

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460364

研究課題名(和文) nucleoredoxinによるグルコース代謝経路の制御

研究課題名(英文) Regulation of glucose metabolism pathway by nucleoredoxin

研究代表者

船戸 洋佑 (Funato, Yosuke)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：60505775

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Nucleoredoxin (NRX) はチオレドキシンファミリーに属する蛋白質である。pull-down法によりNRXの結合因子を網羅的に探索したところ、新たなNRX結合蛋白質として、解糖系の酵素PFK1を同定した。

NRXによるグルコース代謝制御の全貌を明らかにするため、野生型とNRX欠損MEFを用いたメタボローム解析を行った。乳酸などPFK1の下流の代謝物量が低下し、一方でPFK1の上流で分岐するペントースリン酸経路(PPP)の代謝物であるリブロース5リン酸は増加傾向にあった。これらの実験結果より、NRXがPFK1の制御を介してペントースリン酸経路とのバランスをとっていることが明確となった。

研究成果の概要(英文)：Nucleoredoxin (NRX) is a Thioredoxin family protein. We searched for novel binding protein for NRX, and identified glycolysis enzyme PFK1 as a major one.

To clarify the regulation of glycolytic pathway by NRX, we performed metabolome analyses with wild type and NRX-deficient MEF cells. We found that the metabolites produced downstream of PFK1, such as lactate, decreased, and the products of pentose phosphate pathway, which diverges at the upstream of PFK1, increased. Thus, these results strengthen the notion that NRX regulates the balance between glycolytic pathway and the pentose phosphate pathway through PFK1.

研究分野：細胞生物学

キーワード：nucleoredoxin 代謝 グルコース

## 1. 研究開始当初の背景

グルコースから始まる代謝は生命活動を維持するために必須であり、エネルギーや各種生体物質の産生に寄与している。ホスホフルクトキナーゼ 1 (PFK1) は解糖系における不可逆的な反応を司る酵素であり、その酵素活性が抑制されると、上流で解糖系から分岐するペントースリン酸経路 (PPP) を亢進させると知られている。PPP の亢進は核酸や抗酸化物質 NADPH の産生を促進し、がん細胞の増殖に利すると考えられている。従って、PFK1 の活性調節機構を解明することは、グルコースの代謝制御機構の理解に貢献するだけでなく、がん治療における新たなターゲットの創出へと繋がる可能性がある。

Nucleoredoxin (NRX) は還元酵素チオレドキシンと相同性の高いドメインを有する蛋白質であり、NRX も *in vitro* においてインスリンのジスルフィド (S-S) 結合を還元する活性を有している。私は Wnt シグナルの伝達に必須のアダプター分子 Dishevelled (Dvl) の結合因子として NRX を同定し、以降 NRX の研究に携わってきた。その過程で、酸化ストレスにさらされると NRX が分子内 S-S 結合を形成することで Dvl から乖離し、結果として Wnt シグナル伝達をレドックス依存的に抑制していること (Funato et al., *Nat. Cell Biol.* 2006) や、個体レベルでは NRX ノックアウトマウスが生後すぐに致死となり、骨や心臓の形成に必要であること (Funato et al., *Curr. Biol.* 2010) などを見つけた。

私はさらに NRX の新たな機能を明らかにするべく、GST を融合させた NRX の組換え精製蛋白質を用いて pull-down 法により NRX の結合因子を網羅的に探索した。そして質量分析の結果、新たな NRX 結合蛋白質として PFK1 を同定した。実際に内在性の NRX と PFK1 が共沈し、また両者が直接結合することを確認している。さらに、NRX ノックアウトマウスより樹立した NRX 欠損 MEF 細胞では野生型 MEF 細胞と比較して PFK1 の酵素活性が弱まっており、併せて PPP によって産生される抗酸化物質 NADPH の量が顕著に増大していた。そして、NRX 欠損 MEF 細胞は野生型 MEF 細胞に比べて活性酸素処理後の細

胞死の割合が低下していた。これらの結果は NRX が新たな PFK1 およびグルコース代謝経路の調節因子であることを示しており、NRX が PPP を負に制御することで、がん細胞の増殖制御などに寄与している可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究は上述の予備的実験結果に立脚して、NRX によるグルコース代謝経路の制御機構を明らかにすることを目的と定めた。NRX 欠損 MEF 細胞を用いた実験から、NRX が PFK1 の活性を維持し、解糖系から分岐する PPP を負に制御していることを示唆する結果を得ている。しかし、その詳細な分子機序や、代謝系全般に与える影響などについてはわかっていない。NRX が PFK1 の翻訳後修飾を制御し、活性を調節するその仕組みを生化学的な手法などから解明するとともに、メタボローム解析などを通じて、NRX 欠損による代謝系全般への影響を明らかにすることを目的とした実験を行った。

## 3. 研究の方法

NRX による PFK1 の活性維持機構について、細胞溶解液を用いた *in vitro* での PFK1 の活性測定で NRX 欠損 MEF 細胞における活性が減弱していたことから、NRX 欠損 MEF 細胞では PFK1 の翻訳後修飾が変化しているものと考えられる。NRX の分子機能と直結する酸化について、S-S 結合の検出に汎用される非還元型 SDS-PAGE で調べた。また PFK1 の組換え精製タンパク質の酵素活性についても、還元剤ジチオスレイトール (DTT) や NRX の有無で比較検討を行った。

併せて、質量分析法を用いたメタボローム解析によって、NRX による PFK1 活性の制御が代謝系全般に与えている役割についても調べた。

酸化ストレスに対する耐性獲得については、ゲノム DNA を電気泳動し、DNA 断片化の度合いを調べたほか、コメットアッセイ法により DNA 損傷の割合についても評価した。

## 4. 研究成果

NRX による PFK1 の活性維持機構について、

特に NRX が還元活性を示し、また PFK1 の酵素活性が酸化還元によって変化することが知られていたため、PFK1 の酸化について中心的に調べた。まず確認実験として、PFK1 の組換え精製タンパク質の酵素活性を DTT の有無で比較したところ、DTT の存在下で高い活性を示しており、既報どおり PFK1 の酵素活性がレドックス依存的であることが確かめられた。次に酸化、あるいは還元、それぞれの状態の NRX の組換え精製タンパク質との共存下で比較したところ、還元型の NRX と共存下でのみ、PFK1 の酵素活性が上昇することが明らかとなった。これらの実験結果より、NRX は PFK1 を還元することで、その酵素活性を高めていると考えられた。実際にどのアミノ酸残基が酸化されているか調べるべく非還元型 SDS-PAGE を行ったが、PFK1 の泳動度に明確な差は見受けられなかった。このため、PFK1 の酸化修飾は非還元型 SDS-PAGE で泳動度が変化する、分子内あるいは分子間ジスルフィド結合とは異なる様式である可能性が示唆された。

また、NRX による PFK1 制御の代謝系全般に与える影響を調べるため、野生型および NRX 欠損 MEF 細胞を用いたメタボローム解析を行っている。それぞれ2つの細胞株を用い、一貫した傾向が見受けられるものを探索した。その結果、乳酸など、いくつかの代謝物の量が NRX 欠損細胞で有意に低下していた。乳酸は NRX によって活性が制御される PFK1 の下流に位置しており、NRX が PFK1 の活性を正に制御しているという、これまでの結論と合致するものであった。また同様に PFK1 の下流で産生されるピルビン酸やクエン酸などの代謝物も NRX 欠損細胞で低下傾向にあった。一方で、PFK1 の上流で分岐する PPP の代謝物であるリブローズ5リン酸の量は増加傾向にあった。これらの実験結果により、NRX が PFK1 の働きを制御しており、NRX の欠損はペントースリン酸経路へのシフトを引き起こすというこれまでの結論がより強固なものとなった。

実際、ペントースリン酸経路活性化の意義の一つと考えられている、活性酸素種に対する耐性獲得についてより詳細に調べたところ、

過酸化水素で処理したゲノム DNA の断片化の度合いは野生型 MEF 細胞では過酸化水素処理後 9 時間から DNA の断片化が顕著に観察された一方で、NRX 欠損 MEF 細胞では過酸化水素処理後 9 時間の段階では断片化は見られず、また過酸化水素処理後 12 時間後の DNA 断片化の度合いも野生型 MEF 細胞と比べて有意に抑えられていた。また、過酸化水素処理後 9 時間の細胞を用いたコメットアッセイ法でも、NRX 欠損 MEF 細胞ではテイルを有する細胞の割合や、テイルの長さが野生型 MEF 細胞と比べて短くなっていた。つまり、NRX の欠損は PFK の活性低下と PPP の亢進を介して、活性酸素種に対する抵抗性を細胞に付与していると考えられた。

またメタボローム解析の結果からは、PPP の他にも NRX 欠損細胞ではグリシンの量が有意に増えており、一方でリン酸化セリンの量が低下していることが判明した。この結果は NRX 欠損 MEF ではセリン代謝経路の働きが活性化していることを示唆するものであり、NRX が PFK 以外のターゲット分子に対しても影響を及ぼし、代謝を変容させている可能性を想起させるものと考えられた。

## 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計13件)

Yoshida, A., Funato, Y., and Miki, H.  
Phosphatase of regenerating liver maintains cellular magnesium homeostasis.  
*Biochem. J.* 475, 1129-1139 (2018)

#Funato, Y., Furutani, K., Kurachi, Y., and #Miki, H.(#: co-correspondence)  
CNNM proteins are Na<sup>+</sup>/Mg<sup>2+</sup> exchangers playing a central role in transepithelial Mg<sup>2+</sup> (re)absorption.  
*J. Physiol.* 596, 743-746 (2018)

Matsui, Y., Funato, Y., Imamura, H., Miki, H., Mizukami, S., and Kikuchi, K.  
Visualization of long-term Mg<sup>2+</sup> dynamics in apoptotic cells using a novel targetable fluorescent probe.  
*Chem. Sci.* 8, 8255-8264 (2017)

Funato, Y., Yamazaki, D., and Miki, H.  
Renal function of cyclin M2 Mg<sup>2+</sup> transporter

maintains blood pressure.  
*J. Hypertens.* 35, 585-592 (2017)

#Gulerez, I., #**Funato, Y.**, #Wu, H., Yang, M., Kozlov, G., Miki, H., and Gehring, K. (#: equal contribution)  
Phosphocysteine in the PRL-CNNM pathway mediates magnesium homeostasis.  
*EMBO Rep.* 17, 1890-1900 (2016)

Ishii, T., #Funato, Y., Hashizume, O., Yamazaki, D., Hirata, Y., Nishiwaki, K., Kono, N., Arai, H., and #Miki, H. (#: co-correspondence)  
Mg<sup>2+</sup> Extrusion from Intestinal Epithelia by CNNM Proteins Is Essential for Gonadogenesis via AMPK-TORC1 Signaling in *Caenorhabditis elegans*.  
*PLoS Genet.* 12, e1006276 (2016)

Yamazaki, D., **Funato, Y.**, Miyata, H., Ikawa, M., and Miki, H.  
Complementary role of CNNM2 in sperm motility and Ca(2+) influx during capacitation.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 474, 441-446 (2016)

Yamazaki, D., Miyata, H., **Funato, Y.**, Fujihara, Y., Ikawa, M., and Miki, H.  
Mg<sup>2+</sup> transporter CNNM4 regulates sperm Ca<sup>2+</sup> homeostasis and is essential for reproduction.  
*J. Cell Sci.* 129, 1940-1949 (2016)

Hirata, Y., **Funato, Y.**, and Miki, H.  
Basolateral sorting of the Mg(2+) transporter CNNM4 requires interaction with AP-1A and AP-1B.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 455, 184-189 (2014)

**Funato, Y.**, Yamazaki, D., Mizukami, S., Du, L., Kikuchi, K., and Miki, H.  
Membrane protein CNNM4-dependent Mg<sup>2+</sup> efflux suppresses tumor progression.  
*J. Clin. Invest.* 124, 5398-5410 (2014)

Yugi, K., Kubota, H., Toyoshima, Y., Noguchi, R., Kawata, K., Komori, Y., Uda, S., Kunida, K., Tomizawa, Y., **Funato, Y.**, Miki, H., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Kashikura, K., Endo, K., Ikeda, K., Soga, T., and Kuroda, S.  
Reconstruction of insulin signal flow from phosphoproteome and metabolome data.  
*Cell Rep.* 8, 1171-1183 (2014)

Hirata, Y., **Funato, Y.**, Takano, Y., and Miki, H.  
Mg<sup>2+</sup>-dependent interactions of ATP with the cystathionine-β-synthase (CBS) domains of a magnesium transporter.

*J. Biol. Chem.* 289, 14731-14739 (2014)

**Funato, Y.** and Miki, H.  
Reversible oxidation of PRL family protein-tyrosine phosphatases.  
*Methods* 65, 184-189 (2014)

〔学会発表〕(計9件)

船戸 洋佑、橋爪 脩、山崎 大輔、三木 裕明  
PRL による環境 pH 応答性の変化  
第2回酸素生物学・ダイニングコード合同若手会議、2018年2月、仙台

船戸 洋佑、山崎 大輔、三木 裕明  
PRL による酸性微小環境への適応  
2017年度生命科学系学会合同年次大会、2017年12月、神戸

Funato, Y., Yamazaki, D., and Miki, H.  
CNNM magnesium transporters in health and disease.  
IUPS2017, Aug 2017, Rio de Janeiro, Brasil.

船戸 洋佑、山崎 大輔、三木 裕明  
がん悪性化のドライバー分子 PRL による上皮細胞の浸潤促進  
日本生化学会第64回近畿支部例会、2017年5月、大阪

船戸 洋佑、山崎 大輔、三木 裕明  
PRL による細胞競合を利用したがん浸潤促進機構  
第6回細胞競合コロキウム、2017年3月、札幌

船戸 洋佑、山崎 大輔、三木 裕明  
PRL は細胞競合の悪用により上皮細胞の浸潤を促す  
第39回日本分子生物学会年会、2016年12月、横浜

船戸 洋佑、山崎 大輔、三木 裕明  
PRL による細胞内 Mg<sup>2+</sup>量の調節とその破綻によるがん悪性化  
第89回日本生化学会大会、2016年9月、仙台

船戸 洋佑、山崎 大輔、三木 裕明  
PRL による Mg<sup>2+</sup>排出蛋白質 CNNM4 の阻害とがん悪性化  
第1回酸素生物学・ダイニングコード合同若手会議、2016年1月、千葉

船戸 洋佑、山崎 大輔、三木 裕明  
CNNM4 による Mg<sup>2+</sup>排出は細胞のエネルギー状態を制御することでがん悪性化を防ぐ  
BMB2015、2015年12月、神戸

Funato, Y., Yamazaki, D., and Miki, H.  
Mg<sup>2+</sup>-efflux by MagEx and its suppression of  
tumor progression  
第 11 回プロテインホスファターゼ国際カン  
ファレンス、2014 年 11 月、仙台

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biken.osaka-u.ac.jp/lab/cellreg/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

船戸 洋佑 (FUNATO, Yosuke)  
大阪大学・微生物病研究所・助教  
研究者番号: 60505775

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし

### (4) 研究協力者

該当なし