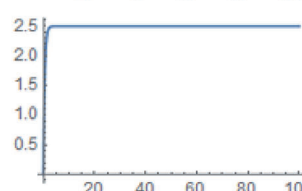
x(2),



x(5),



x(3),



x(6)

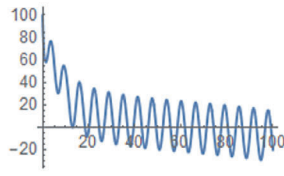
B

Vmax1m...200
 Vmax2m...100
 Vmax3m...50
 Vmax4m...200
 Vmax5m...10
 Vmax6m...50

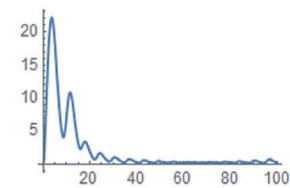
Km1m...100
 Km2m...97
 Km3m...30
 Km4m...300
 Km5m...270
 Km6m...30

Kx5m...4

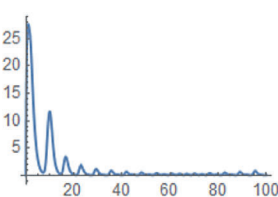
kinm...10
 hinsm...5
 hinm...0
 houtm...2



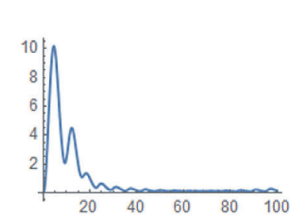
x(1)



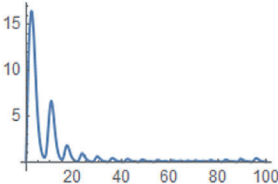
x(4)



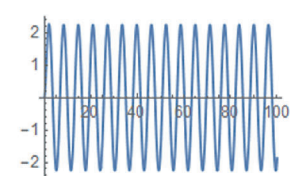
x(2)



x(5)



x(3)



x(6)

図4 GFAT (4量体)を想定したシミュレーション:Fru-6Pへの入力様式の検討

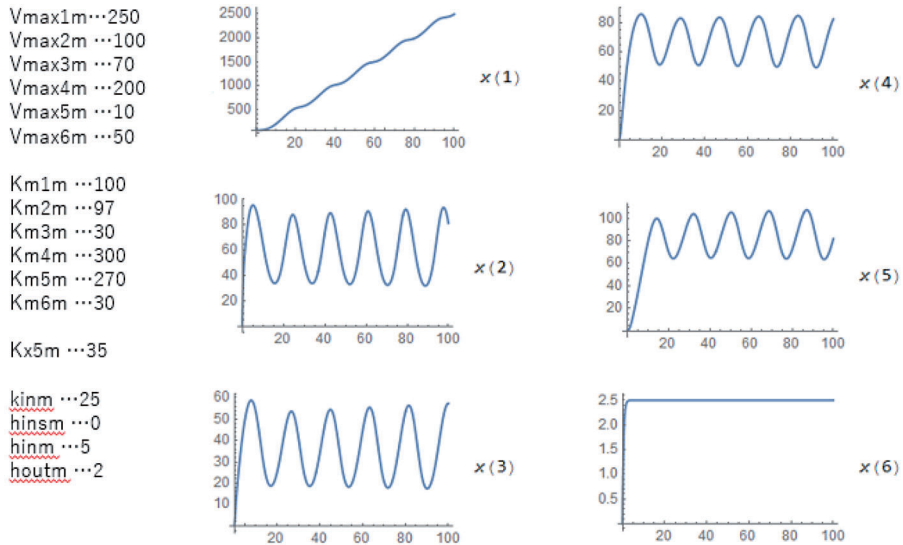
A. 一定入力時における振動モデル

B. Sin波による入力時における振動モデル

X(1) ~ X(6)は代謝産物の濃度を示す。

次に、GFATが2量体を形成する場合を想定してシミュレーションを行った。フルクトース-6-リン酸への代謝の流れが一定あるいはsin波による入力に関わらず、図5に示す各パラメータ値で $x(2) \sim x(5)$ の濃度が振動することが明らかとなった。このとき、4量体形成時にみられたような激しい振動は見られず、緩やかな振動が観察された(図5)。

A



B

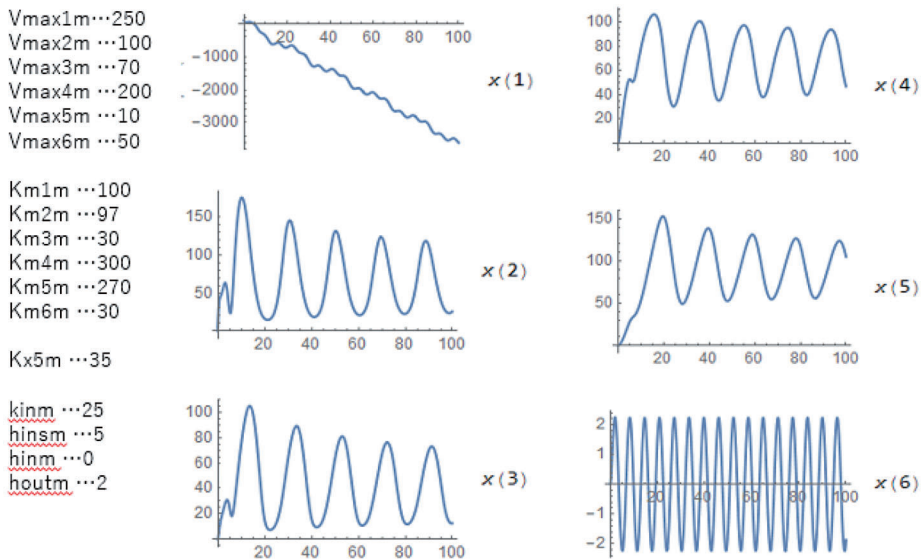


図5 GFAT(2量体)を想定したシミュレーション

- A. 一定入力時における振動モデル
 B. Sin波による入力時における振動モデル
 $X(1) \sim X(6)$ は代謝産物の濃度を示す。

4. まとめ

本研究では、HBPの最終産物であるUDP-GlcNAcの代謝振動が、下流シグナルの発信やがん幹細胞性の制御に働くという仮説を立て、HBP代謝流束に関する数理モデルを構築してシミュレーションによる検証を行った。

UDP-GlcNAcを合成基質として利用するヒアルロン酸の産生は、HBP代謝流束を加速する要因として挙げられる。先行研究では、乳がん細胞におけるヒアルロン酸の過剰な産生が、HBP代謝流束を加速してがん幹細胞性の促進に働くことが明らかとなっている [3]。そこで本研究では、ヒアルロン酸合成によるUDP-GlcNAcの消費が、HBP代謝振動に及ぼす影響に着目してシミュレーションを実施した。ヒアルロン酸合成反応を触媒するヒアルロン酸合成酵素の V_{max6} の値を一定範囲で変化させてシミュレーションを行った結果、18から78に設定した場合に振動が観察され、50で最大となった。このことは、ヒアルロン酸合成によるUDP-GlcNAcの消費過程が、HBP代謝振動の制御に重要であることを示唆している。

GFATはアロステリック酵素であり、HBP最終産物であるUDP-GlcNAcによって負の活性制御を受ける。GFATのUDP-GlcNAcに対する阻害定数を変化させてシミュレーションを行った結果、阻害定数が2から20の範囲でHBP代謝振動が大きく影響を受けることが明らかとなった。このことは、UDP-GlcNAcの生成と消費の相互調節が、代謝振動の発生と制御に重要であることを示唆している。

GFATはその活性化状態に応じて、2量体あるいは4量体として存在することが知られている。活性型GFATが4量体の場合、2量体に比べて、UDP-GlcNAc濃度における振動の振幅や周波数が拡大し、これにより、振動パターンがGFATの活性型サブユニットの数に大きく依存していることが示唆された。

今後は、今回構築した数理モデルがUDP-GlcNAcの細胞内動態を正確に反映しているかについて、実験的に得られたUDP-GlcNAcのカイネティクスの実測値を用いて検証し、モデルの最適化を図る必要がある。

5. 謝辞

本研究は、令和3年度京都産業大学総合学術研究所特定課題研究（課題番号E2103）の支援を受けて行った。数理モデルのシミュレーションは、大阪大学数理・データ科学教育研究センター 鈴木貴教授の助言を得て実施した。

6. 引用文献

1. Akella NM., Ciraku L., and Reginato MJ. Fueling the fire: emerging role of the hexosamine biosynthetic pathway in cancer. *BMC Biol.* 2019, 17 (1):52. doi: 10.1186/s12915-019-0671-3.
2. Ong Q., Han W., and Yang X. O-GlcNAc as an Integrator of Signaling Pathways. *Front Endocrinol (Lausanne)*.

- 2018, 9:599. doi: 10.3389/fendo.2018.00599. eCollection 2018.
3. Chanmee T., et al. Hyaluronan production regulates metabolic and cancer stem-like properties of breast cancer cells via hexosamine biosynthetic pathway-coupled HIF-1 signaling. *J Biol Chem.* 2016, 291 (46):24105-24120. doi: 10.1074/jbc.M116.751263.
 4. Richez C., et al. Expression and purification of active human internal His (6) -tagged L-glutamine: D-Fructose-6P amidotransferase I. *Protein Expr Purif.* 2007, 54 (1):45-53. doi: 10.1016/j.pep.2007.01.015.
 5. Broschat KO., et al. Kinetic characterization of human glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase I: potent feedback inhibition by glucosamine 6-phosphate. *J Biol Chem.* 2002, 277 (17):14764-70. doi: 10.1074/jbc.M201056200.
 6. Hurtado-Guerrero R., et al. Structural and kinetic differences between human and *Aspergillus fumigatus* D-glucosamine-6-phosphate N-acetyltransferase. *Biochem J.* 2008, 415 (2):217-23. doi: 10.1042/BJ20081000.
 7. Vocadlo DJ., et al. A chemical approach for identifying O-GlcNAc-modified proteins in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003, 100 (16):9116-21. doi: 10.1073/pnas.1632821100.
 8. Chuh KN., et al. Changes in metabolic chemical reporter structure yield a selective probe of O-GlcNAc modification. *J Am Chem Soc.* 2014, 136 (35):12283-95. doi: 10.1021/ja504063c.
 9. Alvarez-Añorve LI., et al. Allosteric kinetics of the isoform 1 of human glucosamine-6-phosphate deaminase. *Biochim Biophys Acta.* 2011, 1814 (12):1846-53. doi: 10.1016/j.bbapap.2011.07.010.

Mathematical model of hexosamine biosynthetic pathway governing cancer cell stemness

Kohei SHIRAOKA

Naoki ITANO

Abstract

Cancer stem cells (CSCs) represent a small subpopulation of self-renewing oncogenic cells that are suggested to be responsible for cancer recurrence and therapeutic resistance. Therefore, they have been considered promising targets for curative therapies in cancer. We have previously discovered that hyaluronan production led to CSC-like properties via the metabolic reprogramming of hexosamine biosynthetic pathway (HBP) flux. HBP regulates a wide range of cellular functions including signal transduction, transcriptional regulation, and epigenetics via the supply of the donor substrate, UDP-*N*-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc). However, the detailed mechanism by which HBP metabolic flux regulates cancer stemness remains to be elucidated. Furthermore, the mechanisms by which intracellular UDP-GlcNAc dynamics modulates downstream signaling are not well understood because methods for measuring the cellular levels of UDP-GlcNAc in real time have not been developed. Here, we hypothesized that oscillation of cellular UDP-GlcNAc levels controls downstream signaling and cancer stemness, and verified the hypothesis by simulating a mathematical model.

Keywords : Breast cancer, Cancer stem cell, Hyaluronan, Hexosamine biosynthetic pathway, Mathematical model, Simulation

