

原 著

ヒト癌細胞型ピルビン酸キナーゼ (PKM2) の過酸化水素に应答した
レドックス状態変化の検出

色川 隼人, 三好 道世, 菅原 大輔, 岩井 健太, 久下 周佐*

Detection of H₂O₂-induced changes in redox status of tumor-type pyruvate kinase (PKM2)

Hayato IROKAWA, Michiyo MIYOSHI, Daisuke SUGAWARA, Kenta IWAI, and Shusuke KUGE*

(Received November 20, 2013)

Recent studies shed light on a crucial function of M2 isoform of mammalian pyruvate kinase (PKM2) on tumor cell growth. Pyruvate kinase activity of PKM2 was shown to be negatively regulated by growth factors or reactive oxygen species (ROS). The negative regulation of PKM2 enhances tumor cell growth. Despite biochemical and genetic evidences to indicate mechanism for the ROS-induced negative regulation of PKM2, an apparent oxidized form of PKM2, which is induced by cellular ROS such as H₂O₂, has not been identified so far. Thus, we aimed to identify oxidized PKM2 in cells in response to H₂O₂. To identify number of free cysteine thiols, we examined changes of molecular weight shift of PKM2, which is determined by the number of pegylated-maleimide molecule (MW 2,000) bound to PKM2 thiols. Our results suggested that one or two out of nine cysteine residues in PKM2 were oxidized in response to H₂O₂. Our system may be useful to determine changes in PKM2 redox status in cells in response to ROS-inducible environmental changes such as oxygen and nutrient availability.

Key words — pyruvate kinase, redox status, cysteine oxidation

緒 論

細胞は好氣的代謝の過程で活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) を発生する。ROS のレベルは、代謝に変動を及ぼす酸素濃度の変化やグルコース濃度の増減により、また、増殖因子の有無により変動する。細胞は ROS の毒性を軽減する抗酸化能を備えているが、この能力を超えた濃度の ROS は細胞に障害を与える一方、ROS は特定のタンパク質のシステイン残基の酸化を介してそのタンパク質の機能を制御することが明らかになってきた。^{1,2)}

ROS により制御されるタンパク質の一つとしてピルビン酸キナーゼ分子種 M2 (PKM2) が挙げられる。ピルビン酸キナーゼは、解糖系において最終反応である ADP とホスホエノールピルビン酸 (PEP) から ATP とピルビン酸を合成する反応を触媒する。哺乳動物ピルビン酸キナーゼの中で PKM2 は胎児や成人幹細胞に特異的に発現する一方、多くの癌細胞に発現し癌の増殖に重要な役割を持つ。³⁾ PKM2 はグルコースの代謝量に依存して増加するフルクトース-1,6-ビスリン酸 (FBP) に

よりアロステリック活性化されることは古くから明らかにされてきた現象であるが、^{4,5)} 最近の研究により、PKM2 のピルビン酸キナーゼ活性は、ROS⁶⁾ や増殖因子シグナル^{7,8)} に应答して抑制制御されることが明らかになった。興味深いことに、この制御機構を遮断すると癌細胞の増殖が低下することから、癌細胞の効率の良い増殖にはピルビン酸キナーゼ活性を低く抑えることが必要であることが示され、^{3,8)} トピックスとなっている。⁹⁾

これまでの報告では、ROS による PKM2 の制御機構はチオール酸化剤によって示された。すなわち、PKM2 の 358 番目のシステイン残基 (Cys358) がチオール酸化剤のジアミドにより酸化されると、ピルビン酸キナーゼ活性が抑制されるという現象である。⁶⁾ ここで用いられたジアミドは、システインのジスルフィド結合を非特異的に誘導する人工的な酸化剤であり、細胞内還元型グルタチオンを酸化するなど細胞内 ROS を間接的に上昇させる物質である。一方、細胞内に起因する酸化ストレス誘発因子は呼吸鎖や NADPH オキシダーゼに由来した ROS が主要分子である。¹⁾ また、ROS の中で、細胞内で最も高い濃度で存在するのは過酸化

水素である。そこで、過酸化水素による PKM2 の制御機構を明らかにする必要があると考えた。これまで我々は、出芽酵母の PKM2 ホモログであるピルビン酸キナーゼ Pyk1 の研究を行う過程で、Pyk1 の複数のシステイン残基が過酸化水素によるその活性制御に寄与することを示しつつある。そこで、PKM2 においても同様な制御機構がある可能性を考え PKM2 内のシステイン残基の酸化-還元 (レドックス) 制御機構の理解を目指した。本研究では過酸化水素によるヒト癌細胞の PKM2 の酸化状態を容易に検出する実験系の構築を行った。

実験材料および実験方法

1. 細胞培養と生存率の測定

H1299 (ヒト非小細胞肺癌細胞由来) は、ATCC より購入した。この細胞を 0.03% (w/v) L-glutamine, 0.075% (w/v) 炭酸水素ナトリウム, 10% (v/v) 非働化ウシ胎児血清 (BioWest) Penicillin-Streptomycin (GIBCO) (penicillin 100 units/mL, streptomycin 100 μ g/mL) を添加した D-MEM (日本製薬) 中で培養した。生存率は、96 穴の培養ディッシュ 1 穴あたりに 1,000 個の細胞を播種し一晩培養後に、最終濃度 10 mM 過酸化水素で 10 分間処理した後、培地一定時間後に細胞の生存率を AlamarBlue (コスモバイオ) を用いて定量した。

2. 培養細胞からのタンパク質抽出方法

培養ディッシュに付着した H1299 細胞を剥離後、 5×10^4 個/ml の濃度に懸濁し新しいディッシュで培養した。翌日、過酸化水素処理を行った後に細胞を氷冷した PBS で洗浄後、氷上で 12.5% トリクロロ酢酸 (TCA) 溶液で 30 分間処理した。スクレーパーを用いて細胞をディッシュより剥離し 1.5 mL のチューブに集め遠心し回収した後、アセトンで 3 回洗浄した。次に、Urea-SDS buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 8 M Urea (Invitrogen), 1% SDS, 100 mM NaCl) を加え、タンパク質濃度を定量し後に 50 mM ポリエチレングリコール化マレイミド誘導體 (以下 PEG-maleimide; 平均分子量 2000, SUNBRIGHT 日本油脂) を添加し 37°C で 30 分反応させた。PEG-maleimide を同時添加する場合、上記 Urea-SDS buffer に 5 mM PEG-maleimide を添加したものをを用いた。アルキル化したサンプルは、50 mM DTT を添加し電気泳動に供した。我々は、

これまでに分子量 5 K の PEG 化 maleimide (PEG-maleimide) を用いて、組換えタンパク質分子内のシステイン残基の酸化または還元型システイン残基の数を測定する研究を行ってきた。¹⁰⁾ しかし、この方法では電気泳動後のメンブレンへの転写効率が悪く、ウエスタンブロットティングを用いて細胞内のタンパク質を検出することはできなかった (データは未掲載)。そこで、今回は分子量 2 K の PEG-maleimide を用いた。

3. PKM2 のウエスタンブロットティングによる検出

ウエスタンブロットティング時のメンブレンへの転写を高めるために、ブロットティングバッファーに SDS およびメタノールを添加しウエット法を用いた。SDS-PAGE (Fig. 2A および 2B: 10% ポリアクリルアミド, それ以外は 8% ポリアクリルアミド) を用いて電気泳動分離したタンパク質は、Immobilon™-P (Millipore) メンブレン上に Criterion トランスブロットセル (BioRad) を用いてウエット法により転写した。2 L のブロットティング溶液 (25 mM Tris, 19.2 mM glycine, 0.1% SDS, 20% methanol) を用い、冷却しながら 30 V で一晩かけて転写した。5% スキムミルクでブロッッキングを行った後に、一次抗体として 5,000 倍希釈した anti-PKM2 抗体 (Sigma-Aldrich; SAB4200095) で反応させた。また、二次抗体として anti-rabbit IgG/HRP (Dako) を用いた。Immobilon™ Western Detection Reagents (Millipore) で 5 分浸し反応させた後に生じる化学発光を Versa doc imaging system model 5000 (Bio-Rad) を用いて検出した。

結 果

1. PKM2 酸化体検出方法の検討

前述したように、これまでの報告ではジアミドにより PKM2 の Cys358 が酸化されることが示された。⁶⁾ この研究では PKM2 のシステイン残基が酸化されたかどうかを検出する系として、SDS-PAGE 中の軽微な移動度の変化や、酸化型システイン残基をビオチン化マレイミド誘導體で特異的に修飾後アビジン結合ビーズを用いてプルダウンする方法が用いられた。しかし、この方法では PKM2 内に存在する 9 つのシステイン残基の中でいくつが酸化されたかを確認することはできない。そこで、本研究では分子量 2 K の PEG-maleimide を用いた解析を行った。

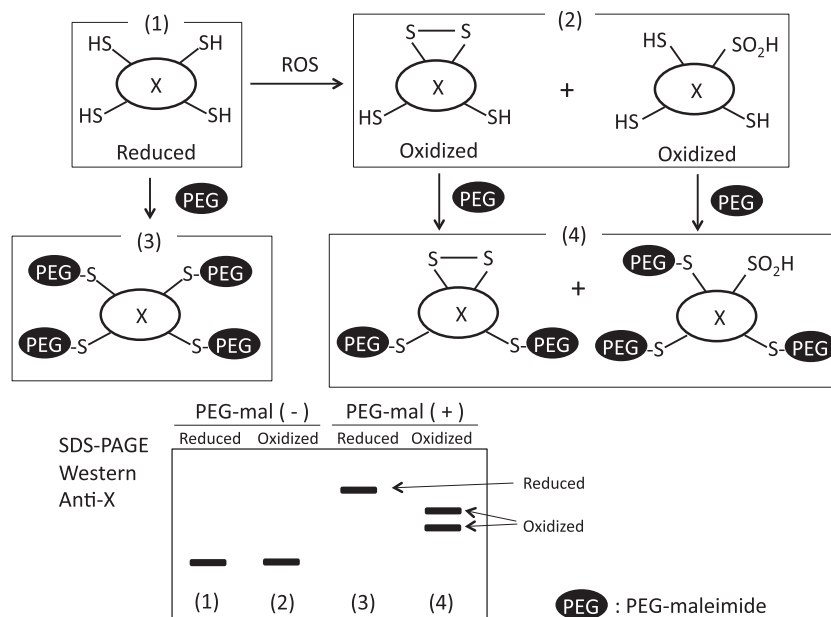


Fig. 1. Strategy for detection of redox status of PKM2 by using a pegylated-maleimide derivative and western blotting.

We performed western blotting analysis of PKM2 in pegylated cell lysate. We expected shift in protein mobility that is depended on the number of reduced cysteine residue by alkylating the sulfhydryl groups with PEG-maleimide (MW 2 K; PEG-mal). Protein X (1) with four reduced Cys that is reacted with four PEG-mals (3). Protein X with one disulfide bond (2) can be reacted with two PEG-mals (4). Differences in the mobility of these X proteins in SDS-PAGE are expected to be dependent on the number of PEG-mal molecules that are covalently bounded to X.

PEG-maleimide 修飾法の原理を Fig. 1 に示した。PEG-maleimide は還元型のシステイン残基 (-SH) には結合できるが、過酸化水素などによりジスルフィド結合 (-S-S-) やスルフィン酸 (-SOOH) に酸化されたシステイン残基には結合することができない。Fig. 1 の X タンパク質の 4 つのシステイン残基のすべてが還元型 (Cys-SH) で存在すると、PEG-maleimide が 4 分子付加し分子量が 8 K 程度増加し、SDS-PAGE で分離したときに移動度が低下する [(1) と (3) を比較]。一方、X タンパク質内にジスルフィド結合 (-S-S-) が一つ存在する場合、PEG-maleimide は 2 分子結合するため、前述した還元型に比べて 4 K 分の移動度の違いが、スルフィン酸化システイン残基が一つ存在すれば 2 K 分の移動度の明確な違いが期待される (4)。PKM2 の分子量は 60 K であるため、PKM2 内の 9 つのシステイン残基が還元型 (Cys-SH) で存在すると、PEG-maleimide が 9 分子付加し分子量が 18 K 増加し SDS-PAGE で分離したときに 78 K 以上の移動度が期待される。このように移動度の明確な違いにより酸化型システイン残基の数を予想することができると考えた。

次に、細胞の処理とタンパク質の抽出法を検討した。Anastasiou⁶⁾ らによるジアミド処理による

PKM2 の酸化を検出した実験では、細胞を界面活性剤で溶解した後、タンパク質をアルキル化し酸化型 PKM2 を検出する方法がとられた。この方法では、細胞溶解液内でチオレドキシニン等のジスルフィド還元酵素による還元や、グルタチオン等のシステイン残基がタンパク質内のシステイン残基とジスルフィドを形成する危険性が考えられた。そこで、タンパク質システイン残基の酸化はチオレートアニオン (Cys-S-) 化により誘導されることから、これをブロックするため 10% トリクロロ酢酸を細胞に添加し強酸性下で細胞を溶解した (TCA 処理)。また、TCA 処理は細胞内の酸化還元酵素、タンパク質分解酵素の失活も同時に期待される。細胞を溶解して SDS-PAGE で分離しウエスタンブロットティングで検出すると PKM2 は 63 K 付近に泳動されたが (Fig. 2A 左)、TCA 処理後の抽出液を尿素、SDS を含む溶解液に溶解した後に PEG-maleimide 処理をした場合、110 K 付近に泳動された (Fig. 2A 右)。細胞内 PKM2 は通常の培養時に還元型で存在することが示されているため、⁶⁾ この方法で観察された 110 K のバンドが還元型 PKM2 であると考えられた。一方、PEG-maleimide 処理まで時間がかかった場合に一部移動度の低い 100 K 付近のバンドが出現するなど、安定した結果

が得られなかった (Fig. 2B 左). このバンドは, アセトンによる洗浄と PEG-maleimide 処理を窒素を充満した無酸素ボックス内で実験を行うと消失した (Fig. 2B 右) ことから, PKM2 のシステイン残基がサンプル調製時に空気酸化された可能性を示唆している.

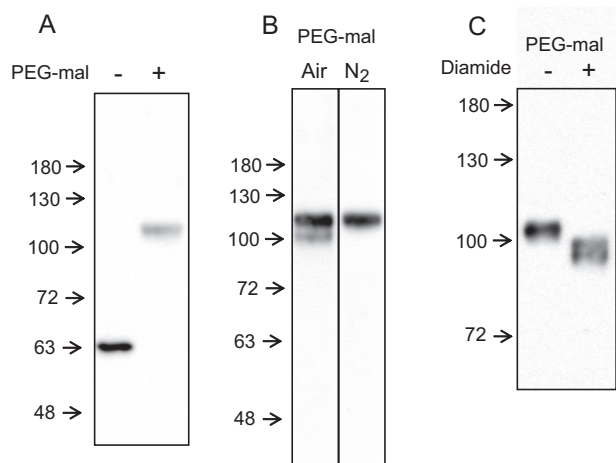


Fig. 2. Detection of mobility shift in PKM2 by treatment of pegylated maleimide.

A. PKM2 (a reduced form) in H1299 cell lysate is detected as 63 K Dalton (left), whereas pegylated PKM2 is 110 K Dalton band (right). B. PKM2 was partially oxidized (100 K Dalton) during the sample preparation under air (Air), however the oxidation of PKM2 was prevented if sample preparation was performed in oxygen-free condition under nitrogen (N_2). C. PKM2 Cys is oxidized in cells treated with thiol-oxidizing reagent diamide (0.5 mM for 5 min, "+"). The artificial oxidation is prevented by immediate alkylation after neutralization (the acetone wash; left lane). Positions of molecular weight standard are indicated as K Dalton with arrows on the left of the western blotting image.

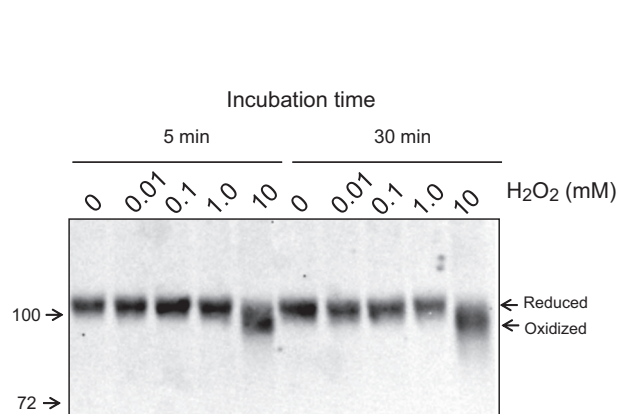


Fig. 3. Oxidation of PKM2 in cells in response to H_2O_2 .

HT1299 cells were exposed without (0) or with series of concentration of H_2O_2 (0, 0.01, 0.1, 1.0, 10 mM) for 5 and 30 min. Pegylated PKM2 was detected by western blotting. Positions of molecular weight standard are indicated as K Dalton with arrows on the left of the western blotting image.

一方, TCA 処理後のタンパク質溶解時に PEG-maleimide を同時に添加した結果, 無酸素ボックス内の操作と同様な効果があることが明らかになった (Fig. 2C 左). そこで, この方法を用いて, 先行研究⁶⁾と同様にジアミドによる PKM2 の酸化体の検出を試みた. 最終濃度で 0.5 mM のジアミドを細胞培養液に添加し 5 分間処理した結果, 還元型のバンドより移動度が高い 100 K 付近に 2 本のバンドが出現し PKM2 のシステイン残基が酸化されることが明らかになった (Fig. 2C 右). 先行研究ではジアミドにより PKM2 の Cys358 が酸化されることが示されたが,⁶⁾ この結果は酸化 PKM2 の約半量は 2 分子のシステイン残基が酸化されている可能性を示唆している.

2. 過酸化水素処理濃度および時間の影響

PKM2 のシステイン残基の酸化状態を検出する実験系が構築できたため, これまで明確に示されていなかった過酸化水素による PKM2 の酸化状態の変化を検討した. 培養液に最終濃度で 0.01 mM ~ 10 mM の過酸化水素を添加し 5 分後および 30 分後に TCA 処理を行い酸化型 PKM2 の検出を行った. Fig. 3 に示すように 10 mM の過酸化水素の処理で PKM2 の酸化型を検出することができた. 次に, 10 mM 過酸化水素による PKM2 の経時的な酸化状態の変化を解析したところ, 60 分, 120 分と処理時間を延長すると処理時間依存的に酸化され

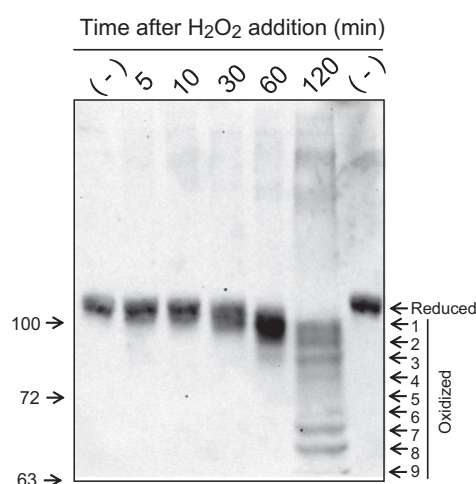


Fig. 4. Time-dependent oxidation of PKM2 in cells in response to 10 mM H_2O_2 .

H1299 cells were exposed without (-) or with 10 mM H_2O_2 for 5, 10, 30, 60 and 120 min. Numbers with arrows on the right side of the western blotting indicate positions of possible oxidized Cys residues. Pegylated PKM2 was detected by western blotting. Positions of molecular weight standard are indicated as K Dalton with arrows on the left of the western blotting image.

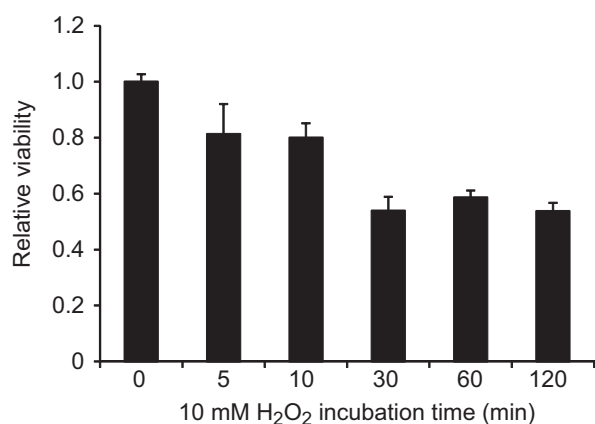


Fig. 5. Effect of 10 mM H₂O₂ on viability of H1299 cells.

Cells were incubated with 10 mM H₂O₂ for the indicated time. Cell viability was observed in a fresh medium without H₂O₂ using AlamerBlue. Error bars indicate \pm standard error of the mean ($n=3$).

るシステイン残基の数が増えることが明らかになった (Fig. 4). 120分では還元型 PKM2 は消失し9本の酸化型と思われるバンドがラダー状に検出された. この結果は, 9個のシステイン残基中の酸化型の数を見積もることが可能な実験系であることを示唆している.

ここで用いた 10 mM の過酸化水素は細胞に障害を与える可能性がある濃度であるため, 細胞が生存している状態かどうかを検討した. 10 mM の過酸化水素で5分または10分の処理で細胞の生存率は80%程度, 30~120分で50%程度であった (Fig. 5). そこで, 生存率が高めの条件 (10 mM の過酸化水素 10分) で酸化された PKM2 が再還元されるか検討した. その結果, 酸化され移動度が早くなった PKM2 のバンドは, 培地を交換して過酸化水素を除いて経時的に観察した結果, 60分で完全に還元型に戻った (Fig. 6). この結果は 10 mM の過酸化水素 10分で酸化された PKM は可逆的に還元されることを示唆している.

考 察

本研究で, PKM2 の9個あるシステイン残基の中でマレイミドに反応しなくなった残基, すなわち過酸化水素やジアミドで酸化された残基の数を見積もる方法を確立できた. 分子量 2 K の PEG 化マレイミド誘導体を用い, ウェット法による転写を行うことでウエスタンブロットティングによる PKM2 の酸化状態の検出を可能とした. 細胞内の

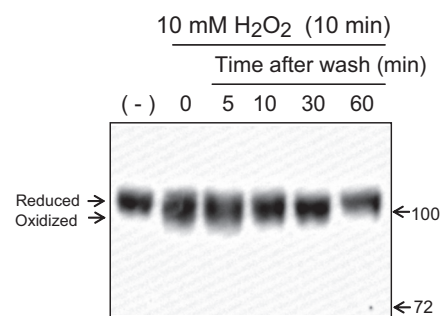


Fig. 6. Reversibility of oxidation of PKM2.

Cells were treated with 10 mM H₂O₂ for 10 min (0). Cells were further incubated for indicated time (5, 10, 30 and 60 min) under fresh medium without H₂O₂. Pegylated PKM2 was detected by western blotting. Positions of molecular weight standard are indicated as K Dalton with arrows on the right of the western blotting image.

他のタンパク質においても同様にシステイン残基の酸化還元状態 (レドックス状態) を検出する系として有効である可能性がある. Anastasiou ら⁶⁾ の報告では, ジアミド処理で PKM2 が酸化されることは明らかに示されていたが, 酸化されたシステイン残基の数を見積もることはできていなかった. 本研究は, ジアミドは PKM2 の1つまたは2つのシステイン残基を酸化する可能性を示唆した. SDS-PAGE を DTT 未添加で行った場合も PKM2 の2量体と考えられる分子量のバンドは検出されなかった (未掲載) ことから, ジアミドは分子内の2つのシステイン残基を介したジスルフィド結合形成を誘導した可能性も考えられた.

また, 本研究では, 初めて PKM2 システイン残基が過酸化水素により酸化されることを示した. 細胞を 10 mM の過酸化水素で処理すると PKM2 はブロードなバンドとして検出されたが, 5分でシステイン残基1残基分の移動度の, 30分で2残基分の移動度が上昇した分子も観察された. 120分ではラダー状になり, 1個~9個のシステイン残基が酸化された PKM2 分子の検出が可能であることを示した. また, 過酸化水素 10分処理後に培地を交換し過酸化水素を除いた場合, 60分で完全に還元されたことから 10 mM 過酸化水素の処理による PKM2 の酸化には可逆性があることが示唆された. ここで観察された複数の酸化システイン残基の間でジスルフィド結合を形成しているかどうかは, 還元剤処理後にアルキル化するなどの実験を加えることで予想することが可能と考えられる. この

方法を用いることで癌細胞が酸素, 血清や糖の濃度などの環境の変化に応答して, ROS 依存的に PKM2 が酸化されるかを検討することが可能と考えられる.

REFERENCES

- 1) Giorgio M., Trinei M., Migliaccio E., Pelicci P. G., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 722–728 (2007).
- 2) Woolley J. F., Corcoran A., Groeger G., Landry W. D., Cotter T. G., *Antioxid. Redox Signal.*, **19**, 1815–1827 (2013).
- 3) Christofk H. R., Vander Heiden M. G., Harris M. H., Ramanathan A., Gerszten R. E., Wei R., Fleming M. D., Schreiber S. L., Cantley L. C., *Nature*, **452**, 230–233 (2008).
- 4) Hess B., Haeckel R., Brand K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **24**, 824–831 (1966).
- 5) Jurica M. S., Mesecar A., Heath P. J., Shi W., Nowak T., Stoddard B. L., *Structure*, **6**, 195–210 (1998).
- 6) Anastasiou D., Poulogiannis G., Asara J. M., Boxer M. B., Jiang J. K., Shen M., Bellinger G., Sasaki A. T., Locasale J. W., Auld D. S., Thomas C. J., Vander Heiden M. G., Cantley L. C., *Science*, **334**, 1278–1283 (2011).
- 7) Christofk H. R., Vander Heiden M. G., Wu N., Asara J. M., Cantley L. C., *Nature*, **452**, 181–186 (2008).
- 8) Hitosugi T., Kang S., Vander Heiden M. G., Chung T. W., Elf S., Lythgoe K., Dong S., Lonial S., Wang X., Chen G. Z., Xie J., Gu T. L., Polakiewicz R. D., Roesel J. L., Boggon T. J., Khuri F. R., Gilliland D. G., Cantley L. C., Kaufman J., Chen J., *Sci. Signal.*, **2**, ra73 (2009).
- 9) Tamada M., Suematsu M., Saya H., *Clin. Cancer Res.*, **18**, 5554–5561 (2012).
- 10) Okazaki S., Tachibana T., Naganuma A., Mano N., Kuge S., *Mol. Cell*, **27**, 675–688 (2007).