

# 東北薬科大学

## 審査学位論文（博士）要旨

氏名（本籍）	和加 ハト 色川 隼人（宮城県）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	甲第 135 号
学位授与の日付	平成 26 年 3 月 18 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条 1 項該当
学位論文題名	ペルオキシレドキシンによる新規ピルビン酸キナーゼ の活性制御機構と 代謝制御を介した酸化ストレス応答機構
論文審査委員	主査 教授 久下周佐
	副査 教授 顧建国
	副査 教授 関政幸

# ペルオキシレドキシニンによる新規ピルビン酸キナーゼの活性制御機構と代謝制御を介した酸化ストレス応答機構

東北薬科大学薬学研究科  
微生物学教室 色川 隼人

本研究では抗酸化酵素ペルオキシレドキシニンが、解糖系律速酵素ピルビン酸キナーゼと相互作用し代謝の流れを制御することで、酸化ストレスを軽減するという新たな機構を見出したので報告する。

**【序論 1, 活性酸素種 (Reactive Oxygen Species : ROS) の機能】** 生物は呼吸代謝により酸素を電子受容体として ATP を獲得するが、その一部は完全には還元されずに活性酸素種 (ROS) として残存する。過剰な ROS 産生は細胞内高分子物質を酸化し、癌化や老化、動脈硬化などといった多くの疾患の引き金や憎悪因子となる。一方で、ROS は細胞増殖を制御するなどの可溶性シグナル分子としても機能することが示されてきた。ROS はスーパーオキシド ( $O_2^-$ ) や過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) などの過酸化物の総称であるが、この中でも過酸化水素は比較的安定であり細胞内で最も濃度が高く、様々な抗酸化酵素により、細胞内過酸化水素レベルは適切にコントロールされている。過酸化水素を消去する酵素のカタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼやペルオキシレドキシニン (Prx) の中で、Prx は過酸化水素をシグナル分子として受容する機能があることを当研究室では示唆してきた。

**【序論 2, ペルオキシレドキシニン (Prx) の機能】** ペルオキシレドキシニン (Prx) は、細菌から哺乳動物まで広く保存された抗酸化因子と認識されている。Prx は 1989 年に出芽酵母から初めて同定されて以来、その機能に関する先駆的な研究は出芽酵母を用いて行われてきた。最近、マウスの癌化や老化に寄与するなどその重要性が示された。本研究では出芽酵母の主要 Prx である Tsa1 の機能解析を行いこれまでに報告されていない Prx の新たな機能を見出した。一般的な Prx と同様に、Tsa1 はそのペルオキシダーゼ活性を担う 2 つのシステイン残基を持ち、ホモダイマー分子間でチオール-ジスルフィドのレドックス交換反応を起こす。Tsa1 は N 末端システイン残基のチオール基 (Cys-SH) が過酸化水素によって直接酸化されると一時的に反応性の高いスルフェン酸 (Cys-SOH) となり、次にパートナー Tsa1 分子の C 末端システイン残基のチオール基 (Cys-SH) により還元され、ホモダイマー間ジスルフィド結合 (Cys-S-S-Cys) を形成する。Tsa1 ジスルフィド結合はチオレドキシニン、チオレドキシニンレダクターゼを介したレドックス反応で NADPH から電子を受け取り再び還元型となることで抗酸化活性を発揮する (ペルオキシダーゼ活性)。

一方、Tsa1 は高濃度の過酸化水素により容易に過酸化 (-SOOH) されペルオキシダ

一ゼとしては不活化することからその機能は謎とされてきた。しかし近年、過酸化された Tsa1 は熱ストレスによりマルチマーを形成し、分子シャペロン活性を示すことが報告された。このように、Tsa1 は様々な外因的ストレスから細胞を守る重要な因子であることが明らかにされてきた。しかし一方で、*TSA1* 欠損株は、栄養の豊富なグルコース培地での培養条件でも対数期後期以降に増殖が低下することから Tsa1 には非ストレス環境下でも何らかの役割が存在すると考え本研究を進めた。

**【結果 1, Tsa1 の新たな機能の示唆】** *TSA1* 欠損株は非ストレス環境下でも増殖が低下する。細胞内 ROS 濃度を定量すると *TSA1* 欠損株は野生株よりも高かった。そこでカタラーゼ (*CTT1*)、*AHP1* (*Tsa1* の次に発現量の高い Prx) などの抗酸化酵素を *TSA1* 欠損株に発現させたところ細胞内 ROS 濃度は WT 同等まで低下したが、増殖阻害は回復しなかった。このことから、*TSA1* 欠損株の対数期後期以降の増殖阻害がその抗酸化活性の消失による ROS の蓄積が原因ではないと結論付けた。

**【結果 2, Tsa1 は Pyk1 を制御し、代謝を制御する】** それでは Tsa1 は非ストレス環境下、どのような役割を果たしているのか？出芽酵母はグルコース存在下では解糖系に依存して ATP を生産し、培養液中にエタノールやグリセロールを放出する。グルコース枯渇後には、これらの炭素源を好氣的に代謝して増殖する。*TSA1* 欠損株ではこの時期に増殖が低下するため、炭素源の代謝変化時に Tsa1 が機能している可能性が考えられた。まず初めにグルコースの代わりにグリセロールを用いた培地で *TSA1* 欠損株を培養したところ、予想とは逆に野生株より *TSA1* 欠損株で増殖が亢進した。グリセロールを代謝する際、ミトコンドリアの活性が必須であるが、*TSA1* 欠損株ではむしろミトコンドリアの活性は低下していた。グリセロール代謝では解糖系の後半部分も使用しそこから ATP を得る。グルコース枯渇後の解糖系の律速酵素であるのはピルビン酸キナーゼ (*Pyk1*) であるとの報告が存在するため、グリセロール培地中の *TSA1* 欠損株のピルビン酸キナーゼ活性を測定した結果、野生株よりも高いことが分かった。さらに共免疫沈降法により Tsa1 と *Pyk1* が複合体を形成していることが明らかとなった。この事実から、グリセロール培地では Tsa1 による *Pyk1* の抑制効果が解除されたため、ATP 合成が亢進し、結果的に増殖が亢進したことが考えられた。次に *TSA1* 欠損株をエタノール培地で培養したところ、野生株の増殖と差がなかったが、その培地からトリプトファン (*Trp*) を除くと *TSA1* 欠損株の増殖は著しく阻害された。*Trp* は phosphoenol pyruvate (PEP) から合成されるが、PEP は *Pyk1* の基質であり、糖新生の出発物質である。*TSA1* 欠損株では *Pyk1* 活性が高いためにエタノール培地中の PEP の供給が上手くいかず、*Trp* 合成や糖新生が阻害され、増殖が阻害された可

能性が考えられる。これらの結果は、グルコース枯渇時に Tsa1 による Pyk1 の抑制的制御が糖新生を亢進するために機能を果たす可能性を示唆している。

そこで、グルコース培地における TSA1 欠損株の増殖の低下が、Pyk1 の活性の上昇によるかを検証した結果、TSA1 欠損株が野生株に比べ、グルコース培地の後期対数期でわずかに Pyk1 活性が高いこと、野生株に Pyk1 を高発現した時に後期対数期の増殖が低下することが明らかとなり、これらの結果はグルコース培地での後期対数期の増殖における Tsa1 による Pyk1 活性制御の重要性を示唆している。

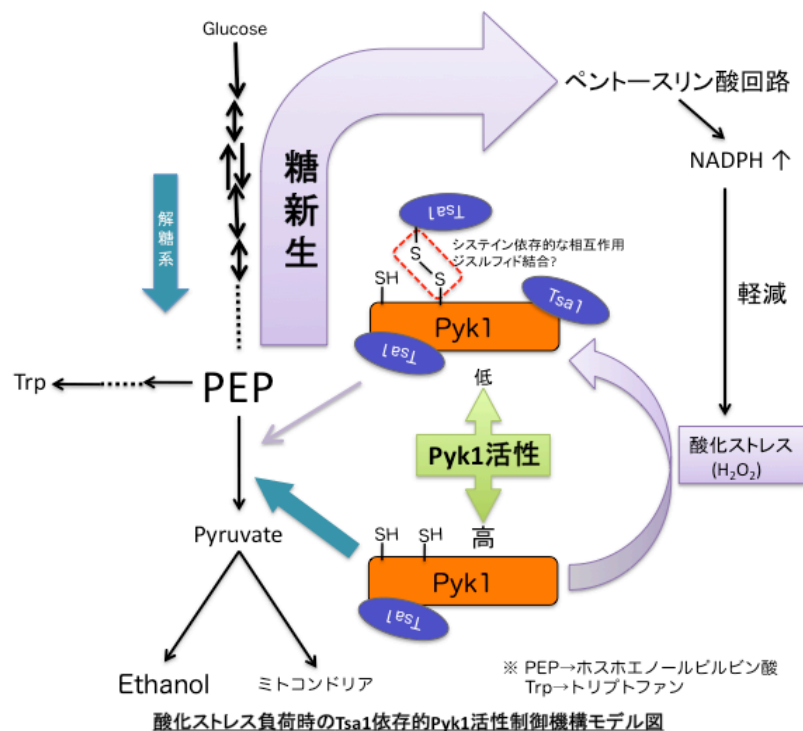
### 【結果 3，Pyk1 との相互作用に重要な Tsa1 の機能】

最近、ヒトの Pyk1 オーソログである PKM2 は癌細胞に優位に発現しており、その活性制御が、癌細胞の増殖を促進することが報告され注目を集めている。出芽酵母 Pyk1 の新規制御機構の解明は PKM2 の制御機構の解明に重要な知見を与えると考えられる。解糖系律速酵素である Pyk1 はグルコース枯渇後も細胞内存在量がそれほど低下しないことから、何らかの活性制御機構が存在する可能性がある。これまでに fructose-1,6-bisphosphate (FBP) によるアロステリック制御の重要性が証明されたが、グルコース枯渇後の FBP 非依存的制御に関する知見はない。そこで、本研究で見出した Tsa1 依存的な Pyk1 の制御機構の解析を行った。Pyk1 との相互作用に必要な Tsa1 のアミノ酸残基や構造を探るため、様々な Tsa1 変異体を発現する株を構築し、Pyk1 との共免疫沈降を用いて検討した。活性中心の Cys48 をトレオニン (T) に置換した Tsa1C48T と Pyk1 との結合は著しく減少した。一方で、Tsa1C171T では逆に結合が著しく増加した。この事実から Tsa1-Pyk1 相互作用には Tsa1 の Cys48 が重要であり、解離に Cys171 が重要であることから一過的にジスルフィド複合体を形成する可能性が考えられた。Tsa1C48,171T と Pyk1 間も減少するものの相互作用していることからジスルフィド結合と物理的相互作用の両方が起きている可能性が考えられた。さらに分子シャペロン活性を持たない Tsa1Y78R (チロシン→アルギニン)、および過酸化されずにペルオキシダーゼ活性の非常に高い Tsa1ΔC (C 末端欠損)をもつ株で同様の実験を行ったところ、Tsa1Y78R、Tsa1ΔC 株で Pyk1 との相互作用が増加した。これらの結果から、Tsa1 の Cys48 が還元型 (-SH) またはスルフェン酸 (-SOH) として存在し、レドックス活性型のダイマーまたはモノマーで存在することが効率の良い Tsa1-Pyk1 相互作用に必要であること考えられた。

【結果 4，Tsa1 依存的 Pyk1 活性制御の重要性】 次に Pyk1 側のシステイン残基の重要性について検討した。Pyk1 内のシステイン残基で Tsa1 とジスルフィド結合する可能性の高いシステイン残基として Cys174 が考えられた。さらにその近傍に

Cys121 が存在した。そこでこれら両システイン残基をアラニンに変異した Pyk1C121,174A 株を作成し Tsa1 との結合を観察したところ、過酸化水素処理時に Pyk1WT 株では Tsa1 との結合が上昇したが、Pyk1C121,174A 株では Tsa1 の結合量の増加は観察されなかった。次に Pyk1WT 株と Pyk1C121,174A 株の過酸化水素感受性を比較したところ、対数期では差はなかったものの、定常期では Pyk1C121,174A 株のほうが過酸化水素に

感受性が高かった。この結果は、グルコース枯渇後の Tsa1-Pyk1 相互作用が酸化ストレス応答に重要である可能性を示している。そこで酸化ストレス負荷時の Pyk1 活性を測定したところ、Pyk1WT では活性が低下したが、Pyk1C121,174A 株及び Pyk1WT の TSA1 欠損株ではそのような変化は観察されなかった。以上の結



果から、『酸化ストレス負荷⇒Tsa1C48 が酸化⇒Pyk1C121, C174 依存的に Tsa1 と Pyk1 の相互作用増大⇒Pyk1 活性抑制⇒糖新生亢進⇒酸化ストレス応答に寄与』というモデルが考えられた。

本研究により、Prx が過酸化水素シグナルを受容し、解糖系と TCA 回路の中間地点に位置する Pyk1 の活性を調節することで糖代謝を制御すること、この制御が酸化ストレスおよび細胞増殖をコントロールするという Prx の新たな機能が示された。

#### 引用文献

Toshihiko Watanabe, Hayato Irokawa, Ayako Ogasawara, Kenta Iwai and Shusuke Kuge (2013) Requirement of peroxiredoxin on the stationary phase of yeast cell growth. The Journal of Toxicological Sciences vol.39, No,1.

色川隼人、三好道世、菅原大輔、岩井健太、久下周佐 (2013) ヒト癌細胞型ピルビン酸キナーゼ (PKM2) の過酸化水素に応答したレドックス状態変化の検出. 東北薬科大学研究誌, 60 号